



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Wagner Luis de Carvalho Bernardo

Biossíntese (*Green Synthesis*): caracterização e ação antimicrobiana do extrato e das nanopartículas de prata (AgNPs) da semente, flor e folha de *Syzygium cumini*: estudo *in vitro*: ação antibiofilme e citotóxica da folha de *S. cumini* e sua AgNP

Araraquara

2020



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Wagner Luis de Carvalho Bernardo

Biossíntese (*Green Synthesis*): caracterização e ação antimicrobiana do extrato e das nanopartículas de prata (AgNPs) da semente, flor e folha de *Syzygium cumini*: estudo *in vitro*: ação antibiofilme e citotóxica da folha de *S. cumini* e sua AgNP

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista - Unesp, Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr, para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Biociências, Biomateriais e Ciências Forenses.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

Araraquara

2020

Bernardo, Wagner Luis de Carvalho

Biossíntese (Green Synthesis): caracterização do extrato e das nanopartículas de prata (AgNPs) da semente, flor e folha de *Syzygium cumini*: estudo in vitro: ação antibiofilme e citotóxica da folha de *S. cumini* e sua AgNP / Wagner Luis de Carvalho Bernardo-- Araraquara: [s.n.], 2020

80 f.; 30 cm.

Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

1. Nanopartículas metálicas 2. Biofilmes 3. Anti-infecciosos I. Título

Wagner Luis de Carvalho Bernardo

Biossíntese (*Green Synthesis*): caracterização e ação antimicrobiana do extrato e das nanopartículas de prata (AgNPs) da semente, flor e folha de *Syzygium cumini*: estudo *in vitro*: ação antibiofilme e citotóxica da folha de *S. cumini* e sua AgNP

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de doutor em Odontologia

Presidente e orientador: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo

Prof. Dr. Luiz Geraldo Vaz

Prof. Dr. Fernando Cruz Moraes

Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara 27 de março de 2020.

DADOS CURRICULARES

Wagner Luis de Carvalho Bernardo

Dados pessoais

Nascimento 05/06/1974 - Caçapava/SP - Brasil

CPF 178.783.898-61

Formação acadêmica/titulação

- | | |
|-------------|--|
| | Doutoramento em Odontologia, na Área de Biociências, Biomateriais e Ciências Forenses.
Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, Brasil
Título: Biossíntese (<i>Green Synthesis</i>) e caracterização e ação antimicrobiana do extrato e das nanopartículas de prata (AgNPs) da semente, flor e folha de <i>Syzygium cumini</i> . Estudo <i>in vitro</i> da ação antibiofilme e citotóxica da folha de <i>S. cumini</i> e sua AgNP
Orientadora: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidório |
| 2015 - 2020 | |
| | Mestrado em Biologia Patologia Buco Dental.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
Título: Polimorfismo Genético de Linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i> Resistentes a Antibióticos, Obtidos na Clínica Odontológica, Ano de obtenção: 2002
Orientador: José Francisco Höfling
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior |
| 2000 - 2002 | |
| | Graduação em ODONTOLOGIA.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil |
| 1996 - 1999 | |
| 2000 - 2000 | Aperfeiçoamento em Extensão em Microbiologia Prática e Aplicada.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil |
| 2000 - 2000 | Aperfeiçoamento em Caracterização Molecular de Bactérias.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil |
| 1999 - 1999 | Aperfeiçoamento em Dentística Estética e Restauradora.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil |
| 1998 - 1998 | Aperfeiçoamento em Procedimentos Clínicos Integrados.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil |
| 1997 - 1997 | Aperfeiçoamento em Clínica Integrada.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil |

Atuação profissional

Unidade de Ensino Superior Ingá - UNINGÁ

Vínculo institucional

2001 - 2004	Vínculo: Professor Assistente, Enquadramento funcional: Professor, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva
-------------	---

Atividades

09/2001 -
06/2004 Graduação: Odontologia, Fisioterapia e Enfermagem

Disciplinas ministradas:

Imunologia, Microbiologia, Patologia, Biossegurança,.

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico

1. Bernardo W L C, Silva J J D, Höfling J F, Rosa E A R, Boriollo M F G. Dynamics of the seasonal airborne propagation of *Staphylococcus aureus* in academic dental clinics. J Appl Oral Sci. 2018, Apr 5;26.
2. Boriollo M F G, Rosa E A R, Bernardo, W L C, Spolidorio, D M P, GONÇALVES, R B, HÖFLING J F. Multilocus enzyme electrophoresis typing of *Candida albicans* populations isolated from healthy children according to socioeconomic background. Revista Brasileira de Epidemiologia. 2005, v.8, p.51 - 66.
3. Bernardo W L C, Boriollo M F G, Gonçalves R B, Höfling J F. *Staphylococcus aureus* ampicillin-resistant from the odontological clinic environment. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2005, v.47, p.19 - 24.
4. Spolidorio D M P, Guimaraes M S, Zuanon A C C, Bernardo W L C, Campos J A D B. Atividade de cárie na primeira infância: fatalidade ou transmissibilidade?. Ciência Odontológica Brasileira. 2004, v.7, p.45 – 51.
5. Boriollo M F G, Rosa E A R, Bernardo W L C, Gonçalves R B, Höfling, J F. Electrophoretic protein patterns and numerical analysis of *Candida albicans* from the oral cavities of healthy children. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2003, v.45, p.249 - 57.
6. Rosa E A R, Rosa R T, Boriollo M F G, Bernardo W L C, Höfling J F. Oral *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* differentiation by multilocus enzyme electrophoresis and sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis.. Revista Argentina de Microbiología. 2003, v.35, p.24 - 8.
7. Spolidorio D M P, Spolidorio L C, Barbeiro R H, Hofling J F, Bernardo W L C, Pavan S. Avaliação quantitativa de *Streptococcus* grupo mutans e *Candida* sp. e fatores salivares na cavidade bucal de pacientes submetidos a radioterapia. Pesquisa Odontológica Brasileira. 2001, v.15, p.354 - 58.

À DEUS

Coloquei em suas Mãos todas as minhas dificuldades.... e comecei a orar:

- Ajoelhei e pedi inteligência... **ELE** me deu Força de Vontade.
- Ajoelhei e pensei em desistir.... **ELE** me deu Perseverança
- Ajoelhei novamente e pedi sorte.... **ELE** mandou Oportunidades
- Ajoelhei e perguntei qual era meu Dom.... **ELE** me tornou Cirurgião-Dentista
- Ajoelhei e pedi um presente **ELE** me tornou um Pesquisador
- Ajoelhei e pedi uma família.... **ELE** me deu a Minha

O que mais posso querer nessa vida..... **MEU MUITO OBRIGADO SENHOR!!!**

À minha ORIENTADORA

Um dia escutei, há muitos anos, do meu orientador José Francisco Höfling:

- O Orientador tem que ter um agradecimento em especial em uma página sozinho!

Acho que realmente merece e com razão, não só com uma página, mas em todas, porque independentemente de qualquer coisa, sem seu consentimento nada disso teria acontecido. Por isso eu dedico essa tese a Sra. minha amiga e orientadora **profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidório** por ser meu anjo na Terra. Pessoa de qualidades infinitas, só quem teve, tem e terá o privilégio de acompanhá-la entenderá o que eu sinto, por isso desejo a você e sua linda família as maiores realizações e sorte nessa vida. Devo tudo que tenho hoje às oportunidades que você me proporcionou na minha jornada acadêmica e profissional. Lembro do primeiro dia de aula quando comecei admirá-la (há 25 anos atrás) e essa admiração só aumentou após todos esses anos. O meu mais sincero

MUITO OBRIGADO.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao irmão de coração e amigo especial **prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo** por pelos anos e horas que passamos estudando e rindo na pós-graduação e agora, pois sua ajuda foi primordial para a realização dessa pesquisa. Deixando seus afazeres pessoais e de trabalho para me acompanhar até aos finais de semana. Como posso descrever como você foi especial nessa jornada. A sua inteligência é singular e o coração é um dos maiores que eu já vi em toda minha vida, me ensinando que, a todo momento, o mais importante é **PENSAR**. Você é uma estrela que brilha e ilumina a todos em sua volta. Você foi com certeza meu coorientador nesse trabalho. Meu **MUITO MUITO OBRIGADO**

Ao amigo de infância e **prof. Dr. Fernando Cruz Moraes** por ter ajudado e contribuído com seu vasto conhecimento em Química e com as análises nos mais sofisticados equipamentos dentro do seu departamento. Meu **MUITO OBRIGADO BROTHER.**

Ao meu irmão de sangue e amigo para toda hora **Dr. Klaus Fernando de Carvalho Bernardo**. Desde pequeno sigo os seus passos e por acaso da vida somos Cirurgião-Dentistas e sócios em nossa empresa. Pessoa de inteligência excepcional e irmão para toda obra, desejo as maiores realizações para você e toda sua família. Que meu afiliado de crisma **Lucas Bernardo** siga os nossos passos e prospere mais que nós. Espero estar contribuindo para o nosso sucesso profissional. Meu **MUITO OBRIGADO.**

A minha família, pela sorte que tive nessa vida em ter ao meu lado uma companheira tão especial **Érica Cristina Anno de Carvalho Bernardo** que fez várias vezes café da manhã pra eu poder viajar sem sono (**MEU AMOR**) e aos meus filhos **Felipe Anno de Carvalho Bernardo** e **Pedro Anno de Carvalho Bernardo** por ter me escolhido para ser seu pai. Que eu possa ser exemplo de perseverança e fé para eles. Que que saibam que todo esse esforço é muito importante para mostrar o quanto eu me preocupo e **AMO** vocês. **MUITO MUITO MUITO OBRIGADO**

AGRADECIMENTOS

À CAPES:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Aos meus pais Jorge Serafim Bernardo e Leny Célia de Carvalho Bernardo, ao meu irmão Klaus e sua família Geruza Bernardo, Artur e Lucas Bernardo e ao meu irmão Jorge Gustavo e família, pelo apoio incondicional sempre.....

A minha sogra e sogro Yoshie Anno e Sakuzo Anno (*in memoriam*) pela ajuda e apoio em todas as horas.....

Ao meu cunhado e cunhada Marcos e Michelle Anno e sobrinhos Rafael Anno (afilhado) e Isabela Anno pela alegria de estarmos sempre juntos.

A todos amigos, em especial Dr. Erico Faustino e Roberto Vitória, Gilson Rossi, Tatiana Sigolo, Michelle, Viviane e Josiane Arroni, Anderson (FOP-Unicamp) que ajudaram direta e indiretamente nessa jornada.....

À Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - FOAr-UNESP

Ao Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Aos amigos e funcionários do departamento pela ajuda concedida em várias etapas do trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia, Caroline e Renata pelo ótimo convívio e colaboração nas etapas do meu doutorado.

A todos os meus amigos pelo companheirismo. Agradeço o apoio e as palavras de incentivo, pois vocês nunca serão esquecidos.

Aos amigos da seção técnica de pós-graduação Alexandre e Cristiano, que me auxiliaram durante todo esse processo.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Quanto mais cedo você compreender que ninguém, além de você próprio, pode lhe oferecer o que deseja, mais depressa a sua vida irá melhorar. Mesmo que você mude de lugar, se não mudar a atitude mental não conseguirá substituir os aborrecimentos por satisfações.

Masaharu Taniguchi

Bernardo WLC. Biossíntese (*Green Synthesis*): caracterização e ação antimicrobiana do extrato e das nanopartículas de prata (AgNPs) da semente, flor e folha de *Syzygium cumini*: estudo *in vitro*: ação antibiofilme e citotóxica da folha de *S. cumini* e sua AgNP [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

Biossíntese ou síntese verde é utilizada para a síntese de nanopartículas ecológica, verde e de baixo custo frente os processos tradicionais. O estudo das nanopartículas de prata (AgNPs) visa desenvolver novos materiais que possam combater aumento da resistência por bactérias patogênicas a diferentes antimicrobianos *MDR* (*Multi Drug Resistant*). O objetivo deste estudo foi produzir o extrato da semente, flor e folha de *Syzygium cumini* e sintetizar AgNPs, caracterizar suas propriedades, funções e atividade antimicrobiana. Avaliar a ação antibiofilme das AgNPs do extrato da folha e a citotoxicidade. A triagem fitoquímica foi realizada por cromatografia gasosa e as AgNPs foram caracterizadas por diferentes técnicas (UV-Vis, EDS, FEG/SEM, DLS e PZ). Atividades antimicrobianas foram analisadas por testes de microdiluição em caldo e difusão em ágar e antibiofilme (90min, 24hs e 48hs). Ensaio de citotoxicidade foram feitos em queratócitos orais humanos HOK-18A. Os compostos fitoquímicos encontrados: semente - escaleno, campesterol, tocoferol; flor - estigmasterol, ac. hexadecanóico e octadecadienial; folha - hexadecanoato de etila, octadecanoato de etila, fitol e octadecatrienoato de etila. As nanopartículas de prata apresentaram-se estáveis (PZ: -36,7; -29,2; e -37,0 mV) e tamanhos variados (DLS: 24,30-396,10 nm). As espécies de *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *V. dispar* e *C. albicans* exibiram diferentes perfis de susceptibilidade: semente (MIC: 0,64-2,5mg/ml); flor (MIC: 1,29-5,18mg/ml); folha (MIC: 1,29-10,37 mg/ml); AgNPs - semente (MIC: 0,03-2,0 mg/ml); AgNPs - flor (MIC: 0,03-0,25 mg/ml); e AgNPs - folha (MIC: 0,03-0,25 mg/ml). As AgNPs-folha exibiram efeitos antibiofilme - adesão celular (90min) - *C. albicans* (0,5 mg/ml), *S. mutans*/*S. oralis* (0,125 mg/ml) e *S. aureus*/*S. epidermidis* (0,5 mg/ml); ação antibiofilme simples *C. albicans* (0,5-8,0 mg/ml - 90 min; 0,5-8,0mg/ml - 48hs) e mistos *S. mutans*/*S. oralis* (0,125-8,0 mg/ml - 90min/ 24hs/ 48hs); *S. aureus*/*S. epidermidis* (0,5-8,0 mg/ml - 24hs; 0,125-8,0 mg/ml 24hs /48hs). Ausência de citotoxicidade foi observada para extrato da folha e AgNPs-folha (0,68 e 0,032 mg/ml - 5 min). Os extratos da semente, flor e folha e suas AgNPs mostraram ter ação antimicrobiana contra patógenos de interesse médico-odontológico, cujas concentrações inibitórias são espécie-dependente. As AgNPs das folhas apresentaram potencial de ação contra a cinética de desenvolvimento de biofilmes simples e mistos, dose/tempo/espécies-dependente. A ausência de citotoxicidade dos extratos de folha e suas AgNPs mostraram-se de modo dose/tempo-dependente.

Palavras – chave: Nanopartículas metálicas. Biofilmes. Anti-infecciosos.

Bernardo WLC. Biosynthesis (*Green Synthesis*): characterization and antimicrobial action of extract and silver nanoparticles (AgNPs) of seed, flower and leaf of *Syzygium cumini*: *In vitro* study: antibiofilm and cytotoxicity action of the *S. cumini* leaf and your AgNP [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020

ABSTRACT

Biosynthesis (green synthesis) is used for synthesis nanoparticles ecological, green and of low cost on traditional processes. The study of silver nanoparticles (AgNPs) aims to develop new materials that can combat increased resistance by pathogenic bacteria to different antimicrobials (*Multi Drug Resistant*). The aim of this study was to produce the extract from the seed, flower and leaf of *Syzygium cumini* and synthesize AgNPs, characterize your properties, functions and antimicrobial activity. Evaluate the antibiofilm action and the cytotoxicity of the leaf extract and yours AgNPs. Phytochemical screening of the was carried out by gas chromatography and AgNPs were characterized by different techniques (UV-Vis, EDS, FEG/SEM, DLS e PZ). Antimicrobial activities were analyzed by microdilution tests in broth and diffusion in agar and antibiofilm (90min, 24hs and 48hs). Cytotoxicity tests were carried out in human oral keratocytes HOK-18A. The compounds phytochemicals present: seed - scalene, campesterol, tocopherol; flower - estigmasterol, ac. hexadecanoic and octadecadiennial; leaf - ethyl hexadecanoate, ethyl octadecanoate, phytol and ethyl octadecatynate. Silver nanoparticles presented themselves stable (PZ: -36.7; -29.2; And -37.0 mV) and varying sizes (DLS: 24.30-396.10 nm). The species of *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *V. dispar* and *C. albicans* Exhibited different profiles of susceptibility: seed (MIC: 0.64-2.5mg/ml); flower (MIC: 1.29-5.18mg/ml) ; leaf (MIC: 1.29-10.37 mg/ml) e para AgNPs: seed (MIC: 0.03-2.0 mg/ml); flower (MIC: 0.03-0.25 mg/ml); leaf (MIC: 0.03-0.25 mg/ml). Leaf AgNPs exhibited antibiofilm effects - cell adhesion (90min) - *C. albicans* (0.5 mg/ml), *S. mutans*/*S. oralis* (0.125 mg/ml) e *S. aureus*/*S. epidermidis* (0.5 mg/ml); simple antibiofilm action *C. albicans* (0.5-8.0 mg/ml - 90 min; 0.5-8.0mg/ml - 48hs) and mixed *S. mutans*/*S. oralis* (0.125-8.0 mg/ml - 90min/ 24hs/ 48hs); *S. aureus*/*S. epidermidis* (0.5-8.0 mg/ml - 24hs; 0.125-8.0 mg/ml 24hs /48hs). No cytotoxicity was observed for leaf extract and AgNPs leaf (0.68 and 0.032 mg/ml - 5 min). The seed, flower and leaf extracts and their AgNPs showed antimicrobial action against pathogens of medical-dental interest, whose inhibitory concentrations are species-dependent. The AgNPs of the leaves showed action potential of against kinetics of the development of simple and mixed biofilms, dose/time/species dependent. The absence of cytotoxicity of leaf extract and your AgNPs was detected in a dose/time dependent.

Keywords: Metal nanoparticles. Biofilm. Anti-infective agents.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 PROPOSIÇÃO.....	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
4 MATERIAL E MÉTODO	24
4.1 Extrato Vegetal	24
4.2 Cromatografia a Gás - Espectrometria de Massa (GC-MS)	24
4.3 Síntese Verde de AgNPs – HESc	24
4.4 Espectroscopia UV-Vis das AgNPs-HESc	25
4.5 Espectrometria por EDS das AgNPs-HEScs	25
4.6 Microscopia (FEG/SEM) das AgNPs-HESc	25
4.7 DLS e Potencial Zeta das AgNPs-HESc	26
4.8 Microrganismos e Condição de Crescimento	26
4.9 Testes de Sensibilidade Antimicrobiana por Disco Difusão....	26
4.10 Testes de Sensibilidade Antimicrobiana por Diluição em Caldo.....	27
4.11 Concentração Microbicida Mínima (CMM)	28
4.12 Ação Antibiofilme Simples e Misto das AgNPs-HEScLeaf	28
4.13 Microscopia Eletrônica de Varredura dos Biofilmes	29
4.14 Ensaio de Citotoxicidade in Vitro dos HEScLeaf e AgNPs- HEScLeaf	30
4.15 Análises Estatísticas.....	31
 5 RESULTADOS	 32
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	68
APÊNDICE A.....	76

1 INTRODUÇÃO

No final da década de 1960 surgiu uma maior preocupação com o meio ambiente e essa questão ecológica tomou forte impulso nos anos 70. Hoje, este é um assunto de grande relevância e de enorme repercussão na sociedade, apresentando tendências de um melhor aproveitamento de recursos naturais.

Preocupados com essa nova tendência, se deu origem a ciência chamada de Nanobiotecnologia Verde que utiliza princípios da Química Verde para um desenvolvimento sustentável. Ela foi criada a partir da Nanociência e/ou Nanotecnologia que é a área de estudo onde se encontram os materiais ou estruturas em escala nanométrica, definida entre 1 a 100nm consideradas como nanopartículas¹. O campo da Nanotecnologia é uma área, dentre muitas, que tem a capacidade de criar materiais, dispositivos e sistemas com novas funções e propriedades. Ela atravessa as fronteiras do conhecimento e ramifica-se dentre todas as áreas das Ciências, incluindo a Biologia, Química, Física, Engenharia, Zoologia, Ciências da Terra e Medicina e torna-se uma ciência de fronteira, avançada e altamente interdisciplinar².

Baseados nestes aspectos foram desenvolvidos diferentes tipos de estruturas e materiais em nanoescala denominadas de nanopartículas (NPs), que normalmente, podem ser sintetizadas por métodos físicos, químicos e biológicos³. As sínteses físicas e químicas possuem alto consumo de energia e envolvem, em muitos casos, substâncias tóxicas, enquanto as técnicas biológicas são rentáveis, limpas, atóxicas e ecologicamente corretas. As vias biológicas de síntese usando extratos de plantas, enzimas e ou microrganismos tem sido sugerido como alternativas de potencial ecologicamente correto em relação a métodos físicos e químicos⁴.

Dentre as NPs as mais frequentemente sintetizadas, são as nanopartículas metálicas de ouro, prata e cobre, e seu uso abrange diversas áreas, como na biomedicina e finalidades, entre elas a atividade antimicrobiana⁵. As nanopartículas metálicas, quando utilizadas como agentes antimicrobianos, são capazes de ligar-se na membrana da bactéria por interação eletrostática causando a ruptura da integridade da membrana celular bacteriana. Essa nanotoxicidade nos microrganismos ocorre pela indução do estresse oxidativo pelos radicais livres formados (ROS) durante a aplicação das nanopartículas⁶.

Esta tecnologia em nanoescala, acompanhada pelos princípios da Química Verde é denominada síntese verde (*Green Synthesis*). A síntese verde, a partir de extrato de plantas, é a técnica mais simples de sintetizar nanopartículas. As plantas produzem biomoléculas funcionais que reduzem ativamente íons metálicos de modo eficiente para sintetizar nanopartículas⁷.

Muitos estudos têm indicado que os metabólitos secundários encontrados nos óleos essenciais presentes nos extratos vegetais podem ser os principais agentes responsáveis pela redução do íon metálico e formação das nanopartículas, assim como pelo seu encapsulamento evitando posterior agregação das partículas, otimizando assim o processo de formação de nanopartículas^{8,9}.

A obtenção de nanopartículas de prata utilizando planta (*Green Synthesis*) foi reportada por Gardea-Torresdey et al.¹⁰, que utilizaram broto de alfafa para obter AgNP. Entretanto empregando a planta na íntegra, mostrou ser um processo lento e trabalhoso. Essa dificuldade foi superada pelo uso de extratos vegetais, minimizando o tempo de redução do Ag¹⁺¹¹.

Syzygium cumini é uma planta popularmente conhecida como “jambolão”, é usada em tratamento para diversas doenças, entre elas, infecções por microrganismos, pois apresentam constituintes químicos diversos e os compostos fitoquímicos apresentam variabilidade nas diferentes estruturas de sua anatomia¹². A biossíntese das nanopartículas de prata é um método “bottom-up”, envolvendo principalmente, reações de oxidação e redução. Como as substâncias fitoquímicas das plantas possuem propriedades antioxidantes ou redutoras, elas agem sobre as partículas de prata em forma de sal formando as nanopartículas¹³.

Devido ao fato do desenvolvimento da resistência contra a maioria dos agentes microbianos, as doenças infecciosas continuam a ser, mundialmente, um dos grandes desafios da saúde. Pois o uso indiscriminado dos antimicrobianos na profilaxia e no tratamento de infecções tem exercido pressão seletiva, induzindo o aumento da incidência de formas bacterianas resistentes a diversos antimicrobianos. Além disso, o número crescente de pacientes imunocomprometidos nas últimas décadas elevou a incidência de infecções bacterianas. O aparecimento de microrganismos resistentes a drogas é um fenômeno genético e tem grande importância na saúde pública, visto que essas cepas contêm genes de resistência a múltiplas fármacos os quais podem ser disseminados por elementos móveis, como plasmídeos, transposons e integrons, de um organismo ao outro. A resistência é

então repassada a cada geração, proporcionalmente elevando o número de bactérias que a possui, e reduzindo a concentração dos organismos sensíveis¹⁴.

Uma das formas de combater os microrganismos é conseguir atuar em seu biofilme, que é uma coleção microbiana envolta por polissacarídeos extracelulares que promove a aderência e multiplicação desses em variadas superfícies tanto bióticas quanto abióticas. O ciclo de vida do biofilme microbiano ocorre em diferentes estágios: - inicialmente as células se fixam formando microcolônias na superfície de interesse, onde posteriormente ocorre a maturação das microcolônias dentro do biofilme estabelecido e finalmente há o processo de dispersão das bactérias a partir do biofilme formado para encontrar e colonizar outras superfícies ou habitat¹⁵.

Assim, os nanomateriais, como as nanopartículas de prata têm surgido como alternativa para novos agentes antimicrobianos, levando ao desenvolvimento de estratégias alternativas para tratamento das doenças infecciosas em suas diversas formas. O estudo dessas AgNPs aumentou exponencialmente nos últimos anos, tem potencial relevante e no futuro, após extensos estudos, poderá ser utilizado como um medicamento de grande importância socioeconômica.

2 PROPOSIÇÃO

Para contribuir com as informações acerca do potencial das atividades biológicas das plantas e síntese verde de nanopartículas metálicas, o objetivo do presente estudo foi:

1. Produzir extrato hidroalcoólico das sementes, flores e folhas de *S. cumini* e fazer uma triagem dos compostos fitoquímicos;
2. Sintetizar e caracterizar as nanopartículas de prata (AgNPs) das sementes, flores e folhas de *Syzygium cumini*;
3. Avaliar a atividade antimicrobiana de espécies patogênicas planctônicas: *Actinomyces naeslundii*, *Veillonella dispar*, *Fusobacterium nucleatum*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*.
4. Avaliar a atividade antibiofilme das nanopartículas de prata das folhas de *S. cumini* e avaliar a atividade citotóxica do extrato e das AgNPs das folhas de *S. cumini*.

3 REVISÃO Da LITERATURA

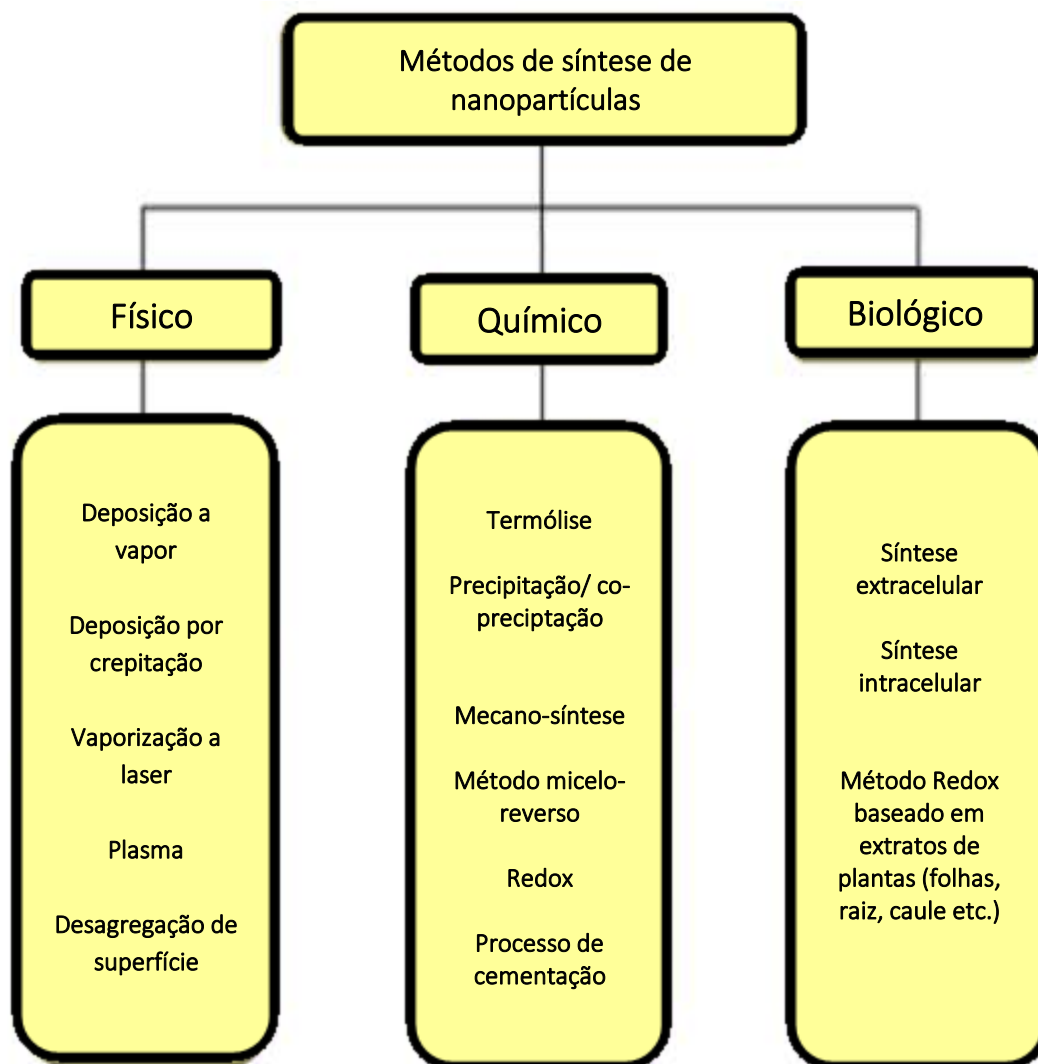
O gênero *Syzygium* (Família Myrtaceae) compreende cerca de 1.100 espécies. Nativa dos trópicos - América tropical e Austrália, estende-se em uma faixa, pelo Pacífico para África, Madagascar, ao sul e a Leste da Ásia¹⁶. As plantas desta família são ricas compostos fitoquímicos utilizados para fins medicinais. *Syzygium cumini* Lam. é uma das espécies mais conhecidas como jambolão, ameixa preta, de java, portuguesa, roxa, amora indiana etc¹⁶.

Syzygium cumini é usada para o tratamento de doenças que ocorrem no ser humano como diabetes, câncer, desordens digestivas, hemorroida, acne, dor de estômago e apresentam, também, atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobiana, anti-HIV, antifúngica, anorexígenos, gastroprotetor, radioprotetor e protetora dos dentes e gengivas¹⁷. Sendo assim, o emprego intenso desta planta na medicina popular estimulou as pesquisas científicas, uma vez, que ela possui diversas propriedades terapêuticas identificadas devido às inúmeras ações farmacológicas dos compostos fitoquímicos do *S. cumini*¹⁸.

Todas as partes das plantas e seus compostos bioativos (polifenólicos, alcalóides, flavonóides, óleos e terpenos) podem ser usadas de modo eficiente para sintetizar nanopartículas (NPs). Elas são definidas como materiais ou estruturas de escala nanométrica, com tamanho estabelecido entre 1 a 100nm, dentro de uma área em desenvolvimento chamada de Nanociência e/ou Nanotecnologia¹⁹.

O campo da Nanotecnologia é uma área, dentre muitas, que tem a capacidade de criar materiais, dispositivos e sistemas com novas funções e propriedades². Da fusão entre nanotecnologia e biotecnologia surge a Nanobiotecnologia, uma ciência de fronteira, avançada e altamente interdisciplinar³. A Nanobiotecnologia Verde é utilizada como alternativa para um desenvolvimento sustentável, empregando tecnologia ecologicamente correta e economicamente viável, como parte de um esforço global em reduzir os resíduos tóxicos gerados pelos processos químicos da indústria e ciência para a síntese de NPs^{3,4}. Normalmente, as NPs podem ser sintetizadas por métodos físicos, químicos e biológicos (Figura 1)²⁰.

Figura 1 - Esquema dos principais métodos para síntese de nanopartículas



Fonte: Reverberi et al.²⁰

As sínteses físicas e químicas possuem alto consumo de energia e envolvem, em muitos casos, substâncias tóxicas, enquanto as técnicas biológicas são mais rentáveis, limpas, atóxicas e ecológica. - As vias biológicas de síntese usando extratos de plantas, enzimas e ou microrganismos tem sido sugerido como alternativas de potencial ecologicamente correto em relação aos outros métodos²¹.

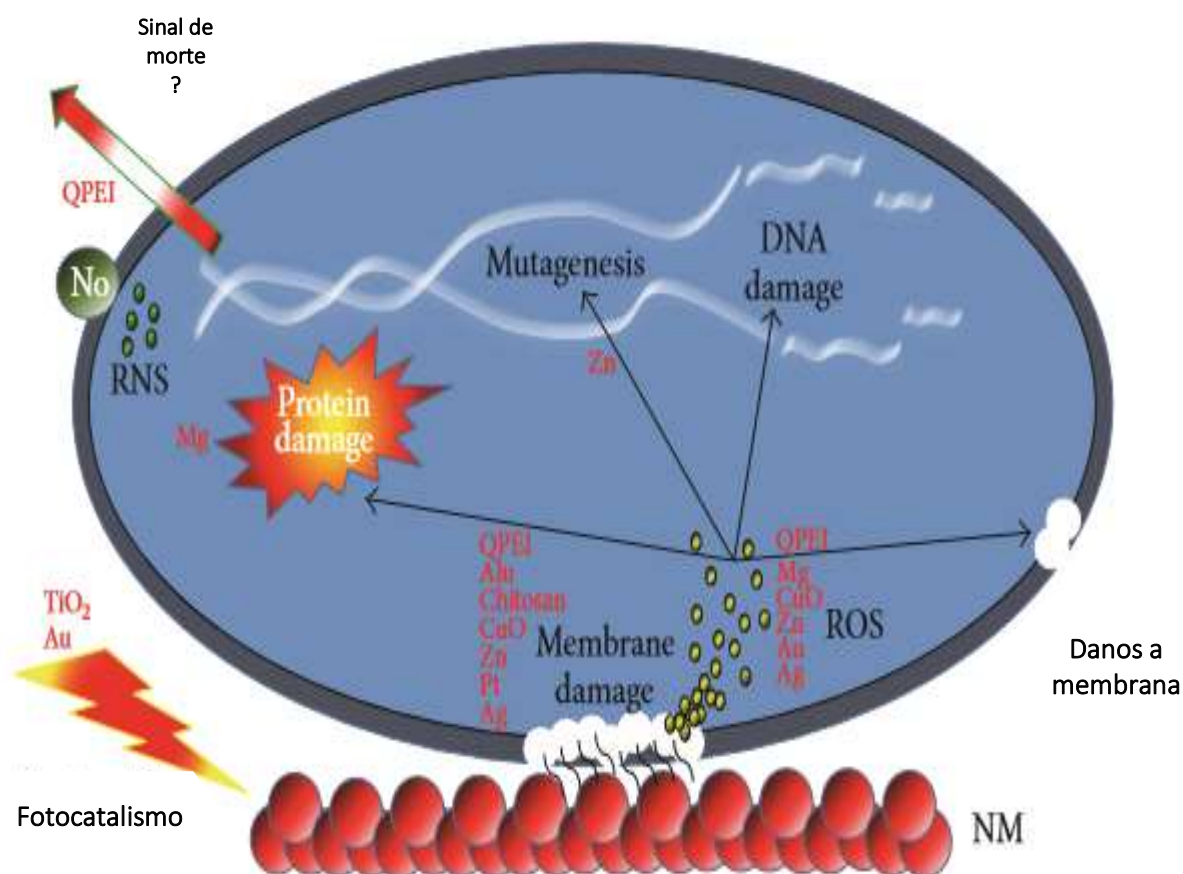
Seguindo essa tendência mundial, a produção de NPs ecológica e verde é chamada de biossíntese ou síntese verde (*Green Synthesis*), método no qual utiliza-se de extratos vegetais, apresentando algumas vantagens em comparação a outros tipos de síntese: - as plantas são amplamente distribuídas; - facilmente disponíveis; -

seguras de manusear; - baixo custo de produção; - e, por ser fonte de vários metabólitos (elementos bioativos - compostos fitoquímicos)^{22,23}.

Qualquer parte das plantas pode ser usada de modo eficiente para sintetizar as NPs, tanto a biomassa da planta como as folhas, caules, sementes, frutos, látex, quanto seus compostos bioativos (biomoléculas funcionais), pois reduzem ativamente os íons metálicos, agindo como agentes protetores e estabilizadores das NPs. Para tanto, são três os fatores chaves na síntese: o agente redutor, o meio de reação e o agente estabilizador^{7,23}.

Existem vários tipos de NPs e entre elas as nanopartículas metálicas (MNPs). Geralmente as mais frequentemente sintetizadas são as de ouro, prata, cobre e seu uso abrange diversas áreas e finalidades na biomedicina e atividade antimicrobiana (Figura 2)²⁴. Dentre as MNPs, as nanopartículas de prata (AgNPs) podem ser usadas como agente antimicrobiano (bactérias, fungos e vírus). Essa atividade antimicrobiana foi relatada como dependente do tamanho da sua partícula, pequenos diâmetros de NPs têm efeito antimicrobiano superior ao de diâmetros maiores⁴.

Figura 2 - Nanomateriais (NM) modo de ação antibacteriano.



Esquema geral representando os modos comuns de ação do NM. Antibacteriano mais conhecido interage eletrostaticamente com a membrana bacteriana causando interrupção da membrana. Frequentemente, radicais livres (pontos amarelos – espécies oxigênio reativo - ROS) são produzidos devido às interações de membrana NM. Esses radicais podem causar danos secundários na membrana, dificultar a função proteica, causar destruição de DNA e resultar em excesso de produção radicais livres. Outros NM antibacterianos são fotoativados (fotocatalismo). NM Óxido nítrico (NO) está envolvido com RNS (espécies nitrogênio reativo-pontos verdes). O NM polication (QPEI - quaternary ammonium polyethylenimine) tem uma característica única, pois parecem induzir a produção de sinal que pode promover a morte celular programada.

Fonte: Beyth et al.²⁴

Especificamente a biossíntese das nanopartículas de prata (AgNPs) é um método “bottom-up” - reações de oxidação e redução. Como as substâncias fitoquímicas das plantas possuem propriedades antioxidantes e redutoras, elas agem sobre as partículas de prata em forma de sal formando as nanopartículas

(reação redox)²⁵. Para tanto, são três os fatores chaves na síntese: o agente redutor, o meio de reação e o agente estabilizador⁷.

Propriedades únicas das AgNPs fazem delas uma boa escolha para uma variedade de aplicações, como fácil redução de sais de Ag^{1+} a Ag^0 (zero-valente), inércia química, condutividade elétrica, catalisador, biossensor e agente antimicrobiano¹⁹. As ações antibacterianas exercidas pelas AgNPs estão ligadas a: (a) adesão à parede celular, (b) penetração e danos de organelas citoplasmáticas; (c) Indução de estresse oxidativo através da produção de espécies de oxigênio reativo (ROS); (d) Modulação das vias de transdução de sinal (via de resposta ao estresse)^{26,27}.

Existem evidências que bactérias desenvolvem menor resistência contra AgNPs do que contra antibióticos²⁸. No entanto, alguns pontos de controvérsia ainda devem ser discutidos: a definição e determinação da concentração inibitória mínima; surgimento de cepas resistentes; mecanismos bactericida ou bacteriostático das AgNPs; efeitos citotóxicos em humanos ; e destruição apenas de células microbianas planctônicas e do biofilme²⁹⁻³¹.

Sendo assim, devido ao fato do desenvolvimento da resistência dos microrganismos à maioria dos agentes antimicrobianos, as doenças infecciosas continuam a ser um dos grandes desafios da área médica-odontológica atualmente. Isso estimula o desenvolvimento de novas estratégias para tratamento das doenças infecciosas, incluindo o combate aos mutantes multidrogas resistentes (*MDR – Multi-Drug Resistance*) e ao biofilme microbiano pelas nanopartículas³².

Os biofilmes são formados por microrganismos e podem habitar diversos dispositivos médicos-odontológicos como cateteres, válvulas cardíacas, juntas protéticas³³ e implantes dentários³⁴. O biofilme é uma coleção microbiana envolvida por uma trama de polissacarídeos extracelulares que resulta na aderência e multiplicação de microrganismos em superfícies bióticas ou abióticas.

O desenvolvimento do biofilme microbiano ocorre em diferentes estágios. Inicialmente as células se fixam formando microcolônias na superfície de interesse, onde posteriormente ocorre a maturação das microcolônias dentro do biofilme estabelecido e finalmente há o processo de dispersão microbiana a partir do biofilme formado para encontrar e colonizar outras superfícies ou habitat¹⁵.

Por sua vez, o biofilme dental é o único entre os vários tipos que requer as glicoproteínas salivares do hospedeiro para se fixar e desenvolver, podendo ser a

causa de várias doenças que acomete o ser humano³⁵. O início da formação do biofilme dental requer a pré-existência da película de esmalte adquirida (AEP, *acquired enamel pellicle*). A AEP consiste predominantemente de proteínas salivares, proteínas, carboidratos e lipídios não derivados da saliva, regulando processos que incluem lubrificação, desmineralização-remineralização e modelando a composição da microbiota precoce que adere às superfícies dentárias³⁶.

Espécies microbianas planctônicas da cavidade bucal podem estabelecer ligações reversíveis com a AEP por meio da adesão física, atrações eletrostáticas ou predominantemente interações químicas³⁵. Entre os principais gêneros bacterianos pioneiros do biofilme dental encontram-se os *Actinomyces* sp., *Streptococcus* sp., *Haemophilus* sp., *Capnocytophaga* sp., *Veillonella* sp. e *Neisseria* sp., os quais se aderem na superfície do dente e auxiliam outras espécies aos eventos de colonização e competição³⁵.

Outros microrganismos como *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema* sp., *Tannerella forsythensis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, entre outras, podem ser encontradas no estágio de maturação do biofilme dental. Estas espécies reconhecem e se aderem aos receptores glicoproteicos existentes sobre os microrganismos pioneiros formando estruturas complexas de biofilmes dental que favorecem os processos de interação e adaptação microbiana³⁷. Neste estágio de desenvolvimento do biofilme dental, a dispersão de células únicas ou grupos celulares microbianos pode ocorrer por erosão, descamação e espalhamento como consequência da escassez de nutrientes no local ou dos eventos de defesa do hospedeiro (força de cisalhamento de fluido salivar)³⁸.

Outros microrganismos de interesse médico estão envolvidos em infecções humanas graves e na disseminação de cepas resistentes aos antimicrobianos, como por exemplo as espécies de *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*³⁹⁻⁴³.

Cepas de *S. aureus* e *Candida albicans* podem ser disseminadas durante os tratamentos odontológicos e, ocasionalmente, levar à contaminação e infecção de pacientes e dentistas. Entre as espécies mais prevalentes encontrados nas superfícies dos equipamentos odontológicos estão o *Streptococcus viridans* e *Staphylococcus* sp.⁴³. Outros estudos reportaram a existência de infecções por *Candida* na cavidade bucal e apesar da espécie de *C. albicans* ser encontrada predominantemente na cavidade bucal, outras espécies do gênero também foram

identificadas e estão envolvidas na patogênese de indivíduos com candidíase orofaríngea^{44,45}. Essa levedura também tem sido considerada altamente virulenta entre as espécies de *Candida*, e é capaz de desenvolver biofilmes consistindo em uma complexa comunidade celular inserida numa matriz de polissacarídeo extracelular. Estas estruturas exibem propriedades fenotípicas distintas das células planctônicas e elevada resistência aos agentes antimicrobianos^{46,47}.

Dessa forma, o estudo de nanopartículas com atividade antimicrobiana abrirá a possibilidade para a busca de novos medicamentos, em breve, poderão ser empregados no tratamento e prevenção de infecções microbianas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Extrato Vegetal

Amostras vegetais de semente, flor e folhas de *Syzygium cumini* foram colhidas no período de janeiro a maio de 2017, correspondente à época de frutificação e florada, no município de Araraquara, SP - Brasil (Latitude: -21.7946, Longitude: - 48.1766; 21° 47' 41" Sul, 48° 10' 36" Oeste). As amostras foram lavadas, secas a temperatura ambiente e a 50°C, trituradas separadamente e misturadas com etanol 70% na proporção de 10% (m/V). As misturas foram estocadas durante 25 dias, em temperatura ambiente, protegidas da luz, e posteriormente filtradas (Whatman n3)⁴⁸.

Os extratos da semente - HEScSeed, flor - HEScFlower e folha - HEScLeaf de *S. cumini* foram submetidas ao processo de rotoevaporação (40 r.p.m./ 40 °C / bomba de vácuo 175 mbar/ recirculador e destilador de água 10 °C) para remoção do solvente. Os produtos foram transferidos para frascos 0,5L (SCHOTT® DURAN®) e armazenados a -20 °C por 24 horas, em seguida os extratos foram liofilizados e suas massas foram determinadas. (Lyophilizer model Alpha 1-2 LDPlus, GmbH®, Germany)⁴⁹. A partir daqui rever a apresentação dos números sobrecritos

4.2 Cromatografia a Gás com Espectrometria de Massa (GC-MS)

Produtos extratos liofilizados (HEScSeed, HEScFlower e HEScLeaf) de *S. cumini* foram parcialmente dissolvidos com etanol. As dispersões foram filtradas e analisadas por GC-MS (Aligent 5975C TAD Series GC/MSD System, ©Aligent Technologies, Inc., CA, USA) usando condições cromatográficas de ensaio predefinidas e analisadas (NIST 11/ AMDIS) (APÊNDICE – item. 1).

4.3 Síntese verde de AgNPs – HESCs: HEScSeed, HEScFlower e HEScLeaf

Extratos liofilizados de *S. cumini* (HEScSeed, HEScFlower e HEScLeaf) foram usados para a síntese de nanopartículas de prata semente - AgNPs-HEScSeed, flor - AgNPs-HEScFlower e folha - AgNPs-HEScLeaf). A mistura foi preparada adicionando 10 ml de solução de extrato a 10% em 990ml de solução de 1mM AgNO₃ (água - Milli Q) e mantidas sob agitação durante 2 horas a 90°C. Em seguida,

foram esfriadas, centrifugadas e lavadas 5 vezes a 12.000 g por 10 min a -4°C (Centrifuge 5810 R Eppendorf, Germany). Os sedimentos foram transferidos para microtubos de 2 ml (Axygen Brasil® - Corning Inc.) e desidratados a 65°C overnight (Dryblock, Eppendorf, Germany). Os tubos contendo as nanopartículas de prata foram armazenados a -70°C até o momento de uso⁵⁰.

4.4 Espectroscopia Ultravioleta/Visual (UV-Vis) das AgNPs-HESCs

A síntese das AgNPs-HEScSeed, AgNPs-HEScFlower e AgNPs-HEScLeaf foram monitoradas por UV-vis (espectro de 200 a 800 nm - Thermo Scientific NanoDrop® 2000c Spectrophotometer, Wilmington, DE, USA). As soluções estoques foram preparadas por dispersão das nanopartículas na proporção de 1:10, seguido pela sonicação por 20 min. Essas amostragens foram novamente diluídas na proporção de 1:5 para a avaliação UV/Vis^{50; 51}.

4.5 Espectrometria por Energia Dispersiva de Raios X (EDS) das AgNPs-HESCs

A natureza química dos elementos de superfície das AgNPs-HEScSeed, AgNPs-HEScFlower e AgNPs-HEScLeaf foram investigadas por EDS. Alíquotas de 10 μl das soluções foram aplicadas em pedaços de resina epóxi com o auxílio de fita dupla face condutora de carbono e revestido por pulverização com carbono (Desk II, DVM, NJ, USA). Cada superfície tratada foi escaneada e analisada em conjunto com MVE, obtendo-se a quantificação dos elementos químicos e as imagens das respectivas AgNPs. (EDS - Vantage Digital Microanalysis, Noran equipments, Middleton, WI, USA / MEV - JSM5600 LV; JEOL, Tokyo, Japan)⁵².

4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura e Canhão de Campo de Elétrons (FEG/SEM) das AgNPs-HESc

Para a avaliação ultra estrutural e morfológica das AgNPs-HEScSeed, AgNPs-HEScFlower e AgNPs-HEScLeaf, foi utilizado alíquotas de 25 μl de cada amostra de AgNPs e depositadas sobre uma superfície de carbono aderida em cilindro metálico (30 mm $\times$ 10 mm de $\varnothing$) e mantidas em dessecador acoplado a uma bomba de vácuo (Fisatom 802 –Cole-Parmer, Company) por 24 horas. As imagens das nanopartículas foram obtidas por FEG-SEM (Carl Zeiss Microscopy-Gemini Supra 35, software), e analisadas quanto suas formas, tamanhos e arranjos⁴.

4.7 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta (ZP) das AgNPs

As AgNPs-HEScSeed, AgNPs-HEScFlower e AgNPs-HEScLeaf foram diluídas em 2 mg/ml em alíquotas de 1 a 1,5 ml, dispensadas em cubetas de quartzo (Malvern Analytical – DTS1070) e submetidas às análises (Zetasizer Nano – ZS – ZEN 3600 com Laser Red He-Ne OD 632,8 nm, MALVERN). Os resultados de tamanho, diversidade relativa e potencial zeta das nanopartículas foram obtidos, analisados e interpretados conforme dados estabelecidos (MALVERN – APÊNDICE – item. 2)⁴.

4.8 Microrganismos e Condição de Crescimento

Foram utilizadas linhagens bacterianas de *Actinomyces naeslundii* ATCC® 12104D-5™, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC® 25586D-5™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228, *Streptococcus mutans* ATCC® 25175D-5™, *Streptococcus oralis* ATCC® 35037™ and *Veillonella dispar* ATCC® 17748™ e de levedura *Candida albicans* ATCC® 90028™. As bactérias anaeróbias foram cultivadas em Agar Sangue (AS Oxoid, Hampshire, UK) suplementado com 5mg/ml de hemina, 1 mg/ml de menadiona e 5% de sangue de carneiro, a 37 °C por 48 a 72 horas em condições anaeróbias. (MiniMacs Anaerobic Workstation, Don Whitley Scientific, Shipley, UK). *Staphylococci* e *Streptococci* foram cultivadas em ágar BHI a 37 °C durante 24 a 48 horas em condições de aerobiose e a 10% de CO₂ (Water Jacketed CO₂ Incubator, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). As leveduras foram cultivadas em ágar SDA (Sabouraud Dextrose Agar- Oxoid, Hampshire, UK) a 35 °C durante 24 a 48 horas em condições aeróbias⁵³.

4.9 Testes de Sensibilidade Antimicrobiana por Disco Difusão

Os perfis de suscetibilidade antimicrobiana in vitro dos extratos HEScSeed, HEScFlower e HEScLeaf e das nanopartículas AgNPs-HEScSeed, AgNPs-HEScFlower e AgNPs-HEScLeaf foram determinados⁵⁴⁻⁵⁷. Inicialmente, soluções aquosas dos extratos e das nanopartículas foram preparadas (água Milli-Q) e esterilizadas por filtração (Millipore Corporation, hydrophilic Durapore® PVDF, 0.22 µm, Ø 47 mm) na concentração de: 166mg/ml para os extratos HEScSeed,

HEScFlower e HEScLeaf, e; 8 mg/ml para as nanopartículas AgNPs-HEScSeed, AgNPs-HEScFlower e AgNPs-HEScLeaf.

Discos de papel (discos brancos estéreis, 6 mm x 0,8 mm, Laborclin - PR, Brasil) foram saturados com as soluções dos extratos e nanopartículas. Os microrganismos cultivados foram suspensos em 5ml de solução salina estéril (145mM NaCl) e ajustados em espectrofotômetro - $DO_{625\text{ nm}/530\text{ nm}}$ (bactérias: $1-4 \times 10^8$ UFC/ml; Leveduras: $1-5 \times 10^6$ UFC/ml) (Thermo Scientific Multiskan GO UV/Vis, Waltham, MA, USA). Esta suspensão foi agitada e semeada em placa com ágar específico para cada microrganismo (APÊNDICE – item. 3).

Em seguida, os discos contendo extratos e nanopartículas foram colocados na superfície do meio e incubadas entre 35 e 37 °C por 24 a 72 horas nas condições atmosféricas específicas para cada microrganismo. Esses testes foram realizados e a interpretação dos resultados foi realizada medindo o diâmetro do halo em milímetros, a partir da zona de inibição do crescimento microbiano. Discos contendo soluções aquosas de clorexidina 0,12% (12mg/ml Chlorhexidine digluconate, SUPELCO, Merck, Germany) e fluconazol 0,00025% (25µg/ml, SIGMA-ALDRICH, Merck, Germany) foram utilizados como controle.

4.10 Testes de Sensibilidade Antimicrobiana por Diluição em Caldo

A concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos - HEScSeed, HEScFlower, HEScLeaf e das nanopartículas - AgNPs-HEScSeed, AgNPs-HEScFlower e AgNPs-HEScLeaf frente aos microrganismos foi determinada pelo método de microdiluição em caldo^{54; 57-59}. Esses testes foram realizados empregando placas de microdiluição com múltiplos poços (96-well cell culture microplates, Corning Inc., NY, USA), contendo 100 µl/poço de meio de cultura com cada extrato e nanopartícula e 100µl do inóculo microbiano nas concentrações testadas: - 166mg/mL até 0,3242mg/ml dos extratos HEScSeed, HEScFlower e HEScLeaf, e; - 8,0mg/mL até 0,0156mg/mL das AgNPs-HEScSeed, AgNPs-HEScFlower AgNPs-HEScLeaf.

Os microrganismos cultivados foram ajustados a uma $DO_{625\text{ nm}/530\text{ nm}}$ (bactérias: $1-4 \times 10^8$ UFC/ml; Leveduras: $1-5 \times 10^6$ UFC/ml) usando espectrofotômetro em meio de cultura específica para cada microrganismo (APÊNDICE - item. 4).

Em seguida, as placas de microdiluição foram incubadas a 35 ou 37 °C por 24 a 48 horas em condições atmosféricas específicas para cada microrganismo. Esses testes foram realizados em sistemas de triplicata. Adicionalmente, os ensaios colorimétricos foram realizados baseados em sistemas de biotransformação da resazurina por bactérias (Resazurin sodium salt, SIGMA-ALDRICH, Merck, Germany) e do TTZ por leveduras (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride, SIGMA-ALDRICH, Merck, Germany)^{60; 61}.

4.11 Concentração Microbicida Mínima (CMM)

A concentração microbicida mínima (CMM) foi determinada para cada cepa microbiana, alíquotas de 50µl do volume total do poço correspondente ao CIM foram homogeneizadas com uma pipeta e semeadas em placas de Petri contendo meios de cultura sólidos específicos para cada espécie estudada, e incubadas a 35 a 37 °C por 24 a 48 horas em condições atmosféricas específicas de cada espécie. O CMM foi a menor concentração dos extratos e das nanopartículas capaz de eliminar ≥ 99,9% do inóculo final (0,05-0,25 colônia)^{62; 63}.

4.12 Ação Antibiofilme Simples e Misto das AgNPs-HEScLeaf

A ação antibiofilme das nanopartículas das folhas - AgNPs-HEScLeaf foi determinada a partir do desenvolvimento de um biofilme simples (*C. albicans*) e dois biofilmes mistos (*S. mutans*/ *S. oralis*; *S. aureus*/ *S. epidermidis*). Para os ensaios controles do desenvolvimento de biofilmes, culturas microbianas foram dispensadas (100µl de cultura de *C. albicans*; 50µl de *S. mutans* + 50µl de *S. oralis*; 50µl de *S. aureus* + 50µl de *S. epidermidis*) em placas de microdiluição com múltiplos poços (96-well, Corning Inc., NY, USA) e incubadas a 37 °C por 90 minutos, sob agitação constante de 75 r.p.m. (Incubadora 430 RDB, Nova Ética Produtos e Equipamentos Científicos Ltda.), correspondente a fase de adesão microbiana sobre a superfície dos poços. Logo após, as células planctônicas foram cuidadosamente removidas por lavagem (2×) com solução tampão PBS estéril (100mM NaCl, 100mM NaH₂PO₄, pH 7,2). Então, 100 µl de meios de culturas foram adicionados aos poços das microplacas contendo células microbianas aderentes (meios RPMI 1640 para leveduras e BHI para bactérias). Essas microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, sob agitação constante de 75 r.p.m., a fim de promover a formação inicial dos

biofilmes simples e mistos. Então, esses biofilmes iniciais foram cuidadosamente lavados com solução PBS estéril (2×), adicionados de novos meios de culturas e incubados a 37 °C por 24 horas (totalizando 48 horas), a fim de promover o desenvolvimento avançado dos biofilmes simples e mistos^{45; 64}.

Previamente ao tratamento com as nanopartículas, células aderentes (90min) e biofilmes iniciais (24 horas) e avançados (48 horas) foram cuidadosamente lavados (2×) com solução PBS estéril, para a remoção das células planctônicas. Então, todas essas fases de desenvolvimento dos biofilmes simples e mistos foram expostas às alíquotas de 100µl de soluções de AgNPs-HEScLeaf nas concentrações de: - 8,0mg/mL; 0,5mg/mL; e 0,125mg/mL (meio RPMI 1640 ou BHI) e incubadas a 37 °C por 5 minutos, sob agitação constante de 75 r.p.m., seguido por novas lavagens cuidadosas (2×) com solução PBS estéril. Soluções aquosas de clorexidina 0,12% foram utilizadas como controle positivo.

As atividades metabólicas celulares presentes nas três fases de desenvolvimento dos biofilmes simples e mistos foram monitoradas pelo método colorimétrico XTT ^{45; 65}. A solução de XTT (XTT sodium salt, SIGMA, Merck, Germany) foi preparada em água (Milli Q) na concentração de 1 mg/ml, esterilizada por filtração e estocada a -70 °C até o momento do uso.

Uma solução de menadiona (0,4mM em acetona; Menadione, SIGMA, Germany) foi adicionada na solução de XTT. Alíquotas de 200µl dessa solução de XTT-menadiona foram distribuídas nos poços das placas de microdiluição, contendo células aderentes ou biofilmes iniciais ou avançados previamente tratados com AgNPs-HEScLeaf e lavados com PBS. Então, essas placas foram incubadas no escuro a 37 °C por 3 horas. Então, alíquotas de 100µl de cada poço foram cuidadosamente transferidas para novas microplacas e o produto formazan solúvel foi quantificado por espectrofotometria a 492nm em leitor de Elisa (Multiskan, Ascent 354, Labsystems CE, Lês Ulis, França).

4.13 Microscopia Eletrônica de Varredura dos biofilmes

As avaliações ultra-estruturais e morfológicas das fases de desenvolvimento dos biofilmes simples e mistos avançados (90min – aderência celular; 24horas – fase inicial; e 48horas – biofilme maduro), sob a exposição das AgNPs-HEScLeaf (concentrações: 8,0mg/ml; 0,5mg/ml; e 0,125mg/ml), foram realizadas por meio da

microscopia eletrônica de varredura. As condições dos ensaios foram feitas conforme descrito previamente (item 4.12.), usando lâminas LAB-TEK (Nunc® Lab-Tek® Chamber Slide™ system, SIGMA, Merck, Germany). Essas foram cuidadosamente lavadas 2× com solução PBS e mantidas a temperatura ambiente até a completa secagem e fixadas (APÊNDICE - item. 5). As lâminas foram metalizadas com ouro a 20Ω por 120 segundos (Desk V – Standard, Delton Vacuum, LLC, JOEL USA, Inc.) e analisadas em aumento de 3,000× (MEV - JSM-6610 LV JEOL Tokyo, Japan)^{45; 66}.

4.14 Ensaios de Citotoxicidade In Vitro dos HEScLeaf e AgNPs-HEScLeaf

Previamente aos ensaios de citotoxicidade, o extrato da folha - HEScLeaf e a nanopartícula da folha - AgNPs-HEScLeaf foram diluídos em meio de cultura DMEM/F-12 (SIGMA-ALDRICH, Merck, Germany), suplementado com 10% de FBS (Fetal Bovine Serum, SIGMA-ALDRICH, Germany) e 1% de 100UI/ml de penicilina (Penicillin G sodium salt, SIGMA-ALDRICH, Germany), 1% de 100ug/ml de estreptomicina (Streptomycin sulfate salt, SIGMA-ALDRICH, Germany) e 1% de 2mmol/L de glutamina (L-Glutamine, SIGMA-ALDRICH, Germany), e esterilizados por filtração nas concentrações: - HEScLeaf: 10,37mg/mL; 5,18mg/mL; 2,59mg/mL; 1,29mg/mL, e; 0,68mg/ml; - AgNPs-HEScLeaf: 0,5mg/mL; 0,25mg/mL; 0,12mg/mL; 0,06mg/mL; e 0,03mg/ml.

Queratinócitos orais humanos (Human Oral Keratinocytes – HOK-18A) foram usados para a avaliação da citotoxicidade. HOKs foram cultivados em frascos de cultura estéreis de 75cm² (Costar Corp., MA, EUA), contendo meio de cultura DMEM/F-12, suplementado FBS + penicilina-estreptomicina-glutamina. Culturas celulares foram produzidas a cada três dias em condições atmosféricas de 5% de CO₂ a 37 °C (Heracell™ 150i CO2 Incubators with Stainless-Steel Chambers, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), a fim de se obter uma quantia celular adequada ao estudo de citotoxicidade. Em seguida, os HOKs cultivados foram semeados (30.000 células/cm²) em placas estéreis de 24 poços (Corning® Costar® TC-Treated Multiple Well Plates, SIGMA, Merck, Germany), com as mesmas condições nutricionais, e incubados a 37 °C por 48 horas sob uma atmosfera de 5% de CO₂. Então, os conteúdos líquidos dos poços foram

cuidadosamente substituídos por 1ml de meios de culturas estéreis e, novamente, incubados a 37 °C por 24 horas sob uma atmosfera de 5% de CO₂⁴⁵.

Para os tratamentos com diferentes concentrações, os conteúdos líquidos dos poços das culturas celulares foram cuidadosamente substituídos por 1ml de soluções de HEScLeaf e AgNPs-HEScLeaf (mantidas a 37 °C), seguido pela incubação a 37°C por 5 e 10 minutos, sob uma atmosfera de 5% de CO₂. Decorridos os tempos de tratamentos, os conteúdos dos poços das culturas foram cuidadosamente aspirados, lavados com PBS estéril, e incubados a 37°C por 4 horas, sob uma atmosfera de 5% de CO₂, com reagente de viabilidade celular alamarBlue™ (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) a 10% (vol/vol) em DMEM. Então, alíquotas de 100µl de cada poço foram transferidas para novas placas de microdiluição (96-well) e analisados em leitor de microplacas (BioTek™ Synergy™ H1 Hybrid Multi-Mode All Detection Modes Microplate Readers, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) com comprimentos de onda de 545/590nm.

Componentes controles também foram incluídos no ensaio de citotoxicidade: peróxido de hidrogênio a 3% (H₂O₂, SIGMA-ALDRICH, Merck KGaA, Germany) e clorexidina a 0,12% (Chlorhexidine digluconate,, Merck KGaA, Germany) foram usados como controles citotóxicos, enquanto meios de cultura DMEM, suplementado FBS + penicilina-estreptomicina-glutamina, e sem quaisquer outras substâncias testes, foram usados como controles de crescimento celular. Os procedimentos metodológicos de citotoxicidade foram realizados em sistemas de ensaios triplicatas e em três experimentos independentes⁴⁵.

4.15 Análises Estatísticas

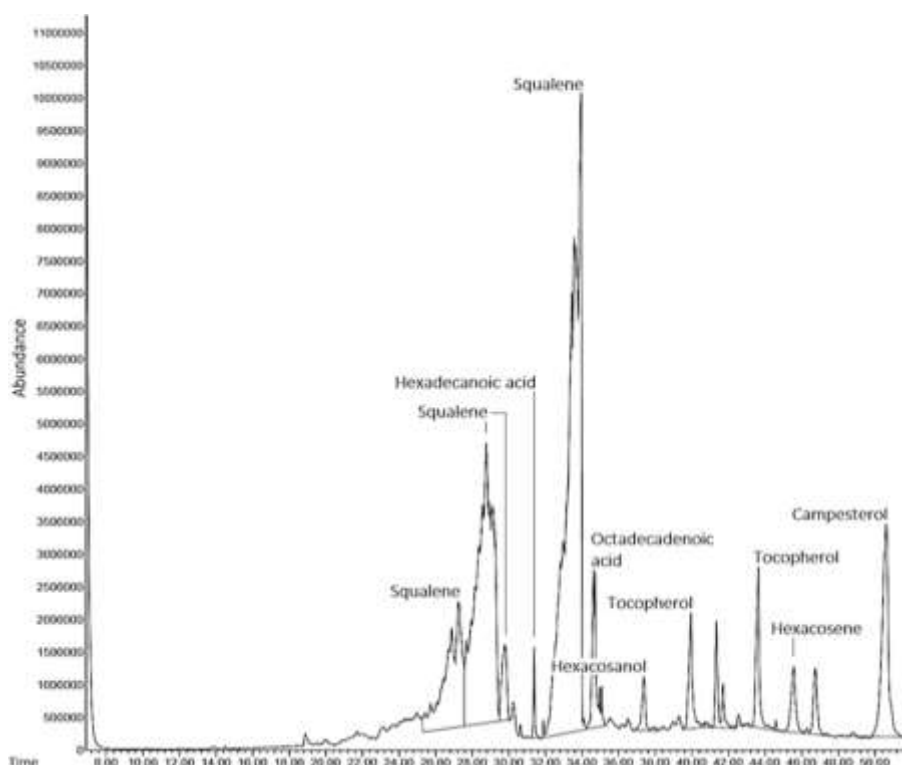
Os dados obtidos nos ensaios de susceptibilidade antimicrobiana e antibiofilme e citotoxicidade foram submetidos às análises de variância (ANOVA), e comparação das médias com os testes de Tukey e de Dunnett ($\alpha = 0,05$) usando o software GraphPad Prism versão 5.0c.

5 RESULTADOS

Os perfis cromatográficos e espectros de massas dos extratos da semente - HEScSeed, flor - HEScFlower e folha - HEScLeaf de *S. cumini* identificaram a presença diferentes compostos fitoquímicos, conforme seguem:

HEScSeed semente - *Squalene* (distribuição relativa igual a 77,15%; tempo de retenção igual a 27'26"/ 28'77"/ 29'76"/ e 33'87"); - *Campesterol* (distribuição relativa igual a 7,35%; tempo de retenção igual a 55'95"); - *Tocoferol* (distribuição relativa igual a 5,36%; tempo de retenção igual a 39'92" e 43'59"); - outros compostos (distribuição relativa igual a 6,79%); e não identificados (3,35%), (Figura 3);

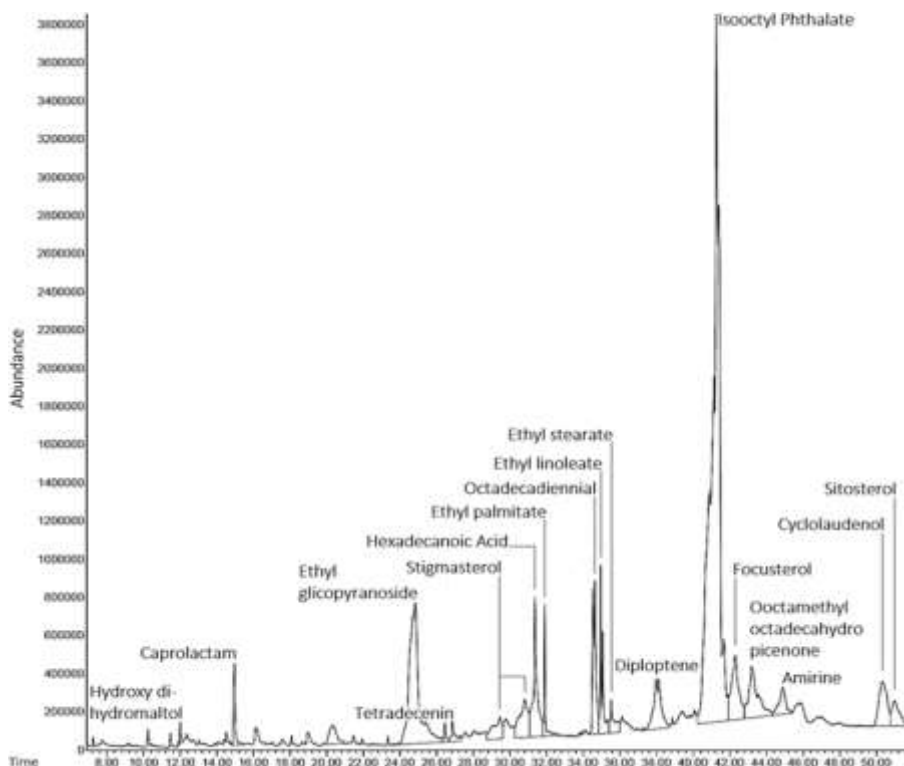
Figura 3 - Perfis cromatográficos do extrato de semente (HEScSeed) de *S. Cumini*.



Fonte: Elaboração própria.

HEScFlower flor – *Estigmasterol* (distribuição relativa igual a 4,62%; tempo de retenção igual a 29'44" e 30'08"); - *ácido Hexadecanóico* (distribuição relativa igual a 4,36%; tempo de retenção igual a 31'36"); - *Octadecadiennial* (distribuição relativa igual a 4,20%; tempo de retenção igual a 34'62") entre outros compostos (distribuição relativa igual a 22,27%); e não identificados (1,59%) (Figura 4).

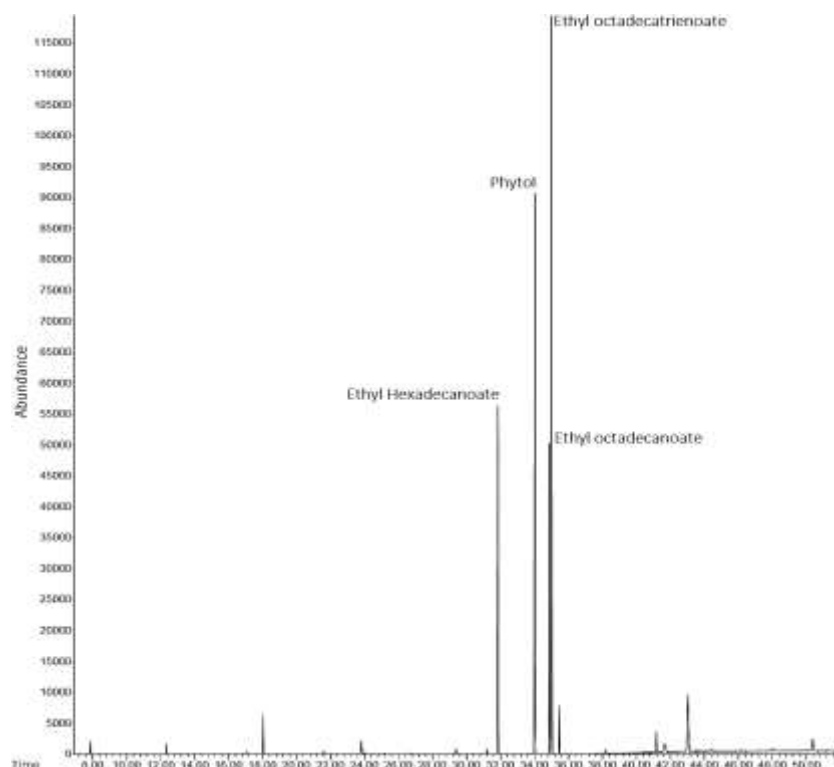
Figura 4 - Perfis cromatográficos do extrato da flor (HEScFlower) de *S. Cumini*.



Fonte: Elaboração própria.

HEScLeaf folha - *hexadecanoato de etila* (distribuição relativa igual a 16,68%; tempo de retenção igual a 31'850"), *fitol* (distribuição relativa igual a 29,15%; tempo de retenção igual a 34'015"), *octadecanoato de etila* (distribuição relativa igual a 14,78%; tempo de retenção igual a 34'88") e *octadecatrienoato de etila* (distribuição relativa igual a 39,69%; tempo de retenção igual a 35'01") (Figura 5).

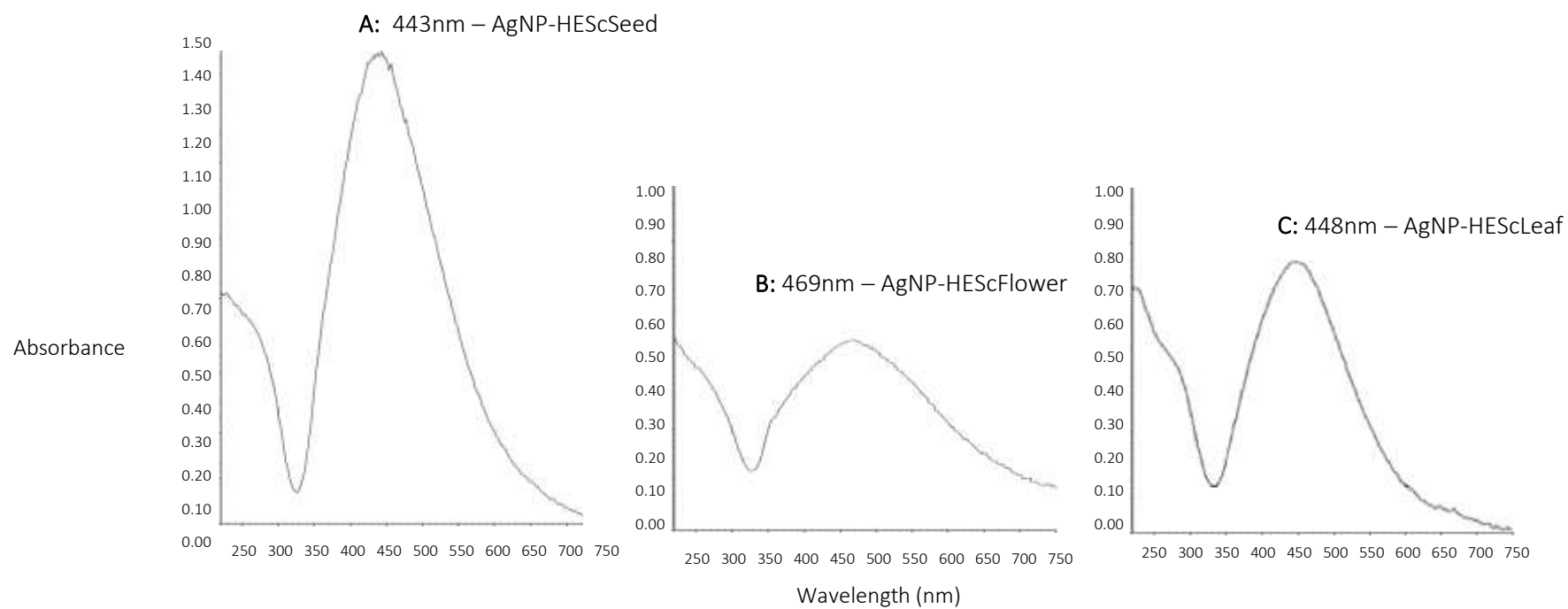
Figura 5 - Perfis cromatográficos do extrato da folha (HEScLeaf) de *S. Cumini*.



Fonte: Elaboração própria.

A adição dos extratos liofilizados das sementes, flores e folhas de *S. cumini* em água Milli Q resultou em soluções relativamente opacas de colorações marrom claro, bege e verde claro, respectivamente. A mistura desses extratos em soluções de 1mM AgNO₃, seguindo o protocolo de síntese verde (incubação a 90°C por 2 horas), mostrou soluções de coloração marrom escura e opaca indicando a formação de AgNPs (APÊNDICE – item. 6). A formação de AgNPs foi monitorada por análise UV-Visual e os espectros de absorção foram equivalentes a: AgNP-HEScSeed - 443nm, AgNP-HEScFlower - 469nm e AgNP-HEScLeaf - 448nm (Figura 6).

Figura 6 - Espectro de absorção UV-VIS das AgNPs de semente (A), flor (B) e folha (C).



Fonte: Elaboração própria.

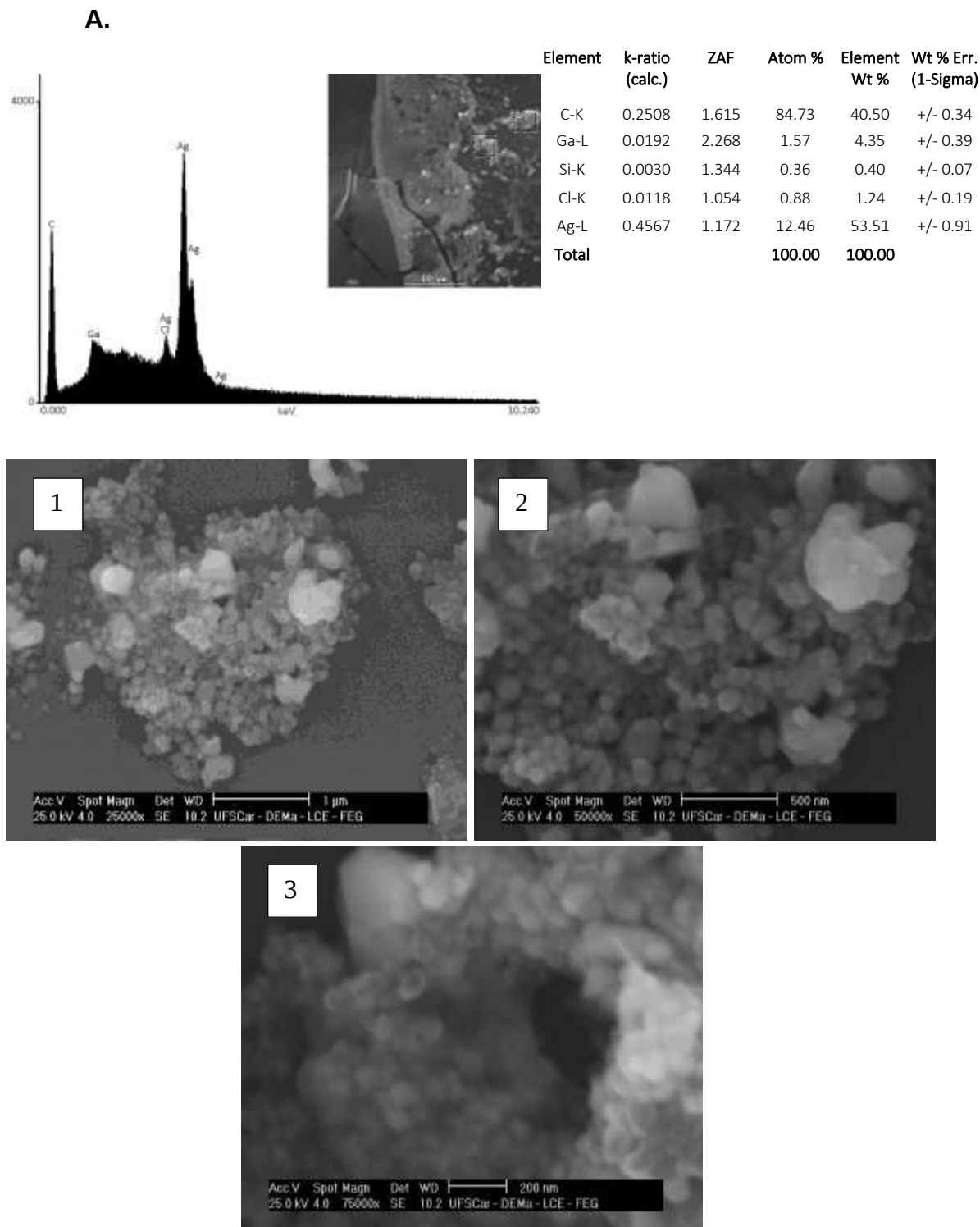
As análises de espectrometria de energia dispersiva de raio-X (EDS) em conjunto com microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelaram variações na proporção de elementos químicos e imagens, conforme seguem:

- **AgNPs-HEScSeed** - Ag (53,51%), C (40,5%), Cl (1,24%), Ga (4,35) e Si (0,4%) - Figura 7A;

- **AgNPs-HEScFlower** - Ag (24,38%), C (70,98%), Cl (2,26%), Mg (0,5%), P (1,33%) e Si (0,54%) - Figura 7B;

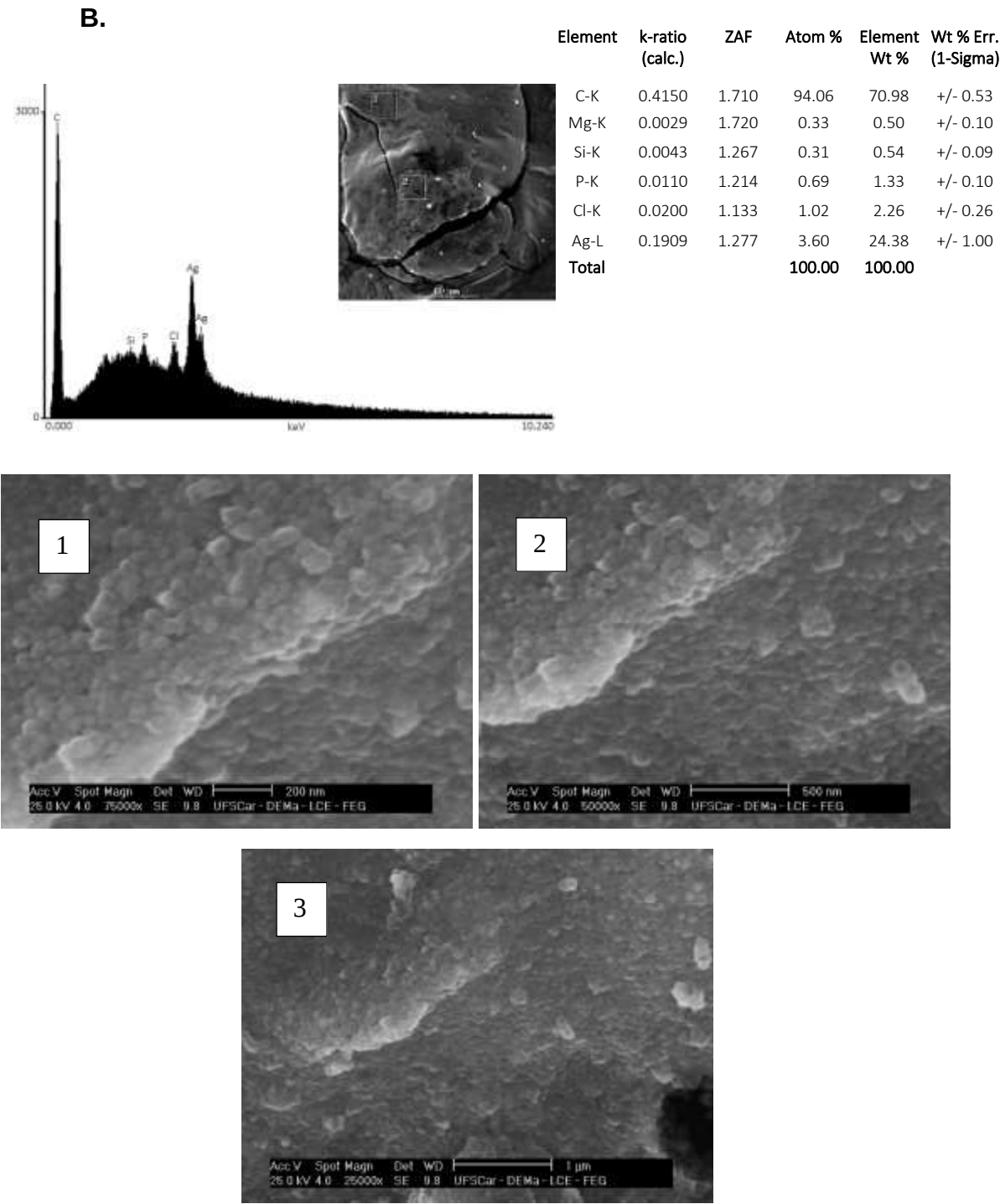
- **AgNPs-HEScLeaf** - Ag (23,23%), C (75,4%) e Cl (1,37%) - Figura 7C.

Figura 7A - Elementos químicos das AgNP-HEScSeed (**A**), analisados por EDS e MEV - FEG – magnificação de 25.000 x (**1**) / 50.000 x (**2**) / 75.000 x (**3**) vezes, mostrando as nanopartículas de Ag formadas e o local das análises.



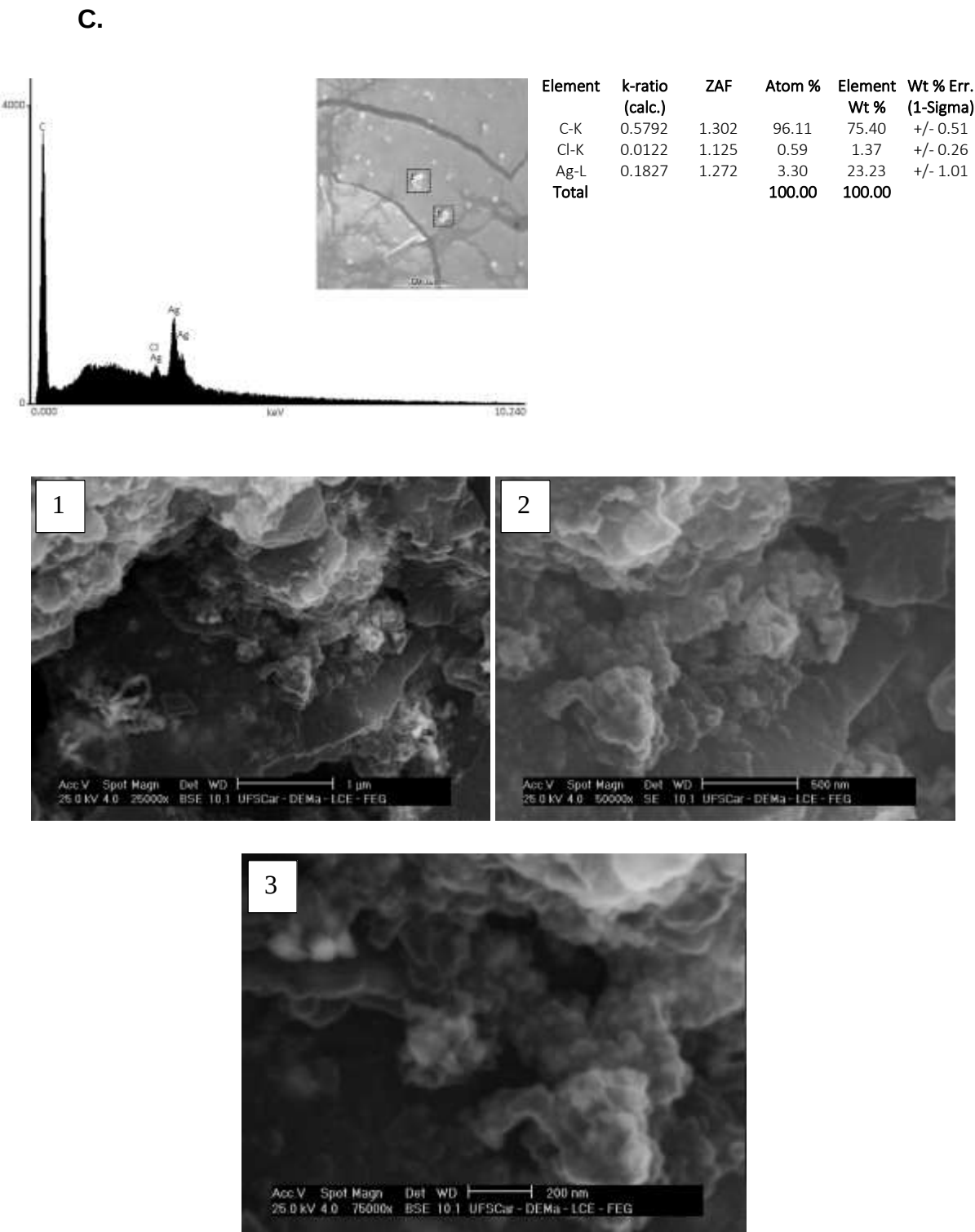
Fonte: Elaboração própria.

Figura 7B - Elementos químicos das AgNP-HEScFlower (A), analisados por EDS e MEV - FEG – magnificação de 25.000 x (1) / 50.000 x (2) / 75.000 x (3) vezes, mostrando as nanopartículas de Ag formadas e o local das análises.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 7C - Elementos químicos das AgNP-HEScLeaf (A), analisados por EDS e MEV - FEG – magnificação de 25.000 x (1) / 50.000 x (2) / 75.000 x (3) vezes, mostrando as nanopartículas de Ag formadas e o local das análises.

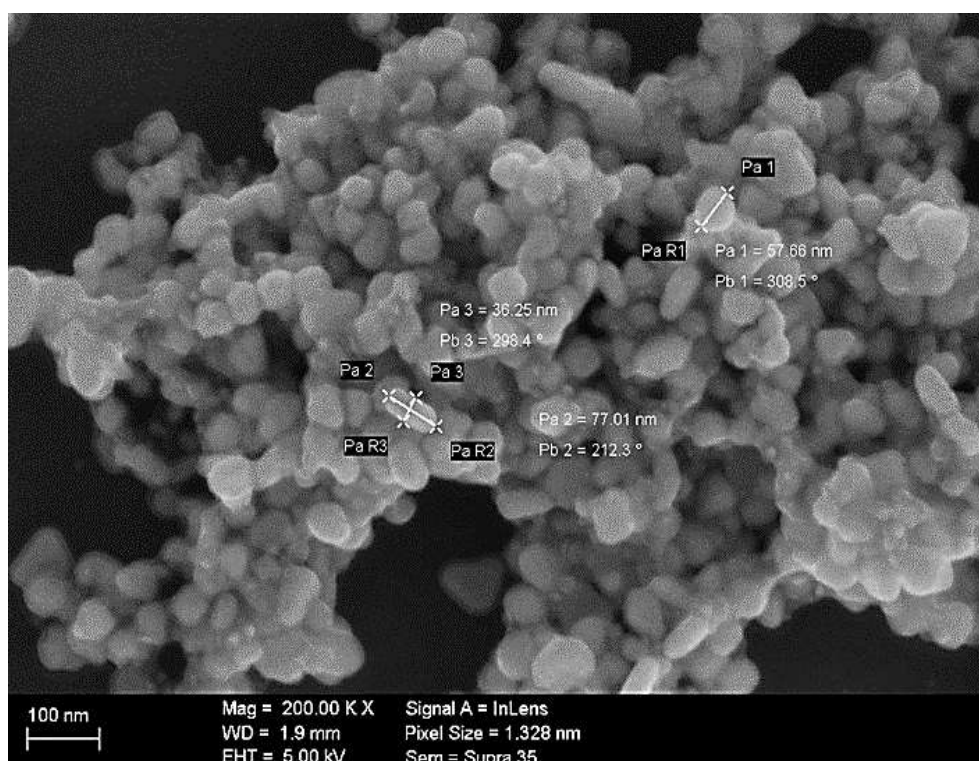


Fonte: Elaboração própria.

As análises ultra estruturais e morfológicas das AgNPs realizadas por FEG-SEM (Carl Zeiss Microscopy-Gemini Supra 35, software) em magnificação 200,000× mostraram variabilidades geométricas nas formas e diferentes dimensões:

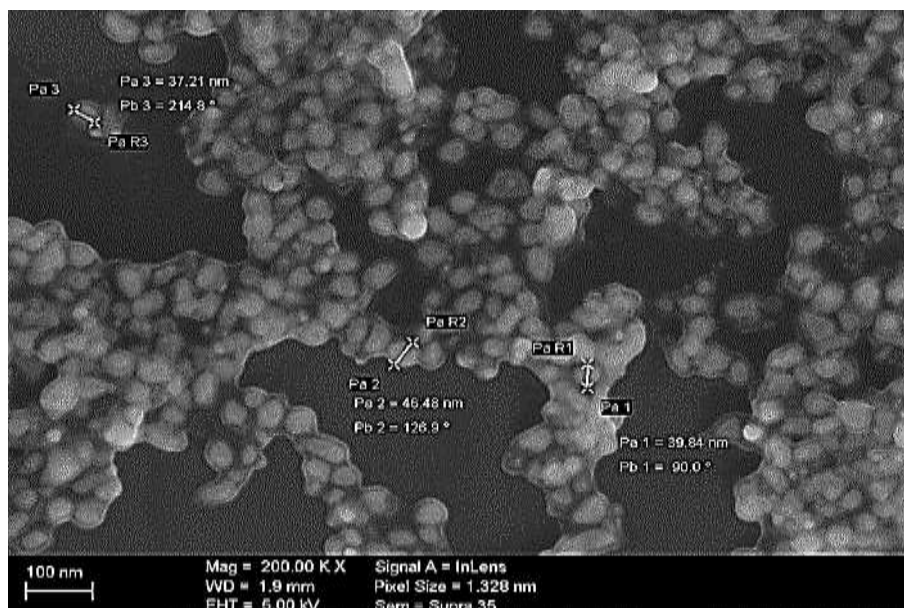
- **AgNPs-HEScSeed** - tamanho entre 36,25 – 77,01nm e formas predominantemente ovaladas e cilíndricas -Figura 8A;
- **AgNPs-HEScFlower** - tamanho entre 37,21 – 46,48nm e formas predominantemente ovaladas - Figura 8B;
- **AgNPs-HEScLeaf** - tamanho entre 65,12 – 129,7nm e formas ovaladas, cilíndricas e triangulares - Figura 8C.

Figura 8A - Morfologias ultra estruturais das AgNPs-HEScSeed. Obtido por FEG-SEM. Magnificação de 200.000 x.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 8B - Morfologias ultra estruturais das AgNPs-HEScFlower. Obtido por FEG-SEM. Magnificação de 200.000 x.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 8C - Morfologias ultra estruturais das AgNPs-HEScLeaf. Obtido por FEG-SEM. Magnificação de 200.000 x.

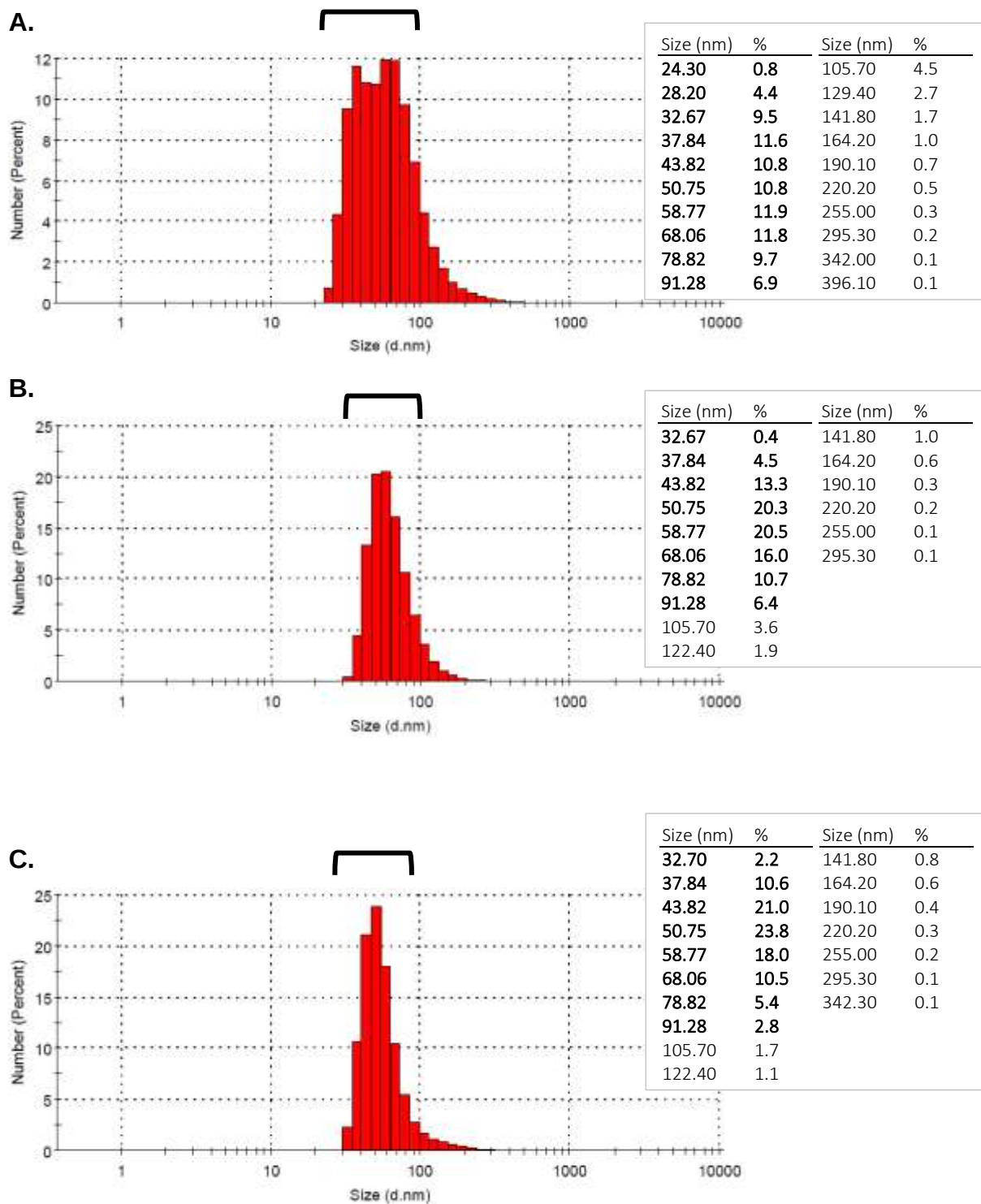


Fonte: Elaboração própria.

Após a síntese verde das nanopartículas, foi utilizada a técnica de DLS para verificar o tamanho das nanopartículas e a porcentagem (frequência) presente no meio. Foram identificados a partir das análises, tamanhos e frequências variadas,:

- ***AgNPs-HEScSeed*** - o tamanho das nanopartículas variou entre 24,30 a 396,10nm e pode-se observar que 88,1% (frequência no meio) ficou entre 24,30 a 91,28nm - Figura 9A;
- ***AgNPs-HEScFlower*** - o tamanho variou entre 32,67 a 295,30nm e 91,4% das nanopartículas formadas (frequência no meio) ficaram entre 32,67 a 91,28nm - Figura 9B;
- ***AgNPs-HEScLeaf*** - o tamanho das nanopartículas variou de 32,70 a 342,30nm, sendo 94.3% de tamanho (frequência no meio) entre 32.7 a 91.28nm, respectivamente - Figura 9C.

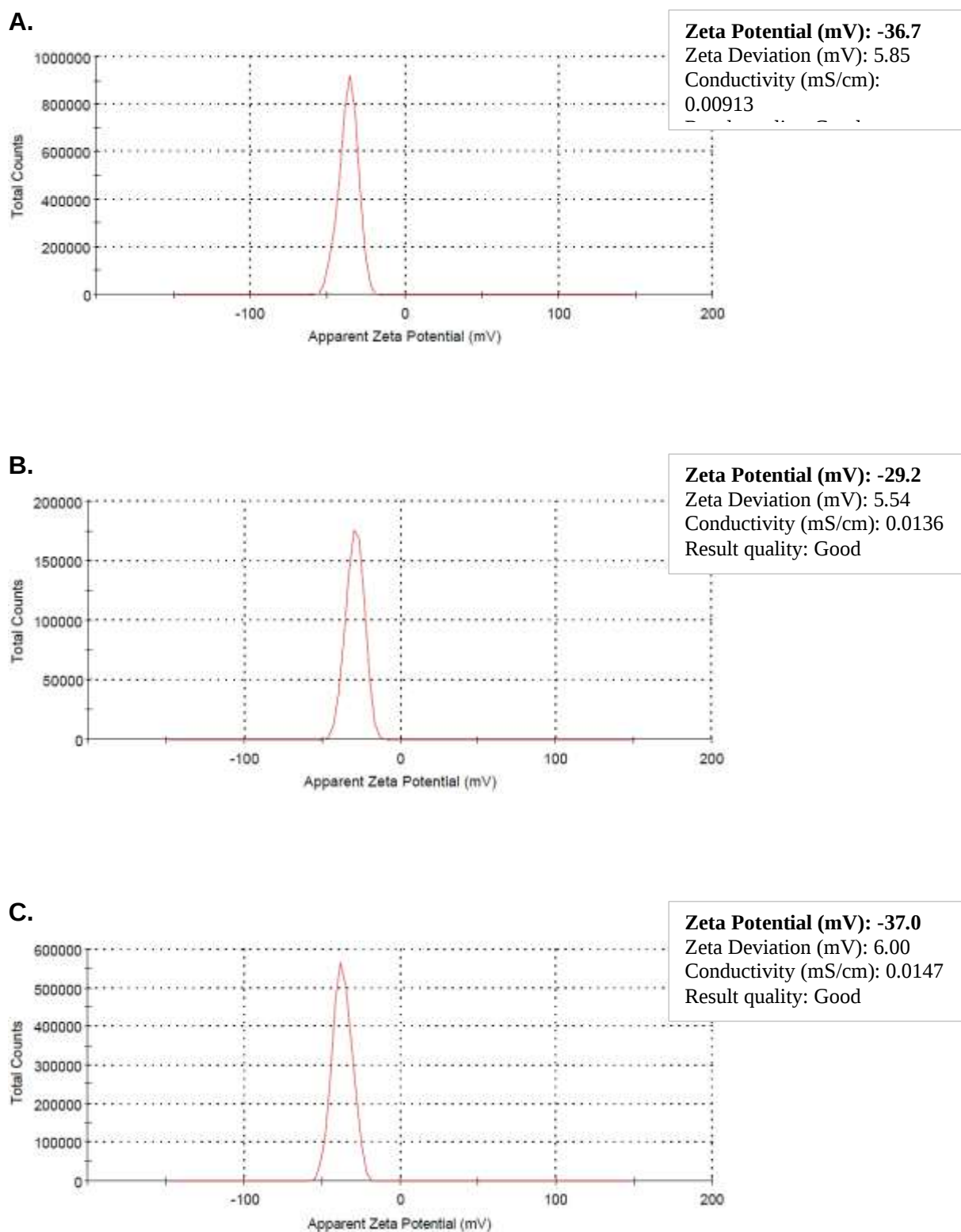
Figura 9 - Distribuição numérica e de tamanho das AgNPs-HEScSeed (A), AgNPs-HEScFlower (B) e AgNPs-HEScLeaf (C)



Fonte: Elaboração própria.

O Potencial Zeta foi utilizado para avaliar a estabilidade das nanopartículas. Pois é um parâmetro fundamental relacionado à estabilidade de dispersões, emulsões e suspensões. A sua medição permitiu observar as causas de desagregação ou floculação dos sistemas. Os resultados mostram que para as nanopartículas AgNPs-HEScSeed o valor do ZP foi $-36,7\text{mV}$ - Figura 10A. para as nanopartículas AgNPs-HEScFlower o ZP foi de $-29,2\text{mV}$ - Figura 10B e para as nanopartículas AgNPs-HEScLeaf o ZP foi de -37mV - Figura 10C.

Figura 10 - Análise do potencial zeta das AgNPs-HEScSeed (A), AgNPs-HEScFlower (B) e AgNPs-HEScLeaf (C).



Fonte: Elaboração própria.

Os resultados dos testes de sensibilidade antimicrobiana dos extratos de *S. cumini* mostraram valores de CIM variáveis dependendo da parte anatômica da planta e da espécie microbiana (Tabela 1).

Para as sementes de *S. cumini* - HEScSeed, esses valores variaram:

- anaeróbios estritos – de 0,648 até 2,593mg/ml;
- anaeróbios facultativos – de 1,296 até 2,593mg/ml;
- aeróbios – de 0,648 até 1,296mg/ml.

Para as flores de *S. cumini* - HEScFlower, os CIMs variaram:

- anaeróbios estritos - de 1,296 até 5,187mg/ml;
- anaeróbios facultativos e aeróbios - 2,593mg/ml.

Para as folhas de *S. cumini* - HEScLeaf, os CIMs variaram:

- anaeróbios estritos - de 1,296 até 10,375mg/ml;
- anaeróbios facultativos - de 1,296mg/ml;
- aeróbios - de 1,296 até 5,187mg/ml.

A espécie de *A. naeslundii* foi mais sensível ao extrato da flor de *S. cumini*, enquanto *S. oralis* mostrou maior sensibilidade ao extrato da folha e as demais espécies (*C. albicans*, *F. nucleatum*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *V. dispar*) exibiram maior sensibilidade ao extrato da semente. *S. mutans* mostrou maior sensibilidade tanto para o extrato da folha quanto semente de *S. cumini*.

Atividade bactericida de todos os extratos de *S. cumini* foi observada apenas para as espécies de *S. mutans* e *S. oralis*, geralmente na concentração acima do CIM. Para os demais microrganismos, todos os extratos mostraram atividade bacteriostática (*A. naeslundii*, *V. dispar*, *F. nucleatum*, *S. epidermidis* e *S. aureus*) ou fungistática (*C. albicans*). Os tamanhos dos halos também mostraram variações dependendo da espécie e da parte anatômica de *S. cumini* (Tabela 1).

Os resultados dos testes de sensibilidade antimicrobiana das AgNPs de *S. cumini* revelaram valores de CIM variáveis dependendo da parta

anatômica da planta para parte das espécies microbianas estudadas (Tabela 2).

Para as AgNPs-HEScSeed, esses valores variaram:

- anaeróbios estritos – de 0,031 até 0,125mg/ml;
- anaeróbios facultativos – de 0,031 até 0,250mg/ml;
- para os, e de 0,031 até 2,0mg/ml para os aeróbios.

Para as AgNPs-HEScFlower, os CIMs variaram:

- anaeróbios estritos – de 0,031 até 0,125mg/ml;
- anaeróbios facultativos – de 0,062 até 0,125mg/ml;
- aeróbios – de 0,250mg/ml.

Para as AgNPs-HEScLeaf, os CIMs variaram de:

- anaeróbios estritos – 0,031 até 0,250 mg/ml;
- anaeróbios facultativos – de 0,125 mg/ml;
- aeróbios – de 0,062 até 0,125 mg/ml.

As espécies de *A. naeslundii* e *V. dispar* foram mais sensíveis às AgNPs-HEScSeed e AgNPs-HEScFlower, enquanto *F. nucleatum* foi sensível aos três nanocompósitos (AgNPs-HEScSeed, AgNPs-HEScFlower e AgNPs-HEScLeaf). *S. oralis* foi mais sensível à AgNPs-HEScSeed, enquanto *S. mutans* foi mais sensível às AgNPs-HEScFlower e AgNPs-HEScLeaf. *C. albicans* e *S. aureus* mostraram maior sensibilidade à AgNPs-HEScLeaf e *S. epidermidis* mostrou maior sensibilidade à AgNPs-HEScSeed. Todas as AgNPs mostraram atividades bacteriostática ou fungistática a partir das concentrações testadas. Os tamanhos dos halos também mostraram variações dependendo da espécie microbiana e das AgNPs (Tabela 2).

A razão entre os valores de MIC dos extratos vegetais HESc^(a) e das nanopartículas AgNPs-HESc^(b) ($a/a + b$) foi presentemente refletida como um indicativo quantitativo da amplificação de resposta antimicrobiana entre as substâncias testes: sendo que valores >0.9 correspondem à uma concentração da substância teste *a* com efeito biológico (antimicrobiano) acima de $10\times$ a

concentração da substância teste b (i.e., a/b), ou então, a concentração efetiva (antimicrobiana) da substância teste b é no mínimo $10\times$ menor que a substância a quando $a/a+b > 0.9$. Portanto, as AgNP-HEScSeed tiveram efeitos biológicos (antimicrobianos) a partir das concentrações de cerca de $83\times$ (*S. oralis*), $20\times$ (*A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *S. epidermidis* e *V. dispar*), $5\times$ (*S. aureus* e *S. mutans*) ou $0.6\times$ (*C. albicans*) maior quando comparadas com os HEScSeed. As AgNP-HEScFlower tiveram efeitos antimicrobianos a partir das concentrações de cerca de $166\times$ (*F. nucleatum*), $41\times$ (*S. oralis* e *V. dispar*), $20\times$ (*S. mutans*) ou $10\times$ (*A. naeslundii*, *C. albicans*, *S. epidermidis* e *S. aureus*) maior quando comparadas com os HEScFlower. As AgNP-HEScLeaf tiveram efeitos antimicrobianos a partir das concentrações de cerca de $83\times$ (*V. dispar*), $41\times$ (*C. albicans* e *F. nucleatum*), $20\times$ (*A. naeslundii* e *S. aureus*) ou $10\times$ (*S. epidermidis*, *S. oralis* e *S. mutans*) maior quando comparadas com os HEScLeaf (Tabela 3).

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (CIM), Concentração microbicida mínima (CMM) e valores médios dos halos de inibição ($\varnothing$ mm) obtidos a partir de testes de suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* de extratos de *S. cumini* (semente-seed, flor-flower e folha-leaf).

Microrganismos	Extrato de <i>Syzygium cumini</i>									Controles	
	Seed			Flower			Leaf			Chlorhexidine	Fluconazol
	CIM	CMM	M $\varnothing_h$	CIM	CMM	M $\varnothing_h$	CIM	CMM	M $\varnothing_h$	M $\varnothing_h$	M $\varnothing_h$
Anaeróbios estritos											
<i>A. naeslundii</i>	2.5937	-	13	1.2968	-	14	5.1875	-	12	13	na
<i>V. dispar</i>	1.2968	-	15	2.5937	-	15	10.375	-	13	15	na
<i>F. nucleatum</i>	0.64	-	18	5.1875	-	10	1.2968	-	17	17	na
Anaeróbios facultativos											
<i>S. mutans</i>	1.2968	2.5937	13	2.5937	5.1875	7	1.2968	1.2968	12	13	na
<i>S. oralis</i>	2.5937	5.1875	12	2.5937	5.1875	10	1.2968	2.5937	10	16	na
Aeróbios											
<i>C. albicans</i>	1.2968	-	7	2.5937	-	8	5.1875	-	-	14	25*
<i>S. epidermidis</i>	0.6484	-	8	2.5937	-	8	1.2968	2.5937	8	17	na
<i>S. aureus</i>	0.6484	-	11	2.5937	-	12	1.2968	2.5937	10	17	na

CIM: Concentração Inibitória Mínima (mg/ml); MMC: Concentração Microbicida Mínima (mg/ml); M $\varnothing_h$: Média dos valores de diâmetro ($\varnothing$) de halos de inibição(mm); na: Não aplicável. *Fluconazol: halo > 19 mm (Sensível), halo 14-19 mm (Intermediário) e halo < 14 mm (Resistente).

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM), Concentração microbicida mínima (CMM) e valores médios dos halos de inibição ($\varnothing$ mm) obtidos a partir de testes de suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* AgNPs-extrato planta (AgNPs-HEScSeed, AgNPs-HEScFlower e AgNPs-HEScLeaf).

Microrganismos	AgNPs extrato de <i>Syzygium cumini</i>									Controles	
	AgNPs-HEScSeed			AgNPs-HEScFlower			AgNPs-HEScLeaf			Chlorhexidine	Fluconazol
	MIC	MMC	M $\varnothing_h$	MIC	MMC	M $\varnothing_h$	MIC	MMC	M $\varnothing_h$	M $\varnothing_h$	M $\varnothing_h$
Anaeróbios estritos											
<i>A. naeslundii</i>	0.125	-	10	0.125	-	12	0.25	-	9	13	na
<i>V. dispar</i>	0.0625	-	7	0.0625	-	7	0.125	-	7	15	na
<i>F. nucleatum</i>	0.0312	-	9	0.0312	-	9	0.0312	-	9	17	na
Anaeróbios facultativos											
<i>S. mutans</i>	0.25	-	10	0.125	-	8	0.125	-	7	13	na
<i>S. oralis</i>	0.0312	-	8	0.0625	-	10	0.125	-	10	16	na
Aeróbios											
<i>C. albicans</i>	2	-	-	0.25	-	9	0.125	-	13	14	25*
<i>S. epidermidis</i>	0.0312	-	8	0.25	-	12	0.125	-	12	17	na
<i>S. aureus</i>	0.125	-	11	0.25	-	12	0.0625	-	12	17	na

CIM: Concentração Inibitória Mínima (mg/ml); MMC: Concentração Microbicida Mínima (mg/ml); M $\varnothing_h$: Média dos valores de diâmetro ($\varnothing$) de halos de inibição(mm); na: Não aplicável. *Fluconazol: halo > 19 mm (Sensível), halo 14-19 mm (Intermediário) e halo < 14 mm (Resistente).

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 3 - Perfil quantitativo da amplificação de resposta antimicrobiana entre os HESc^(a) e as suas respectivas AgNPs-HESc^(b), obtido a partir da razão entre os valores de CIM.

Microrganismos	Resposta Biológica					
	<i>S. cumini</i> seed		<i>S. cumini</i> flower		<i>S. cumini</i> leaf	
	$a/(a+b)$	ARA ($n \times$)	$a/(a+b)$	ARA ($n \times$)	$a/(a+b)$	ARA ($n \times$)
Anaeróbios estritos						
<i>A. naeslundii</i>	0.954	20.750	0.912	10.374	0.954	20.750
<i>V. dispar</i>	0.954	20.749	0.976	41.499	0.988	83.000
<i>F. nucleatum</i>	0.954	20.513	0.994	166.266	0.977	41.564
Anaeróbios facultativos						
<i>S. mutans</i>	0.838	5.187	0.954	20.750	0.912	10.374
<i>S. oralis</i>	0.988	83.131	0.976	41.499	0.912	10.374
Aeróbios						
<i>C. albicans</i>	0.393	0.648	0.912	10.375	0.976	41.500
<i>S. epidermidis</i>	0.954	20.782	0.912	10.375	0.912	10.374
<i>S. aureus</i>	0.838	5.187	0.912	10.375	0.954	20.749

As letras A e B correspondem ao HESc e seus AgNP-HESc. ARA correspondem à Amplificação da Resposta Antimicrobiana.

Fonte: Elaboração própria.

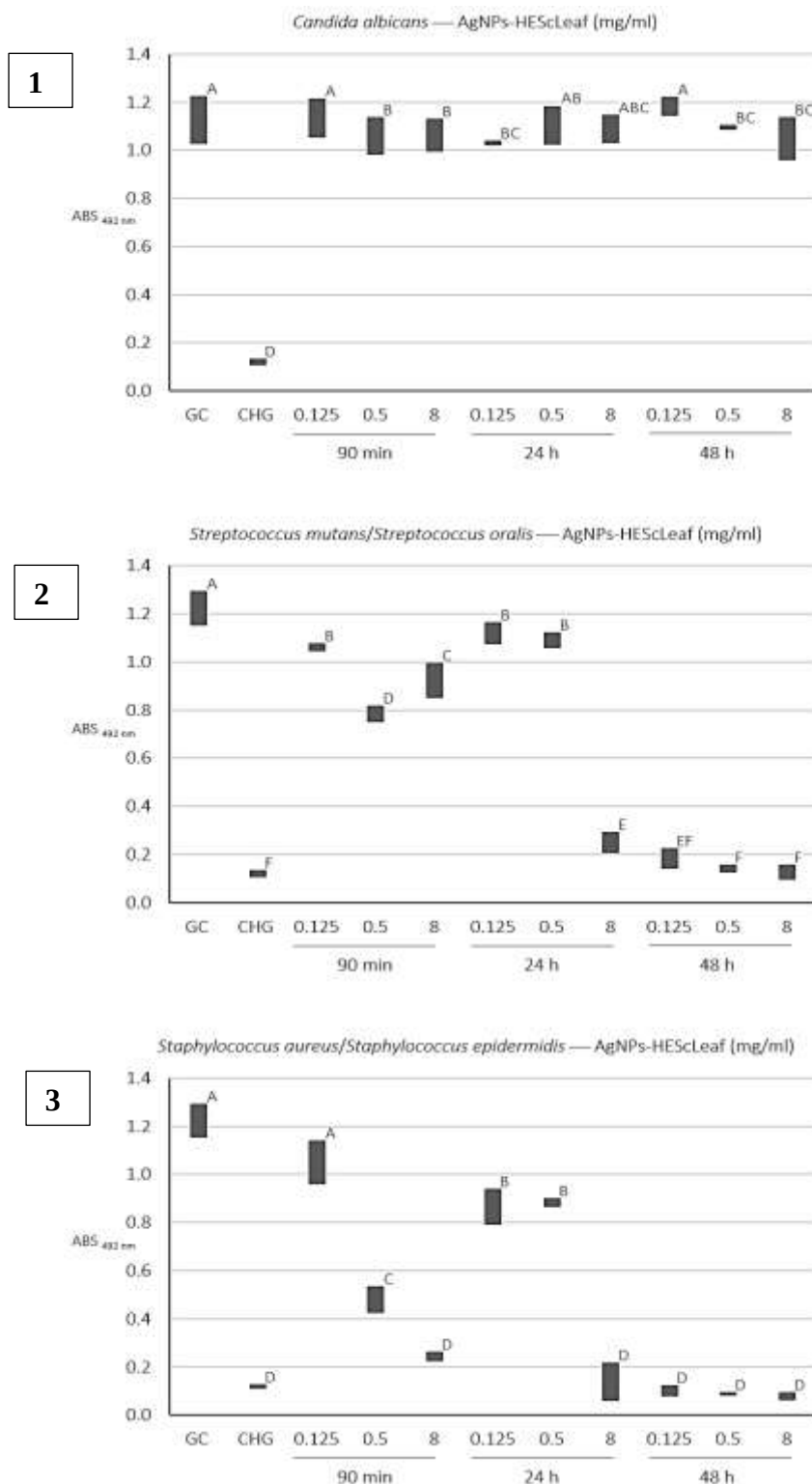
Para a cinética de formação do biofilme de *C. albicans*, não foram observadas diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$) entre o controle de crescimento e os tratamentos com AgNPs-HEScLeaf nas concentrações de 0,125mg/ml nos tempos de 90min (adesão celular) e 48horas (biofilme maduro), bem como nas concentrações de 0,5mg/ml e 8mg/ml no tempo de 24horas (biofilme inicial). Ações contra a adesão celular e antibiofilme de *C. albicans* estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram observadas com os tratamentos de AgNPs-HEScLeaf nas concentrações de 0,125mg/ml no tempo de 24horas (biofilme inicial), e 0,5mg/ml e 8mg/ml nos tempos de 90min (adesão celular) e 48horas (biofilme maduro). Diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) foram observadas entre o tratamento com CHX (digluconato de clorexidina a 0,12%) e o tratamento com AgNPs-HEScLeaf em todas as concentrações e tempos, e o controle de crescimento (GC) (Tabela A1 – APÊNDICE – item. 7 e Figura 11 e 12).

Para o biofilme misto de *S. mutans* e *S. oralis*, diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$) foram observadas entre o controle de crescimento e os tratamentos com AgNPs-HEScLeaf em todas as concentrações e tempos, e o tratamento com CHX (digluconato de clorexidina a 0,12%). Diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$) não foram observadas entre (i) os tratamentos com AgNPs-HEScLeaf nas concentrações de 0,5mg/ml no tempo de 24horas (biofilme misto inicial) e na concentração de 0,125mg/ml nos tempos de 90min (adesão celular mista) e 24horas (biofilme misto inicial), ou ainda, entre (ii) os tratamentos com AgNPs-HEScLeaf nas concentrações de 8mg/ml, 0,5mg/ml e 0,125mg/ml no tempo de 48horas (biofilme misto maduro), e o tratamento com CHX (digluconato de clorexidina a 0,12%), ou ainda, entre (iii) os tratamentos com AgNPs-HEScLeaf na concentração de 8mg/ml no tempo de 24horas (biofilme misto inicial) e na concentração de 0,125mg/ml no tempo de 48horas (biofilme misto maduro). Ações contra a adesão celular mista e antibiofilme misto de *S. mutans* e *S. oralis* estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram observadas com os tratamentos de AgNPs-HEScLeaf em todas as concentrações (0,125mg/ml, 0,5mg/ml e 8mg/ml) e tempos (90min, 24horas e 48horas). Entretanto, apenas os tratamentos com as AgNPs-HEScLeaf nas concentrações de 8mg/ml, 0,5mg/ml e 0,125mg/ml e no tempo de 48horas (biofilme misto maduro) produziram idênticos efeitos deletérios ($p < 0,05$) aos da clorexidina a 0,12% (i.e., ação contra a adesão celular mista e

antibiofilme misto de *S. mutans* e *S. oralis*) (Tabela A1 – APÊNDICE – item. 7 e Figura 11 e 12).

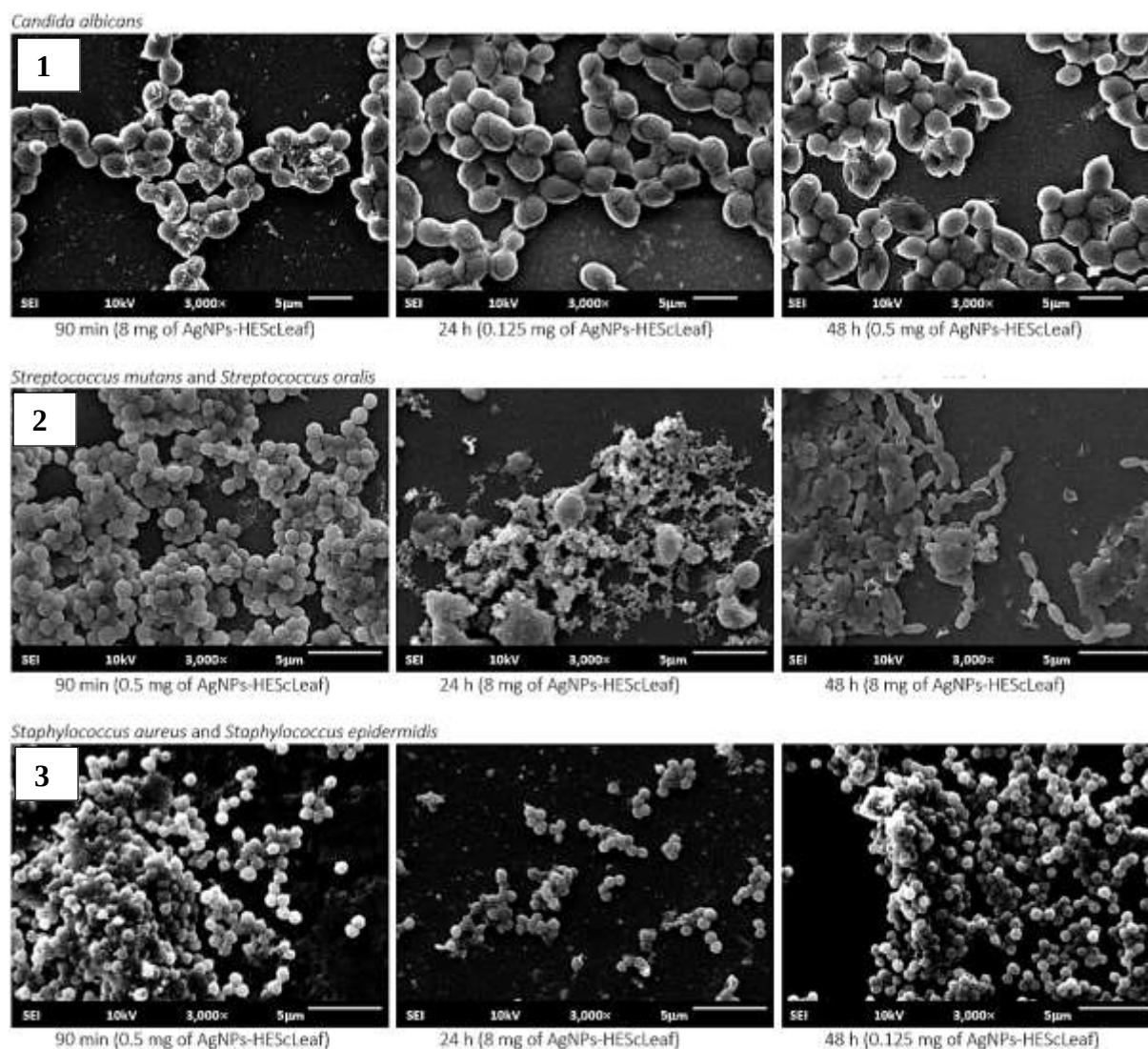
Para o biofilme misto de *S. aureus* e *S. epidermidis*, diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$) foram observadas entre o controle de crescimento e os tratamentos com AgNPs-HEScLeaf na maioria das concentrações e todos os tempos (i.e., exceto na concentração de 0,125mg/ml no tempo de 90min), e o tratamento com CHX (digluconato de clorexidina a 0,12%). Diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$) não foram observadas entre (i) os tratamentos com AgNPs-HEScLeaf nas concentrações de 0,5mg/ml e 0,125mg/ml no tempo de 24horas (biofilme misto inicial), ou ainda, entre (ii) os tratamentos com AgNPs-HEScLeaf nas concentrações de 8mg/ml nos tempos de 90min (adesão celular mista) e 24horas (biofilme misto inicial), e nas concentrações de 8mg/ml, 0,5mg/ml e 0,125mg/ml no tempo de 48horas (biofilme maduro). Ações contra a adesão celular mista e antibiofilme misto de *S. aureus* e *S. epidermidis* estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram observadas com os tratamentos de AgNPs-HEScLeaf nas concentrações de 0,5mg/ml e 8mg/ml no tempo de 90min, bem como todas as concentrações (0,125mg/ml, 0,5mg/ml e 8mg/ml) nos tempos de 24horas e 48horas. Entretanto, os tratamentos com as AgNPs-HEScLeaf nas concentrações de 8mg/ml nos tempos de 90min (adesão celular mista) e 24horas (biofilme misto inicial), e todas as concentrações (0,125mg/ml, 0,5mg/ml e 8mg/ml) no tempo de 48horas (biofilme misto maduro), produziram idênticos efeitos deletérios ($p < 0,05$) aos da clorexidina a 0,12% (i.e., ação contra a adesão celular mista e antibiofilme misto de *S. aureus* e *S. epidermidis*) (Tabela A1 – APÊNDICE – item. 7 e Figura 11 e 12).

Figura 11 - Perfis semiquantitativos do desenvolvimento dos biofilmes simples (*C. albicans* - **1**) e mistos (*S. mutans* + *S. oralis* - **2** e *S. aureus* + *S. epidermidis* - **3**) obtidos a partir dos tratamentos com diferentes concentrações de AgNPs-HEScLeaf por 5 minutos. Médias com as mesmas letras (A, B, C, D, E ou F) não são significativamente diferentes ($p < 0,05$). GC: controle de desenvolvimento do biofilme. CHX: Digluconato de clorexidina a 0,12%.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 12 - Imagens ultra estruturais e morfológicas dos biofilmes simples (*C. albicans* - **1**) e mistos (*S. mutans* + *S. oralis* - **2** e *S. aureus* + *S. epidermidis* - **3**), sob a exposição das AgNPs-HEScLeaf - magnificação de 3.000 X.



Fonte: Elaboração própria.

A exposição de HOKs aos tratamentos com o HEScLeaf e as AgNPs-HEScLeaf por 5 min e 10 min resultou em citotoxicidade dose-dependente. Os controles experimentais de citotoxicidade em HOKs, digluconato de clorexidina a 0,12% (CHX) e peróxido de hidrogênio a 3% (H₂O₂), mostraram diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$) entre si e com o controle de crescimento celular (GC), isto é, HOKs não expostos ao HEScLeaf e as AgNPs-HEScLeaf.

HOKs tratados com 0,68mg/ml de HEScLeaf por 5min não exibiram diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$) ao GC, ao contrário das demais concentrações de HEScLeaf (1,29mg/ml; 2,59mg/ml; 5,18mg/ml; e 10,37mg/ml) e em ambos os tempos de 5min e 10min (incluindo 0,68mg/ml em 10min).

No tempo de 5min, a exposição de HOKs nas concentrações de 1,29mg/ml e 2,59mg/ml de HEScLeaf produziu efeitos citotóxicos menores ($p < 0,05$) do que o CHX, enquanto nas concentrações de 5,18mg/ml e 10,37mg/ml de HEScLeaf houve a produção de efeitos citotóxicos intermediários ($p < 0,05$) aos controles experimentais de citotoxicidade CHX e H₂O₂.

No tempo de 10min, HOKs tratados nas concentrações de 0,68mg/ml e 1,29mg/ml de HEScLeaf produziram efeitos citotóxicos menores ($p < 0,05$) do que o CHX, enquanto na concentração de 2,59mg/ml de HEScLeaf ocorreu um efeito idêntico ($p < 0,05$) ao CHX, e nas concentrações de 5,18mg/ml e 10,37mg/ml de HEScLeaf houve a produção de efeitos citotóxicos intermediários ($p < 0,05$) aos controles experimentais de citotoxicidade CHX e H₂O₂ (Tabela A2 – APÊNDICE – item. 8 e Figura 13).

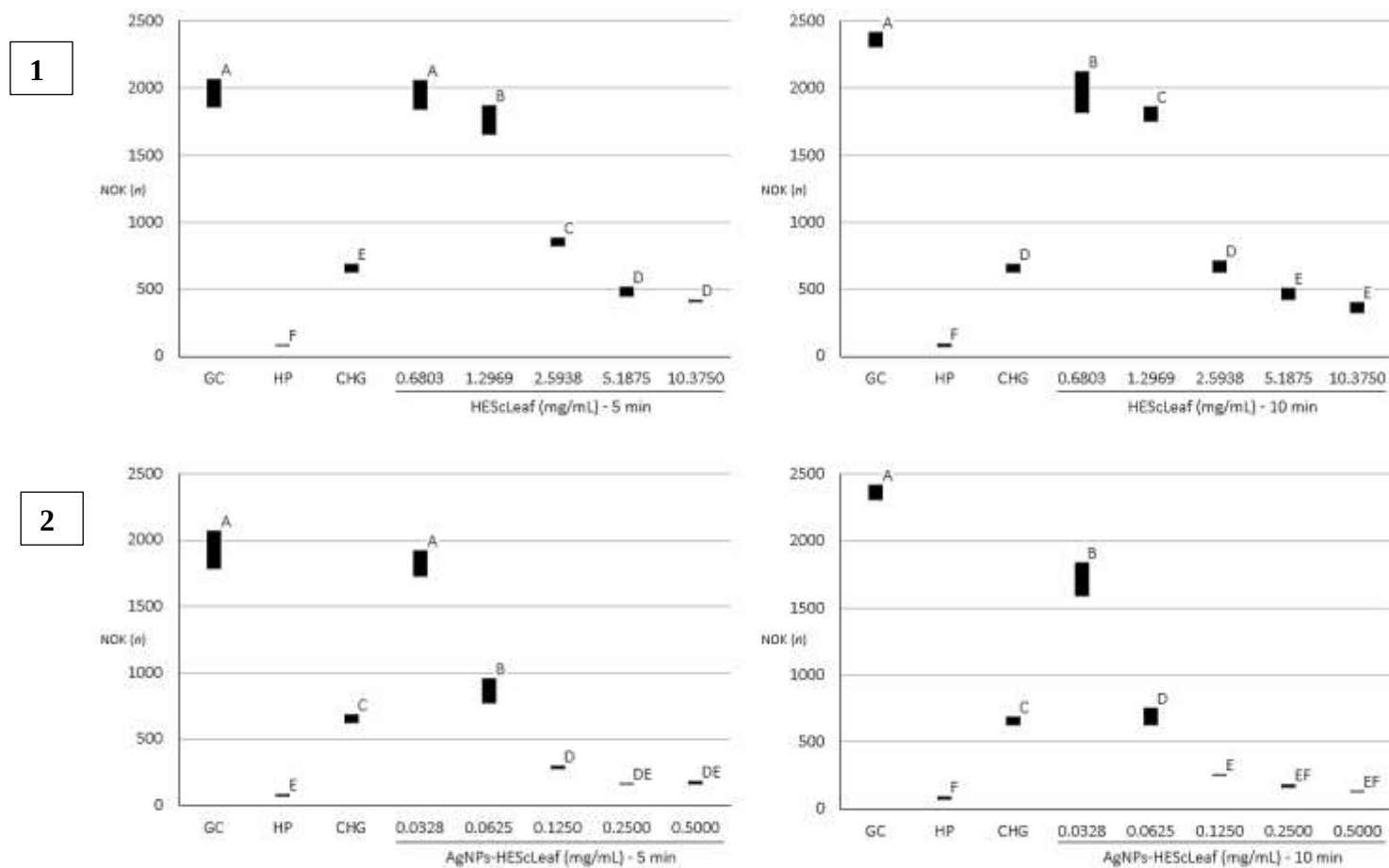
Apesar das concentrações das AgNPs-HEScLeaf serem menores no tratamento de HOKs, o seu comportamento citotóxico foi similar ao HEScLeaf. HOKs tratados com 0,03mg/ml de AgNPs-HEScLeaf por 5 min não exibiram diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$) ao GC, ao contrário das demais concentrações das AgNPs-HEScLeaf (0,062mg/ml; 0,125mg/ml; 0,250mg/ml; e 0,500mg/ml) e em ambos os tempos de 5min e 10 min (incluindo 0,032mg/ml em 10min).

No tempo de 5min, a exposição de HOKs na concentração de 0,062mg/ml produziu efeitos citotóxicos menores ($p < 0,05$) do que o CHX, enquanto na concentração de 0,125mg/ml de AgNPs-HEScLeaf houve a produção de efeito citotóxico intermediário ($p < 0,05$) aos controles experimentais de citotoxicidade CHX

e H₂O₂, e nas concentrações de 0,250mg/ml e 0,500mg/ml ocorreram efeitos citotóxicos idênticos ($p < 0,05$) ao H₂O₂.

No tempo de 10min, HOKs tratados na concentração de 0,032mg/ml de AgNPs-HEScLeaf produziram efeitos citotóxicos menores ($p < 0,05$) do que o CHX, enquanto nas concentrações de 0,062mg/ml e 0,125mg/ml houve a produção de efeitos citotóxicos intermediários ($p < 0,05$) aos controles experimentais de citotoxicidade CHG e H₂O₂, e nas concentrações de 0,250mg/ml e 0,500mg/ml mg/ml ocorreram efeitos citotóxicos idênticos ($p < 0,05$) ao H₂O₂ (Tabela A2 – APÊNDICE – item. 8 e Figura 13).

Figura 13 - Perfis quantitativos de HOKs obtidos a partir dos tratados com diferentes concentrações de HEScLeaf (1) por 5 e 10 minutos e AgNPs-HEScLeaf (2) por 5 e 10 minutos. Médias com as mesmas letras (A, B, C, D, E F) não são significativamente diferentes ($p < 0,05$). GC: controle de crescimento celular. H_2O_2 : peróxido de hidrogênio. CHX: Digluconato de clorexidina (12mg/ml).



Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

Diversas pesquisas a partir de diferentes partes anatômicas da planta do jambolão avaliaram os compostos fitoterápicos e sua ação farmacológica, no tratamento de diabetes⁶⁷, como antioxidante⁶⁸, anti-inflamatórios⁶⁹ e antimicrobiano^{70, 71}.

A ação antimicrobiana dos extratos da semente, flor e folha, juntamente com a síntese, caracterização de suas nanopartículas de prata e a atividade antibiofilme, com ênfase em microrganismos patogênicos de importância médico-odontológica e a atividade citotóxica do extrato e das nanopartículas de prata das folhas de *S. cumini* foram avaliadas neste estudo.

A triagem e identificação fitoquímica dos principais componentes dos extratos da semente, flor e folha de *S. cumini* foram avaliadas e diferentes componentes com atividades biológicas em seres humanos foram comprovadas. O *squaleno* pode ser encontrado em certos óleos de peixe, especialmente óleo de fígado de tubarão, em grandes quantidades e alguns óleos vegetais. Estudo de Kim e Karadeniz⁷², também identificaram e comprovaram a bioatividade do *squaleno* com importante potencial nas indústrias nutricional e farmacêutica.

Os resultados apresentados neste estudo relatados que identificou substâncias como o *campesterol* e *stigmasterol* foram descritos na revisão de literatura de Choudhary e Tran⁷³ que trata das características dos fitoesteróides (PSs- Phytosterols) encontrados em vários grupos de plantas e sua ação nos seres humanos. Segundo o autor os componentes apresentaram fitoesteróides integrantes das membranas celulares vegetais, com efeitos estabilizadores na bicamada fosfolipídica, assim como o colesterol nas membranas celulares animais com capacidade de reduzir os níveis de LDL-colesterol de forma natural de seres humanos.

Outra substância presente na identificação fitoquímica foi o tocoferol (vitamina E), corroborando com os achados de Azlina et al.⁷⁴. O tocoferol é um potente antioxidante com capacidade de reduzir o estresse oxidativo e segundo Azlina et al.⁷⁴ foi capaz de reduzir úlceras gástricas induzidas pelo estresse e enzimas hepáticas. Estudos recentes demonstraram que a utilização de tocoferol combinado com outras substâncias e alimentos, como por exemplo, o alho e vitamina C, são capazes de diminuir os efeitos tóxicos dos metais pesados em organismos e tecidos

(órgãos reprodutivos, sistema renal, sistema nervoso central, fígado, pulmões) e essas estratégias terapêuticas são benéficas tanto para a prevenção quanto para aliviar a toxicidade do chumbo e outros metais⁷⁵.

O *fitol* também identificado neste estudo foi associado por Islam et al.⁷⁶ a determinadas atividades biológicas, destacando-se como ansiolíticos, moduladores do metabolismo, antioxidantes, anti-inflamatórios, moduladores imunológicos e antimicrobianos sendo considerado um candidato potencial a uma ampla gama de aplicações na indústria farmacêutica.

Os hexadecanoato de etila, octadecanoato de etila e octadecatrienoato de etila e os demais compostos identificados neste correspondem aos ésteres etílicos de ácidos graxos (*fatty acid ethyl esters* – FAEEs), ou seja, produtos de esterificação de ácidos graxos e etanol. Observações de estudos in vitro e in vivo revelaram toxicidade associada aos FAEEs⁷⁷.

Soluções aquosas dos extratos da semente, flor e folha (HEScSeed, HEScFlower e HEScLeaf) e AgNO₃ foram usadas para a síntese das AgNPs (AgNPs-HEScSeed, AgNPs-HEScFlower, AgNPs-HEScLeaf), cuja transformação de coloração de transparente para escuras e opacas dessas soluções indicam a presença de nanocompósitos, conforme dados obtidos anteriormente por Khan et al.⁵⁰. Os resultados aqui apresentados, demonstraram a biossíntese pelos compostos fitoquímicos das nanopartículas de prata AgNPs, utilizando extratos de diferentes partes da planta *S. cumini* (semente, flor e folha) e corroboram com os estudos de Sathishkumar et al.⁷⁸, Khan et al.⁵⁰, Kota et al.⁵¹ e Siddiqi et al.⁴. Esses autores mostraram que as características UV-Vis das nanopartículas de prata a partir de extratos vegetais normalmente exibem absorção sob uma faixa visível de 380 a 460 nm, dependendo de suas formas e tamanhos variados. As análises de espectrometria por energia dispersiva de raios X (EDS) foram empregados para confirmação de átomos, onde a presença da Ag é marcador da formação das nanopartículas e outros elementos químicos como o C, Cl, Ga, P, S, acompanhados por outros elementos não identificados (sinais mais fracos) foram observados também nas AgNPs-HEScSeed, AgNPs-HEScFlower, AgNPs-HEScLeaf, conforme resultados também obtidos por Molina et al.⁷⁹. Segundo Molina et al.⁷⁹, o intenso sinal do C elemento de maior composição nas análises (EDS), corresponde ao composto orgânico dos extratos adsorvido na superfície das AgNPs e ao filme de carbono usado como suporte e fixação da amostra.

As imagens das AgNPs-HEScSeed, AgNPs-HEScFlower, AgNPs-HEScLeaf obtidas por FEG-SEM revelaram morfologias (ovais, cilíndricas, triangulares e poliédricas) e dimensões de tamanhos variados. A estabilidade coloidal das AgNPs foi considerada moderada, conforme a análise do potencial zeta, no tempo da análise. A distribuição de tamanho e forma das nanopartículas obtidas por síntese verde usando extratos vegetais é influenciada por vários fatores, como natureza do extrato vegetal, pH da solução, temperatura da reação⁸⁰ e concentração do extrato⁵¹. De acordo com Kota et al.⁵¹, a distribuição uniforme do tamanho e forma das nanopartículas de prata pode ser obtida pela otimização dos parâmetros acima para cada tipo de extrato de planta sob investigação.

Nossos resultados estão de acordo com Molina et al.⁷⁹ que demonstraram que grupos funcionais nas superfícies das nanopartículas são negativos, conforme observado pelo potencial zeta, devido principalmente ao comportamento do grupo OH eletronegativo e é um indicador de nivelamento (*capping*) na superfície, uma vez que as AgNPs não devem ter atividade elétrica na superfície, pois são Ag⁰. Jalal et al.⁸¹, também, caracterizaram AgNPs de *S. cumini* por espectroscopia de UV-Vis, espectroscopia de energia dispersiva de raio-X (*energy-dispersive X-ray* – EDX), microscopia eletrônica de varredura (*scanning electron microscopy* – SEM) e de transmissão (*transmission electron microscopy* – TEM) corroborando, também, com nossos dados sobre espectroscopia de absorbância UV-Vis e EDX que indicaram a redução de íons Ag¹⁺ para Ag⁰.

A espectroscopia FTIR indicou a presença de grupos hidroxilas de componentes fenólicos no extrato de sementes Jalal et al.⁸¹ e Kanthammal et al.⁸², e também demonstraram que grande quantia de polifenóis, flavonoides, ácido gálico e grupos carboxílicos (C=O) de compostos fenólicos estão presentes em extratos de sementes. Adicionalmente, a presença de compostos fenólicos no extrato de semente de *S. cumini* pode ser responsável pela redução da Ag¹⁺ para Ag⁰ e estabilização das nanopartículas de prata e esses achados estão de acordo com Kanthammal et al.⁸² e Atale et al.¹². As microscopias eletrônicas de varredura e transmissão revelaram partículas hexagonais e a análise de EDX confirmou a presença do elemento prata na forma de nanopartículas, resultados estes também apresentados por Jalal et al.⁸¹.

Os extratos (HEScSeed, HEScFlower e HEScLeaf) e suas nanopartículas de prata (AgNPs-HEScSeed, AgNPs-HEScFlower, AgNPs-HEScLeaf) apresentaram

neste estudo, ação antibacteriana e antifúngica e as concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram dose/espécies-dependentes. Estudos semelhantes Satish et al.⁸³, Reddy e Jose⁸⁴ apresentaram resultados que corroboram com os mostrados neste estudo, onde avaliaram extrato das folhas de *S. cumini* demonstraram o potencial antibacteriano do contra alguns microrganismos patógenos humanos, como *B. cereus*, *E. faecalis*, *S. paratyphi*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, e *S. marcescens*; além disso, também apresentaram efeito sobre isolados de *Citrobacter spp.*, *S. typhi*, *S. typhimurium*, *S. boydii*, *S. sonnei*, e *S. faecalis*. O extrato da folha foi efetivo também, contra as bactérias cariogênicas como o *S. mutans* e foi capaz de suprimir a formação do biofilme *in vitro*.

Atividades antimicrobianas e antibiofilme de nanopartículas de prata sintetizadas a partir do extrato aquoso de sementes de *S. cumini* (ScAgNPs) foram relatadas por Jalal et al.⁸¹. ScAgNPs exibiram alta atividade anti-*Candida* sp. dose-dependente (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*) e antibacteriana (*S. aureus* e *E. coli*). A inibição dose-dependente dos fatores de virulência também foram observados durante o tratamento com as ScAgNPs. O tratamento do biofilme com as ScAgNPs também resultou em inibição quase completa da formação do biofilme de *C. albicans*, sugerindo danos na matriz de exopolissacarídeos e inibição do crescimento celular. A aderência e o acúmulo dessas ScAgNPs em células de *C. albicans* tratadas resultaram em alterações morfológicas e ultra-estruturais (ruptura e desintegração) envolvendo principalmente as paredes, membranas celulares e citoplasma. Resultados semelhantes foram descritos por Priya et al.⁸⁵ utilizando extrato hidroalcoólico de folha de *S. cumini*, onde acharam resultados do CIM de *S. cumini* contra cepa multirresistente de *Pseudomonas aeruginosa* e compararam o CIM do extrato metanólico da pele da fruta de *S. cumini* com o acetato de etilo e extrato de diclorometano de frutas *S. cumini* contra *E. faecalis* resultados, esses podem ser corroborados e extrapolados para os apresentados no neste estudo.

Em concordância com nossos achados sobre os efeitos antimicrobianos, Yadav et al.⁸⁶ avaliaram o potencial antibacteriano do extrato metanólico de sementes de *S. cumini* e sugeriram que esse extrato pode ser utilizado do tratamento de infecções. Além dessa característica, o extrato metanólico de sementes de *S. cumini* poderia ser um novo e importante substituto natural para

fornecer uma maneira segura de preservar os alimentos da contaminação bacteriana. A ação antibacteriana desse extrato poderia ser melhorada usando-o em combinação com fitoquímicos dietéticos naturais, como ácido fitólico e resveratrol a fim de aumentar a vida útil e controlar a deterioração dos alimentos. Outros estudos como de Ugbabe et al.⁸⁷ também apresentaram achados semelhantes aos aqui apresentados e também demonstraram o efeito inibidor do crescimento de microrganismos do extrato das folhas, sementes e casca *S. cumini*. Dessa maneira, os achados aqui apresentados utilizando AgNPs-HEScSeed, AgNPs-HEScFlower, AgNPs-HEScLeaf mostraram ação antimicrobiana frente todas as espécies testadas. Resultados semelhantes a este estudo não foram encontrados na literatura e isso o torna relevante, pois a ação antimicrobiana das AgNPs foi produzida a partir de uma concentração de 10 até 83 vezes menores que os extratos HEScSeed, HEScFlower e HEScLeaf.

Ensaio com resultados relevantes também foram realizados sobre biofilmes simples (*C. albicans*) e mistos (*S. mutans* + *S. oralis* e *S. aureus* + *S. epidermidis*) utilizando exclusivamente nanopartículas AgNPs-HEScLeaf. O motivo do seu uso foi devido a apresentação de sua potente ação antimicrobiana quando comparado ao extrato HEScLeaf. Os resultados dos efeitos das AgNPs-HEScLeaf sobre a cinética de desenvolvimento de biofilme simples sugerem potencial ação contra a adesão celular, ação antibiofilme inicial e maduro, respectivamente. Contudo, seus efeitos são menores quando comparados à CHX 0,12% sobre *C. albicans*.

Candida albicans também tem sido considerada altamente virulenta entre as espécies de *Candida*, sendo capaz de desenvolver biofilmes e exibir propriedades fenotípicas distintas das células planctônicas e elevada resistência aos agentes antimicrobianos^{46,47}. No estudo de Souza et al.⁸⁸ que produziu nanopartículas usando extrato de diferentes partes da Romã por biossíntese apresentou propriedade antimicrobianas e antibiofilme contra *Candida albicans* e. Os compostos feitos com extratos de casca mostraram a maior atividade antimicrobiana e antibiofilme forma semelhante ou até melhor que a clorexidina.

A clorexidina tem sido utilizada amplamente no tratamento da redução de biofilme oral e controle da inflamação, devido a sua substantividade, propriedades biológicas e atividade antibacteriana de amplo espectro (bactérias Gram-positivas e Gram-negativas)⁸⁹. Apresenta eficácia na diminuição da carga bacteriana quando comparado a outros degermantes como hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio

e ácido cítrico. Entretanto, a clorexidina apresenta desvantagens frequentemente observadas, tais como, coloração dos dentes e alteração do paladar⁹⁰. Segundo Giannelli et al.⁹¹ a clorexidina pode induzir apoptose e necrose celular devido a perturbação da função mitocondrial, aumento intracelular de Ca^{2+} e estresse oxidativo.

Os dados dos efeitos das AgNPs-HEScLeaf sobre a cinética de desenvolvimento de biofilme misto de *S. mutans* e *S. oralis* sugerem potencial ação contra a adesão celular e ação antibiofilme inicial e maduro. Para o biofilme misto de *S. mutans* e *S. oralis* de 48 horas (biofilme maduro), os efeitos antibiofilme das AgNPs-HEScLeaf foram idênticos ao CHX 0,12% em todas as concentrações testadas. Nossos resultados demonstraram que AgNPs-HEScLeaf possui ação antimicrobiana contra a bactéria Gram-positiva, *S. mutans* e *S. oralis*. Sua ação ocorreu com o microrganismo apresentado na forma de biofilme, reduzindo sua viabilidade metabólica. As ações das AgNPs-HEScLeaf sobre a cinética de desenvolvimento de biofilme misto de *S. aureus* e *S. epidermidis* sugerem potencial efeito contra a adesão celular, bem como ação antibiofilme inicial e maduro. Para o biofilme misto de *S. aureus* e *S. epidermidis* de 48 horas (biofilme maduro), os efeitos antibiofilme das AgNPs-HEScLeaf foram idênticos ao CHX 0,12% em todas as concentrações testadas, assim como um idêntico efeito para o biofilme de 24 horas (biofilme inicial).

Esses resultados corroboram com os resultados de Bordini et al.⁶⁴, que avaliaram a atividade antibacteriana de produtos naturais e obtiveram redução de biofilme sobre bactérias *S. mutans* e *S. oralis*. Segundo Marsh⁹², quando em biofilme, os microrganismos tornam-se mais resistentes do que na forma planctônica, pois ocorrem trocas metabólicas intra e interespecies. Estudos na tentativa de controle do biofilme estão voltados para substâncias naturais, que têm potentes microbicidas e atividades antibiofilme de amplo espectro e representam um baixo risco para o desenvolvimento de resistência.

Há duas razões principais pelas quais os produtos naturais não criam linhagens de bactérias resistentes, isto é justificado por serem complexos e por abrangerem numerosos compostos em proporções variáveis, dependendo do tipo químico da planta. Sendo assim, devem ocorrer múltiplas e simultâneas mutações nas bactérias para que elas possam escapar de todos os mecanismos antimicrobianos dos componentes presentes nesses produtos naturais^{93,94}.

Focando na aplicação clínica de novas substâncias como nanopartículas AgNPs-HEScLeaf, é necessário determinar seus possíveis efeitos tóxicos sobre células. Neste estudo, os ensaios de citotoxicidade *in vitro* do HEScLeaf e AgNPs-HEScLeaf foram avaliados em queratinócitos orais normais (Human Oral Keratinocytes – HOK) a partir de diferentes concentrações das substâncias testes e em dois tempos. A ausência de citotoxicidade em HOK do HEScLeaf foi AgNPs-HEScLeaf observada em baixas concentrações no tempo de 5 min. Assim, diferentemente das outras concentrações avaliadas, após 5 minutos de contato, o HEScLeaf foi AgNPs-HEScLeaf apresentou grau leve de citotoxicidade quando comparado ao grupo controle, de acordo com a norma ISO 10993-5 2009. A presente pesquisa revela informações sobre a toxicologia do extrato etanólico liofilizado das folhas de *S. cumini*, incluindo suas nanopartículas metálicas, e agrega valores científicos aos estudos incipientes da literatura.

Os resultados mostram o efeito pouco citotóxico ou não citotóxico das nanopartículas - AgNPs-HEScLeaf e do extrato - HEScLeaf nos queratinócitos orais normais (HOK) com base nas concentrações com efeito antibiofilme. Alguns estudos relatam efeito citotoxicidade e citoprotetor do extrato. Por exemplo, o efeito do extrato aquoso liofilizado das folhas de *S. cumini* na hepatotoxicidade induzida pelo tetracloreto de carbono em ratos Wistar albinos machos foi avaliado, segundo Moresco et al.⁹⁶. O grupo de animais previamente tratados com o extrato e uma dose intraperitoneal única de tetracloreto de carbono revelou atividades significativamente menores de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) séricas, quando comparado com o grupo de animais que recebeu apenas o tetracloreto de carbono.

Esse foi o primeiro estudo demonstrando o efeito hepatoprotetor das folhas de *S. cumini* em associação com uma droga teste, porém sem qualquer evidência do efeito desta planta administrada exclusivamente⁹⁶. Barai et al.⁹⁷ avaliaram o extrato etanólico das folhas de *S. cumini*, na forma de suplemento em ração de camundongos (50 µg/g), e quanto à sua atividade preventiva contra os efeitos adversos causados por arsênio (10 µg/g) em camundongos experimentais.

Outros estudos toxicológicos de *S. cumini* envolvendo outras partes anatômicas dessa planta foram reportados na literatura. O estudo de Tripathi et al.⁹⁸ avaliou o potencial antigenotóxico do extrato metanólico das sementes de *S. cumini* como também, ensaios de aberração cromossômica e micronúcleo em medula

óssea de camundongos, ensaio de anormalidade espermática e estresse oxidativo. Ainda, o efeito protetor do extrato metanólico da semente de *S. cumini* sobre a genotoxicidade e hepatotoxicidade induzida por arsênico também foi avaliado em ratos albinos Wistar⁹⁹. A administração oral desse extrato não resultou em genotoxicidade significativa e a coadministração do extrato e arsênico resultou em diminuição significativa de danos ao DNA de linfócitos de maneira dose-dependente, obtidos pelo ensaio do cometa⁹⁹. O extrato de sementes de *S. cumini* possui potente atividade antioxidante e de eliminação de radicais livres devido à presença de compostos ativos, especialmente os flavonóides miricetina, quercetina, kaempferol e ácido polifenol elágico^{100,101}, que podem ser responsáveis por seu efeito antígeno-tóxicos induzidos por arsênico.

Não há estudos que evidenciem o efeito citotóxico das folhas de *S. cumini* na linhagem de queratinócitos orais. No entanto, segundo Gupta et al.¹⁰² as nanopartículas preparadas por síntese 'verde' utilizando o extrato metanólico da folha de *Syzygium cumini* inibiram a formação de biofilmes em uma ampla gama de concentrações de AgNP. Significativamente, os ensaios de citotoxicidade mostraram boa compatibilidade de AgNPs com células renais embrionárias humanas (HEK 293) a partir de 0,125 mg/ ml, corroborando com nossos achados em HOK.

É difícil comparar os resultados deste estudo com outras investigações sobre nanopartículas AgNPs porque alguns fatores como pH, cepas de bactérias, tempo de incubação, temperatura, testes de concentração e outros fatores podem influenciar nos resultados. Uma limitação deste estudo foi o uso de apenas duas espécies orais de patógenos no desenvolvimento de biofilme simples e de duas espécies. No entanto, este é um estudo preliminar e mais estudos com biofilme oral multi-espécies serão necessárias para imitar a complexa microbiologia oral. Este trabalho pode abrir caminho para o desenvolvimento futuro de oportunidades terapêuticas contra a diferentes microrganismos de importância médico-odontológico.

7 CONCLUSÃO

1. Foram produzidos extratos das sementes, flores e folhas de *S. cumini* e seus principais compostos fitoquímicos encontrados foram: escaleno, campesterol, tocoferol; - estigmasterol, ácido hexadecanóico; octadecadienial; hexadecanoato de etila, octadecanoato de etila, fitol e octadecatrienoato de etila.
2. Foram sintetizadas (biossíntese) e caracterizadas AgNPs das sementes, flores e folhas de extrato de *S. cumini*, apresentando estabilidade coloidal, tamanhos e formas variadas.
3. Os extratos da semente, da flor e da folha - (HEScSeed, HEScFlower e HEScLeaf) e AgNPs-HESc (HEScSeed, HEScFlower e HEScLeaf) mostraram ação antimicrobiana contra patógenos de interesse médico e odontológico (anaeróbios estritos: *A. naeslundii*, *F. nucleatum* e *V. dispar*; anaeróbios facultativos: *S. mutans* e *S. oralis*; aeróbios: *C. albicans*, *S. epidermidis* e *S. aureus*), cujas concentrações inibitórias mínimas são espécie-dependente.
4. Em adição, as AgNPs-HEScLeaf apresentam potencial ação parcial contra a cinética de desenvolvimento de biofilmes simples de (*C. albicans*) e mistos (*S. mutans*/*S. oralis* e *S. aureus*/*S. epidermidis*), dose/ tempo-dependente.
5. A citotoxicidade *in vitro* do HEScLeaf e das AgNPs-HEScLeaf ocorre de maneira dose e tempo-dependentes em HOKs, a ausência de citotoxicidade ocorre em concentrações menores e próximas daquelas concentrações inibitórias mínimas das células planctônicas, conforme a espécie microbiana.

REFERÊNCIAS*

1. Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv Colloid Interface Sci.* 2009; 145(1-2): 83-96.
2. GnanaDhas GJ, Gurusamy A, Chellapandian K. Green synthesis of silver nanoparticle using *Elettaria Cardamomom* and assessment of its antimicrobial activity. *Int J Pharma Sci Res.* 2012; 3(3): 323–30.
3. Rai M. Nanobiotecnologia verde: biossínteses de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos. *Cienc Cult.* 2013; 65 (3): 44-8.
4. Siddiqi KS, Husen A, Rao RAK. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J Nanobiotechnol.* 2018; 16 (1): 14.
5. Thill A, Zeyons O, Spalla O, Chauvat F, Rose J, Auffan M, Flank A M. Cytotoxicity of CeO₂ nanoparticles for *Escherichia coli*. Physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism. *Environ Sci Technol.* 2006; 40 (19): 6151-6.
6. Hajipour MJ, Fromm KM, Ashkarran AA, Jimenez de Aberasturi D, de Larramendi I R, Rojo T, et al. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol.* 2012; (10): 499-511.
7. Husen A, Siddiqi K S. Phytosynthesis of nanoparticles: concept, controversy and application. *Nanoscale Res Lett.* 2014; 9(1): 229.
8. Vilas V, Philip D, Mathew J. Catalytically and biologically active silver nanoparticles synthesized using essential oil. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2014; 132: 743-50.
9. Park J, Cha S, Cho S, Park Y. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using gallic acid: catalytic activity and conversion yield toward the 4-nitrophenol reduction reaction. *J Nanoparticle Res.* 2016; 18:111.
10. Gardea-Torresdey J L, Gomez, E, Peralta-Videa J R, Parsons J G, Troiani H, Jose-Yacamán M J. Alfafa sprouts: a natural source for the synthesis of silver nanoparticles. *Langmuir.* 2003; 19:1357-61.
11. Mittal A K, Chisti Y, Banerjee U C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnol Adv.* 2013; 31: 346-56.
12. Atale N, Saxena S, Nirmala J G, Narendhirakannan R T, Mohanty S, Ran V. Synthesis and characterization of *Syzygium cumini* nanoparticles for its protective potential in high glucose-induced cardiac stress: a green approach. *Appl Biochem Biotechnol.* 2017; 181(3): 1140–54.
13. Prabhu S, Poulose E K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Int Nano Letters.* 2012; 2: 32.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

14. Arzanlou M, Chai W C, Venter H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in gram-negative bacteria. *Essays Biochem.* 2017; 61: 49-59.
15. Huang R, Li M, Gregory R L. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence.* 2011; (5): 435-44.
16. Ayyanar M, SubashBabu P. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: a review of its phytochemical constituents and traditional uses. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012; 2(3): 240-6.
17. Sagrawat H, Mann A S, Kharya M D. Pharmacological potential of *Eugenia jambolana*: a review. *Pharmacogn Mag.* 2006; 2(6): 96-105.
18. Migliato K F, Baby A R, Zague V, Velasco M V R, Corrêa M A, Sacramento L V S, et al. Ação farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Acta Farm Bonaerense.* 2006; 25 (2): 310-4.
19. Chinnasamy G, Chandrasekharan S, Bhatnagar S. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Melia azedarach*: Enhancement of Antibacterial, Wound Healing, Antidiabetic and Antioxidant Activities. *Int J Nanomedicine.* 2019; 14: 9823-36.
20. Reverberi A P, Vocciante M, Salerno M, Ferretti M, Fabiano B. Green synthesis of silver nanoparticles by low-energy wet bead milling of metal spheres. *Mater Basel.* 2019; 13 (1): 63.
21. Saravanakumar A, Peng M M, Ganesh M, Jayaprakash J, Mohankumar M, Jang H T. Low-cost and eco-friendly green synthesis of silver nanoparticles using *Prunus japonica* (Rosaceae) leaf extract and their antibacterial, antioxidant properties. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2017; 45 (6):1-7.
22. Elumalai E K, Prasad T N V K V, Hemachandran J, Vivian Therasa S, Thirumalai T, David E. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using leaves of *Euphorbia hirta* and their antibacterial activities. *J Pharm Sci Res.* 2010; 2 (9): 549-54.
23. Lagashetty A, Ganiger S K, Shashidhar. Synthesis, characterization and antibacterial study of Ag-Au Bi-metallic nanocomposite by bioreduction using piper betle leaf extract. *Heliyon.* 2019; 5 (12): e02794.
24. Beyth N, Houri-Haddad Y, Domb A, Khan W, Hazan R. Alternative antimicrobial approach: nano-antimicrobial materials. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015; 2015: ID246012
25. Thungunta T, Reddy A C, Lakshmana Reddy D C N. Green synthesis of nanoparticles: current prospectus. *Nanotechnol. Rev.* 2015; 4 (4): 303–23.
26. Quinteros M A, Cano Aristizábal V, Dalmaso P R, Paraje M G, Páez P L. Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its relationship with the antimicrobial activity. *Toxicol Vitro.* 2016; 36: 216–23.

27. Meroni G, Soares Filipe J F, Martino P A. In vitro antibacterial of biological-derived silver nanoparticles: preliminary data. *Vet Sci.* 2020; 7 (1): 12.
28. Chernousova S, Epple M. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angew Chem Int.* 2013; 52 (6): 1636-53.
29. Tolaymat T M, El Badawy A M, Genaidy A, Scheckel K G, Luxton T P, Suidan M. An evidence based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Sci Total Environ.* 2010; 408 (5): 999-1006.
30. Sheng Z, Liu Y. Effects of silver nanoparticles on wastewater biofilms. *Water Res.* 2011; 45 (18): 6039-50.
31. Majdalawieh A, Kanan M C, El Kadri O, Kanan S M. Recent advances in gold and silver nanoparticles: synthesis and applications. *J Nanosci Nanotechnol.* 2014; (7): 4757-80.
32. Pelgrift R Y, Friedman A J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv Drug Deliv Ver.* 2013; 65(1314): 1803-15.
- 33 Markowska K, Grudniak AM, Wolska K I. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. *Acta Biochim Pol.* 2013; 60 (4): 523-530
34. Daubert D M, Weinstein B F. Biofilm as a risk factor in implant treatment. *Periodontol2000.* 2019; 81 (1): 29-34.
35. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res.* 2009; 88 (11): 982-90.
36. Siqueira W L, Custodio W, McDonald E E. New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. *J Dent Res.* 2012; 91 (12):1110-8.
37. Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J Bacteriol.* 2005, 187: 7193-203.
38. Parsek M R, Singh P K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 2003; 57: 677-701.
39. Chung P Y, Toh Y S. Anti-biofilm agents: recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Pathog Dis.* 2014; 70 (3): 231-9.
40. Gonçalves R H, Miranda E T, Zaia J E, Giannini M J. Species diversity of yeast in oral colonization of insulin-treated diabetes mellitus patients. *Mycopathologia.* 2006; 162 (2): 83-9.
41. Suleyman G, Alangaden G J. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. *Infect Dis Clin North Am.* 2016; 30 (4): 1023-52.

42. Bernardo W L C, Boriollo M F G, Gonçalves R B, Höfling J F. *Staphylococcus aureus* ampicillin-resistant from the odontological clinic environment. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2005; 47: 19-24.
43. Bernardo W L C, Silva J J D, Höfling J F, Rosa E A R, Boriollo M F G. Dynamics of the seasonal airborne propagation of *Staphylococcus aureus* in academic dental clinics. J Appl Oral Sci. 2018; 5(26): 1-12.
44. Pesee S, Arpornsuwan, T. Salivary cytokine profile in elders with *Candida*-related denture stomatitis. Gerodontol. 2015; 32: 132-40.
45. Tonon C C, Francisconi R S, Bordini E A F, Huacho P M M, Sardi J C O, Spolidorio D M P. Interactions between Terpinen-4-ol and Nystatin on biofilm of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. Braz Dent J. 2018; 29 (4): 359-67
46. Ramage G, Tomsett K, Wickes B L, López-Ribot J L, Redding S W. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004, 98(1): 53-69.
47. Ramage G, Saville S P, Thomas D P, López-Ribot J L. *Candida* biofilms: an update. Eukaryot Cell. 2005; 4(4): 633-8.
48. ANVISA. Farmacopeia brasileira. 6ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2019.
49. Boriollo M F G, Souza L S, Resende M R, Silva T A, Oliveira N M, Resck M C, et al. Nongenotoxic effects and a reduction of the DXR-induced genotoxic effects of *Helianthus annuus* Linné (sunflower) seeds revealed by micronucleus assays in mouse bone marrow. BMC Complement Altern Med. 2014; 2: 121.
- 50 Khan M, Khan S T, Khan M, Adil S F, et al. Antibacterial properties of silver nanoparticles synthesized using *Pulicaria glutinosa* plant extract as a green bioreductant. Int J Nanomedicine. 2014; 28 (9): 3551-65.
51. Kota S, Dumpala P, Anantha R K, Verma M K, Kandepu S. Evaluation of therapeutic potential of the silver/silver chloride nanoparticles synthesized with the aqueous leaf extract of *Rumex acetosa*. Sci Rep. 2017; 7 (1): 11566.
52. Murillo-Gómez F, Palma-Dibb R G, De Goes M F. Effect of acid etching on tridimensional microstructure of etchable CAD/CAM materials. Dent Mater. 2018; 34 (6): 944-55.
53. Giertsen E, Arthur R A, Guggenheim B. Effects of xylitol on survival of mutans streptococci in mixed-six-species in vitro biofilms modelling supragingival plaque. Caries Res. 2011; 45 (1): 31-9.
54. CLSI. M27-A3: reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. 3rd ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

55. CLSI. M44-A2: reference method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved standard. 2nd ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
56. CLSI. M100-S22: reference performance standards for antimicrobial susceptibility tests: approved standard. 22nd ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
57. CLSI. M11: reference methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: approved standard. 9th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
58. CLSI. M07-A9: reference methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 9th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
59. CLSI. M27-S4: reference methods for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. 4th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
60. Martin A, Camacho M, Portaels F, Palomino J C. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47 (11): 3616-9
61. Silva J J D, Silva T A D, Almeida H, Rodrigues Netto M F, Cerdeira C D, Höfling J F, Boriollo M F G. *Candida* species biotypes in the oral cavity of infants and children with orofacial clefts under surgical rehabilitation. *Microb Pathog*. 2018; 124: 203-15.
62. Moore C B, Oakley K L, Denning D W. In vitro activity of a new echinocandin, LY303366, and comparison with fluconazole, flucytosine and amphotericin B against *Candida* species. *Clin Microbiol Infect*. 2001; 7 (1): 11-6.
63. Cantón E, Pemán J, Viudes A, Quindós G, Gobernado M, Espinel-Ingroff A. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003; 45 (3): 203-6.
64. Bordini E A F, Tonon C C, Francisconi R S, Magalhães F A C, Huacho P M M, Bedran T L, Pratavieira S, Spolidorio L C, Spolidorio D P. Antimicrobial effects of terpinen-4-ol against oral pathogens and its capacity for the modulation of gene expression. *Biofouling*. 2018; 34 (7): 815-25.
65. Thein Z M, Smaranayake Y H, Smaranayake L P. Dietary sugars, serum and the biocide chlorhexidine digluconate modify the population and structural dynamics of mixed *Candida albicans* and *Escherichia coli* biofilms. *APMIS*. 2007; 115: 1241-51.
66. Boni G C, Feiria S N B, Santana P L, Anibal P C, Boriollo M F G, Buso-Ramos M M, et al. Antifungal and cytotoxic activity of purified biocomponents as carvone, menthone, menthofuran and pulegone from *Mentha* spp. *African J Plant Sci*. 2016; 10 (10): 203–10.

67. Villasenor I M, Lamadrid M R. Comparative anti-hyperglycemic potentials of medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2006; 104: 129–31.
68. Sultana B, Anwar F, Przybylski R. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica* and *Eugenia jambolana* Trees. *Food Chem.* 2007; 104: 1106–14.
69. Muruganandan S, Pan S, Srinivasan K, Chandra S, Tandan S K, Lal J, et al. Inhibitory role of *Syzygium cumini* on autacid-induced inflammation in rats. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2002; 46: 482–6.
70. Chandrasekaran M, Venkatesalu V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. *J Ethnopharmacol.* 2004; 91: 105-8.
71. Braga F G, Bouzada M L, Fabri R L, de O Matos M, Moreira F O, Scio E, et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J Ethnopharmacol.* 2007; 111(2): 396-402.
72. Kim S K, Karadeniz F. Biological importance and applications of squalene and squalane. *Adv Food Nutr Res.* 2012; 65: 223-33.
73. Choudhary S P, Tran L S. "Phytosterols: perspectives in human nutrition and clinical therapy". *Curr Medl Chem.* 2011; 18 (29): 4557–67.
74. Azlina M F N, Qodriyah M S, Kamisah Y. Tocopherol and Tocotrienol: therapeutic potential in animal models of stress. *Curr Drug Targets.* 2018; 19 (12): 1456-62.
75. Mumtaz S, Ali S, Khan R, Shakir H A, Tahir H M, Mumtaz S, et al. Therapeutic role of garlic and vitamins C and E against toxicity induced by lead on various organs. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2020; 27: 8953–64
76. Islam M T, Ali E S, Uddin S J, Shaw S, Islam M A, Ahmed M I, et al. Phytol: a review of biomedical activities. *Food Chem Toxicol.* 2018; 121: 82–94.
77. Laposata M, Hasaba A, Best C A, Yoerger D M, McQuillan B M, Salem R O, et al. Fatty acid ethyl esters: recent observations. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002; 67 (2-3): 193-6.
78. Sathishkumar G, Gobinath C, Karpagam K, Hemamalini V, Premkumar K, Sivaramakrishnan S. Phyto-synthesis of silver nanoscale particles using *Morinda citrifolia* L. and its inhibitory activity against human pathogens. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2012; 95: 235–40.
79. Molina G A, Esparza R, López-Miranda J L, Hernández-Martínez A R, España-Sánchez B L, Elizalde-Peña E A, Estevez M. Green synthesis of Ag nanoflowers using *Kalanchoe Daigremontiana* extract for enhanced photocatalytic and antibacterial activities. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019; 180 (1): 141-9.
80. Rauwel P, Kuunal S, Ferdov S, Rauwel E. Review on the green synthesis of silver nanoparticles and their morphologies studied via TEM. *Adv Mater Sci Eng.* 2015; 2015: ID682749.

81. Jalal M, Ansari M A, Alzohairy M A, Ali S G, Khan H M, Almatroudi A, et al. Anticandidal activity of biosynthesized silver nanoparticles: effect on growth, cell morphology, and key virulence attributes of *Candida* species. *Int J Nanomedicine*. 2019; 14: 4667–79.
82. Kanthammal S, Jebanesan A, Kovendan K, Subramaniam J, Vijay M. Novel insecticides of *Syzygium cumini* fabricated silver nanoparticles against filariasis, malaria, and dengue vector mosquitoes. *Int J Mosq Res*. 2018; 5(5): 95–106.
83. Satish S, Raghavendra M P, Raveesha K A. Evaluation of the antibacterial potential of some plants against human pathogenic bacteria. *Adv Biol Res*. 2008; 2: 44–8.
84. Reddy L J, Jose B. Evaluation of antibacterial and DPPH radical scavenging activities of the leaf extracts and leaf essential oil of *Syzygium cumini* (Linn.) from South India. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2013; 5 (3): 1–5.
85. Priya S S L, Devi P R, Eganathan P, Kingsley J. In vitro antimicrobial activity of *Syzygium cumini* fruit peel and identification of anthocyanins. *Afr J Pharm Pharmacol*. 2013; 7(25): 1719–28.
86. Yadav A K, Saraswat S, Sirohi P, Rani M, Srivastava S, Singh M P, Singh N K. Antimicrobial action of methanolic seed extracts of *Syzygium cumini* Linn. on *Bacillus subtilis*. *AMB Express*. 2017; 7(1): 196.
87. Ugbabe, G E, Ezeunala M N, Edmond I N, Apev J, and Salawu O A. Preliminary phytochemical, antimicrobial and acute toxicity studies of the stem, bark and the leaves of a cultivated *Syzygium cumini* Linn. (Family: Myrtaceae) in Nigeria. *Afr J Biotechnol*. 2010; 9 (41), 6943-7.
88. Souza J A, Barbosa D B, Berretta A A, do Amaral J G, Gorup L F, de Souza Neto F N, et al. Green synthesis of silver nanoparticles combined to calcium glycerophosphate: antimicrobial and antibiofilm activities. *Future Microbiol*. 2018; 13: 345-57.
89. Jones C G. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol 2000*. 1997; 15: 55-62
90. Guggenheim B, Meier A. In vitro effect of chlorhexidine mouth rinses on polyspecies biofilms. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2011; 121(5): 432-41.
91. Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. *Toxicol In Vitro*. 2008; 22(2): 308-17.
92. Marsh P D. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res*. 2004, 38: 204–11.
93. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - a review. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46(2): 446-75.

94. Mertas A, Garbusińska A, Szliszka E, Jureczko A, Kowalska M, Król W. The influence of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on fluconazole activity against fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. Biomed Res Int. 2015; 2015: 590470
95. International Standard Organization. ISO 10993-5 2009: biological evaluation of medical devices: Tests for in vitro cytotoxicity: method *in vitro*. Genova; ISO 2009.
96. Moresco R N, Sperotto R L, Bernardi A S, Cardoso R F, Gomes P. Effect of the aqueous extract of *Syzygium cumini* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. Phytother Res. 2007; 21 (8): 793-5.
97. Barai M, Ahsan N, Paul N, Hossain K, Abdur Rashid M, Kato M, et al. Amelioration of arsenic-induced toxic effects in mice by dietary supplementation of *Syzygium cumini* leaf extract. Nagoya J Med Sci. 2017; 79 (2): 167-77.
98. Tripathi P, Patel R K, Tripathi R, Kanzariya N R. Investigation of antigenotoxic potential of *Syzygium cumini* extract (SCE) on cyclophosphamide-induced genotoxicity and oxidative stress in mice. Drug Chem Toxicol. 2013; 36(4): 396-402.
99. Kumar M, Thakur R. *Syzygium cumini* seed extract ameliorates arsenic-induced blood cell genotoxicity and hepatotoxicity in Wistar albino rats. Rep Biochem Mol Biol. 2018; 7(1): 110-18.
100. Singh N P, McCoy M T, Tice R R, Schneider E L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res. 1988; 175(1): 184-91.
101. Tanaka M, Kuei CW, Nagashima Y, Taguchi T. Application of antioxidative maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products. Nippon Sui Gakk. 1998; 54: 1409-14.
102. Gupta K, Singh S P, Manhar A K, Saikia D, Namsa N D, Konwar B K, et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and virulence by active fraction of *Syzygium cumini* (L.) Skeels leaf extract: in vitro and in silico studies. Indian J Microbiol. 2019; 59(1):13-21.

APÊNDICE A

1 Cromatografia a gás com espectrometria de massa (GC-MS)

Condições cromatográficas predefinidas

- (i) Amostra: volume injetado de 2,0 µl;
- (ii) Coluna: HP-5MS, 5% difenil, 95% dimetil polisiloxano (30m × 0,25mm × 0,25µm);
- (iii) Gás de arraste: He (99.9999) → 1 ml/min;
- (iv) Injetor: 280 °C, Split 1:1; (v) Forno: 50 °C (2 min) → 250 °C (5 °C/1 min); 250 °C (10 min); e
- (v) Detector: Espectrofotômetro de Massas tipo Quadruple Linear, Fonte de Ionização (Impacto por Elétrons → 70 eV), Modo Varredura (0,5 seg/scan), Faixa de Massas [33–500 Dalton (u)], Linha Transferência (280 °C) e Filamento (desligado a 7,0 min).

O banco de dados espectral de massa (NIST 11) e o programa AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System) foram usados para identificar compostos detectados nos cromatogramas.

2 Potencial Zeta (ZP) das AgNPs

Os resultados do potencial zeta e estabilidade coloidal do sistema foram interpretados conforme dados estabelecidos (MALVERN):

- 0 a ±5 mV, coagulação ou floculação rápida;
- 10 a ±30 mV, instabilidade incipiente;
- 30 a ±40 mV, estabilidade moderada;
- 40 a ±60 mV, boa estabilidade, e;
- > ±61 mV, estabilidade excelente

3 Testes de sensibilidade antimicrobiana por disco difusão

Meios de Cultura - Agar

- Brucella Agar (BD BBL™ Brucella Agar Germany – suplementado com 5% sangue de carneiro/ hemina e menadiona) para *A. naeslundii*, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* e *V. dispar*.

- Mueller Hinton Agar (Mueller Hinton Broth, Himedia) para *S. aureus* e *S. epidermidis*.
- Mueller Hinton Agar suplementado com 2% glucose (Mueller Hinton Agar, 2% Glucose with Methylene blue, Himedia) para *C. albicans*.
- Mueller Hinton Agar suplementado com 5% de sangue de cavalo (BD Mueller Hinton Agar, Becton Dickinson GmbH, Germany) para *S. mutans* e *S. oralis*.

4 Testes de sensibilidade antimicrobiana por diluição

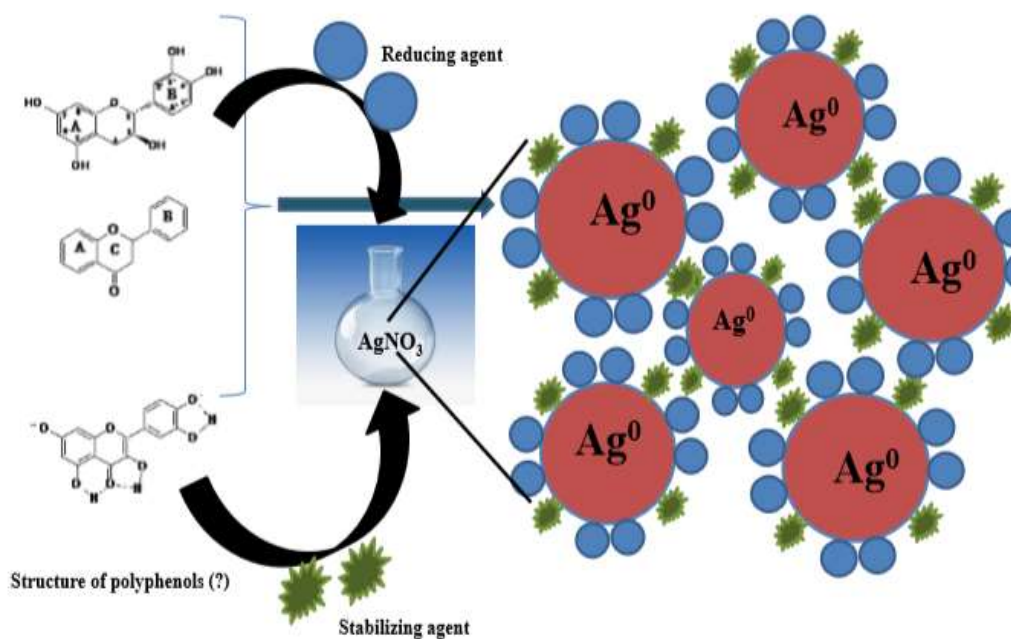
Meios de Cultura - Caldo

- Brucella Caldo (BD BBL™ Brucella Broth with 5% Sheep Blood, Hemin and Vitamin K1, Germany) para *A. naeslundii*, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* e *V. dispar*.
- Mueller Hinton Caldo, pH 7,2 a 7,4 (Mueller Hinton Broth No. 2 Control Cations, Himedia) para *S. aureus* e *S. epidermidis*.
- Mueller Hinton Caldo cátions ajustado e suplementado com sangue de cavalo lisado a 5% para *S. mutans* e *S. oralis*.
- Meio de cultura RPMI-1640 tamponado com MOPS [1,04% m/v RPMI-1640 (SIGMA-ALDRICH Cat. # R7388, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), 165mM MOPS (SIGMA Cat. # M3183, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), glucose 2% m/v, pH 7.0 ajustados com 1M NaOH a 25 °C e esterilizado por filtração para *C. albicans*.

5 Microscopia Eletrônica de Varredura dos biofilmes (protocolo de fixação)

As lâminas com biofilme foram fixadas em glutaraldeído a 2% (Glutaraldehyde solution, SIGMA-ALDRICH Cat. # G5882, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) em solução PBS por 30 minutos, e desidratadas por lavagens sequenciais com etanol por 10 minutos (i.e., lavagens realizadas 2× em cada uma das concentrações: 50%, 70%, 90% e etanol absoluto) seguido pela secagem a temperatura ambiente.

6 Produção das Nanopartículas de prata AgNPs



Esquema: Mecanismo de redução e estabilização das nanopartículas usando extrato da folha de *S. cumini*.

Fonte:.. Adaptado de Gupta et al.¹⁰²

7 Valores da medias dos tratamentos dos biofilmes

Tabela A1 - Padrões numéricos semiquantitativos do desenvolvimento dos biofilmes simples (*C. albicans*) e mistos (*S. mutans*/ *S. oralis* e *S. aureus*/ *S. epidermidis*) obtidos a partir dos tratamentos com diferentes concentrações de AgNPs-HEScLeaf por 5 minutos.

Adesão celular	AgNPs-HEScLeaf					
/Biofilme	8 mg/ml		0,5 mg/ml		0,125 mg/ml	
<i>C. albicans</i>						
GC (48 horas)	1,097 ^A	±0,186	1,097 ^A	±0,186	1,097 ^A	±0,186
CHG (48 horas)	0,126 ^D	±0,024	0,126 ^D	±0,024	0,126 ^D	±0,024
90 min	1,068 ^B	±0,098	1,085 ^B	±0,116	1,127 ^A	±0,085
24 horas	1,101 ^{ABC}	±0,091	1,093 ^{AB}	±0,089	1,031 ^{BC}	±0,052
48 horas	1,058 ^{BC}	±0,117	1,095 ^{BC}	±0,075	1,181 ^A	±0,059
<i>S. oralis</i> + <i>S. mutans</i>						
GC (48 horas)	1,226 ^A	±0,074	1,226 ^A	±0,074	1,226 ^A	±0,074
CHG (48 horas)	0,118 ^F	±0,047	0,118 ^F	±0,047	0,118 ^F	±0,047
90 min	0,940 ^C	±0,071	0,780 ^D	±0,064	1,066 ^B	±0,032
24 horas	0,243 ^E	±0,053	1,083 ^B	±0,037	1,131 ^B	±0,044
48 horas	0,121 ^F	±0,034	0,146 ^F	±0,030	0,172 ^{EF}	±0,053
<i>S. aureus</i> + <i>S. epidermidis</i>						
GC (48 horas)	1,226 ^A	±0,074	1,226 ^A	±0,074	1,226 ^A	±0,074
CHG (48 horas)	0,118 ^D	±0,047	0,118 ^D	±0,047	0,118 ^D	±0,047
90 min	0,247 ^D	±0,061	0,496 ^C	±0,098	1,043 ^A	±0,102
24 horas	0,115 ^D	±0,112	0,885 ^B	±0,073	0,847 ^B	±0,110
48 horas	0,080 ^D	±0,073	0,089 ^D	±0,030	0,095 ^D	±0,037

Os valores correspondem às médias e desvios padrões das absorbâncias obtidas no ensaio de redução do XTT. Médias com as mesmas letras (A, B, C, D, E ou F) não são significativamente diferentes ($p < 0,05$). GC: controle de desenvolvimento do biofilme em meio de cultura RMPI 1640 ou BHI. CHG: Digluconato de clorexidina a 0,12%.

Fonte: Elaboração própria.

8 Valores da medias dos tratamentos dos biofilmes

Tabela A2 - Padrões numéricos de HOKs obtidos a partir dos tratamentos com diferentes concentrações de HEScLeaf e AgNPs-HEScLeaf por 5 e 10 minutos.

Componentes testes	HEScLeaf			
HEScLeaf (mg/ml)	5 min ^A		10 min ^A	
GC	1975,7 ^A	±121,2	2351,0 ^A	±64,2
H ₂ O ₂ (3%)	81,2 ^F	±5,5	80,2 ^F	±13,0
CHG (0,12%)	660,3 ^D	±40,5	660,3 ^D	±40,5
0,6803	1925,2 ^A	±156,8	1955,0 ^B	±163,3
1,2969	1747,1 ^B	±191,0	1825,8 ^C	±116,5
2,5938	839,7 ^C	±78,0	673,3 ^D	±71,3
5,1875	489,0 ^E	±52,1	451,7 ^E	±67,3
10,3750	408,7 ^E	±30,2	364,2 ^E	±56,3
Componentes testes	AgNPs-HEScLeaf			
AgNPs-HEScLeaf (mg/ml)	5 min ^A		10 min ^A	
GC	1949,4 ^A	±161,0	2351,0 ^A	±64,2
H ₂ O ₂ (3%)	81,2 ^E	±5,5	80,2 ^F	±13,0
CHG (0,12%)	660,3 ^C	±40,5	660,3 ^C	±40,5
0,0328	1850,6 ^A	±182,1	1682,4 ^B	±187,1
0,0625	847,4 ^B	±140,5	677,3 ^D	±121,9
0,1250	283,0 ^D	±96,2	250,7 ^E	±12,2
0,2500	161,6 ^{DE}	±14,0	169,6 ^{EF}	±21,4
0,5000	171,1 ^{DE}	±23,1	129,8 ^{EF}	±13,1

Médias com as mesmas letras (A, B, C, D, E ou F) não são significativamente diferentes ($p < 0,05$). GC: controle de crescimento celular. H₂O₂ ou HP: peróxido de hidrogênio. CHG: Digluconato de clorexidina (12 mg/ml).

Fonte: Elaboração própria.

Autorizo a publicação deste trabalho

Araraquara 27 de março de 2020.

Wagner Luis de Carvalho Bernardo