

**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS**

HOZANA DE SOUZA FERREIRA

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOSSURFACTANTE
VEGETAL NA ESTABILIZAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA COMO AGENTES
ANTIBACTERIANOS**

Recife

2024

HOZANA DE SOUZA FERREIRA

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOSSURFACTANTE
VEGETAL NA ESTABILIZAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA COMO AGENTES
ANTIBACTERIANOS**

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Moura de Luna

Co-orientadora: Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo

Recife

2024

FERREIRA, H.S. Produção e Aplicação de Biossurfactante Vegetal na Estabilização de Nanopartículas de Prta como Agentes Antibacterianos, 2024. p.

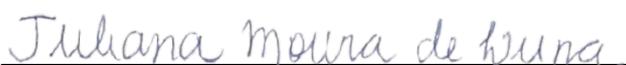
Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2024.

1. Nanopartículas de prata; 2. Biossurfactante; 3. Antimicrobiano 5. Estabilidade de Nanopartículas; Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

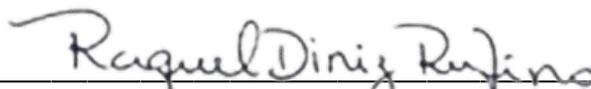
PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOSURFACTANTE VEGETAL NA ESTABILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA COMO AGENTES ANTIBACTERIANOS

HOZANA DE SOUZA FERREIRA

Examinadores:



Profa. Dra. Juliana Moura Luna (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco –
UNICAP



Profa. Dra. Raquel Diniz Rufino
Universidade Católica de Pernambuco –
UNICAP

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco -
UFRPE

Defendida em 23/02/2024

Coordenador (a): Prof. Dr. Sérgio Mendonça de Almeida

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, pela força e coragem que me foi concedida nessa caminhada.

Aos meus pais, Edilene e Joelcio por todo o incentivo, confiança, amor, carinho, por sempre se esforçarem para me proporcionar as melhores oportunidades, se não fosse por eles, certamente eu não chegaria até aqui. Assim como minhas irmãs, Hortência e Josiclécia, que são minhas maiores incentivadoras, e estão sempre torcendo por mim.

A professora Juliana, minha querida orientadora, pela oportunidade, confiança, ensinamentos, paciência, e toda a contribuição que foi fundamental para o meu crescimento profissional.

A professora Leonie, pela disponibilidade, recursos e confiança.

Ao meu querido amigo Hugo, que contribuiu de forma valiosa e essencial nessa pesquisa, por todo o conhecimento compartilhado, ajuda, parceria e disponibilidade.

A Lucas, meu parceiro, que foi tão importante nesse processo, chorando e se alegrando junto comigo, sempre confiante na minha capacidade de vencer todos os obstáculos.

Aos integrantes do meu grupo de pesquisa, sempre tão solícitos, dispostos, e prestativos, de fato, são amigos preciosos que o laboratório me proporcionou.

Aos meus amigos mais próximos que estiveram comigo desde o início, e aos que essa jornada me proporcionou conhecer, por todo o apoio, força, incentivo, por tornarem toda essa etapa mais leve.

A Lucas Rocha, que desde o início esteve me dando suporte em tudo o que era necessário no laboratório, sua paciência e alegria diária foi de grande valia para mim.

A FACEPE, pela concessão da bolsa de estudos, que fez com que esse projeto fosse viável.

A CNPq, ao Instituto Avançado de Tecnologia, Inovação (IATI) e ao Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise - LIMCA, pela disponibilidade de recursos.

Aos professores Marcos e Rosileide pelo suporte na análise do meu material.

A todos que de alguma forma contribuíram de alguma forma para que esse sonho pudesse ser realizado.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
CAPÍTULO I.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1 Biossurfactantes.....	17
3.1.1 Propriedades.....	18
3.1.2 Classificação.....	20
3.2 Biossurfactantes de origem vegetal.....	21
3.2.1 Saponinas.....	21
3.2.2 Fontes de saponina.....	24
3.2.3 <i>Citrus reticulata</i>	26
3.3 Nanopartículas de Prata (AgNPs).....	27
REFERÊNCIAS.....	30
CAPÍTULO II	38
Resumo.....	40
1. Introdução.....	41
2. Material e Métodos.....	42
2.1 Biossurfactante vegetal.....	42
2.2 Extração de biossurfactante de origem vegetal.....	43
2.3 Determinação da Tensão superficial e da CMC.....	44
2.4 Determinação da emulsificação.....	44
2.5 Avaliação da estabilidade do biossurfactante vegetal.....	44
2.6 Teste de toxicidade do biossurfactante frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i> ...44	
2.7 Teste de fitotoxicidade do biossurfactante com sementes vegetais.....	45

2.8 Caracterização do biossurfactante vegetal.....	45
2.9 Síntese das nanopartículas estabilizadas com biossurfactante vegetal.....	46
2.10 Propriedades e características das nanopartículas de prata estabilizadas com biossurfactante vegetal.....	46
2.11 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	47
3. Resultados e Discussão.....	47
3.1 Seleção do processo de extração de biossurfactante de origem vegetal.....	47
3.2 Propriedades tensoativas do biossurfactante de origem vegetal.....	48
3.3 Estabilidade do biossurfactante relacionado à tensão superficial do biossurfactante vegetal.....	49
3.4 Índice de emulsificação do biossurfactante de origem vegetal.....	50
3.5 Teste de toxicidade com <i>Artemia salina</i>	51
3.6 Teste de fitotoxicidade com sementes.....	51
3.7 Caracterização do biossurfactante vegetal	52
3.7.1 Cromatografia em camada fina do extrato vegetal.....	52
3.7.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	53
3.7.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	54
3.7.4 Teste de Liebermann-Burchard.....	56
3.8 Caracterização das nanopartículas de prata.....	56
3.9 Teste antimicrobiano.....	59
4. Conclusão.....	59
5. Agradecimentos.....	59
Referências.....	60
CAPÍTULO III	66
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 - Estrutura molecular do surfactante.....	17
Figura 2 - Representação da interação do tensoativo (surfactante) com as interfaces líquido-líquido, líquido-ar e líquido-sólido.....	18
Figura 3 - Ilustração esquemática do agente tensoativo e a formação de micelas.....	19
Figura 4 - Estrutura da saponina esteroideal.....	22
Figura 5 - Classificação das agliconas e triterpenóides.....	23
Figura 6 - Estruturas dos tipos de esqueletos triterpênicos das saponinas.....	24
Figura 7 - Principais vias do mecanismo citotóxico das AgNPs.....	28

CAPÍTULO II

Figura 1 - Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante vegetal extraído através da casca da tangerina.....	49
Figura 2 - Componentes detectados por cromatografia em camada delgada do extrato bruto extraído da tangerina revelado por anisaldeído.....	53
Figura 3 - Espectro de RMN H do biossurfactante vegetal.....	54
Figura 4 - Espectro de RMN C do biossurfactante vegetal.....	55

Figura 5 - Infravermelho biossurfactante vegetal.....	55
Figura 6 - Mudança da cor da solução após a redução do complexo de prata demonstrando a formação de nanopartículas (a) biossurfactante vegetal solubilizado em água destilada; (b) ANPs sintetizadas com o biossurfactante vegetal.....	56
Figura 7 - Espectro UV/visível de nanopartículas de prata estabilizadas biossurfactante vegetal.....	57
Figura 8 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas de prata estabilizadas com o biossurfactante vegetal da tangerina ampliação de 20000x.	58

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Presença de saponinas em algumas espécies vegetais.....25

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Estabilidade da tensão superficial do biossurfactante de origem vegetal extraído da casca da tangerina.....50

Tabela 2 - Índice de Emulsificação do biossurfactante de origem vegetal extraído da casca da tangerina (*Citrus Reticulata*)51

Tabela 3 - Fitotoxicidade do biossurfactante de origem vegetal isolado por *Citrus reticulata* nas diferentes concentrações propostas em sementes de tomate, maxixe e repolho.....52

LISTA DE ABREVIATÖES

NPs - Nanopartículas

AgNPs - Nanopartículas de prata

SDS - Dodecil sulfato de sódio

PVP - Polivinilpirrolidona

CMC - Concentração Micelar Crítica

IE - Índice de Emulsificação

C30 - 30 átomos de carbono

UV-visível - Ultravioleta visível

NPs - Nanopartículas

AgNPs - Nanopartículas de prata

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

CMC - Concentração micelar crítica

IG - Índice de germinação

GRS - Germinação relativa das sementes

CRR - Comprimento das raízes

TLC - Cromatografia em camada delgada

FTIR - Espectroscopia de infravermelho por transformada de fourrier

BS-AgNPs - Nanopartículas de prata complexas com biossurfactante

RMN- Ressonância magnética nuclear

DMSO- Dimetilsulfóxido

RESUMO

Os biossurfactantes vêm sendo amplamente explorados pelas suas diversas propriedades bioativas, dentre elas, o potencial de estabilizar nanopartículas de prata, o que pode ser uma alternativa aos surfactantes químicos que são tóxicos para os seres humanos e para o meio ambiente. Logo, o objetivo desse estudo foi extrair moléculas surfactantes dos resíduos da tangerina (*Citrus reticulata*) e avaliar suas propriedades surfactantes e emulsificantes, testando o seu potencial como agente estabilizante de nanopartículas de prata (AgNPs) e como agente antimicrobiano. Para isso, três métodos de extração foram testados, de forma que o método ácido-base foi escolhido por ter potencializado a obtenção de um extrato capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 30 mN/m, com CMC de 0,7 % e rendimento de 1,0 g/Kg. Sua estabilidade foi confirmada após a realização de testes em condições extremas de pH e temperatura. O extrato apresentou natureza aniônica, e não foi tóxico para as sementes de hortaliças e para o microcrustáceo *Artemia salina*. As nanopartículas de prata estabilizadas com o extrato foram identificadas e caracterizadas através de análises com espectroscopia no ultravioleta visível (UV/Vis), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e potencial zeta. A UV/Vis apresentou um pico de máxima absorção em 400-450 nm, característico de nanopartículas. A microscopia MEV, identificou a formação de nanopartículas de morfologia predominantemente esféricas apresentando tamanhos na faixa de 384-568 nm. O potencial zeta foi de - 86,30 mV, mostrando que a presença do biossurfactante promoveu estabilidade das nanopartículas de prata. A atividade antimicrobiana das AgNPs sintetizadas com o biossurfactante vegetal foi avaliada frente a micro-organismos patogênicos (*Echerichia coli* e *Staphylococcus aureus*), que se mostraram sensíveis. Sendo assim, o biossurfactante extraído da casca da tangerina é um estabilizante promissor de nanopartículas de prata, além de possuir potencial como agente antimicrobiano.

Palavras-chave: Biossurfactante vegetal, nanopartículas de prata, antimicrobianos

ABSTRACT

Biosurfactants have been widely explored for their diverse bioactive properties, including the potential to stabilize silver nanoparticles, which can be an alternative to chemical surfactants that are toxic to humans and the environment. Therefore, the objective of this study was to extract surfactant molecules from tangerine (*Citrus reticulata*) residues and evaluate their surfactant and emulsifying properties, testing their potential as a stabilizing agent for silver nanoparticles (AgNPs) and as an antimicrobial agent. For this, three extraction methods were tested, so that the acid-base method was chosen because it enhanced the obtaining of an extract capable of reducing the surface tension of water from 72 to 30 mN/m, with a CMC of 0.7 % and yield of 1.0 g/Kg. Its stability was confirmed after carrying out tests under extreme pH and temperature conditions. The extract was anionic in nature and was not toxic to vegetable seeds and the microcrustacean *Artemia salina*. The silver nanoparticles synthesized with the extract were identified and characterized through analyzes with ultraviolet visible spectroscopy (UV/Vis), scanning electron microscopy (SEM) and zeta potential. UV/Vis showed a maximum absorption peak at 400-450 nm, characteristic of nanoparticles. SEM microscopy identified the formation of nanoparticles with predominantly spherical morphology featuring sizes in the range of 384-568 nm. The zeta potential was - 86.30 mV, showing that the presence of the biosurfactant promoted stability of the silver nanoparticles. The antimicrobial activity of AgNPs synthesized with plant biosurfactant was evaluated against pathogenic microorganisms (*Echerichia coli* and *Staphylococcus aureus*), which proved to be sensitive. Therefore, the biosurfactant extracted from tangerine peel is a promising stabilizer of silver nanoparticles, in addition to having potential as an antimicrobial agent.

Keywords: Plant biosurfactant, silver nanoparticles, antimicrobials.

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia vem crescendo em virtude da grande quantidade de aplicações eficazes em diversos setores, que vão desde técnicas químicas tradicionais às tecnologias medicinais e ambientais (Ahmad *et al.*, 2019). Estipula-se que uma partícula é nano se o seu diâmetro for de 1 a 100 nanômetros (bilionésimo de metro), sendo inclusive nesta faixa encontradas as nanopartículas (NPs) consideradas mais práticas e eficazes, tradicionalmente sintetizadas por vias químicas (Lee; Jun, 2019). As nanopartículas de prata (AgNPs) têm sido usadas em uma ampla variedade de aplicações, por apresentarem propriedades não tóxicas, inorgânicas e antibacterianas (Eswari; Dhagat; Mishra, 2018). Devido a essas características, as AgNPs podem contribuir para diversas aplicações, como pomadas, na nanomedicina, detecção química, armazenamento de dados, biologia celular, agricultura, cosméticos, têxteis, indústria de alimentos, atividade de degradação de corante orgânico fotocatalítico, antioxidantes e agentes antimicrobianos (Ahmad *et al.*, 2019).

Apesar dos avanços recentes na aplicação de nanopartículas, a alta relação entre área de superfície e volume e sua alta energia de superfície intrínseca causa um desafio para sintetizar nanopartículas com tamanho controlado, estabilidade, forma e dispersibilidade à medida que as nanopartículas se agregam para diminuir sua alta energia superficial, o que compromete sua alta área de superfície, maior reatividade e aplicações bactericidas (Nie *et al.*, 2018). Assim, vários surfactantes químicos, como dodecil sulfato de sódio (SDS), polivinilpirrolidona (PVP) são usados como estabilizantes promissores de nanopartículas. Apesar de sua ampla aplicabilidade, surfactantes sintéticos e polímeros representam riscos ambientais e riscos biológicos, pois são produtos derivados do petróleo (Almeida *et al.*, 2016).

Portanto, uma das estratégias recentes para a síntese sustentável, ecologicamente correta e biocompatível de nanopartículas metálicas biologicamente ativas é o uso de biosurfactantes como agentes de cobertura, que além de estabilizadores, também podem atuar como um agente redutor (funcionalidade dupla) (Bezza; Tichapondwa; Chirwa, 2020).

Biosurfactantes são compostos tensoativos com estruturas bioquímicas diversas produzidos por microrganismos ou por vegetais, podendo ser aplicados industrialmente em processos fermentativos, especialmente utilizando substratos

imiscíveis em água como fontes nutricionais (Bezza; Tichapondwa; Chirwa, 2020). Eles apresentam vantagens sobre os similares químicos, como biocompatibilidade, baixa toxicidade, diversidade de aplicações e funcionalidade sob condições extremas (Liu *et al.*, 2020), além de possuírem a vantagem de utilizar em seu processo de produção, tanto os microbianos quanto os vegetais, resíduos agroindustriais que seriam descartados, como por exemplo, resíduo da cana-de-açúcar, resíduo do pendúculo do cajueiro, resíduo do coco verde, entre outros, agregando ainda mais valor ao produto (Magalhães *et al.*, 2018).

Vários estudos relataram a síntese verde ecológica de AgNPs usando produtos naturais como extratos de plantas, vitaminas, polímeros biodegradáveis, biossurfactantes e enzimas como agentes redutores e niveladores / estabilizadores (Song *et al.*, 2019). Nesse sentido, esse trabalho teve como objetivo extrair moléculas surfactantes da casca da tangerina (*Citrus reticulata*), avaliar suas propriedades emulsificantes e surfactantes, testar seu potencial como agente estabilizante de nanopartículas de prata e como agente antibacteriano.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir e aplicar um biossurfactante na estabilização de nanopartículas de prata e avaliar seu potencial como agente antimicrobiano.

2.2 Objetivos Específicos

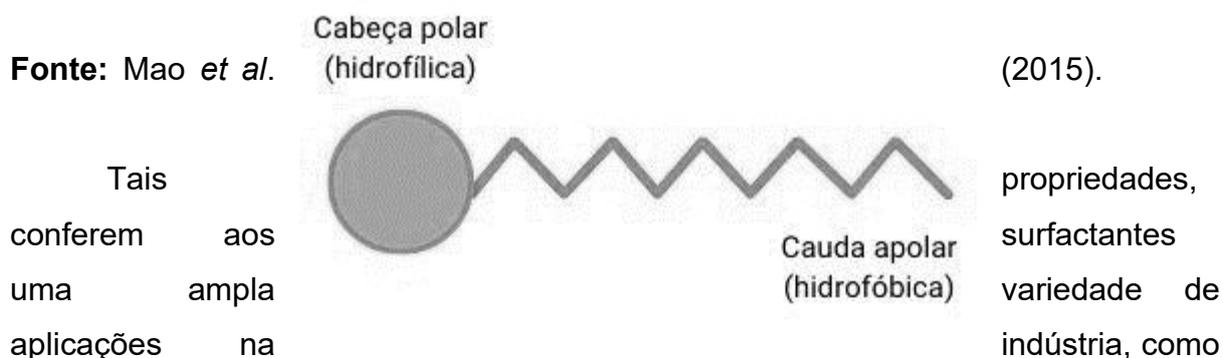
- Extrair biossurfactante da espécie vegetal *Citrus reticulata* (tangerina);
- Determinar o rendimento de produção;
- Avaliar diferentes metodologias de extração para melhor obtenção do biossurfactante;
- Determinar as propriedades tensoativas e emulsificantes;
- Investigar as propriedades surfactantes do extrato vegetal.
- Elucidar a estrutura molecular do biossurfactante presente no extrato.
- Avaliar a sua toxicidade e fitotoxicidade do biossurfactante
- Utilizar o biossurfactante vegetal como agente estabilizador na síntese de nanopartículas de prata;
- Avaliar as nanopartículas de prata sintetizadas quanto ao seu potencial antimicrobiano.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Biossurfactantes

Os biossurfactantes são compostos anfipáticos que apresentam em sua estrutura uma porção polar hidrofílica (que podem ser negativamente e/ou positivamente carregados, ou não possuir carga) e uma porção apolar hidrofóbica (que é composta por uma cadeia de hidrocarbonetos) (Figura 1). Devido a essa dualidade nas moléculas, os biossurfactantes possuem a capacidade de reduzir a tensão de líquidos através de interações específicas e preferenciais em superfícies e interfaces imiscíveis, como por exemplo, água e óleo. Possuindo também outras propriedades importantes, como a emulsificante, de detergência, dispersão de fases, formação de espuma (Farias *et al.*, 2021; Akbari *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2021).

Figura 1- Estrutura molecular dos surfactantes



Tais propriedades, conferem aos surfactantes uma ampla variedade de aplicações na indústria, como por exemplo, na área farmacêutica, na formulação de produtos alimentícios, cosméticos, produtos de higiene e limpeza, na recuperação terciária em poços de petróleo, na remoção de tinta na reciclagem do papel, na produção de polímeros, entre outras possíveis aplicações (Kashif *et al.*, 2022).

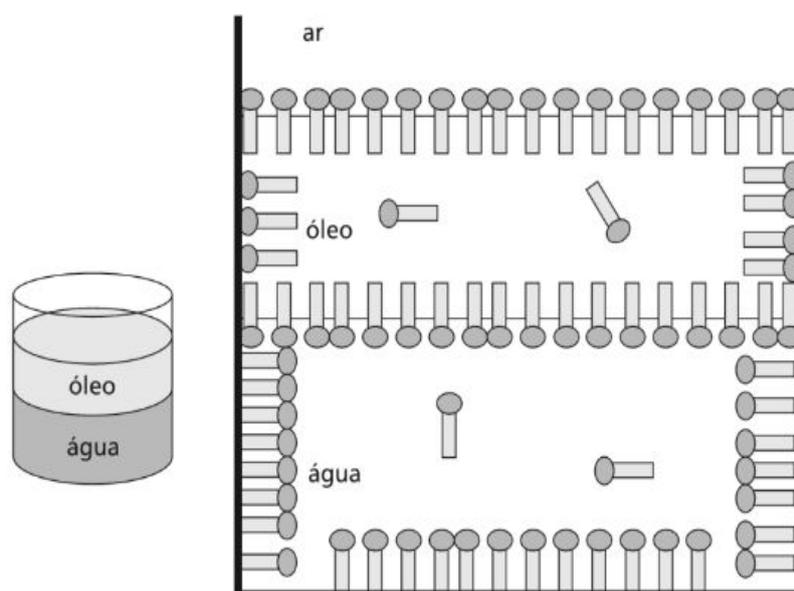
Porém, há outros aspectos a serem levados em consideração que são de grande relevância para a saúde e meio ambiente, já que grande parte dos surfactantes utilizados em larga escala nas indústrias são de origem petroquímica, aspectos esses como a toxicidade, bioacumulação e biodegradabilidade. Por esse motivo, há a necessidade do surgimento de surfactantes que sejam compatíveis com o meio ambiente (Zimmerman *et al.*, 2020).

3.1.1 Propriedades

Uma das principais propriedades de um biossurfactante, é a sua capacidade de reduzir a tensão superficial, que é a energia necessária para criar uma unidade de área na superfície de um líquido que ocorre devido a forças intermoleculares, comportando-se como uma membrana (Bezerra *et al.*, 2018).

Com isso, aumentam a solubilidade aquosa das moléculas hidrofóbicas, reduzindo a tensão superficial nas interfaces ar-líquido e líquido-líquido onde as moléculas tensoativas organizam-se de forma a migrar para as interfaces do sistema em que a parte hidrofóbica da molécula fica voltada para a fase mais apolar (óleo ou hidrocarboneto), enquanto a parte hidrofílica, fica voltada para a parte mais polar da molécula (água), interagindo também com a superfície líquido-sólido, para melhorar a estabilidade da solubilidade dos tensoativos (Figura 3) (Santos, 2016).

Figura 2- Representação da interação do tensoativo (surfactante) com as interfaces líquido-líquido, líquido-ar, líquido-sólido



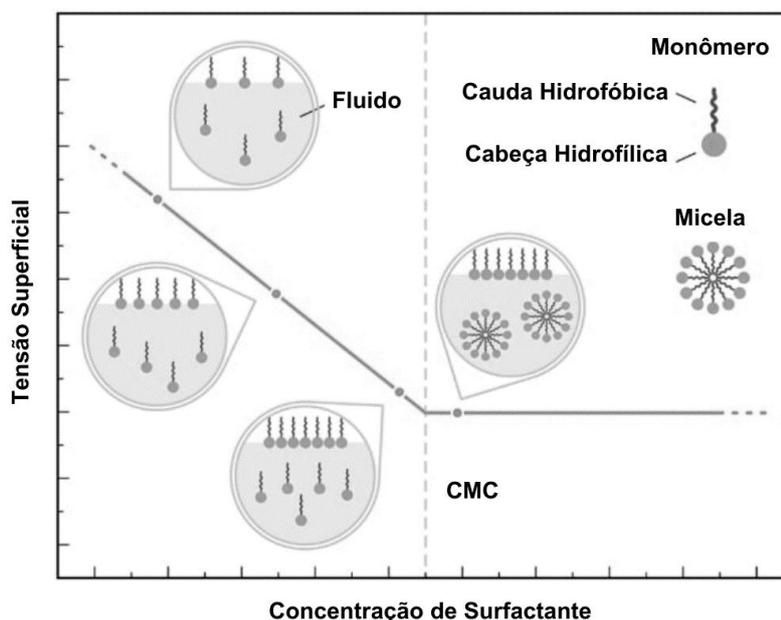
Fonte: Daltin, 2011.

O tipo de arranjo representado na Figura 2, é o fenômeno de adsorção onde as moléculas surfactantes se organizam de modo a minimizar a interação das regiões hidrofílicas com as regiões hidrofóbicas, alterando assim, as propriedades interfaciais (Daltin, 2011).

Outro tipo de estrutura pode ser formado durante esse processo, denominadas micelas, as quais ocorrem através do fenômeno de micelização. Ocorre quando há uma determinada concentração de surfactante na solução saturando a interface, ocorrendo a agregação dessas moléculas de forma que a parte hidrofóbica se orienta para o interior do agregado e a parte hidrofílica para o exterior. Esta conformação acontece quando há somente componentes hidrofílicos na solução ou quando óleos e/ou hidrocarbonetos estão em menor quantidade, podendo também ocorrer o contrário dependendo do solvente (Chowdhury, 2019).

As micelas são formadas apenas quando se atinge a Concentração Micelar Crítica (CMC), que corresponde à quantidade mínima de surfactante necessário para redução máxima da tensão superficial resultando em sua estabilidade, processo esse, que pode ser observado na Figura 3 (Ribeiro *et al.*, 2020).

Figura 3- Ilustração esquemática do agente tensoativo e a formação de micelas



Fonte: Vieira *et al.* (2021).

Tensoativos eficientes são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 35 mN/m e a tensão interfacial da água e do n-hexadecano (um hidrocarboneto) de 40 mN/m para 1 mNm, essa tensão é medida por tensiômetro, e

geralmente é utilizada para a identificação primária da presença de biossurfactante no meio (Bezerra *et al.*, 2018; Twigg, 2021).

Quando líquidos imiscíveis são agitados na presença de um surfactante, as moléculas tensoativas organizam-se na mistura dos líquidos de uma forma que geram barreiras elétricas ou estéricas na interface evitando a coalescência das gotas dos líquidos imiscíveis, podendo assim, gerar emulsões de água em óleo caso o surfactante seja mais solúvel em óleo, e óleo em água, caso o surfactante seja mais solúvel em água, se tornando uma fase líquida contínua (Dell'anno *et al.*, 2018; Vieira *et al.*, 2021).

Para a avaliação do índice de Emulsificação (IE), que avalia a capacidade emulsificante e a estabilidade, realiza-se um cálculo que se dá através da razão entre a altura total do líquido, e a altura remanescente da emulsão formada, estabelecendo um tempo para a realização das medições após a agitação (agitação de dois líquidos imiscíveis com a adição do surfactante), pois o IE depende do tempo de descanso (Cooper; Goldenberg 1987).

Em meio a agitação de uma solução contendo o biossurfactante, bolhas de ar podem entrar nessa solução fazendo com que seja possível a formação de bolhas, que quando envoltas por moléculas surfactantes, emergem à superfície da solução formando a espuma, podendo ela ser duradoura e volumosa, ou não. O que interfere nesse processo é o tipo de biossurfactante que está sendo utilizado, onde os que possuem uma maior concentração de cargas em sua parte polar são capazes de promover uma maior repulsão eletrostática (Nguyen; Sabatini, 2011; Salek; Euston, 2019).

Sendo as propriedades de redução da tensão superficial, emulsificante, estabilizante, espumante, detergência, concentração micelar crítica baixa, são importantes para a avaliação da eficiência de um surfactante (Shakeri, 2020).

3.1.2 Classificação

Os biossurfactantes são classificados de acordo com a sua origem, podendo ser de primeira geração e segunda geração. Os de primeira geração são aqueles extraídos a partir de matérias-primas de origem vegetal e animal ou inteiramente produzidos a partir de recursos renováveis por meio de síntese química, incluindo, as saponinas, ésteres de açúcar, alquil poliglicosídeos e alcanolaminas. Já os de segunda geração são produzidos inteiramente a partir de recursos renováveis ou

por um processo biológico (biocatálise ou fermentação), que são os surfactantes microbianos, como glicolipídios e lipopeptídeos (Kregiel *et al.*, 2017; Akbari *et al.*, 2018; Kashif *et al.*, 2022).

Também podem ser classificados de acordo com sua carga elétrica, composição química, peso molecular e número de cadeias (Rosenber; Ron, 1999; Jibrin *et al.*, 2021). Geralmente, os surfactantes de menor peso molecular, são mais eficazes na redução da tensão superficial (água-ar) e interfacial (água-óleo), já os de maior peso molecular, são mais eficientes na emulsificação, como por exemplo, na estabilização de emulsões de óleo em água (Drakontis; Amin, 2020; Ambaye *et al.*, 2021).

3.2 Biosurfactantes de origem vegetal

Os surfactantes vegetais são compostos anfífilos que possuem uma ampla distribuição, e podem ser encontrados em diversas partes da planta, desde a raiz até o seu fruto. Podendo ser classificados como fosfolipídios, proteínas ou hidrolisados proteicos e saponinas. (Mesgarzadeh; Akbarzadeh; Rahimi, 2017; Badve; Humbare, 2023).

Os fosfolipídeos, são surfactantes que possuem uma molécula de ácido fosfórico ligada a bases nitrogenadas e álcoois. Os mais utilizados, são aqueles obtidos através da degomagem do óleo de soja, sendo eles o fosfatidilinositol, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, essa mistura é conhecida como lecitina, cuja natureza da parte hidrofílica e hidrofóbica faz com que seja classificada como um emulsificante, oferecendo propriedades espessantes, lubrificantes e estabilizantes (Mumeen *et al.*, 2019; Rocha e Silva *et al.*, 2019).

As proteínas possuem maior massa molar, podendo ser classificada como emulsificante, sendo efetiva na estabilização de emulsões e espumas. Podendo ser modificadas por tratamento químico, térmico ou enzimático, gerando os hidrolisados de proteínas, melhorando ainda mais suas propriedades funcionais (Sałek; Euston, 2019; Pitocchi, *et al.*, 2020).

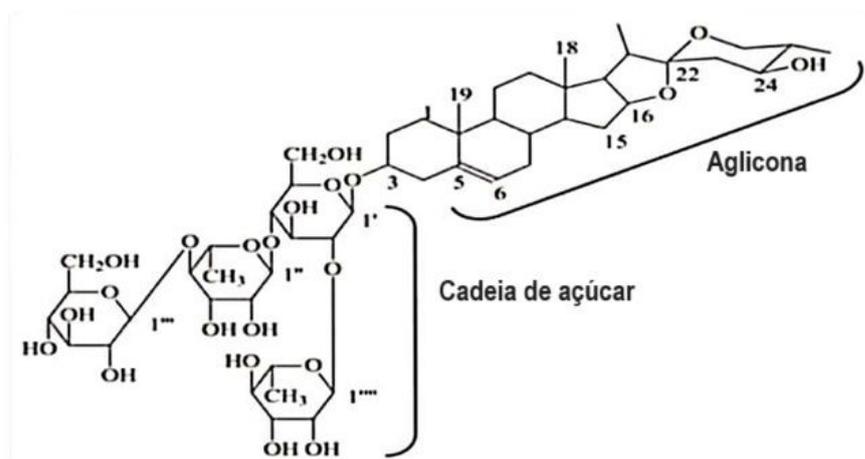
3.2.1 Saponinas

As plantas produzem uma variedade de produtos naturais que possuem uma estrutura química altamente diversificada, as saponinas são metabólitos

secundários de ocorrência natural em vegetais superiores, que possuem em sua estrutura molecular uma porção de açúcar hidrofílica ligada a uma aglicona hidrofóbica, encaixando-se como um glicosídeo, e por possuírem essa dualidade em suas moléculas, apresentam propriedades anfifílicas (Moisés; Papadopoulou; Osbourn, 2014; Mousavi *et al.*, 2022).

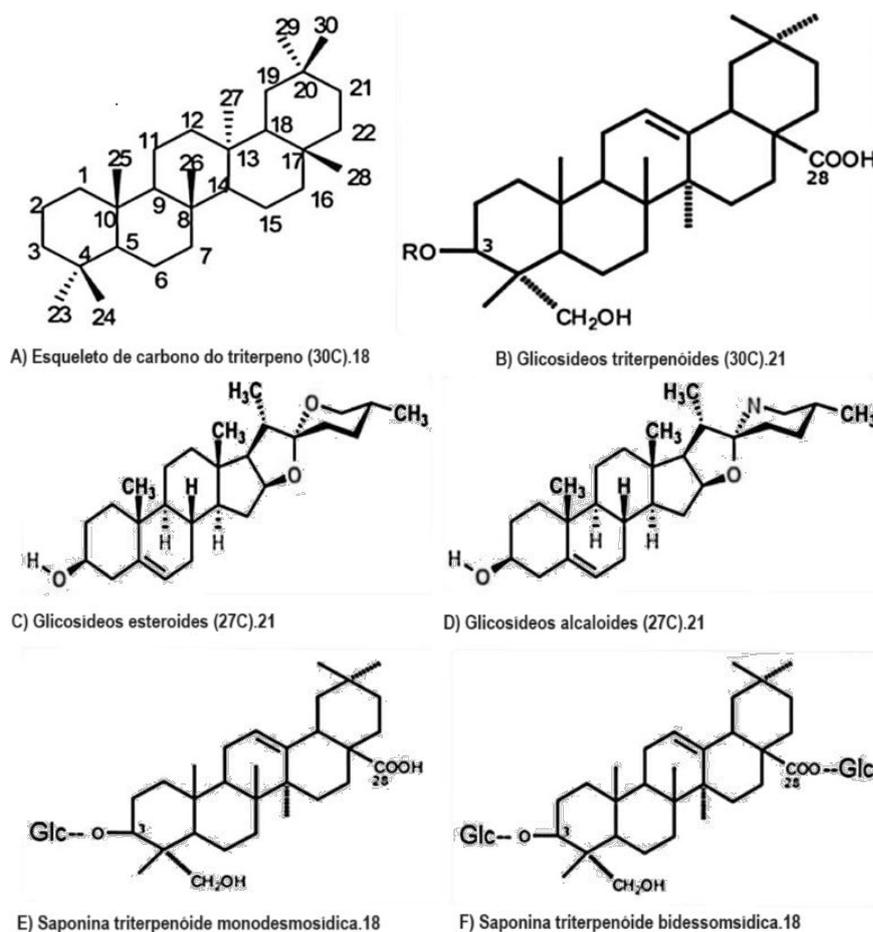
A complexidade da estrutura da saponina deriva da variabilidade da estrutura da aglicona, sendo assim, podem ser classificadas de acordo com o esqueleto dessa porção, sendo geralmente subdivididas em duas principais classes: esteroidal ou triterpênico (Figura 4 e 5) (El aziz; Ashour; Melad, 2019).

Figura 4- Estrutura da saponina esteroidal



Fonte: El aziz; Ashour; Melad, 2019.

Figura 5- Classificação das agliconas e triterpenóides

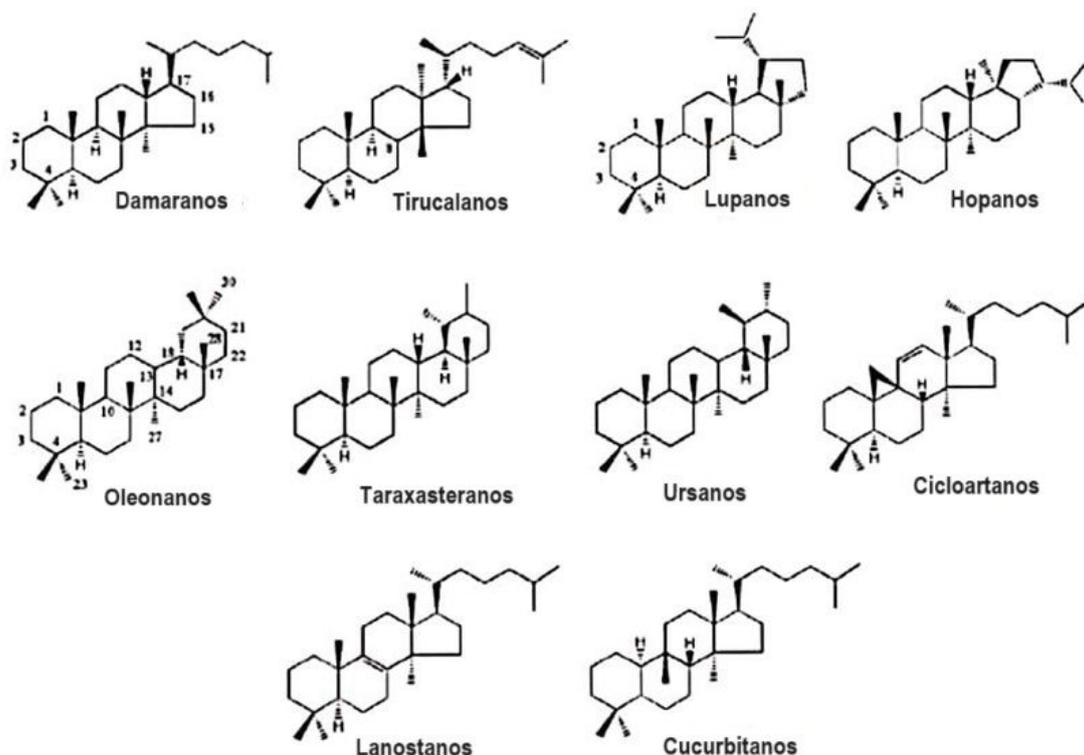


Fonte: El aziz; Ashour; Melad, 2019.

De modo geral, as duas principais classes derivam do precursor óxido de escaleno com 30 átomos de carbono (C30), em que as triterpênicas, se mantêm com os 30 átomos, já as esteróides, possuem apenas 27 átomos de carbono. Ambas as classes podem ser subdivididas baseadas nas modificações adicionais como por exemplo, os arranjos, as ciclizações, degradações, além da presença de substitutos de hidroxilas (Kalashgrani; Javanmardi, 2022).

Existem subclassificações quanto ao esqueleto da aglicona, em que as esteróides podem ser do tipo espirostando ou furostando, e as triterpênicas por apresentarem uma variedade quanto ao tipo de esqueleto, podem ser damaranos, tirucalanos, lupanos, hopenos, oleananos, taraxasteranos, ursanos, cicloartanos, lanostanos e cucurbitanos (Figura 6) (Moghimpour; Handali, 2015; Mousavi *et al.*, 2022).

Figura 6- Estruturas dos tipos de esqueletos triterpênicos das saponinas



Fonte: Vincken *et al.* (2007).

3.2.2 Fontes de saponina

As saponinas são encontradas em muitas espécies vegetais e sua distribuição entre os órgãos varia consideravelmente, estando presentes nas raízes, caules, folhas, flores ou frutos. As principais saponinas esteróides podem ser encontradas nas monocotiledôneas, como por exemplo, os membros das famílias *Agavaceae*, *Dioscoreaceae* e *Liliaceae*. Já as saponinas triterpenóides geralmente são encontradas em espécies de dicotiledôneas (Liu, 2017). Na Tabela 1, é possível observar algumas espécies vegetais que possuem saponinas.

Tabela 1- Presença de saponinas em algumas espécies vegetais

Espécie	Família	Referência
<i>Acacia concinna</i>	Fabaceae	Dan <i>et al.</i> (2022)
<i>Albizia procera</i>	Fabaceae	Pradhan <i>et al.</i> (2022)
<i>Achyranthes root</i>	Amaranthaceae	Kiuchi (2022)
<i>Acanthophyllum Glandulosum</i>	Caryophyllaceae	Dabestani; Yeganehzad; Miller (2021)
<i>Saponaria officinalis</i>	Caryophyllaceae	Grzywaczyk <i>et al.</i> (2023)
<i>Chenopodium quinoa</i>	Chenopodiaceae	Zhang <i>et al.</i> (2022)
<i>Citrus sinensis</i>	Rutaceae	Abdelazem; Hefnawy; El-Shorbagy (2021)
<i>Clematis lasianдра</i>	Ranunculaceae	Li <i>et al.</i> (2022)
<i>Furcraea foetida</i>	Araliaceae	Randriamamonjy <i>et al.</i> (2022)
<i>Hallea ledermannii</i>	Rubiaceae	Koffi <i>et al.</i> (2022)
<i>Panax ginseng</i>	Araliaceae	Piao <i>et al.</i> (2020)
<i>Quillaja saponaria</i>	Quillajaceae	Sotomayor-Gerding; Morales; Rubilar (2022)
<i>Sapindus laurifolia</i>	Sapindaceae	Behari; Mohanty; Das (2022)

Fonte: Autoria própria.

Além disso, as saponinas não se restringem apenas aos vegetais, podendo ser encontradas também, em alguns invertebrados marinhos, como esponjas, estrelas, pepinos do mar, e ainda em insetos (Guo *et al.*, 2018; Mumeen *et al.*, 2019). Moghimipour e Handali (2015) identificaram a presença de saponinas triterpenóides em secreções defensivas de insetos, principalmente do gênero *Platyphora* (besouros).

Os resíduos das frutas cítricas representam uma valiosa fonte de compostos bioativos (compostos fenólicos, carotenóides, açúcares, fibras, compostos voláteis, alcalóides, taninos, esteróides, saponinas, vitaminas, minerais), onde estudos revelaram que vários extratos alcoólicos e aquosos da casca da laranja continham

alcalóides, glicosídeos cardíacos, flavonoides, glicosídeos, fenóis, resinas, saponinas, esteróides, taninos, terpenóides e triterpenóides, em questões de quantidade, foram obtidos bons teores de saponina, sendo de $16,2 \pm 0,02 \%$, $13,4 \pm 0,01 \%$ e $13,1 \pm 0,06 \%$ respectivamente, utilizando diferentes métodos de extração (Abdelazem.; Hefnawy; El-Shorbagy, 2021).

3.2.3 *Citrus reticulata*

O gênero *Citrus* pertence à família *Rutaceae* que possui uma grande variedade de espécies, sendo comumente encontradas em quintais domésticos e na natureza em regiões tropicais e temperadas. Dentre as espécies, as mais comuns são *Citrus indica*, *Citrus macroptera*, *Citrus ichangensis*, *Citrus latipes*, *Citrus megaloxycarpa*, *Citrus aurantium*, *Citrus jambhiri* e *Citrus reticulata*. A *Citrus reticulata* é uma das espécies comercialmente importantes que possui diversas variedades e híbridos, sendo conhecida no Brasil como tangerina (o nome varia de acordo com a região) (Barreca *et al.*, 2013).

Assim como outras espécies cítricas, a tangerina é de origem indígena nas zonas subtropicais e tropicais da Ásia, e representam 22 a 25 por cento da produção mundial entre as espécies de frutas cítricas cultivadas comercialmente. São bastante conhecidas pelo seu sabor agradável e seus diversos fitoquímicos. Suas propriedades permeiam entre o fruto, as sementes, as folhas e a casca (Putnik *et al.*, 2017; Usman, Fatima, 2018; Mahato. *et al.*, 2019).

Com isso, os constituintes químicos presentes na tangerina são diversos, sua casca pode conter saponinas, taninos, glicosídeos cardíacos, carboidratos, açúcares redutores, açúcares redutores compostos, terpenóides, flavanóides e esteróis (Apraj *et al.*, 2011; Omer, *et al.*, 2015).

No Brasil, o clima tropical e subtropical é adequado para o seu cultivo, proporcionando condições ideais para o seu desenvolvimento em várias regiões do país, em especial nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Bahia e outros, sendo assim, de grande importância econômica (FAOSTAT - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, 2020; IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2020).

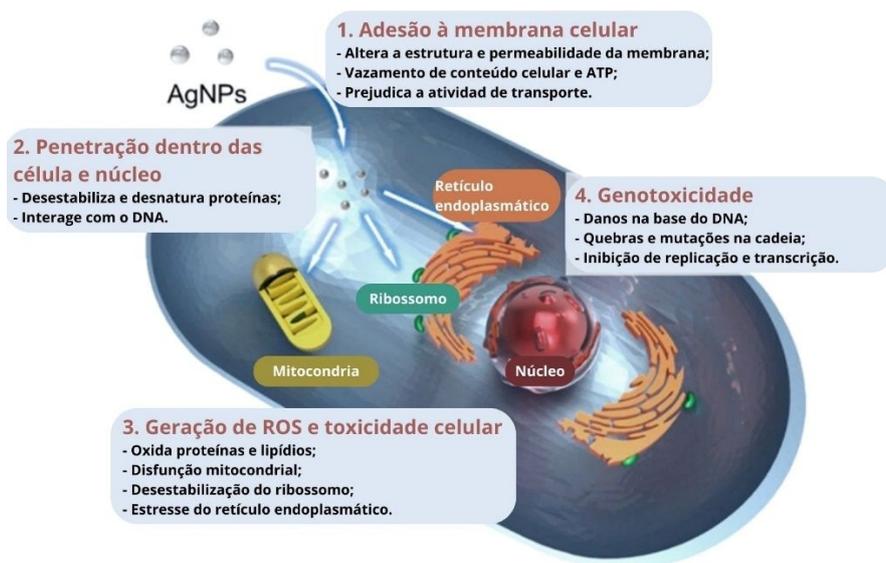
3.3 Nanopartículas de prata (AgNPs)

A nanotecnologia é um campo emergente que vem se destacando devido às suas diversas áreas de aplicações. Seu desenvolvimento se deu a partir da combinação de várias ciências, o que proporcionou a oportunidade de trabalhar no nível atômico e criar estruturas controlando formas e tamanho em escala nanométrica com dimensões de 1 a 100 nm. Neste contexto, as nanopartículas (NPs) estão sendo extensivamente exploradas devido as suas propriedades físico-químicas únicas, onde é possível empregar o seu uso em inúmeros campos da ciência e tecnologia, como na engenharia, medicina, meio ambiente, entre outros (Bayda, *et al.*, 2019; Safaei; Taran; Imani, 2019; Kaur, *et al.*, 2019).

Entre a diversidade de nanomateriais, as nanopartículas de prata (AgNPs) vem sendo amplamente investigadas por apresentar uma maior área de superfície (relação superfície-área-volume) quando comparado à prata em sua forma a granel, apresentando propriedades elétricas, ópticas e catalíticas únicas (Silva *et al.*, 2017; Yaqoob *et al.*, 2020).

O potencial antimicrobiano da AgNPS é a propriedade que mais tem concentrado a atenção de pesquisadores e indústrias. Tal propriedade se dá através de seus mecanismos de ação, que atuam nos micro-organismos atacando várias estruturas ao mesmo tempo, conferindo-lhes a capacidade de eliminar vários tipos de bactérias, agindo a nível de membrana celular, pois, as AgNPs têm a capacidade de romper, atravessar e alterar sua estrutura e permeabilidade, desencadeando a morte da célula (Figura 7) (Seong; Lee, 2017).

Figura 7- Principais vias do mecanismo citotóxico das AgNPs.



Fonte: Adaptada de Lee; Jun, 2019.

O mecanismo de ação das AgNPs sobre as bactérias mencionado na Figura 7 sugere que as nanopartículas de prata aderem à superfície de uma célula, danificando sua membrana e alterando a atividade de transporte, onde as AgNPs e íons Ag penetram no interior da célula e interagem com numerosas organelas e biomoléculas celulares, o que pode afetar a função celular correspondente e participam da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) no interior da célula levando a um dano celular, induzindo a genotoxicidade.

O mecanismo citado acima está correlacionado à estrutura celular bacteriana, espessura e composição da parede celular, que varia de espécie para espécie. Como por exemplo, as células Gram-positivas, que possuem em sua membrana uma camada peptidoglicana espessa com carga negativa medindo aproximadamente 30 nm de espessura são menos sensíveis ao mecanismo de ação das AgNPs. Já as Gram-negativas, apresentam uma camada peptidoglicana de 3 a 4 nm, em que, por serem mais finas, são mais sensíveis às ações das AgNPs, mesmo que em baixas concentrações (Tamayo, *et al.*, 2014; Abbaszadegan, *et al.*, 2015; Dakal, *et al.*, 2016).

Devido à essa propriedade, as AgNPs são comumente utilizadas na fabricação de fármacos, cremes e curativos para tratamento de queimaduras e úlceras, embalagens de alimentos, eletrodomésticos, como geladeira e máquina de lavar, e em diversas aplicações na área industrial, como nas indústrias têxteis,

alimentícia, eletrônica, médica, agrícola (Yaqoob; Umar; Ibrahim, 2020; Tong, 2009; Castellano, *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2008).

As AgNPs são moléculas simples compostas por três camadas, sendo a primeira, a camada superficial composta por uma variedade de pequenas moléculas, íons metálicos, polímeros e surfactantes. A segunda, a camada da casca, que é um material quimicamente diferente do núcleo e a terceira, o núcleo, que é a poção central da NP e geralmente refere-se ao próprio NP (Khan; Saeed; Khan, 2019). Estudos mostram que as propriedades físicas, ópticas e catalíticas são diretamente influenciadas pelo seu tamanho, forma morfológica, propriedades de superfície e distribuição, que são modificadas utilizando métodos sintéticos, que requer um agente redutor e um agente estabilizante (Lee; Jun, 2019; Abbaszadegan, *et al.*, 2015).

Com isso, apesar dos avanços recentes na aplicação de nanomateriais, o desafio mais comum encontrado pelos pesquisadores em sua síntese é controlar o tamanho, forma, estabilidade e dispersabilidade controlados (Saifuddin; Wong; Nur, 2009; Ashkarran, 2013). Isso acontece, pois, as AgNPs tendem a se aglomerar para diminuir sua alta energia superficial, o que compromete sua alta área de superfície, precisando assim, de um agente de capeamento dispersante e estabilizante eficiente (Restrepo; Villa, 2021).

São tradicionalmente sintetizadas por vias químicas e físicas, onde os surfactantes químicos são estabilizantes promissores, sendo consideradas simples de executar, escalável e garantem a obtenção de nanopartículas. Porém, apesar de sua eficiência, por ser um produto derivado do petróleo, oferece riscos ambientais e biológicos (Almeida *et al.*, 2016). Com isso, o interesse em métodos de síntese verde desses nanomateriais vem crescendo, onde estudos relataram a utilização de produtos naturais, como extratos de plantas, vitaminas, polímeros biodegradáveis, biosurfactantes e enzimas como agentes redutores e estabilizadores de cobertura minimizando ou até mesmo eliminando os riscos à saúde e ao meio ambiente, devido a sua biocompatibilidade (Khan; Saeed; Khan, 2019; Rafique, *et al.*, 2017; Bezza; Tichapondwa; Chirwa, 2020).

REFERÊNCIAS

ABBASZADEGAN, A., *et al.* The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: a preliminary study. **Journal of Nanomaterials**, v. 16, n. 1, p. 53-53, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/720654>

ABDELAZEM, R., HEFNAWY, H., EL-SHORBAGY, G. Chemical composition and phytochemical screening of Citrus sinensis (ORANGE) PEELS. **Zagazig Journal of Agricultural Research**, v.48, p. 793-804, 2021. <https://doi.org/10.21608/ZJAR.2021.191315>

AHMAD, S., *et al.* Green nanotechnology: a review on green synthesis of silver nanoparticles — an ecofriendly approach. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 5087–5107, 2019. <https://doi.org/10.2147/IJN.S200254>

AKBARI, S., *et al.* Biosurfactants - a new frontier for social and environmental safety: A mini review. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 2, p. 81–90, 2018.

ALMEIDA, D.G., *et al.* Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1718, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01718>

AMBAYE, T.G., *et al.* Preparation, characterization and application of biosurfactant in various industries: A critical review on progress, challenges and perspectives. **Environmental Technology & Innovation**, v. 24, 102090, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102090>

APRAJ, V. *et al.* Pharmacognostic and phytochemical evaluation of Citrus aurantifolia (Christm) Swingle peel. **Pharmacognosy Journal**, v. 3, n. 26, p. 70-76, 2011. <https://doi.org/10.5530/pj.2011.26.12>

ASHKARRAN, A.A., *et al.* Controlling the geometry of silver nanostructures for biological applications. **Physics Procedia**, v. 40, p. 76-83, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2018.09.001>

BADVE, M.; HUMBARE, T. Foaming and emulsifying properties of saponin glycosides: a natural non-ionic surfactant. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. 89, n. 1, p. 181-188, 2023. <https://doi.org/10.1007/s43538-023-00151-3>

BARRECA, D., *et al.* Polymethoxylated, C-and O-glycosyl flavonoids in tangelo (Citrus reticulata× Citrus paradisi) juice and their influence on antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1481-1488, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.095>

BAYDA, S., *et al.* The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical–physical applications to nanomedicine. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 112, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>

BEHARI, M., MOHANTY, A.M., DAS, D. Influence of a plant-based surfactant on improving the stability of iron ore particles for dispersion and pipeline transportation. **Powder Technology**, V. 407, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2022.117620>

BEZERRA K.G.O., *et al.* Saponins and microbial biosurfactants: potential raw materials for the formulation of cosmetics. **Biotechnology Progress**, v. 34(6) p.1482–93, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2022.117620>

BEZZA, F.A.; TICHAPONDWA, S.M.; CHIRWA, EMN. Synthesis of biosurfactant stabilized silver nanoparticles, characterization and their potential application for bactericidal purposes. **Journal of hazardous materials**, v. 393, p. 122319, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122319>

CASTELLANO, J.J., *et al.* Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. **International wound journal**, v. 4, n. 2, p. 114-122, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2007.00316.x>

CHOWDHURY, Suman *et al.* New amphiphiles and their applications for different purposes, with special emphasis on polymeric surfactants. **Química Select**, v. 4, n. 23, p. 6978-6995, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122319>

COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and environmental microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987. <https://doi.org/10.1128/aem.53.2.224-229.1987>

DABESTANI, M., YEGANEHZAD, S., MILLER, R. A natural source of saponin: Comprehensive study on interfacial properties of Chubak (*Acanthophyllum Glandulosum*) root extract and related saponins. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, V. 630, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127594>

DAKAL, T.C., *et al.* Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1831, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01831>

DALTIN, D. Tensoativos: química, propriedades e aplicações. **Editora Blucher**, 2011.

DAN, A.K., *et al.* Aqueous and chemical extraction of saponin of *Acacia concinna* (Willd.) Dc.: An effective Bio-surfactant solution to extract silk fibroin from muga silk cocoons. **Journal of Molecular Liquids**, V. 360, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119547>

DELL'ANNO, F., *et al.* Biosurfactant-induced remediation of contaminated marine sediments: Current knowledge and future perspectives. **Marine Environmental**

Research, v. 137, p. 196-205, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.03.010>

DRAKONTIS, C.E., AMIN, S. Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, V. 48, P. 77-90, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.03.013>

DURVAL, I.J. et al. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using a Biosurfactant from *Bacillus cereus* UCP 1615 as Stabilizing Agent and Its Application as an Antifungal Agent. **Fermentation**, v.7, pp.233 p. 2021.
<https://doi.org/10.3390/fermentation7040233>

EL AZIZ M.M.A., ASHOUR A.S., MELAD A.S.G. A review on saponins from medicinal plants: chemistry, isolation, and determination. **Journal of Nanomedicine Research**, v. 8, n. 1, p. 282-288, 2019. DOI: 10.15406/jnmr.2019.08.00199

ESWARI, J.S.; DHAGAT, S.; MISHRA, P. Biosurfactant assisted silver nanoparticle synthesis: A critical analysis of its drug design aspects. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 9, n. 4, 2018.
<https://doi.org/10.1088/2043-6254/aaec0e>

Faostat - The Food and Agriculture Organization, 2020.
<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. (Accessed 11 Feb 2023).

FARIAS, C.B.B. et al. Production of green surfactants: Market prospects. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 51, p. 28-39, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.02.002>

GRZYWACZYK, A., et al. Nanofiltered saponin-rich extract of *Saponaria officinalis*—adsorption and aggregation properties of particular fractions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, p. 130937, 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2023.130937>

GUO, N., et al. Saponins from seeds of Genus *Camellia*: Phytochemistry and bioactivity. **Phytochemistry**, 149:42–5, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.02.002>

IBGE - Brazilian Institute of Geography and Statistics, 2020. <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria.html>. (Accessed 11 Feb 2024).

JIBRIN, M.O., et al. Surfactants in plant disease management: A brief review and case studies. **Plant Pathology**, v. 70, n. 3, p. 495-510, 2021.
<https://doi.org/10.1111/ppa.13318>

KALASHGRANI, M.Y.; JAVANMARDI, N. Multifunctional Gold nanoparticle: As novel agents for cancer treatment. **Advances in Applied NanoBio-Technologies**, v. 3, n. 3, p. 1-6, 2022. [https://doi.org/10.47277/AANBT/3\(3\)6](https://doi.org/10.47277/AANBT/3(3)6)

KASHIF A., *et al.* Current advances in the classification, production, properties and applications of microbial biosurfactants – A critical review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 306, p. 102718, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102718>

KAUR, R.; SHARMA, S.K.; TRIPATHY, S.K. Advantages and limitations of environmental nanosensors. In: **Advances in nanosensors for biological and environmental analysis**, Elsevier, 2019. p. 119-132. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817456-2.00007-3>

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian journal of chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908-931, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>

KIM, Young-Teck, *et al.* Antimicrobial active packaging for food. **Smart Packaging Technologies for Fast Moving Consumer Goods**, p. 99-110, 2008. <https://doi.org/10.1002/9780470753699>

KIUCHI, F. Saponin constituents of *Achyranthes* root. **Journal of Natural Medicines**, v. 76, n. 2, p. 343-351, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11418-021-01591-1>

KOFFI, *et al.* New triterpenoid saponins from the stem bark of *Hallea ledermannii*. **Tetrahedron Letters**, v. 116, p. 154335, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2022.154335>

KREGIEL D., *et al.* Saponin-based, biological-active surfactants from plants. **Application and characterization of surfactants**, v. 6, n. 1, p. 184-205, 2017. <http://dx.doi.org/10.5772/68062>

KUMAR, P.S., *et al.* A Review on New Aspects of Lipopeptide Biosurfactant: Types, Production, Properties and its Application in the Bioremediation Process. **Journal of Hazardous Materials**, p. 124827, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124827>

LEE, S.H.; JUN, B.H. Silver nanoparticles: Synthesis and application for nanomedicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20040865>

LI, Y. *et al.* New triterpenoid saponins from *Clematis lasiantha* and their mode of action against pea aphids *Acyrtosiphon pisum*. **Industrial Crops and Products**, v. 187, p. 115517, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115517>

LIU, Z., *et al.* Recent advances in the environmental applications of biosurfactant saponins: A review. **Journal Environmental Chemical Engineering**; v. 5(6), p. 6030–8, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.11.021>

LIU, Z.; *et al.* Efficient sophorolipids production *via* a novel *in situ* separation technology by *Starmerella bombicola*. **Process Biochemistry**, v. 8, pp. 1-10, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.005>

MAGALHÃES, Emilianny Rafaely Batista et al. Use of different agroindustrial waste and produced water for biosurfactant production. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 15, n. 1, p. 17-26, 2018. <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/2604>

MAHATO N., et al. Modern Extraction and Purification Techniques for Obtaining High Purity Food-Grade Bioactive Compounds and Value-Added Co-Products from Citrus Wastes. **Foods**, v. 8(11), p. 523, 2019. <https://doi.org/10.3390/foods8110523>

MAO, X. et al. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v.285, p.419-435, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.12.009>

MESGARZADEH I., AKBARZADEH A.R., RAHIMI R. Surface-active properties of solvent-extracted panax ginseng saponin-based surfactants. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 20, p. 609–614, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11743-017-1940-1>

MOGHIMIPOUR, E.; HANDALI, S. Saponin: properties, methods of evaluation and applications. **Annual Research & Review in Biology**, p. 207-220, 2015. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2015/11674>

MOISÉS, T.; PAPADOPOULOU, KK.; OSBOURN, A. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semisynthetic derivatives. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 49, p. 439–462, 2014. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.953628>

MOUSAVI, S.M., et al. Recent advances in inflammatory diagnosis with graphene quantum dots have increased the detection of SERS. **Biosensores**, 12, 461, 2022. <https://doi.org/10.3390/bios12070461>

MUMEEN, A.Y., et al. Isolation and characterization of lecithin from selected nigerian varieties of soybean (*Glycine max*). **Journal of Experimental Agriculture International**, 29(4):1–8, 2019. <https://doi.org/10.9734/JEAI/2019/45451>

NGUYEN, T.T.; SABATINI, D.A. Characterization and emulsification properties of rhamnolipid and sophorolipid biosurfactants and their applications. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 2, p. 1232-1244, 2011. <https://doi.org/10.3390/ijms12021232>

NIE, X.E. et al., "One-pot synthesis of silver nanoparticle incorporated mesoporous silica granules for hemorrhage control and antibacterial treatment", **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 4, n. 10, p. 3588–3599, 2018. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00527>

OMER, S.S., et al. Phytochemical screening, antioxidant activity and lipid profile effects of *Citrus reticulata* fruit peel, *Zingiber officinale*. Rhizome and *Sesamum indicum* seed extracts. **Intern J Medical Health Biomed Bioeng Pharm Eng**. 9: 797–804, 2015. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1109974>

PIAO, X., et al. Advances in saponin diversity of *Panax ginseng*. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 3452, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25153452>

PITOCCHI, R. *et al.* Cerato-platanins from marine fungi as effective protein biosurfactants and bioemulsifiers. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 8, p. 2913, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21082913>

PRADHAN, A., *et al.* Saponins from *Albizia procera* extract: Surfactant activity and preliminary analysis. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 643, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.128778>

PUTNIK P., *et al.* An integrated approach to Mandarin processing: Food safety and nutritional quality, consumer preference, and nutrient bioaccessibility. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. 16(6): 1345–1358, 2017. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12310>

RAFIQUE, M., *et al.* A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 45, n. 7, p. 1272-1291, 2017. <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1241792>

RANDRIAMAMONJY, T. H. *et al.* Comparative study on the amphiphilicity, emulsifying and foaming properties of saponins extracted from *Furcraea foetida*. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 653, p. 129923, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129923>

RESTREPO, C.V.; VILLA, C.C. Synthesis of silver nanoparticles, influence of capping agents, and dependence on size and shape: A review. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 15, p. 100428, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100428>

RIBEIRO, G.B.; GUERRA, J.M.C.; SARUBBO, L.A. Biosurfactants: Production and application prospects in the food industry. **Biotechnology Progress**, 35 (5), p. 3030, 2020. <https://doi.org/10.1002/btpr.3030>

ROCHA E SILVA, N.M.P., *et al.* Natural surfactants and their applications for heavy oil removal in industry. **Separation & Purification Reviews**, v. 48, n. 4, p. 267-281, 2019. <https://doi.org/10.1080/15422119.2018.1474477>

ROSENBERG, E.; RON, E.Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.52, p.154–162, 1999. <https://doi.org/10.1007/s002530051502>

SAFAEI, M.; TARAN, M.; IMANI, M.M. Preparation, structural characterization, thermal properties and antifungal activity of alginate-CuO bionanocomposite. **Materials Science and Engineering: C**, v. 101, p. 323-329, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.108>

SAIFUDDIN, N.; WONG, C.W.; YASUMIRA, A.A. Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of bacteria with microwave irradiation. **E-journal of Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 61-70, 2009. <https://doi.org/10.1155/2009/734264>

SAŁEK, K.; EUSTON, S.R. Sustainable microbial biosurfactants and bioemulsifiers for commercial exploitation. **Process Biochemistry**, v. 85, p. 143-155, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.027>

SANTOS, D.K.F., *et al.* Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st. **Century International Journal of Molecular Sciences**, 17 (3), p. 401-430, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>

SEONG, M.; LEE, DG. Silver nanoparticles against Salmonella enterica serotype typhimurium: role of inner membrane dysfunction. **Current microbiology**, v. 74, p. 661-670, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1235-9>

SHAKERI, F., *et al.* Production and application of biosurfactants in biotechnology. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, p. 10446–10460, 2020. <https://doi.org/10.33263/briac113.1044610460>

SILVA, L.P., *et al.* Silver nanoparticles as antimicrobial agents: Past, present, and future. In: **Nanostructures for antimicrobial therapy**. Elsevier, p. 577-596, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46152-8.00026-3>

SONG, Z., *et al.* Synergistic antibacterial effects of curcumin modified silver nanoparticles through ROS-mediated pathways. **Materials Science and Engineering: C**, v. 99, p.255-263,2019. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.053>

SOTOMAYOR-GERDING, D.; MORALES, E.; RUBILAR, M. Comparison between Quinoa and Quillaja saponins in the Formation, Stability and Digestibility of Astaxanthin-Canola Oil Emulsions. **Colloids and Interfaces**, v. 6, n. 3, p. 43, 2022. <https://doi.org/10.3390/colloids6030043>

TAMAYO, L.A., *et al.* Release of silver and copper nanoparticles from polyethylene nanocomposites and their penetration into *Listeria monocytogenes*. **Materials Science and Engineering: C**, v. 40, p. 24-31, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.03.037>

TONG, J.W.K. Case reports on the use of antimicrobial (silver impregnated) soft silicone foam dressing on infected diabetic foot ulcers. **International wound journal**, v. 6, n. 4, p. 275-284, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2009.00610.x>

TWIGG, M.S., *et al.* Microbial biosurfactant research: time to improve the rigour in the reporting of synthesis, functional characterization and process development. **Microbial Biotechnology**, v. 14, p. 147–170, 2021. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13704>

USMAN, M.; FATIMA, B. Mandarin (*Citrus reticulata* blanco) breeding. **Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits**, V. 3, p. 465-533, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91944-7_13

VIEIRA, I.M.M., *et al.* An overview of current research and developments in biosurfactants. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 100, p. 1-18, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.05.017>

VINCKEN, J. P., *et al.* Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. **Phytochemistry**, v. 68, n. 3, p. 275-297, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.10.008>

YAQOOB, A.A., *et al.* Recent advances in metal decorated nanomaterials and their various biological applications: A review. **Frontiers in chemistry**, v. 8, p. 341, 2020. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00341>

ZHANG, R., *et al.* Safety assessment of crude saponins from *Chenopodium quinoa* willd. husks: 90-day oral toxicity and gut microbiota & metabonomics study in rats. **Food Chemistry**, v. 375, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131655>

ZIMMERMAN J.B., *et al.* Designing for a green chemistry future. **Science**, v. 367, n. 6476, p. 397-400, 2020. <https://doi.org/10.1126/science.aay3060>

CAPÍTULO II

Artigo foi submetido à Revista Eletronic Journal of Biotechnology - Fator de Impacto: 2.86, Qualis: A3

Extração, Caracterização e aplicação de surfactante Vegetal como agente estabilizador de nanopartículas de prata

Hozana de Souza Ferreira¹, Júlio Cesar Vasconcelos dos Santos¹, Hugo Moraes Meira^{2,4}, Renata Raianny da Silva³, Fabíola Carolina Gomes de Almeida⁴, Leonie Asfora Sarubbo^{4,5}, Juliana Moura de Luna^{4,6*}

¹ Master's Degree in Environmental Process Development, Catholic University of Pernambuco, Recife, Brazil, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, 50050-900 Recife, Brazil;

² Master's Degree in Chemical Engineering, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil;

³ Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Brazil;

⁴ Advanced Institute of Technology and Innovation (IATI), Rua Potira de Brito, n. 216, 50070-280, Boa Vista, Recife, Brazil;

⁵ Icam Tech School, Catholic University of Pernambuco (UNICAP), Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, 50050-900 Recife, Brazil;

⁶ School of Health and Life Sciences, Catholic University of Pernambuco (UNICAP), Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, 50050-900 Recife, Brazil;

* Correspondence: juliana.luna@unicap.br; Tel.: +558121194048

Resumo

Os surfactantes estão emergindo como potenciais agentes estabilizadores de nanopartículas, porém, os surfactantes sintéticos não são ecologicamente corretos. Os biossurfactantes vegetais se apresentam como uma alternativa verde para síntese e estabilização de nanopartículas, com caráter renovável, biodegradável, atóxico para o ser humano e meio ambiente. Portanto, objetivo deste estudo foi extrair moléculas surfactantes da casca da tangerina (*Citrus reticulata*), avaliar suas propriedades emulsificantes e surfactantes e testar seu potencial como agente estabilizante de nanopartículas de prata. Três processos de extração foram avaliados, sendo o método ácido-base selecionado. O extrato vegetal foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 30 mN/m, com CMC de 0,7 % e um rendimento de 1,0 g/Kg. Testes em condições extremas de pH, e temperatura indicaram a estabilidade do extrato vegetal. O extrato é de natureza aniônica, não foi tóxico para o microcrustáceo *Artemia salina*, e nem para sementes de hortaliças testadas. O surfactante presente no extrato foi isolado e caracterizado por Cromatografia de Camada delgada, espectroscopia de RMN, FTIR. As nanopartículas de prata sintetizadas foram identificadas e caracterizadas morfológicamente usando as técnicas de espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Visível), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e potencial zeta. As nanopartículas estabilizadas com o biossurfactante foram avaliadas quanto ao seu potencial de ação antimicrobiana frente a micro-organismos patogênicos. A máxima absorção de UV-visível observada foi de 400 - 450 nm para nanopartículas de prata. A micrografia MEV confirmou a formação de nanopartículas, com estruturas predominantemente esféricas apresentando tamanhos na faixa de 384-568 nm. A presença do biossurfactante promoveu estabilidade, sendo observado um potencial zeta de - 86.30 mV. O potencial antimicrobiano das nanopartículas de prata estabilizadas com biossurfactante (AgNPs) foi avaliado utilizando os microrganismos *Echerichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida lipolytica*, os

quais apresentaram sensibilidade frente ao produto. Desta forma, observou-se o potencial de utilização do biossurfactante como estabilizador de nanopartículas de prata e seu potencial de ação como agente antimicrobiano.

Palavras-chave: Nanopartículas de prata, Biossurfactante vegetal, Antimicrobiano.

1. Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, com uma média de 17 milhões de toneladas, quase 50% das laranjas resultam em resíduos (casca, bagaço, sementes), em parte reaproveitados como subprodutos, mas em sua maioria descartados no meio ambiente (IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2020; Panwar; Panesar; Chopra, 2019).

Nos últimos anos, há um interesse crescente no uso eficiente de diversos resíduos agroindustriais. Vários bioprocessos têm sido desenvolvidos utilizando estes materiais como substratos para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado. O uso de resíduos agrícolas como substratos em bioprocessos, além de poder ser economicamente viável, ajuda a resolver os problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza (Magalhães *et al.*, 2018; Panwar *et al.*, 2021).

Os surfactantes de origem vegetal têm recebido atenção especial pois estão amplamente distribuídos na natureza e podem ser classificados como fosfolípidios, proteínas ou hidrolisados proteicos e saponinas. Dentre estas, as saponinas apresentam potencial para diversas aplicações biotecnológicas devido às suas propriedades físico-químicas e biológicas (Goral e Wojciechowski, 2020).

Com o aumento da demanda por produtos sustentáveis e hipoalergênicos, os surfactantes vegetais são uma opção promissora e ecologicamente correta, oferecendo inúmeras vantagens por serem biocompatíveis, possuírem baixa toxicidade, e atuarem sob condições extremas, sendo assim, uma alternativa sustentável aos surfactantes químicos (Jimoh; Lin, 2019; Bezza; Tichapondwa; Chiwa, 2019; Farias *et al.*, 2021)

Em vista disso, a utilização de biossurfactantes (vegetais e microbianos) como agente estabilizante na síntese das NPs, vem sendo bastante explorado, pois,

possuem dupla funcionalidade, podendo atuar como agente estabilizador e redutor (Liu et al, 2020).

As nanopartículas de prata (AgNPs) vem emergindo com importantes contribuições por possuírem propriedades atóxicas, inorgânicas e antibacterianas (Oliveira, Oliveira e Mishra, 2018). AgNPs são comumente utilizadas em pomadas, nanomedicina, antioxidantes, biologia celular, detecção químicas, indústria alimentícia, cosméticos, têxteis, agricultura, armazenamento de dados, agente antimicrobiano (Kumar *et al.*, 2018; Bezza; Tichapondwa; Chirwa 2020). Destacando-se, as aplicações na área médica, onde seu tamanho pode ser ajustado de acordo com o tipo de aplicação desejada, como por exemplo, no uso em sistema de liberação de fármacos, que utilizam nanopartículas para liberação controlada e direcionada de agentes terapêuticos (Lee; Jun, 2019; Zong, 2022; Sultana, 2022).

O interesse crescente na utilização da prata na forma de nanopartículas, está relacionado à rápida liberação desse metal na forma de sais de prata, tornando-o mais eficiente, apresentando também, uma alta relação entre superfície-volume e reatividade intrínseca, que são novas propriedades físico-químicas distintas de seus respectivos materiais a granel (Le *et al.*, 2010; Bezza; Tichapondwa; Chirwa, 2020).

Apesar dos avanços, as AgNPs são tradicionalmente sintetizadas a partir de métodos físicos e químicos. No entanto, o interesse pela síntese verde vem crescendo consideravelmente, tendo em vista que são ecologicamente corretas, econômicas, proliferam e desencadeiam a formação estável de NPs e podem ser aplicáveis em grandes escalas, diminuindo a toxicidade, e aumentando a compatibilidade com aplicações ambientais e biomédicas (Ribeiro *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2018; Bezza; Tichapondwa; Chirwa, 2020).

Com isso, o presente estudo teve como objetivo extrair um surfactante vegetal a partir da casca da tangerina (*Citrus reticulata*), avaliar suas propriedades emulsificantes e surfactantes, sintetizar nanopartículas de prata, utilizar o biosurfactante vegetal como agente estabilizante e avaliar seu potencial antibacteriano.

2. Material e Métodos

2.1 Biosurfactante vegetal

As cascas da *Citrus reticulata* (tangerina) foi adquirida no Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco (CEASA), em Recife, levadas ao laboratório para lavagem e refrigeração.

2.2 Metodologia de obtenção do extrato contendo biossurfactante

Três processos de extração foram inicialmente realizados para selecionar o método apropriado para obtenção de extratos ricos em biossurfactantes. As determinações da tensão superficial e rendimento foram usados como parâmetros nessa etapa.

O primeiro processo foi realizado a extração alcoólica de acordo com a metodologia de Dumitrescu, Sirbu e Lepadatu (2021), onde 500g de cascas da tangerina (*C. reticulata*) foram pesadas, trituradas e transferidas em 1 L de álcool etílico à 70%, permanecendo em repouso por 48 horas, longe da luz e da umidade, em local fresco. Após esse período, o material foi filtrado em uma malha de nylon, e levados para a secagem em estufa à 48 °C para a evaporação.

O segundo processo foi a extração ácido-base aquecida adaptada, descrita por Jones e Kinghorn (2012), onde as 500 g das cascas de tangerina (*Citrus reticulata*) foram pesadas, trituradas e transferidas para um béquer contendo 1 L de uma solução de 5 % de NaOH, onde permaneceu por 2h na chapa de aquecimento à 77 °C. Em seguida, essa solução foi filtrada com uma manta de nylon e submetida a centrifugação refrigerada por 15 minutos, a 4 °C e 400 rpm. Após essa etapa a solução foi filtrada à vácuo com membrana, acidificada com ácido sulfúrico até atingir o pH 2, em seguida, foi transferida para um funil de separação e lavado três vezes com 200 ml de acetato de etila. Após a separação, a solução foi para a chapa aquecedora à 77 °C para a evaporação na capela de exaustão.

Por fim, foi realizada a extração ácido-base adaptada, descrita por Jones e Kinghorn (2012), 500g de casca de tangerina foi triturado junto a uma solução básica contendo 2 L de água destilada, e 20 g de hidróxido de sódio, numa proporção de 1%. Após a trituração, o extrato foi levado para a centrifugação refrigerada por 20 min, com rotação a 240 rpm à 4 °C. Posteriormente, foi acidificado com ácido clorídrico até atingir o pH 2. A extração da parte aquosa ocorreu através da adição de acetato de etila, na proporção de 200 ml de acetato para cada 500 ml da solução por 5 min. Após essa etapa, o acetato foi transferido para um béquer e submetido a evaporação na estufa à 77 °C na capela de

exaustão. Após a evaporação, o extrato extraído foi devidamente pesado e armazenado para as demais análises.

2.3 Determinação da tensão superficial e da Concentração Micelar Crítica

A tensão superficial do biossurfactante vegetal foi medida em tensiômetro KSV Sigma 700 (Finland) utilizando o anel de NUOY. As tensões superficiais foram medidas através da imersão do anel de platina nos extratos contendo o biossurfactante e registrando a força requerida para puxá-lo através da interface ar-líquido. A Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante foi determinada automaticamente por medidas das tensões superficiais de uma amostra de água gradativamente adicionada do surfactante até se atingir um valor constante de tensão. O valor da CMC foi determinado como g/L do biossurfactante extraído.

2.4 Determinação da atividade de emulsificação

A determinação da atividade emulsificante do extrato vegetal, foi realizada e analisada segundo a metodologia proposta por Cooper e Goldenberg (1987), onde 2 mL do substrato oleoso e 2 mL do extrato foram adicionados em um tubo graduado e agitado em vórtex por 2 minutos. Após 24 horas, as emulsões água em óleo foram expressas em centímetros em relação à altura da emulsão formada.

2.5 Avaliação da estabilidade do biossurfactante vegetal (efeitos do pH e da temperatura)

Os efeitos de diferentes temperaturas e de diferentes pHs na atividade do biossurfactante foram investigados utilizando o extrato vegetal contendo o biossurfactante. Onde o biossurfactante foi mantido em temperatura constante (5°C, 70°C, 100°C e 120°C) e utilizado para a medição da tensão superficial e emulsificação. Assim como o efeito do pH na tensão superficial foi analisado utilizando variações do pHs (2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0 e 12,0) no extrato vegetal. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.6 Teste de toxicidade do biossurfactante vegetal frente ao microcrustáceo *Artemia salina*

Para a avaliação da toxicidade do biossurfactante de origem vegetal, foi utilizado como indicador as larvas de camarão (microcrustáceo *Artemia salina*) após

24 horas de sua incubação. Uma solução do extrato vegetal foi utilizada em diferentes concentrações (1/2xCMC, 1xCMC e 2xCMC). As análises foram conduzidas em frascos de penicilina de 10 ml de capacidade contendo 10 larvas em 5 ml de sal marinho sintético por frasco. As larvas contidas em cada frasco foram expostas a 5 ml da solução do extrato nas concentrações testadas durante 24 horas e depois observadas quanto à mortalidade (OKUMU et al., 2021). O sal marinho sintético foi utilizado como controle. A concentração tóxica limite foi definida como a menor concentração capaz de provocar a morte do crustáceo em 24 horas.

2.7 Teste de fitotoxicidade do biossurfactante frente a sementes de vegetais

A fitotoxicidade do biossurfactante de origem vegetal foi avaliada em ensaio estático através da germinação da semente e do crescimento da raiz de repolho (*Brassica oleracea*), maxixe (*Cucumis anguria*) e tomate (*Solanum lycopersicum*) de acordo com (Tiquia et al., 1996). Uma solução teste do extrato foi preparada em água deionizada com diferentes concentrações (1/2xCMC, 1xCMC e 2xCMC). A toxicidade foi determinada em placas de Petri estéreis (10 cm) contendo discos de papel de filtro Whatman Nº1. Após cinco dias de incubação no escuro, a germinação das sementes, o crescimento da raiz (≥ 5 mm) e o índice de germinação (IG) foram calculados de acordo com as fórmulas de germinação relativa da semente e comprimento da raiz.

A determinação foi expressa no período após 120 horas pela germinação relativa das sementes (GRS), comprimento das raízes (CRR) e índice de germinação das sementes (IG), como segue abaixo:

$GRS (\%) = \frac{\text{número das sementes germinadas no extrato}}{\text{número de semente germinada no controle}} \times 100$

$CRR (\%) = \frac{\text{comprimento médio da raiz no extrato}}{\text{comprimento médio da raiz no controle}} \times 100$

$IG (\%) = (GRS \times CRR) / 100\%$

2.8 Caracterização do biossurfactante vegetal

A cromatografia em camada fina foi realizada em placas de sílica gel (G60; Merck, Alemanha) e o processo de eluição foi realizado em vidro câmara contendo 70% de hexano e 30% de acetona (v/v). A detecção das frações foi realizada por

pulverização do reagente anisaldeído e de permanganato de potássio (Silva *et al.*, 2023).

O biossurfactante isolado também foi caracterizado por Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) espectrometria (Spectrum 400, Perkin Elmer). Os sinais foram coletados de 400 a 4.000 números de onda com resolução de 4 cm^{-1} (Santos *et al.*, 2021).

O biossurfactante isolado foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e seus respectivos espectros de RMN foram registrados a 25 °C usando um espectrômetro de 300 MHz (Agilent, Santa Clara, CA, EUA) operando em 300,13 MHz. Os desvios químicos (δ) em relação à pista tetrametilsilano foram expressos em ppm.

O teste de Libermann-Burchard foi realizado através da evaporação de 2 mL do biossurfactante, que em seguida foi redissolvido com 2 gotas de anidrido acético e 1 gota de ácido sulfúrico concentrado. Saponinas triterpênicas e esteróides produzem coloração azulada, verde e vermelho arroxeado, respectivamente (Tsai e Lin, 2019).

2.9 Síntese das nanopartículas estabilizadas com biossurfactante vegetal

Para a síntese das nanopartículas de prata o biossurfactante isolado foi neutralizado com uma solução de hidróxido de sódio a 0,1 Molar. A cada uma dessas soluções, foi adicionado o nitrato de prata com uma proporção de 1:3 de íons de prata para íons de sódio, respectivamente. As soluções foram resfriadas por meio de um banho de gelo e agitadas continuamente com a utilização de uma barra magnética. Quando a temperatura da mistura atingiu cerca de 5 °C uma solução contendo borohidreto de sódio foi utilizada para reduzir os íons de prata, foi utilizada uma proporção de 1:4 mols de borohidreto de sódio para cada mol de prata, respectivamente. Ao fim da reação, a solução obtida contendo nanopartículas de prata complexadas com biossurfactante (BS-AgNP) foi armazenada a 4° C para outros experimentos (Le *et al.*, 2010).

2.10 Propriedades e características das nanopartículas de prata sintetizadas e estabilizadas com biossurfactante vegetal

A propriedade absorptiva da suspensão das AgNPs estabilizadas com biossurfactante isolado foi analisada usando espectroscopia ultravioleta/visível (UV-vis) (Espectrofotômetro Digital SP-22, Biospectro, Xangai, China), na faixa de

comprimento de onda entre 400 e 1000 nm. A estabilidade das nanopartículas em suspensão, foi determinado utilizando o equipamento Zeta-Meter 4.0 (Zeta-Meter Inc., Staunton, VA, EUA).

A análise da morfologia e do tamanho das nanopartículas de prata sintetizada;s foram realizadas através de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JSM-5600, JEOL, Tóquio, Japão) usando uma tensão de aceleração de 30 kV. Para tornar as amostras condutoras, antes da análise, foi necessário separar uma alíquota da suspensão de nanopartículas e depositá-la numa superfície de fita de carbono revestida por uma fina camada de ouro.

2.11 Avaliação da atividade antimicrobiana

A propriedade antimicrobiana das nanopartículas sintetizadas com biossurfactante vegetal foi avaliada utilizando o método de difusão em disco de Kirby-Bauer (Habiba *et al.*, 2015) contra cepas de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e gram-negativas (*Escherichia coli*) previamente isoladas no laboratório de bioengenharia da Universidade Católica de Pernambuco.

O efeito antibacteriano de nanopartículas de prata foi avaliado usando o disco de Kirby-Bauer método de difusão (Habiba *et al.*, 2015). Uma suspensão bacteriana (100 µL de 5×10^6 UFC/mL) foi espalhada uniformemente na superfície de uma placa de ágar nutriente. Em seguida, discos de papel de filtro (cerca de 6 mm de diâmetro), impregnados com o biossurfactante foram adicionados à superfície como controle. Discos impregnados com as AgNPs estabilizadas com o biossurfactante vegetal (100, 200 µg/disco) também foram adicionadas à superfície do ágar para avaliar seu potencial antibacteriano. As placas de ágar foram então invertidas e incubadas a 37 °C por 24 horas, após esse período, foi medido com uma régua, o diâmetro da zona de inibição ao redor do disco.

3. Resultados e Discussão

3.1 Seleção do processo de extração de biossurfactante de origem vegetal

Diversas técnicas podem ser utilizadas para extrair biossurfactantes vegetais, desde métodos convencionais à base de solvente até técnicas emergentes como o ultrassom (Mesgarzadeh *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2018). No presente

trabalho foram avaliados métodos de extração a fim de saber qual deles apresentaria melhor desempenho na obtenção de extratos ricos em moléculas surfactantes .

O biossurfactante de origem vegetal obtido através da extração ácido-base aquecida apresentou um rendimento de 2,0 g/Kg e uma redução da tensão superficial da água de 70 mN/m para 50 mN/m. Já o método de extração alcoólica, o biossurfactante apresentou rendimento de 1,5 g/Kg e redução da tensão superficial da água de 70 mN/m para 42 mN/m.

O extrato vegetal utilizando a metodologia ácido-base apresentou capacidade de redução da tensão superficial de 70 mN/m para 30 mN/m com um rendimento de 1,0 g/Kg. Portanto, o método de extração ácido-base foi selecionado para dar continuidade à pesquisa, uma vez que o extrato vegetal apresentou excelente propriedade surfactante, com capacidade de redução da tensão superficial, quando comparado a metodologia de extração ácido-base aquecida, e extração alcoólica testadas nesse estudo.

3.2 Propriedades Tensoativas do biossurfactante de origem vegetal

A redução da tensão superficial e a Concentração Micelar Crítica (CMC), são parâmetros importantes para a detecção de um composto tensoativo e sua eficiência (Silva *et al.*, 2014). Segundo Santos *et al.* (2016) quanto menor a concentração do biossurfactante para atingir este fim, maior a sua eficiência, uma vez que, a Concentração Micelar Crítica (CMC) é atingida quando um aumento adicional na concentração de biossurfactante não leva a uma redução da tensão superficial.

Biossurfactantes vegetais apresentam a CMC na faixa de 0,01 em seu estado puro (Hajimo-hammadi *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2019). No entanto, quando presentes em extratos vegetais brutos, os valores de CMC são mais elevados (Zhang *et al.*, 2019).

O biossurfactante extraído da casca da tangerina utilizando a metodologia ácido-base apresentou capacidade de redução da tensão superficial, uma vez que a tensão superficial da água foi reduzida de 70 mN/m para 30 mN/m com um rendimento de 1,0 g/Kg com uma CMC de 0,7 g/L (Figura 1).

Até o momento, valores de CMC não foram relatados na literatura para extratos de *Citrus reticulata*. Porém, Estudos realizados por Samal *et al.* (2017) e

Jarzebski et al. (2018) relataram a CMC de 1 e 0,6% para o extrato vegetal bruto de *Verbascum nigrum* L. (verbasco) e *Sapindus mukorossi*, respectivamente, demonstrando valores próximos ao que foi obtido no presente estudo.

Bezerra et al. (2021) obtiveram CMC de 0,07% do extrato de *Chenopodium quinoa*, apresentando tensão superficial de 31,06 mN/m, para *Glycine max*, a CMC foi 0,08%, com tensão superficial de 32,41mN/m, enquanto para *Malpighia emarginata* a CMC foi 0,03% com tensão superficial de 33,09mN/m. Extratos vegetais ricos em saponinas são capazes de reduzir a tensão superficial da água (72 mN/m) para valores entre 25 e 35 mN/m (Rocha e Silva *et al.*, 2019).

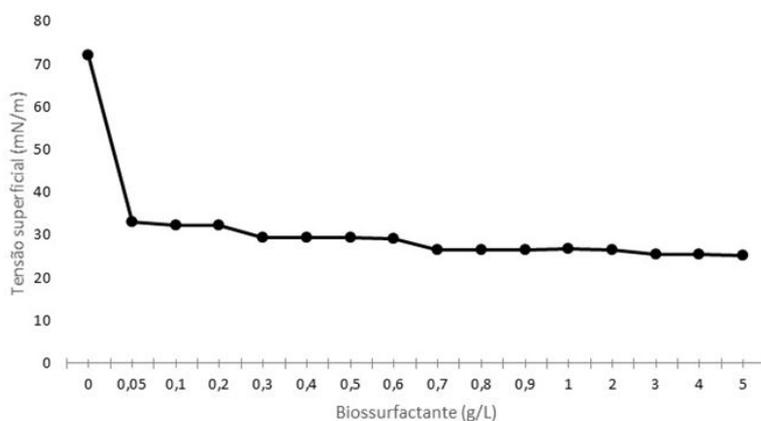


Figura 1- Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante vegetal extraído através da casca da tangerina.

3.3 Estabilidade do biossurfactante vegetal relacionada à tensão superficial

Fatores ambientais como pH e temperatura podem influenciar a atividade e a estabilidade de um biossurfactante. Conseqüentemente torna-se de fundamental importância o estudo da influência desses parâmetros ao se considerar a possibilidade de aplicações específicas para esses compostos (Cavalcanti *et al.*, 2020).

Após a realização dos testes de estabilidade, foi possível observar que o biossurfactante vegetal apresentou uma pequena alteração na tensão superficial quando submetidos a variação de pH (2 e 4), reduzindo a tensão para 29 mN/m, e se manteve estável nas demais variações (6, 8, 10, 12) com valor de 30 mN/m. Enquanto que na variação da temperatura, o extrato apresentou uma tensão

superficial estável em todas as variações, mostrando que a temperatura não é um fator de influência para a redução da tensão superficial (Tabela 1).

Bezerra *et al.* (2023) observaram que no extrato obtido da *C. quinoa*, as variações de temperatura não afetaram a tensão superficial que permaneceu em 31 mN/m. Com relação a variação do pH observou-se que os valores entre 6 e 8 mantiveram a tensão superficial estável, e os valores mais ácidos e alcalinos, 2 e 12, resultaram no aumento da tensão para 37mN/m.

Cada extrato vegetal tem a sua particularidade quanto à estabilidade; entretanto, é conhecido que os biossurfactantes apresentam boa estabilidade quando submetidos à diferentes temperaturas e valores de pH (Santos *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Estabilidade da tensão superficial do biossurfactante de origem vegetal extraído da casca da tangerina.

pH	Tensão superficial (mN/m)
2	29,6±0,22
4	29,7±0,17
6	30,4±0,26
8	30,2±0,18
10	30,6±0,17
12	30,9±0,20
Temperatura (°C)	
2	30,4±0,24
5	30,3±0,12
70	30,0±0,42
100	30,3±0,50
120	30,5±0,13

3.4 Índice de emulsificação do biossurfactante de origem vegetal

Os emulsificantes têm sido utilizados como agentes de floculação, de solubilização, espumantes, emulsificantes ou desemulsificantes. Segundo Bezerra *et al.* (2020), para que um biossurfactante seja considerado um bom emulsificante, é necessário avaliar a capacidade que o surfactante tem de formar emulsões estáveis de no mínimo 50% por 24 horas ou mais.

A Tabela 2 mostra o índice de emulsificação para o biossurfactante vegetal, que apresentou um percentual de emulsificação de 50% para todos os óleos testados, sendo este, um resultado esperado quando comparado à outros extratos vegetais descritos literatura (Bezerra *et al.*, 2020; Bezerra *et al.*, 2021).

Tabela 2- Índice de Emulsificação do biossurfactante de origem vegetal extraído da casca da tangerina (*Citrus Reticulata*).

Biossurfactante	Índice de emulsificação (%)			
	Óleo de canola	Óleo de milho	Óleo de soja	Óleo de girassol
<i>Citrus reticulata</i> (Tangerina)	50±0,32	50±0,42	50±0,23	50±0,42

3.5 Teste de toxicidade com *Artemia salina*

A toxicidade pode ser definida como a capacidade de uma substância causar um efeito prejudicial a um organismo vivo, que depende da concentração e das propriedades do produto químico ao qual o organismo está exposto e do tempo de exposição (Santos *et al.*, 2017).

A *Artemia salina*, é um organismo marinho comumente utilizado na ecotoxicologia devido à viabilidade de manutenção numa escala laboratorial, seu curto ciclo de vida, condições simples para o seu crescimento e por possuírem tolerância reduzida às mudanças ambientais e alta especificidade a influências externas, o que garante clareza nos resultados diante de pequenas variações na qualidade do meio ambiente (Pinto *et al.*, 2022; Lima *et al.*, 2020).

Os testes realizados com a *Artemia salina* apresentaram uma taxa de sobrevivência de 100%, demonstrando que o biossurfactante extraído da casca da tangerina não apresentou toxicidade para todas as concentrações testadas. Resultados semelhantes foram relatados por Lira *et al.* (2020) e Bezerra *et al.* (2023) por biossurfactantes microbianos.

3.6 Teste de fitotoxicidade com sementes

A fitotoxicidade, impacta negativamente o crescimento ou a aptidão das plantas, podendo estar associada com disfunção celular (Santos *et al.*, 2017). Os resultados do teste de fitotoxicidade com o extrato vegetal em três espécies vegetais estão apresentados na Tabela 3.

A literatura considera que o Índice de Germinação (IG) de 80% é um indicador da ausência de fitotoxicidade (Meylheuc; Van Oss; Bellon-Fontaine, 2001). Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que o biossurfactante de origem vegetal nas diluições testadas (1 x CMC, ½ x CMC e 2 x CMC) não apresentou qualquer efeito inibitório sobre a germinação para as sementes do maxixe, tomate e repolho, com IG de nível superior a 80% para biossurfactante vegetal, respectivamente, nas concentrações propostas, realizado em triplicata. Luna *et al.* (2013), Araújo *et al.* (2019) e Ray; Kumar; Banerjee (2022) também não identificaram redução de crescimento radicular em seus testes com biossurfactantes microbianos.

Tabela 3- Fitotoxicidade do biossurfactante de origem vegetal isolado por *Citrus reticulata* em sementes de tomate, maxixe e repolho.

Semente vegetal	Índice de Germinação (%)		
	Biossurfactant e isolado em 0,35 g/L	Biossurfactante isolado em 0,7 g/L	Biossurfactante isolado em 1,4 g/L
Repolho <i>(Brassica oleracea)</i>	100%±0,12	98%±0,11	90%±0,21
Maxixe <i>(Cucumis anguria)</i>	97%±0,10	93%±0,12	90%±0,22
Tomate <i>(Solanum lycoperscum)</i>	100%±0,13	97%±0,13	91%±0,22

3.7 Caracterização do biossurfactante vegetal

3.7.1 Cromatografia em camada fina do biossurfactante vegetal

A Cromatografia em camada fina de fase normal, é um teste qualitativo utilizado para estimar a presença de determinadas substâncias em material vegetal (Bezerra *et al.*, 2021). A cromatografia do biossurfactante vegetal extraído da casca

da tangerina apresentou 4 spots, com valores de retenção de 0,03, 0,18, 0,27 e 0,40. Além de manchas de coloração verde, amarelo azul e violeta, decorrente da revelação com anisaldeído (Fig. 2).

A partir da coloração dos spots, pode-se sugerir que há a presença de compostos fenólicos ácidos, ácidos graxos e ácidos orgânicos. Tais compostos também foram encontradas em um estudo feito a partir da caracterização de substâncias presentes em cascas de laranjas (Moni *et al.*, 2023).

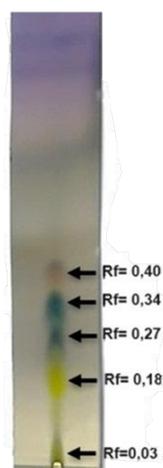


Figura 2 – Fator de retenção (Rf) do extrato purificado da casca de tangerina, detectados por cromatografia em camada delgada.

3.7.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR dos surfactante derivado de plantas isolado, indicaram picos de absorção característicos de saponinas (Figura 3). O longo pico em 3425 cm^{-1} indica a presença dos grupos hidroxila ($-\text{OH}$), O pico em 1589 cm^{-1} de forma alargada pode indicar a presença da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) bem como a presença de ligações duplas ($\text{C}=\text{C}$). Os picos em 1589 e 1270 cm^{-1} indicam as ligações $\text{C}=\text{C}$ e $\text{C}-\text{O}-\text{C}$, respectivamente, com $-\text{OH}$, $\text{C}-\text{H}$ e $\text{C}=\text{C}$ sendo característico das saponinas, enquanto o $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ das ligações glicosídicas é característico de sapogeninas.

Os espectros de FTIR correspondem a sinais indicativos de saponinas no extrato e estão de acordo com os resultados de estudos encontrados na literatura (Bezerra *et al.*, 2023; El-Keiy; Radwan; Mohamed, 2019; Norouzpour, *et al.*, 2022).

Bezerra *et al.* (2023) obteve resultados semelhantes com biossurfactantes vegetais extraídos da semente de *Chenopodium quinoa* e *Glycine max* e frutos secos de *Malpighia emarginata*, que quando comparado ao espectro da saponina padrão, foi possível observar picos correspondentes, estando de acordo resultados de estudos semelhantes encontrados na literatura.

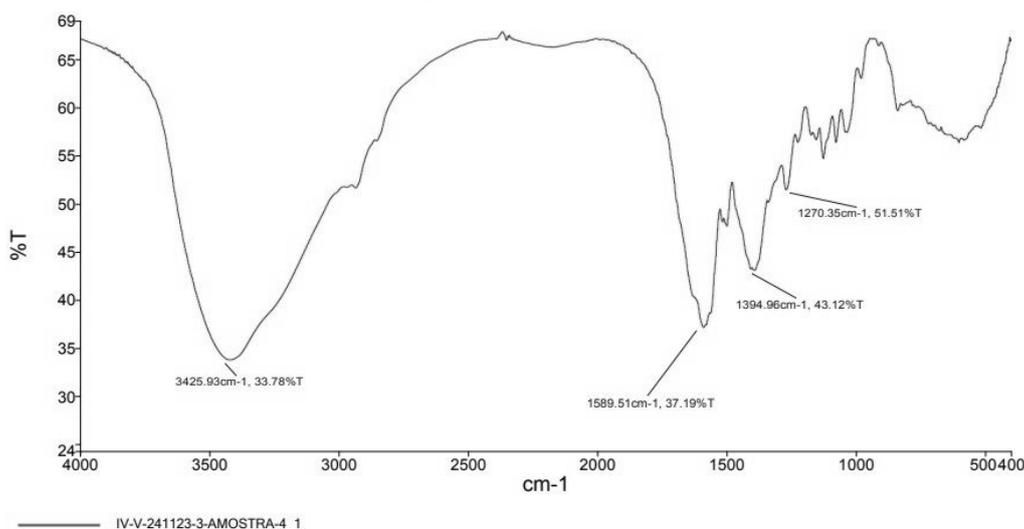


Figura 3 - Espectro FT-IR do biossurfactante de origem vegetal.

3.7.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

o espectro do biossurfactante de ^1H isolado do extrato (Figura 4) sugeriu a presença de hidrogênios ligados à cadeia carbônica alifática na região entre (0 - 1,5 ppm). Tal sinal é menos proeminente quando comparado ao sinal presente na cadeia carbônica de um ácido graxo, esse fato pode sugerir que as frações hidrofóbicas presentes nas moléculas do extrato vegetal encontram-se em menor quantidade. Os sinais presentes entre (1,5 – 2,5) sugerem a presença dos hidrogênios ligados próximos aos carbonos vizinhos aos que apresentam dupla ligação em sua estrutura ou mesmo a função carbonila. Os picos presentes entre a região de (3 – 5 ppm), é uma indicação a presença de hidroxilas responsáveis pelas frações polares das estruturas moleculares.

O conjunto de sinais entre 6 – 8 ppm sugere fortemente a presença de hidrogênios ligado aos carbonos contendo duplas ligações ou mesmo pertencente ao grupo fenil, muito comum nas moléculas de polifenóis, abundantes nas cascas da laranja. É possível observar também um pico entre 9 – 10 ppm, indicando a

presença da função de ácido carboxílico e um pequeno sinal próximo de 12 ppm sugerindo a presença da função aldeído.

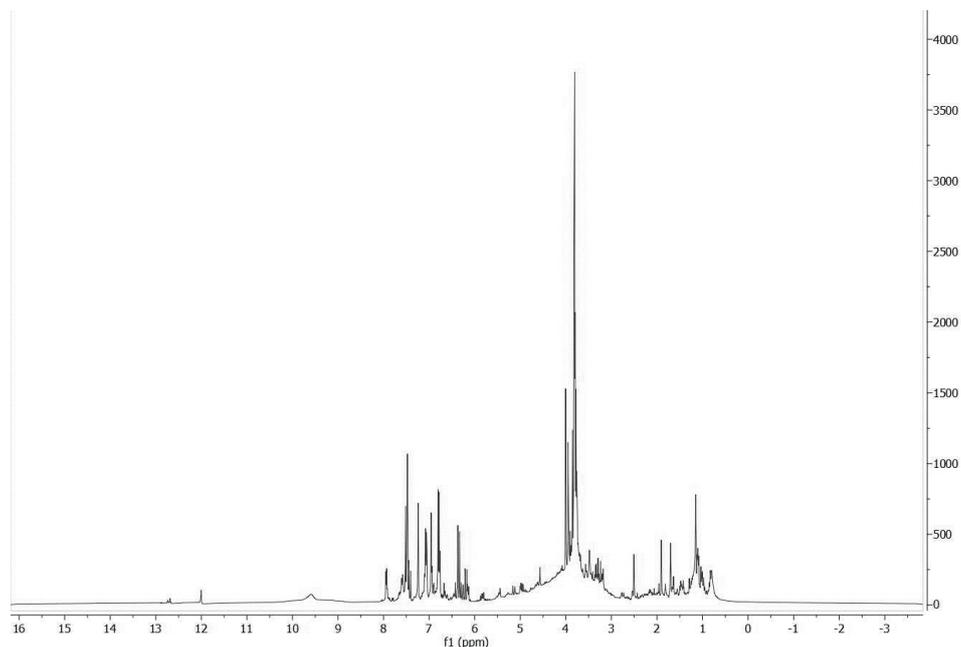


Figura 4 - Espectro de RMN ^1H do biossurfactante vegetal da *Citrus reticulata*.

O espectro de ^{13}C (Figura 5) apresentou na região entre 0 – 45 ppm os sinais que compõe as frações das ligações carbono-carbono. Os picos encontrados entre 50 – 80 ppm são responsáveis por possíveis carbonos ligados aos oxigênios, derivados das funções de éter ou álcool. Os sinais encontrados entre 100 – 150 ppm certamente advém dos carbonos que apresentam dupla ligação, podendo estar presente nas cadeias aromáticas, como sugere o espectro de ^1H ou mesmo na cadeia insaturada. Os picos presentes entre 160 – 180 ppm, sugere a presença de moléculas contendo a função de ácido carboxílico bem como a presença de ésteres. O sinal próximo a 200 ppm sugere a presença da função aldeído ou cetona.

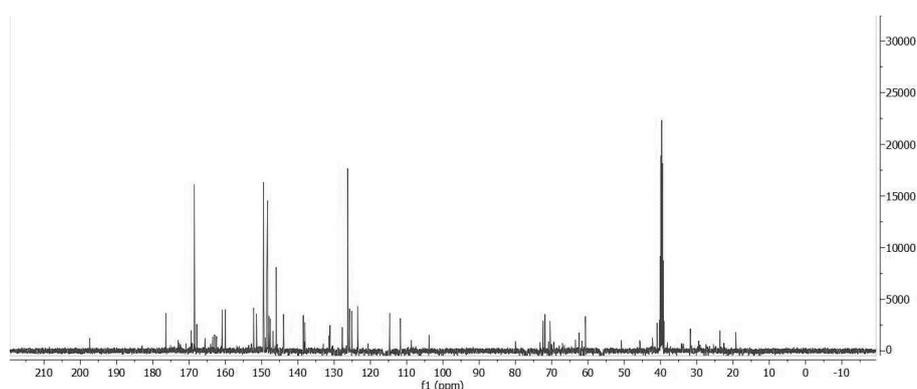


Figura 5 – Espectro de RMN ^{13}C do biossurfactante vegetal da *Citrus reticulata*.

3.7.4 Teste de Liebermann-Burchard

No teste de Liebermann-Burchard a fração de biossurfactante da tangerina apresentou uma coloração vermelho arroxeado, que é indicativo para saponinas triterpênicas de acordo com Tsai e Lin (2019), esse resultado corrobora com os resultados obtidos por Bezerra *et al.* (2021) em que as frações de *C. quinoa* e *G. max* também apresentaram a mesma coloração.

3.8 Caracterização das nanopartículas de prata

Segundo Tyagi *et al.* (2020), as nanopartículas de prata podem ser reveladas pela mudança de cor da solução. Garcia (2011) apontou que uma das principais características da ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) em nanopartículas, é a oscilação de elétrons excitados, que é limitada pelo volume dessas partículas, sendo possível avaliar a presença, uniformidade e o tamanho das AgNPs através da UV/visível. Pois, quando a luz atinge as nanopartículas de prata os elétrons em sua superfície começam a oscilar e ressonância com a frequência da luz incidente fazendo com que algumas cores da luz visível sejam absorvidas, causando assim, a alteração de cor da solução, decorrente da irradiação da luz captado em LSPR (Pryshchepa; Pomastowski; Buszewski, 2020).

Sendo assim, a síntese de nanopartículas utilizando o extrato vegetal obtido através da casca da tangerina como estabilizante foi apresentada na Figura 6a e 6b, pela mudança na coloração. Podendo ser confirmada na análise dos resultados da espectroscopia ultravioleta visível (Figura 7), através de um pico máximo de absorção UV/vis bem definido e característico das nanopartículas de prata, que fica entre 400 e 450 nm, correspondendo à LSPR (Tyagi et al., 2020). Podendo indicar também que as AgNPs possuam forma esférica, já que partículas desse formato têm banda de luz de absorção LSPR normalmente próxima de 400 nm (Tyagi et al., 2020).

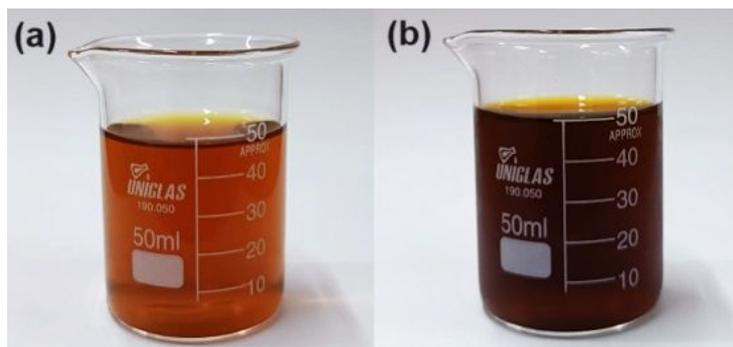


Figura 6- Mudança da cor da solução após a redução do complexo de prata demonstrando a formação de nanopartículas (a) biossurfactante de origem vegetal solubilizado em água destilada; (b) ANPs estabilizado com o biossurfactante vegetal.

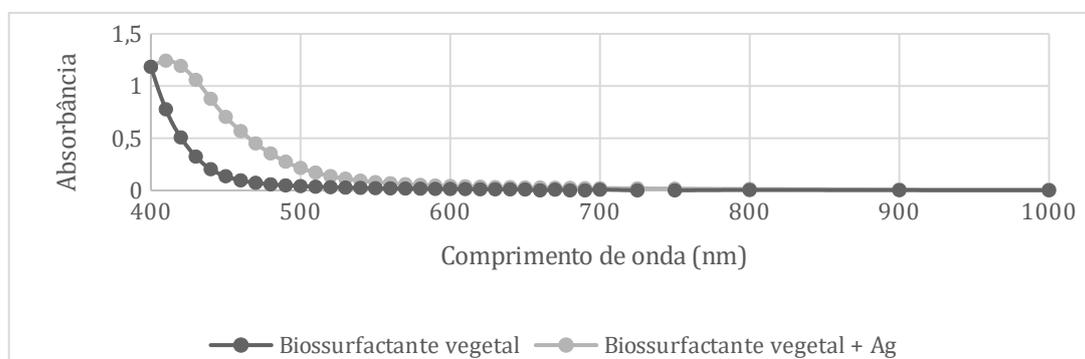


Figura 7- Espectro UV/visível de nanopartículas de prata estabilizadas extrato vegetal.

Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) num aumento de 20000x, observou-se vários pontos com presença de nanopartículas de distribuição aleatória que apresentaram morfologia esférica de tamanhos variados, porém, o MEV possuía uma limitação que só permitia a medição das partículas que fossem maiores que 300 nm, sendo assim, excluiu a medição de diversas partículas que possuíam tamanhos muito menores (Figura 8). As nanopartículas, apresentaram diâmetros de 384-568 nm, destacados por setas nas Figuras 6b e 6b. Comparando os resultados com a literatura, AgNPs sintetizadas com biossurfactantes microbianos, apresentaram estruturas de alta densidade, de forma arredondada e com diâmetros na faixa de 30-160 nm (Durval *et al.*, 2021; Elakkiya *et al.*, 2020).

Como a distribuição foi de forma aleatória, foi possível observar pontos com aglomerações de AgNPs, pode-se afirmar que as partículas exibiram uma alta área superficial, pois, não foram totalmente separadas das outras (Nehal; Singh, 2022). A forma arredondada apresentada, testifica o fato de que as nanopartículas de prata

têm a banda de luz de absorção de ressonância plasmônica de superfície localizada (RPSL) próxima à 400 nm (Pryshchepa.; Pomastowski; Buszewski, 2020).

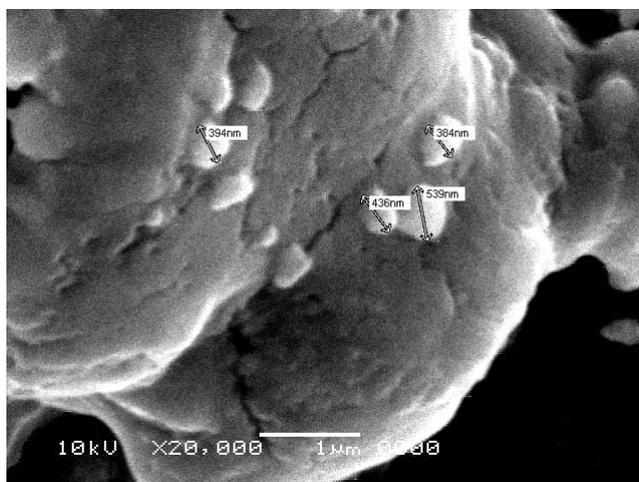


Figura 8- Imagens de microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas de prata sintetizadas com o biossurfactante vegetal com ampliação de 20000x.

A estabilidade das AgNPs foi analisada através do potencial zeta. Estudos realizados previamente com nanopartículas de prata de síntese verde, relataram valores de $-23,4$ mV, $-38,7$ mV, $-22,2$ mV, para biossurfactantes microbianos (Nehal; Singh, 2022; Durval *et al.*, 2021; Radha *et al.*, 2020). Neste trabalho, esse parâmetro atingiu valores de -86.30 mV \pm 4,8 para as nanopartículas sintetizadas com o biossurfactante vegetal. Valor este, bem distante de zero, o que evidencia uma repulsão eletrostática forte entre as partículas, resultando numa alta estabilidade, e baixa probabilidade de agregação ou precipitação.

3.9 Teste antimicrobiano

Micro-organismos patogênicos são uma das grandes preocupações da atualidade, e o uso improprio de medicamentos, levou à resistência de bactérias patogênicas a agentes antimicrobianos convencionais, tornando-se uma ameaça à saúde em todo o mundo (Habiba *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2018). O desenvolvimento de estudos nessa área vem crescendo cada dia mais, a fim de encontrar soluções mais eficazes para tal problema.

Em vista disso, o potencial antimicrobiano das nanopartículas de prata contra cepas conhecidas pela sua patogenicidade foi avaliado neste trabalho. As amostras

controle contendo apenas o biossurfactante não apresentaram atividade antimicrobiana para nenhuma das cepas testadas, indicando que não possuem atividade antibacteriana.

Em contrapartida, todas as amostras contendo as AgNPs estabilizadas com o biossurfactante apresentaram halo de inibição, mostrando que as bactérias foram sensíveis à presença das nanopartículas.

Habeeb *et al.* (2022) relatou estudos atestando a atividade antibacteriana de AgNPs sintetizados com extratos de plantas, que apresentam resultados diversos para bactérias gram-positivas e gram-negativas, mostrando que esse fator não teve muita influência sobre a atividade antibacteriana das nanopartículas.

Pode-se sugerir que provavelmente, a nanopartícula sintetizada e estabilizada com o biossurfactante possua uma quantidade majoritária de partículas menores, cobrindo uma maior área superficial, sendo mais eficazes como agente antimicrobiano (Ethiraj, 2016; Yuan; Peng; Gurunathan, 2017). Porém a realização de estudos mais aprofundados é necessária, para avaliar a relação da capacidade de cobertura do nanomaterial possuindo diferentes concentrações de metal, assim como o tamanho e uniformidade das partículas, pois, segundo Balakrishnan *et al.* (2017) quanto maior a concentração de AgNPs estáveis, maior a atividade das AgNPS.

4. Conclusão

O processo de extração ácido - base utilizado neste trabalho mostrou-se eficiente para obtenção de um biossurfactante a partir da *Citrus reticulata*. A caracterização estrutural do biossurfactante presente no extrato da casca da tangerina sugere um biossurfactante de saponina, não apresentou toxicidade.

O extrato demonstrou propriedades emulsificantes e surfactantes, mostrou-se eficiente como agente estabilizador em processo de síntese de nanopartículas de prata (BS-AgNPs). As BS-AgNPs obtidas mostraram-se estáveis, pequenas, esféricas e uniformes, sendo elas, compatíveis com diversas aplicações biotecnológicas. As nanopartículas exibiram atividade antimicrobiana contra patógenos que prejudicam a saúde humana. Portanto, pode-se concluir que os biossurfactantes têm potencial para uso como estabilizadores ecológicamente corretos de nanopartículas.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), FACEPE, CNPq e ao Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI), Brasil.

Referências

AHMAD, S. *et al.* Green nanotechnology: A review on green synthesis of silver nanoparticles—An ecofriendly approach. **International journal of nanomedicine**, p. 5087-5107, 2019. <https://doi.org/10.2147/IJN.S200254>

ARAÚJO, H.W.C. *et al.* Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 1-13, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1046-0>

BALAKRISHNAN, S. *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles using *Myristica fragrans* seed (nutmeg) extract and its antibacterial activity against multidrug-resistant (MDR) *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 14758-14769, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9065-7>

BEZERRA, K.G.O. *et al.* Application of Plant Surfactants as Cleaning Agents in Shampoo Formulations. **Processes**, v. 11, n. 3, p. 879, 2023. <https://doi.org/10.3390/pr11030879>

BEZERRA, K.G.O. *et al.* Evaluation of the Environmental Toxicity Profile of Shampoos Formulated with Plant Biosurfactants. **Chemical Engineering Transactions**, v. 99, p. 217-222, 2023. <https://doi.org/10.3303/CET2399037>

BEZERRA, K.G.O. *et al.* Plant-derived biosurfactants: Extraction, characteristics and properties for application in cosmetics. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 34, p. 102036, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102036>

BEZERRA, K.G.O. *et al.* Emulsifying capacity of biosurfactants from *Chenopodium quinoa* and *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992 with focus of application in the cosmetic industry. **Chemical Engineering**, v. 79, p. 211-216, 2020. <https://doi.org/10.3303/CET2079036>

BEZZA, F.A.; TICHAPONDWA, S.M.; CHIRWA, EMN. Synthesis of biosurfactant stabilized silver nanoparticles, characterization and their potential application for bactericidal purposes. **Journal of hazardous materials**, v. 393, p. 122319, 2020. [10.1016/j.jhazmat.2020.122319](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122319)

Cavalcanti, M.H.C. *et al.* Maximization of biosurfactant production by *Bacillus invictae* using agroindustrial residues for application in the removal of hydrophobic pollutants. **Chemical Engineering Transactions**, 2020, 79, 55–60. <https://doi.org/10.3303/CET2079010>

COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and environmental microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987. <https://doi.org/10.1128/aem.53.2.224-229.1987>

DUMITRESCU, Ana-Maria; SIRBU, R.; LEPĂDATU, A.C. Study of Antimicrobial Activity of Vegetable Alcoholic Extracts Obtained from L. **European Journal of Natural Sciences and Medicine**, v. 4, n. 2, p. 13-21, 2021. <https://doi.org/10.26417/965yje50d>

DURVAL, I.J.B. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using a biosurfactant from *Bacillus cereus* UCP 1615 as stabilizing agent and its application as an antifungal agent. **Fermentation**, v. 7, n. 4, p. 233, 2021. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040233>

ELAKKIYA, V.T. *et al.* Swift production of rhamnolipid biosurfactant, biopolymer and synthesis of biosurfactant-wrapped silver nanoparticles and its enhanced oil recovery. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, p. 1892–1899, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.04.001>

EL-KEYI, M.M.; RADWAN, A.M.; MOHAMED, T.M. Cytotoxic effect of soy bean saponin against colon cancer. **Journal of Biosciences and Medicines**, v. 7, p. 70–86, 2019. <https://doi.org/10.4236/jbm.2019.77006>

ESWARI, J.S.; DHAGAT, S.; MISHRA, P. Biosurfactant assisted silver nanoparticle synthesis: A critical analysis of its drug design aspects. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 9, p. 045007, 2018. [10.1088/2043-6254/aaec0e](https://doi.org/10.1088/2043-6254/aaec0e)

ETHIRAJ, A.S. *et al.* Control of size and antimicrobial activity of green synthesized silver nanoparticles. **Materials Letters**, v. 185, p. 526-529, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2016.07.114>

FARIAS, C.B.B. *et al.* Production of green surfactants: Market prospects. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 51, p. 28-39, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.02.002>

GARCIA, M.A. Surface plasmons in metallic nanoparticles: Fundamentals and applications. **Journal of Physics D: Applied Physics**. v. 44, p. 283001, 2011. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/44/28/283001>

HABEEB R., HAAJIRA B. *et al.* Medicinal plants mediated the green synthesis of silver nanoparticles and their biomedical applications. **IET nanobiotechnology**, v. 16, n. 4, p. 115-144, 2022. <https://doi.org/10.1049/nbt2.12078>

HABIBA, K. *et al.* Synergistic antibacterial activity of PEGylated silver-graphene quantum dot nanocomposites. **Applied Materials today**. 1, 80-87, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2015.10.001>

HAJIMOHAMMADI, R. *et al.* Production of saponin biosurfactant from *Glycyrrhiza glabra* as an agent for upgrading heavy crude oil. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 19, p.1251–1261, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11743-016-1871-2>

IBGE - Brazilian Institute of Geography and Statistics, 2020. <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria.html>. (Accessed 11 Feb 2024).

JIANG, S.L. *et al.* Tubeimoside-1, a triterpenoid saponin, induces cytoprotective autophagy in human breast cancer cells in vitro via the Akt-mediated pathway. **Acta Pharmacológica Sinica**, v. 40, p. 919-928, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0165-9>

JIMOH, A.A.; LIN, J. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. **Ecotoxicology and Environmental safety**, v. 184, p. 109607, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109607>

JONES, W.P.; KINGHORN, A.D. Extraction of plant secondary metabolites. **Natural products isolation**, p. 341-366, 2012. <https://doi.org/10.1385/1-59259-955-9:323>

KUMAR, S.V. *et al.* High-conversion synthesis of <10 nm starch-stabilized silver nanoparticles using microwave technology. **Scientific reports**. v. 8, p. 5106, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23480-6>

LE, A.T. *et al.* Synthesis of oleic acid-stabilized silver nanoparticles and analysis of their antibacterial activity. **Materials Science and Engineering: C**, v. 30, p. 910–916, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2010.04.009>

LEE, S.H.; JUN, Bong-Hyun. Silver nanoparticles: synthesis and application for nanomedicine. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 4, p. 865, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20040865>

LIRA, I.R.A.S. *et al.* Biosurfactant production from *Candida guilliermondii* and evaluation of its toxicity. **Chemical Engineering**, v. 79, 2020. <https://doi.org/10.3303/CET2079077>

LIU, K. *et al.* Rational design, properties, and applications of biosurfactants: a short review of recent advances. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 45, p. 57-67, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2019.12.005>

LUNA, J.M. *et al.* Characterization, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 202-209, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.08.008>

MESGARZADEH, I., ALI, R.A., RAHIMI, R. Surface-Active properties of solvent-extracted *Panax ginseng* aaponin-based surfactants. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 20 (3), p. 609–614, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11743-017-1940-1>.

MEYLHEUC, T., VAN OSS, C.J., BELLON-FONTAINE, M.N. Adsorption of biosurfactant on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.822– 832, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01455.x>

MICHAEL-IGOLIMA, U. *et al.* Modified Orange Peel Waste as a Sustainable Material for Adsorption of Contaminants. **Materials**, v. 16, n. 3, p. 1092, 2023. <https://doi.org/10.3390/ma16031092>

MONI, S.S. *et al.* Spectral characterization and biological evaluation of biomolecules from the peels of three orange fruits: a comparative study. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, p. e267856, 2023. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.267856>

MOUSAVI, S.M. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles toward bio and medical applications: review study. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 46, n. sup3, p. 855-872, 2018. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1517769>

NEHAL, N.; SINGH, P. Role of nanotechnology for improving properties of biosurfactant from newly isolated bacterial strains from Rajasthan. **Materials Today: Proceedings**, v. 50, p. 2555-2561, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.05.682>

NOROUZPOUR, M. *et al.* Experimental investigation of the effect of a quinoa-derived saponin-based green natural surfactant on enhanced oil recovery. **Fuel**, v. 318, p. 123652, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.123652>

OKUMU, M.O. *et al.* *Artemia salina* as an animal model for the preliminary evaluation of snake venom-induced toxicity. **Toxicon: X**, v. 12, p. 100082, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2021.100082>

PANWAR, D., PANESAR, P. S., & CHOPRA, H. K. Recent trends on the valorization strategies for the management of citrus by-products. **Food Reviews International**, p. 1–30, 2019. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1695834>

PANWAR, D. *et al.* Unraveling the scientific perspectives of citrus by-products utilization: Progress towards circular economy. **Trends in Food Science & Technology**, v. 111, p. 549-562, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.018>

PINTO, M.I.S. *et al.* A Biosurfactant from *Candida bombicola*: Its Synthesis, Characterization, and its Application as a Food Emulsions. **Foods**, v. 11, n. 4, p. 561, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11040561>

PRYSHCHEPA, O.; POMASTOWSKI, P.; BUSZEWSKI, B. Silver nanoparticles: Synthesis, investigation techniques, and properties. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 284, p. 87–100, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102246>

RADHA, P. *et al.* Chicken tallow, a renewable source for the production of biosurfactant by *Yarrowia lipolytica* MTCC9520, and its application in silver nanoparticle synthesis. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 23, n. 1, p. 119-135, 2020. <https://doi.org/10.1002/jsde.12357>

RAY, M.; KUMAR, V.; BANERJEE, C. Kinetic modelling, production optimization, functional characterization and phyto-toxicity evaluation of biosurfactant derived from

crude oil biodegrading *Pseudomonas* sp. IITISM 19. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 2, p. 107190, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107190>

RIBEIRO, M. *et al.* A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 45, p. 1272–1291, 2017. <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1241792>

RIBEIRO, M.M. *et al.* Recent advances in green synthesis of silver nanoparticles and their applications: On future directions. A review. **Bionanoscience**, v. 8, p. 5–16, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12668-017-0413-3>

SAMAL, K.C., KAUSTUBHA, M. Application of saponin biosurfactant and its recovery in the MEUF process for removal of methyl violet from wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 203, p. 8-16, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.07.073>

SANTOS, D.K.F. *et al.* Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity for application as a bioremediation agent. **Process Biochemistry**, v. 54, p. 20-27, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.12.020>

SANTOS, D.K.F. *et al.* Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>

SANTOS, E.M.S. *et al.* Enhanced Oil Removal by a Non-Toxic Biosurfactant Formulation. **Energies**, v. 14, n. 2, p. 467, 2021. <https://doi.org/10.3390/en14020467>

SILVA, R. *et al.* Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 7, p. 12523-12542, 2014. <https://doi.org/10.3390/ijms150712523>

SILVA, R. R. *et al.* Microbial Biosurfactant: *Candida bombicola* as a Potential Remediator of Environments Contaminated by Heavy Metals. **Microorganisms**, v. 11, n. 11, p. 2772, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112772>

SOUZA, A.R.C., *et al.* Extraction of *Arctium Lappa* leaves using supercritical CO₂ + ethanol: kinetics, chemical composition, and bioactivity assessments. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 140, p. 137–146, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.06.011>.

SULTANA, A. *et al.* Nano-based drug delivery systems: Conventional drug delivery routes, recent developments and future prospects. **Medicine in Drug Discovery**, v. 15, p. 100134, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2022.100134>

TIQUIA, S.M.; TAM, N.F.Y.; HODGKISS, I.J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. **Environment pollution**, v. 93(3), p. 249-256, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(96\)00052-8](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(96)00052-8)

TSAI, Chun-En; LIN, Li-Huei. The liquid polyol extracts of camellia seed dregs used in sunscreen cosmetics. **Chemical Papers**, v. 73, p. 501-508, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11696-018-0594-4>.

TYAGI, P.K.; MISHRA, R.; KHAN, F.; GUPTA, D.; GOLLA, D. Antifungal effects of silver nanoparticles against various plant pathogenic fungi and its safety evaluation on *Drosophila melanogaster*. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 10, p. 6587–6596, 2020. <https://doi.org/10.33263/BRIAC106.65876596>

YUAN, Y.G., PENG, Q.L., GURUNATHAN, S. Effects of Silver Nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-infected goats: an alternative approach to antimicrobial therapy. **Journal of Molecular Sciences**, v. 18(3), p. 569, 2017. <https://doi.org/10.3390/ijms18030569>

ZHANG, Q. *et al.* Development of citrus peel ethanolic extract shampoo. In: **The 3rd International Conference on New Materials and the Chemical Industry**, v. 479 (1), 2019. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/479/1/012014>

ZONG, TONG-XIN *et al.* Recent advances in antimicrobial nano-drug delivery systems. **Nanomaterials**, v. 12, n. 11, p. 1855, 2022. <https://doi.org/10.3390/nano12111855>

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As propriedades tensoativas e emulsificantes do extrato vegetal obtido a partir da casca da tangerina apresentou propriedades emulsificantes e surfactantes.
- O surfactante vegetal não apresentou toxicidade.
- O surfactante vegetal apresentou natureza aniônica.
- O surfactante vegetal tem potencial para síntese de nanopartículas de prata;
- O surfactante vegetal apresentou estabilidade e redução às nanopartículas de prata;
- A nanopartículas de prata produzidas com biossurfactante tem potencial antimicrobiano;
- O biossurfactante se apresenta como um insumo biotecnológico de alto valor agregado para diferentes setores industriais.

