

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA UTILIZANDO EXTRATO DE *Humirianthera ampla* COMO AGENTE REDUTOR

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL ANALYSIS OF SILVER NANOPARTICLES USING *Humirianthera ampla* EXTRACT AS A REDUCING AGENT

Antonia Eliane Costa Sena^{1,4}, Dagmar Mercado Soares², Marcelo Ramon da Silva Nunes¹, Dawerson da Paixão Ramos¹, Francisco Patricio de Andrade Júnior³, Edeltrudes de Oliveira Lima³, Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez¹, Fernando Sérgio Escócio Drummond Viana Faria¹, Ricardo de Araújo Marques⁴

1. Universidade Federal do Acre/Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal BIONORTE

2. Secretaria Estadual de Educação, Cultura e Esportes do Acre

3. Laboratório de Micologia/Departamento de Ciências Farmacêuticas/CCS/UFPB

4. Centro Universitário UNINORTE/Curso de Farmácia

* Antonia Eliane Costa Sena elianesena89@gmail.com.br

RESUMO

Nanopartículas, em especial as nanopartículas de prata (NPs-Ag), estão sendo empregadas atualmente em diversas aplicações tecnológicas. O método mais utilizado para síntese de NPs-Ag é o de redução química, porém a síntese verde está ganhando cada vez mais espaço em pesquisas porque esse método reduz a produção de resíduos indesejáveis, dentre eles, aqueles que causam danos ao meio ambiente. O presente trabalho descreve a preparação, caracterização e ensaios microbiológicos para avaliar a ação antimicrobiana das nanopartículas de prata. As NPs-Ag, foram sintetizadas a partir do método de síntese verde, utilizando extrato de *Humirianthera ampla* como agente redutor. A caracterização das nanopartículas foram realizadas utilizando análise espectroscópica de UV-Vis e DLS para verificar tamanho e formato das nanopartículas e ensaios de atividade biológica em bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos filamentosos e leveduriformes. As análises de UV-Vis e DLS mostraram a formação de nanopartículas esféricas de tamanho em torno de 47nm. Os resultados mostraram ser promissor tendo em vista que o extrato de *Humirianthera ampla* e as nanopartículas por redução química utilizando boroidreto de sódio (NPs-Ag/inorgânica) não apresentaram nenhum indício de atividade antimicrobiana, porém, quando associado o extrato com as nanopartículas de prata, pela rota de síntese verde inibiram o crescimento microbiano de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, o que possibilita expectativas para aplicações biomédicas a partir de estudos futuros.

Palavras-chave: Nanopartículas. Síntese Verde. Atividade Antimicrobiana.

ABSTRACT

Nanoparticles, in particular silver nanoparticles (NPs-Ag), are currently being used in several technological applications. The most used method for synthesis of NPs-Ag is chemical reduction, however green synthesis is gaining more and more space in research because this method reduces the production of undesirable residues, among them, those that cause damage to the environment. The present work describes the preparation, characterization and microbiological tests to evaluate the antimicrobial action of silver nanoparticles. The NPs-Ag were synthesized using the green synthesis method, using *Humirianthera ampla* extract as a reducing agent. The characterization of the nanoparticles was performed using spectroscopic analysis of UV-Vis and DLS to verify the size and shape of the nanoparticles and assays of biological activity in gram-positive, gram-negative bacteria and filamentous and yeast-like fungi. The UV-Vis and DLS analyzes showed the formation of spherical nanoparticles of size around 47nm. The results showed to be promising considering that the *Humirianthera ampla* extract and the nanoparticles by chemical reduction using sodium borohydride (NPs-Ag / inorganic) did not present any indication of antimicrobial activity, however, when associated the extract with the silver nanoparticles, by the green synthesis route, inhibited the microbial growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria, which allows expectations for biomedical applications from future studies.

Key words: Nanoparticles. Green Synthesis. Antimicrobial Activity.

1. INTRODUÇÃO

As nanopartículas, em especial as nanopartículas de prata (NPs-Ag), estão sendo empregadas hoje em diversas aplicações tecnológicas, como por exemplo, no campo da informática, medicina, biotecnologia entre outras. As NPs-Ag, possuem propriedades físico-químicas muito características, incluindo a sua flexibilidade, maleabilidade e uma condutividade térmica e elétrica elevada em relação a qualquer outro metal, além da sua estabilidade química, atividade catalítica e um comportamento óptico não linear. Dentre os métodos de síntese de nanopartículas, destaca-se o método de redução química, por se obter uma solução coloidal estável em água ou solventes orgânicos [1] além de desse método de obtenção temos a rota de síntese verde, método é promissor por causar baixo impacto ambiental, se comparado aos demais.

A síntese verde está ganhando espaço na pesquisa e desenvolvimento da atualidade. Sua utilização reduz a produção de resíduos indesejáveis, conseqüentemente evita a poluição, e também incentiva a utilização dos recursos naturais. Para a síntese de nanopartículas de metal tem-se considerado o uso da biodiversidade vegetal devido a disponibilidade de fitoquímicos existentes em vários extratos vegetais, especialmente em folhas como fenóis, cetonas, aldeídos, flavonas, ácidos carboxílicos entre outros constituintes fitoquímicos capazes de reduzir sais metálicos em nanopartículas metálicas [2]. Os parâmetros morfológicos dessas nanopartículas, como o tamanho e a forma, podem ser modulados de acordo com as concentrações de produtos químicos e condições de reação, como os fatores físicos de temperatura e pH, no qual foram utilizados.

Atualmente a busca por novos meios de controle a proliferação de microrganismos resistentes, como as bactérias patogênicas que, cada vez mais, inutilizam os antibióticos conhecidos (por se tornarem resistentes a seu princípio ativo) vêm sendo destaque nas linhas de pesquisa. Visando isso esse trabalho de pesquisa objetivou realizar ensaios contra bactérias e fungos para simular novas utilizações das nanopartículas na indústria farmacêutica.

Dentre as plantas encontradas na região amazônica a escolha pela utilização da *Humirianthera ampla* se deu pelo fato de ser uma espécie pouco estudada, apesar de já se mostrar promissora para novos estudos, pois pode conter alcaloides em sua estrutura [3], esta é famosa pela sua utilização no tratamento contra picadas de cobra relatado por povos indígenas e seringueiros.

O presente trabalho descreve a preparação e a caracterização das nanopartículas de prata a partir da redução de íons pelo método de síntese química inorgânica e verde, utilizando extrato hidro alcóolico liofilizado de *Humirianthera ampla*, além disso, foram realizados ensaios microbiológicos para avaliar a atividade antimicrobiana sobre cepas de bactérias, fungos filamentosos e fungos leveduriformes.

2. FUNDAMENTAÇÃO E PERCURSO METODOLOGICO

PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A amostra vegetal foi coletada no município de Plácido de Castro, a exsicata foi depositada no herbário UFACPZ, para confirmação de gênero e espécie, com número de tomo 20566. Após confirmação, o material vegetal foi secado em estufa à 40 °C por 48h e em seguida triturado. O extrato foi preparado em meio hidro alcóolico, sendo coletadas as frações a cada 24h. Esse processo foi repetido três vezes e filtrado para realizar a rotaevaporação do solvente, para então realizar a liofilização da amostra vegetal.

SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA UTILIZANDO BOROIDRETO DE SÓDIO COMO AGENTE REDUTOR – NPs-Ag/Inorgânicas

Em um Erlenmeyer de 250mL, adicionaram-se 75 mL de uma solução $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de boroidreto de sódio. O frasco foi então colocado em um banho de gelo durante 10 a 15 min. Em seguida, colocou-se uma barra magnética de agitação no frasco e levou-se o conjunto a uma placa de agitação. Com o auxílio de uma bureta, adicionaram-se, gota a gota, 25 mL de uma solução $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de nitrato de prata. Essa adição ocorreu num período de aproximadamente 4 min e com taxa de adição de 1 gota s⁻¹.

SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA A PARTIR DO EXTRATO VEGETAL – NPs-Ag/Orgânicas

As nanopartículas de prata foram sintetizadas a partir do método de síntese verde, utilizando extrato de *Humirianthera ampla* como agente redutor. Para obtenção das NPs-Ag/Orgânicas, foi utilizada uma solução padrão de nitrato de prata 100 mL a 1 mM (AgNO₃ Sigma-Aldrich, São Paulo), da qual foram pipetados 10 mL, que posteriormente foi adicionado a solução do extrato na concentração de 200 µg mL⁻¹ perfazendo um volume total

final de 15 mL. Após a mistura, a solução foi homogeneizada utilizando Agitador Vortex (QUIMIS modelo Q220M) e incubada por um período de 24 horas em temperatura ambiente.

CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Foram realizadas análises espectroscópicas de Uv-Vis em espectrofotômetro Shimadzu (UV-1601 Japan), com resolução de 1 nm na faixa entre 650 e 350 nm. As dimensões e distribuição das nanopartículas nos coloides foram analisadas a partir da técnica de espalhamento dinâmico de luz – DLS, que avalia o raio hidrodinâmico utilizando um sistema zetaser Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK). Essas medidas foram realizadas a partir de comprimento de onda do laser (He-Ne) em 633 nm, ângulo de espalhamento fixo em 173° e temperatura de 25°C e modo de resolução normal em cubeta de poliestireno (DTS0012).

ENSAIO MICROBIOLÓGICO

A amostra vegetal, as NPs-Ag/inorgânicas e as NPs-Ag/verdes foram submetidas a ensaios biológicos para avaliação da atividade antimicrobiana sobre cepas de bactérias, fungos leveduriformes e fungos filamentosos. Os mesmos foram pesados e devidamente solubilizados em 150 µL (5%) de dimetil-sulfóxido (DMSO) e adicionados 60 µL (2%) de Tween 80, completando-se o volume final com água destilada esterilizada q.s.p. 3 mL. Dessa forma, foi obtida a concentração inicial dos produtos ($1024 \mu\text{g mL}^{-1}$) e diluído em série até $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ [4,5,6].

MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para avaliação da atividade biológica foram Brain Heart Infusion (BHI), Agar Sabouraud Dextrose (ASD)- adquiridos da Difco Laboratories Ltd, USA, France, para manutenção, respectivamente, das cepas de bactérias e fungos. Enquanto que para os ensaios de atividade biológica, foram usados caldo Brain Heart Infusion (BHI) para as bactérias e meio RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato para os fungos (Difco Laboratories Ltd, USA, France e INLAB, São Paulo, Brasil). Todos os meios foram preparados conforme as descrições dos fabricantes.

MICRO-ORGANISMOS

Para os ensaios de atividade biológica dos produtos testes, foram utilizadas as seguintes cepas:

-Bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC-25923, *S. epidermidis* ATCC-12228, e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC – 25853, *P.aeruginosa* ATCC-9027, *Escherichia coli* ATCC-18739

-Fungos leveduriformes: *Candida albicans* ATCC-90028, *C. albicans* CBS-562, *C. tropicalis* ATCC-13803, *Candida glabrata* ATCC-90030

-Fungos filamentosos: *Aspergillus flavus* ATCC-13013, *Aspergillus fumigatus* ATCC-40640.

Os micro-organismos pertencem a MICOTECA do Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). As cepas foram mantidas em BHI/bactérias e em ASD/fungos à temperatura de 4°C. Foram utilizados para os ensaios, repiques de 24 - 48 horas em BHI/ASD, respectivamente, para bactérias e leveduras, incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

INÓCULO

Para preparação do inóculo, as colônias obtidas de culturas das cepas de bactérias em meio BHI e fungos em meio ASD, foram suspensas em solução fisiológica a 0,9% estéril e ajustadas de acordo com o tubo 0,5 da escala padrão de Mc Farland para obtenção de 10^6 UFCmL⁻¹ [4,7-11].

CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados conforme os protocolos de Cleeland & Squires [4], Eloff [12] e CLSI [8]. A determinação da CIM das amostras sobre cepas bacterianas e fúngicas foram realizadas através da técnica de microdiluição em caldo, com placa para cultura de células (TPP/ SWITZERLAND/EUROPA) contendo 96 poços com fundo em “U”. Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de caldo RPMI/BHI duplamente concentrado nos poços das placas de microdiluição. Em seguida, 100 µL dos produtos solubilizados foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição, foram obtidas concentrações de 1024 até 8 µgmL⁻¹. Por fim, foi adicionado 10 µL das suspensões das cepas bacterianas e fúngicas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se, especificamente, a uma espécie. Paralelamente, foram realizados os controles: micro-organismos (CBHI + bactérias e RPMI + leveduras e fungos filamentosos), para comprovação da viabilidade das linhagens microbianas, meio de cultura (CBHI/RPMI), para comprovação da esterilidade e controle com antimicrobianos: cloranfenicol (50 µgmL⁻¹) para

inibição das bactérias e fluconazol ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) para inibição dos fungos. As placas preparadas foram assepticamente fechadas e submetidas à incubação numa temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 - 48 horas para os ensaios com bactérias e leveduras e a temperatura ambiente ($28-30^\circ\text{C}$) para os fungos filamentosos.

No caso do ensaio biológico com as bactérias, após 24 h de incubação, foi adicionado $20 \mu\text{L}$ de solução do corante resazurina a 0,01% (INLAB), reconhecido como um indicador colorimétrico de óxido-redução [13]. O ensaio foi incubado a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 - 48 h. Após a mudança de coloração do corante (azul para vermelho), considerou-se como indicador de crescimento microbiano; e se a cor permanece azul, significa a ausência de crescimento microbiano.

O produto foi considerado ativo quando inibiu, pelo menos, 50% dos microorganismos utilizados nos ensaios de atividade biológica. E a CIM para cada produto foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento microbiano e/ou verificado pela permanência da coloração do corante indicador [4,14]. A Concentração Inibitória Mínima /CIM, foi considerada e interpretada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: até $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ = forte atividade; $600-1500 \mu\text{g mL}^{-1}$ = moderada atividade; acima de $1500 \mu\text{g mL}^{-1}$ = fraca atividade [15-17].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

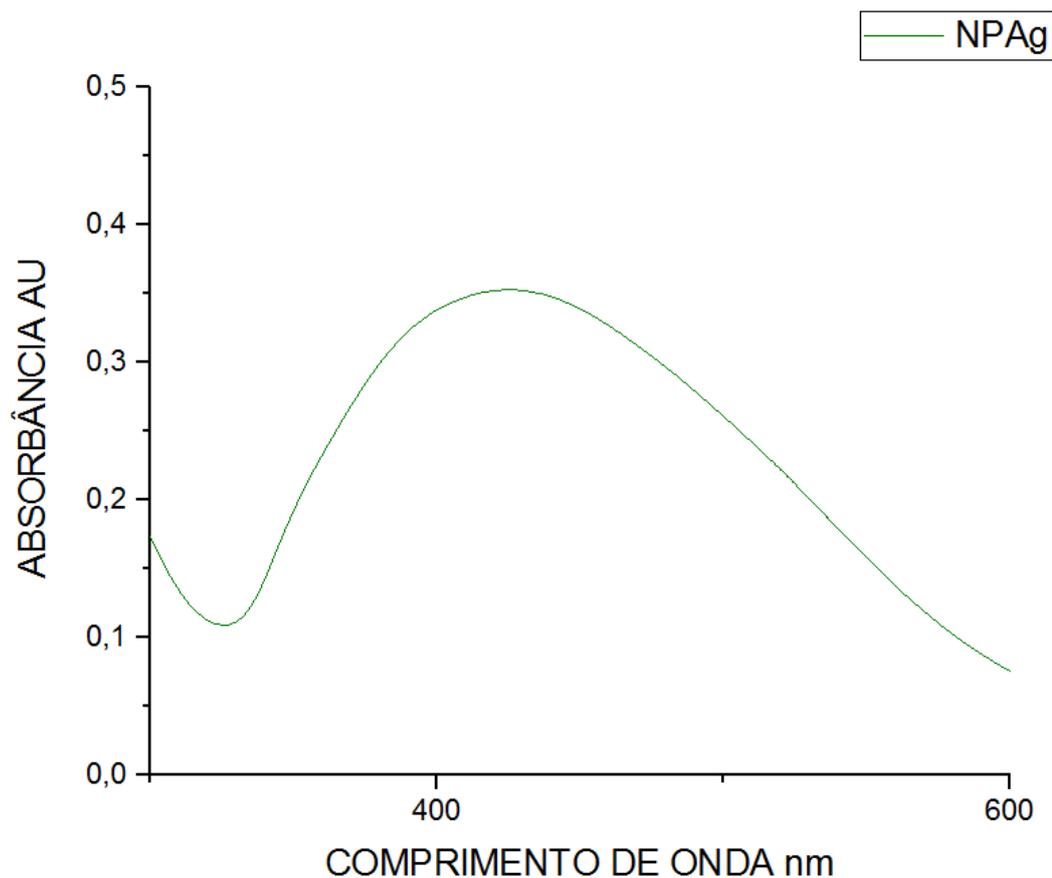
Após o período de incubação das nanopartículas sintetizadas pelo método verde, observa-se a mudança na coloração Fig. 1, onde inicialmente era incolor, passando para um tom âmbar que indica o sucesso da formação do produto da reação química.

FIGURA 1. Síntese de Nanopartículas de Prata após mudança de coloração



As análises de Uv-Vis das nanopartículas endossam esses indícios, pois mostram a intensidade de absorbância (Fig. 2, gráfico UV-VIS) com padrão de curva monomodal, que evidencia a obtenção das nanopartículas em formato esférico e com banda de ressonância plasmônica entre 436-446 nm similar aos reportados na literatura para o extrato de *Cnidocolus chayamansa* e *Azadirachta indica* [18,19].

FIGURA 2. DADOS UV-VIS



A análise de espalhamento dinâmico de Luz (DLS) revelou um tamanho médio de nanopartículas de 47 nm e um volume percentual de aproximadamente 20% da amostra, como pode ser observado na Fig. 3. Os valores de intercept ficaram em torno de 0,9 revelando uma excelente qualidade dos dados. Na Fig. 4 observa-se o raio hidrodinâmico pela intensidade da amostra.

FIGURA 3. Gráfico de Intensidade

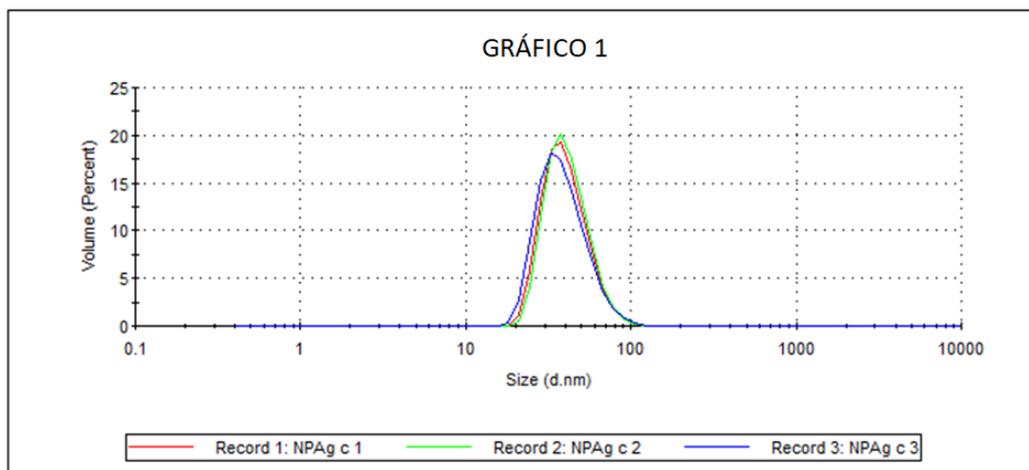
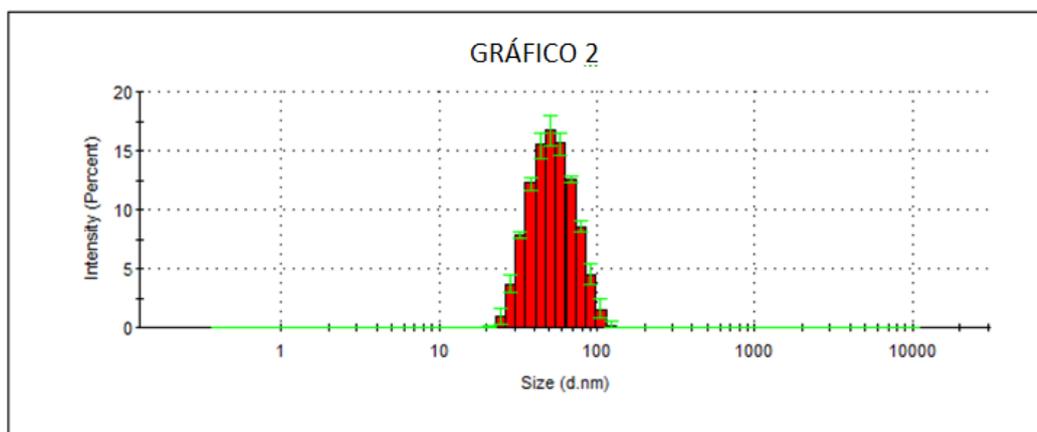


FIGURA 4. Raio hidrodinâmico pela Intensidade



Essas mesmas análises, descritas acima, foram realizadas para a solução de NPs-Ag/inorgânicas, que se mostram bastante semelhantes às NPs-Ag/verde sintetizadas pela rota orgânica, em todos os aspectos.

A Tabela 1 descreve os resultados da avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica dos produtos testados. A ação antimicrobiana das nanopartículas de prata sintetizadas pela rota verde apresentara atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, enquanto que o extrato da *Humirianthera ampla* e das nanopartículas inorgânicas (sintetizadas com boroidreto de sódio como agente redutor), não inibiram o crescimento das espécies bacterianas e fúngicas.

TABELA 1. Resultado do Ensaio Microbiológico

Produtos (µg/ mL)	<i>S. aureus</i> ATCC-25923	<i>S. epidermidis</i> ATCC-12228	<i>P. aeruginosa</i> ATCC-25853	<i>P. aeruginosa</i> ATCC-9027	<i>E. coli</i> ATCC- 18739	<i>C. albicans</i> ATCC-90028	<i>C. albicans</i> CBS-562	<i>C. tropicalis</i> ATCC-12228	<i>C. glabrata</i> ATCC-90030	<i>A. flavus</i> ATCC-13013
Extrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NPs-Ag /inorgânicas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NPs-Ag /orgânicas	1024 (-)	1024 (-)	1024 (-)	1024 (-)	+	+	+	+	+	+

(+) crescimento microbiano em todas as concentrações. 1024(-) concentração onde não houve crescimento microbiano.

A alíquota de cada amostra utilizada nos ensaios microbiológicos foram retirados do seu total, não sendo realizado nenhuma preparação, como por exemplo a liofilização das nanopartículas, para aplicar uma solução mais concentrada o que poderia ter potencializado para obter uma concentração inibitória menor do que o resultado apresentado.

Dentre as bactérias testadas se encontra as *Pseudomonas aeruginosa*, que são consideradas bactérias multirresistentes a maioria dos antimicrobianos devido a capacidade de impermeabilidade da membrana externa, a produção de β-lactamases, regulação de bombas de efluxo e outros fatores que configuram para essa resistência adquirida[20]. As nanopartículas sintetizadas, utilizando o extrato de *Humirianthera ampla*, terem apresentado a inibição do crescimento microbiano para essa espécie bacteriana indica um avanço na perspectiva para novos estudos utilizando essa abordagem de síntese.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A solução das nanopartículas sintetizadas a partir do extrato de *Humirianthera ampla*, como agente redutor, apresentou coloração específica do produto, indicando o sucesso da reação, ao mesmo tempo que, análise de UV-vis reforçou essa hipótese ao revelar curva monomodal para a solução, que evidencia a obtenção das nanopartículas em formato esférico e com banda de ressonância plasmônica entre 436-446 nm. Além disso, a análise de espalhamento dinâmico de Luz (DLS) confirmou a presença de nanopartículas com tamanho médio de 47 nm pela rota de síntese verde. Ao ser confrontadas com microorganismo, o extrato da planta não mostrou ter atividade, tampouco as nanopartículas sintetizadas pelo

método inorgânico, entretanto, quando as NPs e extrato da planta, foram associados, o produto se mostrou capaz de inibir o crescimento microbiano de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, dentre elas a *Pseudomonas aureuginosas*.

A partir de métodos específicos de concentração das NPs-Ag, a CIM pode ser reduzida, por exemplo, utilizando a centrifugação ou a liofilização das nanopartículas, de modo a aumentar a eficiência de inibição dessas bactérias aplicando um produto mais concentrado. Contudo, esses resultados já se mostraram promissores para estudos futuros, tendo em vista que o produto já se mostrou um antimicrobiano em potencial.

REFERÊNCIAS

- [1]. WANG, H., QIAO, X., CHEN, J., & DING, S. Preparation of silver nanoparticles by chemical reduction method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 256, n. 2-3, p. 111-115, 2005.
- [2]. SINGH, J; DUTTA, T; KIM, K.H; RAWAT, M; SAMDDAR, P; KUMAR, P. Green synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation. *Journal of nanobiotechnology*. v. 16, n. 1, p. 84, 2018.
- [3]. SENA, A. E. C., da SILVA, K. L. C., MARQUES, R. de A. (2019). Análise experimental de *Humirianthera ampla*: testando positividade para alcaloides. *Scientia Naturalis*, v. 1, n. 1, 2019.
- [4]. CLELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “*in vitro*” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.
- [5]. NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, M. P. O.; JÚNIOR, A. M. B., TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.
- [6]. PEREIRA, F. O.; MENDES, J. M.; LIMA, I. O.; MOTA, K. S. L.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 2, p. 1–7, 2014.
- [7]. CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE^c. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard

M07-A10. Pennsylvania, United States of America: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2015.

[8]. CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE^a. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved standard M27-A3.

Pennsylvania, United States of America: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

[9]. HADACEK, F. GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, p. 137-147, 2000.

[10]. ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n. 4, p. 517-524, 2006.

[11]. FREIRE, I.C.M.; PÉREZ, A.L.A.L. ; CARDOSO, A.M.R.; MARIZ, B.A.L.A.; ALMEIDA, L.F.D.; CAVALCANTI, Y.W.; PADILHA, W.W.N. Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16 n.2, 2014.

[12]. ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplatemethod to determine the Minimal Inhibitory Concentration of plant etracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.

[13]. MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, v.84, p.538-544, 1998.

[14]. HAFIDH, R. R., ABDULAMIR, A. S., VERN, L. S., BAKAR, F. A., ABAS, F., JAHANSHIRI, F. AND SEKAWI, Z. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **The Open Microbiology Journal**, v. 5, p. 98-106, 2011.

[15]. HOLETZ, F.B.; HOMES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

[16]. SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential

oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

[17]. HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.391-400, 2007.

[18]. AHMED, S.; AHMAD, M.; SWAMI, B. L.; IKRAM, S. Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2016.

[19]. DZUL-EROSA, M. S.; DÍAZ, M. M. C.; LAZCANO, T. A. R.; RODRÍGUEZ, M. Á.; AGUILERA, J. A. R.; GONZÁLEZ-MUÑOZ, P. M. Aqueous leaf extracts of *Cnidocolus chayamansa* (Mayan chaya) cultivated in Yucatan Mexico. Part II: Uses for the phytomediated synthesis of silver nanoparticles. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 91, p. 838-852. 2018.

[20]. POOLE, K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistência ao máximo. **Fronteiras em microbiologia**, v. 2, p. 65, 2011.