











## Antimicrobial activity of nanoparticles prepared with O-carboxymethylchitosan: $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:silver and extract of *Piper solmsianum*

### Atividade antimicrobiana de nanopartículas preparadas com O-carboximetilquitosana: $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:prata e extrato de *Piper solmsianum*

Francieli Molinett<sup>1</sup> , Clovis Antonio Rodrigues<sup>1</sup> , Gizelle Inácio Almerindo<sup>1</sup> , Rosi Zanoni da Silva<sup>2</sup> ,  
Jacir Dal Magro<sup>3</sup> , Rafael Martello<sup>3</sup> , Anna Slawska-Waniewska<sup>4</sup> , Natalia Nedelko<sup>4</sup> ,  
& Alexandre Bella Cruz<sup>1</sup>  

**Keywords:** Silver nanoparticle, magnetic, *Piper*, antimicrobial, carboxymethylchitosan

**Palavras-chave:** nanopartícula de prata, magnética, *Piper*, antimicrobiano, carboximetilquitosano

#### To Cite:

Molinett, F., et al. (2023) Antimicrobial activity of nanoparticles prepared with O-carboxymethylchitosan: $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:silver and extract of *Piper solmsianum*. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 20(2), 58-73.

 [10.19277/bbr.20.2.329](https://doi.org/10.19277/bbr.20.2.329)

1 - Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR), Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Itajaí, SC, Brazil, 88.302-202. Fax +55 (47) 3341.7601

2 - Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Av. Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas, Ponta Grossa, PR, Brazil, 84.030-900

3 - Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Universidade Comunitária da Região de Chapecó (UNOCHAPECÓ), Servidão Anjo da Guarda, 295-D, Bairro Efapi, Chapecó, SC, Brazil, 89.809-900

4 - Institute of Physics, Polish Academy of Sciences, Aleja Lotników 32/46 PL-02668, Warsaw, Poland

Correspondence to / Correspondência a:  
bellacruz@univali.br

Received / Recebido: 16/11/2023  
Accepted / Aceite: 31/12/2023

#### Abstract

Silver nanoparticles incorporated into magnetic nanocomposite were synthesized using a crude methanolic extract from *Piper solmsianum*, which was used as an agent for reduction and stabilization in phytochemical-assisted synthetic nanomaterial. The antimicrobial activity of the pathogenic microorganisms is reported here. The synthesized nanoparticles were also characterized by transmission electron microscopy and quantification of Ag analysis. The antimicrobial activity was evaluated by the broth microdilution method, against the bacteria *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, and the yeast *Candida albicans*. Among the nine compounds tested, CMAgPs2 and CMAgPs5 presented the best results in terms of activity against bacteria (bactericidal) and yeast (fungistatic). It was observed that crude methanolic extract proved to be a potential reducing agent for green synthesis. It was also found that no CMAgPs sample was toxic in the *Artemia salina* test.

#### Resumo

Nanopartículas de prata incorporadas a nanocompósitos magnéticos foram sintetizadas com extrato metanólico bruto de *Piper solmsianum*, que foi utilizado como agente de redução e estabilização em nanomaterial sintético assistido por fitoquímicos. A atividade antimicrobiana sobre microorganismos patogênicos foi descrita. As nanopartículas sintetizadas também foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão e análise de quantificação de Ag. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo, sobre as bactérias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e a levedura *Candida albicans*. Dentre os nove compostos testados, CMAgPs2 e CMAgPs5 foram os que apresentaram os melhores resultados em termos de atividade contra bactérias (bactericidas) e leveduras (fungistáticos). Observou-se que o extrato metanólico bruto demonstrou ser um potencial agente redutor para a síntese verde. Também foi verificado que nenhuma amostra de CMAgPs foi tóxica no teste de *Artemia salina*.

## Introduction

Silver nanoparticles (NPs) are widely used in nanotechnology. Due to their special physical-chemical properties, silver NPs are frequently applied in numerous areas, including medicine, health, agriculture, packaging, and electronics. One of the main problems in using NPs in chemical reactions is related to the agglomeration of NPs. The immobilization of NPs to solid supports, such as polymers (1), carbonaceous materials (2), and metal oxide (3), prevents the agglomeration of NPs during chemical reactions.

The use of plants or plant extracts in the green synthesis of silver nanoparticles has advantages over other biological resources because plants are found everywhere. Different parts of the plants were used for synthesis, such as leaves, roots, fruits, stems, bark, and seeds. Different extracts, such as aqueous, methanolic, hydroalcoholic, ethanolic extracts, are the most used for this purpose (4). The presence of secondary metabolites in plants, and consequently in extracts such as terpenoids, flavonoids and alkaloids, leads to the reduction and capping of nanoparticles (5-9).

According to the World Health Organization, around 2 billion people around the world use water from sources contaminated with feces, which can transmit diseases such as diarrhea, cholera, dysentery, typhoid and poliomyelitis. In addition, 844 million people do not have access to safe drinking water (10). Water treatment technologies are urgently needed, especially point-of-use (POU) disinfection technologies that are suitable for situations where there are limited resources. As such, the POU's water treatment technologies have received widespread attention worldwide (11).

Magnetic nanoparticles (MNPs) are classes of nanoparticles that generally contain iron ( $\text{Fe}^0$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Due to their magnetic properties, the particles can be easily separated from the processing media by applying an external magnetic field. MNPs have broad application in different areas, but especially in those related to the environment (12).

In this aspect, when prepared or incorporated with substances containing antimicrobial or adsorbent properties, MNPs can be employed for the purification of water in POU systems.

## Introdução

Nanopartículas de prata (NPs) são amplamente utilizadas em nanotecnologia. Devido às suas propriedades físico-químicas especiais, as NPs de prata são frequentemente aplicadas em diversas áreas, incluindo medicina, saúde, agricultura, embalagens e eletrônica. Um dos principais problemas no uso de NPs em reações químicas está relacionado à aglomeração de NPs. A imobilização de NPs à suportes sólidos, como polímeros (1), materiais carbonáceos (2) e óxido metálico (3), evita a aglomeração de NPs durante reações químicas.

O uso de plantas ou extratos vegetais na síntese verde de nanopartículas de prata tem vantagens sobre outros recursos biológicos porque as plantas são facilmente encontradas. Diferentes partes das plantas foram utilizadas para fins de síntese, como folhas, raízes, frutos, caules, cascas e sementes. Diferentes extratos, como extratos aquosos, metanólicos, hidroalcoólicos e etanólicos, são os mais utilizados para esse fim (4). A presença de metabólitos secundários nas plantas e, conseqüentemente, em extratos, como terpenoides, flavonoides e alcaloides, leva à redução e cobertura (capeamento) de nanopartículas (5-9).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, cerca de 2 bilhões de pessoas no mundo utilizam água de fontes contaminadas com fezes, que podem transmitir doenças como diarreia, cólera, disenteria, febre tifoide e poliomielite. Além disso, 844 milhões de pessoas não têm acesso à água potável (10). Portanto, tecnologias para o tratamento de água são necessárias e urgentes, especialmente tecnologias para desinfecção de ponto de uso (PDU) que são adequadas para situações onde os recursos são limitados. Como tal, as tecnologias de tratamento de água como PDU, têm recebido ampla atenção em todo o mundo (11).

Nanopartículas magnéticas (MNPs) são classes de nanopartículas que geralmente contêm o ferro ( $\text{Fe}^0$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Devido às suas propriedades magnéticas, as partículas podem ser facilmente separadas do meio de processamento pela aplicação de um campo magnético externo. Os MNPs têm ampla aplicação em diversas áreas, mas principalmente naquelas relacionadas ao meio ambiente (12).

Nesse aspecto, quando preparadas ou incorporadas a substâncias com propriedades antimicrobianas ou adsorventes, as MNPs podem ser empregadas para a purificação de água em sistemas de PDU.

*Piper solmsianum* C. DC. (sin. *Piper leucanthum* or *Piper santosanum*), commonly known as caapeba or pariparoba in Brazil, is a shrub that is frequently found in areas with wet tropical soils. It measures 1 to 3 m in height and presents glabrous and striated branches. Its leaves are petiolate and the blade is ovate with an acuminate apex and truncated to a cordate base. It presents hermaphroditic flowers represented by spike-like inflorescences (13-15).

Phytochemical studies of the plant have indicated the presence of aliphatic hydrocarbons, monoterpenes, sesquiterpenes, arylpropanoids, neolignans (15-17) and flavonoids (18). It has been reported that the plant has antibacterial (19), anti-tuberculosis (20), antifungal (18), and trypanocidal (21) activities.

In this *in vitro* study, we focused on the antimicrobial properties of O-carboxymethylchitosan/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Ag<sup>0</sup>/*P. solmsianum* extract (CMAgPs). First, the nanoparticles were synthesized and characterized. Then, the antimicrobial properties of the CMAgPs were tested on the microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*). The effects of this nanoparticle on the living organism *Artemia salina* were evaluated.

## Materials and methods

The nanoparticles O-carboxymethylchitosan/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (CM) and  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (MNP) were synthesized and characterized (1). Eggs of *Artemia salina* (high hatching) were purchased from Maramar Aquacultura Com. Imp. Exp. Ltda (Rio de Janeiro, Brazil). The reagents used were of analytical grade, purchased from Vetec (São Paulo, Brazil).

For the antimicrobial evaluation, strains were used from the American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA) Bacteria: *Bacillus subtilis* (ATCC 23858), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and yeast *Candida albicans* (ATCC 10231).

*Piper solmsianum* C. DC. (sin. *Piper leucanthum* or *Piper santosanum*), popularmente conhecida no Brasil como caapeba ou pariparoba, é um arbusto frequentemente encontrado em áreas com solos tropicais úmidos. Mede entre 1 e 3 m de altura e apresenta ramos glabros e estriados. Suas folhas são pecioladas e o limbo é ovalado com ápice acuminado e truncado em base cordada. Apresenta flores hermafroditas representadas por inflorescências em espigas (13-15).

Estudos fitoquímicos da planta indicaram a presença de hidrocarbonetos alifáticos, monoterpenos, sesquiterpenos, arilpropanoídes, neolignanas (15-17) e flavonoides (18). Tem sido relatado que a planta possui ação antibacteriana (19), antituberculose (20), antifúngica (18) e tripanocida (21).

No presente estudo *in vitro*, focamos nas propriedades antimicrobianas de O-carboximethylchitosan/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Ag<sup>0</sup>/Extrato de *P. solmsianum* (CMAgPs). Primeiramente, as nanopartículas foram sintetizadas e caracterizadas. Em seguida, as propriedades antimicrobianas dos CMAgPs foram testadas sobre os micro-organismos (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*). Também foram avaliados os efeitos desta nanopartícula sobre o microcrustáceo vivo *Artemia salina*.

## Materiais e métodos

### Materiais

As nanopartículas O-carboximetilquitosana/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (CM) e  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (MNP) foram sintetizadas e caracterizadas (1). Os ovos de *Artemia salina* (alta eclosão) foram adquiridos da Maramar Aquacultura Com. Imp. Exp. Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). Os reagentes utilizados foram de grau analítico, adquiridos da Vetec (São Paulo, Brasil).

Para a avaliação antimicrobiana, foram utilizadas cepas da American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, EUA. As bactérias *Bacillus subtilis* (ATCC 23858), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e a levedura *Candida albicans* (ATCC 10231).

### Preparation of the Extract

Leaves of *P. solmsianum* C.D.C. var *solmsianum* (Piperaceae) were collected in May 2016 in Ponta Grossa, PR, Brazil, and identified by Dr. Elsie Franklin Guimarães. A voucher specimen was deposited at the Museu Botânico do Rio de Janeiro (RB 368597).

Small pieces were extracted with methanol (MeOH) at room temperature for 7 days. The MeOH extract was evaporated under reduced pressure with a rotary evaporator at 50 °C to obtain the crude MeOH extract (CE).

### Synthesis of nanocomposite containing silver

The CM (0.750 g) was dispersed in 50 mL of distilled water. The AgNO<sub>3</sub> (0.085, 0.340, and 0.68 g) was solubilized separately, added to the mixture and stirred for 20 min. Next, (0.1, 0.2 and 0.3 g) of CE, dissolved in 20 mL of methanol: ethanol (40:10) was added to the mixture. Concentrated ammonium hydroxide (0.06 mL) was also added, and the pH was adjusted to 11.0 with concentrated aqueous sodium hydroxide. The mixture was stirred for 120 min, protected from light, and heated to 80 °C. Finally, the mixture was washed with distilled water and dried under vacuum for 24 h. The resulting composite, O-carboxymethylchitosan/γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Ag was reduced with *P. solmsianum* extract and was designated as CMAgPs.

### Material characterization

The particle morphology was studied under transmission electron microscopy (TEM) using a transmission electron microscope (JEOL JEM-1011) operating at 100 kV at LCME/UFSC, Florianópolis, SC, Brazil. The samples were dispersed in isopropyl alcohol and placed in the ultrasound for 3 minutes. Then, 10 µL was added to a carbon-coated copper grid and air-dried. The images were analyzed using the ImageJ software program. The concentration of silver was determined by atomic absorption spectrophotometry (AAnalyst™ 800, PerkinElmer). The calibration curve was prepared by serial dilutions of the stock solution 1000 mg L<sup>-1</sup>, using an assurance grade interference check standard (SPEX CertiPrep®).

The extract content of *P. solmsianum* present in the material was determined by the weight difference of the nanocomposites after Soxhlet extraction of the organic material, using methanol as solvent, for 24 h.

### Preparação do Extrato

Folhas de *P. solmsianum* C.D.C. var *solmsianum* (Piperaceae) foram coletadas em maio de 2016 em Ponta Grossa, PR, Brasil, e identificadas pela Dr<sup>a</sup>. Elsie Franklin Guimarães. Um espécime foi depositado no Museu Botânico do Rio de Janeiro (RB 368597).

As folhas fragmentadas foram submetidas à extração com metanol (MeOH) à temperatura ambiente durante um período de 7 dias. O extrato MeOH foi concentrado através de evaporação sob pressão reduzida com um evaporador rotativo a 50 °C para obter o extrato metanólico bruto (CE).

### Síntese de nanocompósito de prata

O CM (0,750 g) foi disperso em 50 mL de água destilada. O AgNO<sub>3</sub> (0,085; 0,340 e 0,68 g) foi solubilizado separadamente, adicionado à mistura e agitado por 20 min. Em seguida, (0,1; 0,2 e 0,3 g) de CE, dissolvido em 20 mL de uma solução metanol/etanol (40:10) foi adicionado à mistura. Hidróxido de amônio concentrado (0,06 mL) também foi adicionado e o pH foi ajustado para 11,0 com solução de hidróxido de sódio concentrado. A mistura foi agitada por 120 min, protegida da luz e aquecida a 80 °C. Por fim, a mistura foi lavada com água destilada e seca sob vácuo por 24 horas. O composto resultante, O-carboximetilquitosana/γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Ag foi reduzido pelo extrato de *P. solmsianum* sendo denominado CMAgPs.

### Caracterização do material

A morfologia da partícula foi avaliada sob microscopia eletrônica de transmissão (TEM) usando um microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM-1011) operando a 100 kV no LCME/UFSC, Florianópolis, SC, Brasil. As amostras foram dispersas em álcool isopropílico e colocadas em ultrassonicador por 3 minutos. Em seguida, 10 µL foram adicionados em uma grade de cobre revestida com carbono e secados ao ar. As imagens foram analisadas por meio do programa de software ImageJ. A concentração de prata foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica (AAnalyst™ 800, PerkinElmer). A curva de calibração foi preparada por diluições seriadas da solução estoque 1000 mg L<sup>-1</sup>, utilizando padrões de verificação de grau de interferentes (SPEX CertiPrep®).

O teor de extrato de *P. solmsianum* presente no material foi determinado pela diferença de peso dos nanocompósitos após extração do material orgânico através de Soxhlet, utilizando metanol como solvente, por 24 horas.

### *Antimicrobial assay*

The minimum inhibitory concentrations (MIC) against bacteria and yeast strains were determined in 96-well microtiter plates by two-fold dilution of the nanocomposites using a standard broth microdilution of the antibacterial agents, following the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (22,23), with minor modifications. Serial dilutions of the antibacterial material were performed in Mueller-Hinton (bacteria) and Sabouraud dextrose (yeast) broths, which were inoculated with a standardized number of organisms to obtain the final cell concentration equivalent to  $5 \times 10^4$  cell mL<sup>-1</sup> for bacteria and  $0.5 \times 10^3$  to  $5 \times 10^3$  cell mL<sup>-1</sup> for yeast, and incubated at 35 °C for 18 hours (bacteria) and 24-48 hours (yeast). The concentrations tested ranged from 1000 to 1.95 µg mL<sup>-1</sup>. Cell growth was determined by observing the turbidity of the culture. The lowest concentration of the materials at which no visual turbidity could be observed was considered to be the MIC of the antimicrobial materials.

### *Determination of time-kill kinetics*

The time-kill kinetics were determined using the method proposed by CLSI (24) with adaptations. CMAgPs samples with the lowest MIC values for each microorganism were prepared and added to a test tube with 5 mL Mueller-Hinton (bacteria) and Sabouraud (yeast). Next, 10 µL inoculum at  $0.5 \times 10^8$  cells mL<sup>-1</sup>, standardized by comparison with the McFarland scale, was added and the solution was homogenized. For the positive control, only the inoculum was added. 500 µL the solution with CMAgPs plus inoculum was serially dilutions in 0.86% sterile saline ( $10^{-1}$  to  $10^{-8}$ ), and the same was done with the positive control ( $10^{-1}$  to  $10^{-8}$ ). Next, 50 µL of each dilution was dispersed in Petri plates containing Mueller-Hinton agar and Sabouraud agar, spread with a Drigalski loop on the surface of the plate. This procedure was repeated after 2, 4, 8 and 24 hours. After each procedure, the plates were incubated at 35 °C for 48 hours, and the colonies were counted considering the dilution factor for the calculations, and the results reported in colony forming unit per milliliter (CFU mL<sup>-1</sup>) and then extrapolated into Log<sub>10</sub>.

### *Ensaio antimicrobiano*

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) contra cepas de bactérias e leveduras foram determinadas em placas de microtitulação de 96 poços por diluição dupla dos nanocompósitos usando uma microdiluição em caldo padrão dos agentes antibacterianos, seguindo as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (22, 23), com pequenas modificações. Diluições seriadas do material antibacteriano foram realizadas em caldo Mueller-Hinton (bactéria) e Sabouraud dextrose (levedura), os quais foram inoculados com um número padronizado de organismos para obtenção da concentração celular final equivalente a  $5 \times 10^4$  células mL<sup>-1</sup> para bactérias e  $0,5 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  células mL<sup>-1</sup> para levedura, e incubados a 35 °C por 18 horas (bactérias) e 24-48 horas (leveduras). As concentrações testadas variaram de 1000 a 1,95 µg mL<sup>-1</sup>. O crescimento celular foi determinado observando a turbidez da cultura. A menor concentração dos materiais em que nenhuma turbidez visual pode ser observada foi considerada a CIM dos materiais antimicrobianos.

### *Determinação da cinética de morte microbiana*

A cinética de morte foi determinada pelo método proposto por CLSI (24), com adaptações. As amostras de CMAgPs com os menores valores de CIM para cada micro-organismo foram preparadas e adicionadas a um tubo de ensaio com 5 mL de Mueller-Hinton (bactéria) e Sabouraud (levedura). A seguir, foram adicionados 10 µL de inóculo a  $0,5 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup>, padronizado por comparação com a escala de McFarland, e a solução foi homogeneizada. Para o controle positivo, foi adicionado apenas o inóculo. A solução com CMAgPs (500 µL) acrescida de inóculo, foram diluídas seriadamente ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) em solução salina (0,86%) estéril e o mesmo foi feito com o controle positivo ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ). Em seguida, 50 µL de cada diluição foram dispersos em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton e ágar Sabouraud, espalhadas na superfície da placa com auxílio de alça de Drigalski. Este procedimento foi repetido após 2, 4, 8 e 24 horas. Após cada procedimento, as placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas, e posteriormente as colônias foram contadas e para os cálculos, foi levado em consideração o fator de diluição, sendo os resultados relatados em unidades formadoras de colônias por mililitro (CFU mL<sup>-1</sup>) e então expresso em Log<sub>10</sub>.

### Exposure test of *Artemia salina* to CMAgPs

The tests were performed according to the protocol described and validated by Kos et al. (25). The dehydrated eggs of *Artemia salina* were hatched in saline medium (sea salt 38 g L<sup>-1</sup>) at pH 8.0. The eggs were dispersed in the medium (100 mg of eggs per 100 mL of medium) and incubated for 24 h under light and aeration.

The acute toxicity was determined by measuring the number of dead *Artemia*. The 24-hour-old *nauplii* were transferred to 24-well plates, with 10 *nauplii* in each, which were placed in contact with the materials and NPs (2 mL) at concentrations of 5, 10, 15, 25, 50, and 100 mg L<sup>-1</sup>. Ten replicates were used for each treatment. Saline medium was used as negative control, and a 60 mg L<sup>-1</sup> solution of K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> was used as positive control. The plates were incubated in the dark at 24 °C. The number of dead *nauplii* was evaluated after 24 and 48 h, with immobile *nauplii* being considered dead. The test was considered valid if less than 10% of the control *nauplii* were immobile.

The mortality rate was calculated by following the equation:

$$\% \text{ Mortality} = \frac{\text{Number of dead } A. \text{ salina}}{\text{Initial number of } A. \text{ salina}} \times 100$$

### Statistical Analysis

For each assay, the means were averaged from the replicates, and the error bars corresponded to the standard deviation of the mean. One-way analysis of variance (one-way ANOVA) was used, followed by Dunnett's method and Tukey's test, to determine the statistical significance of each parameter among the treatments, with significant differences at  $p < 0.01$  or  $0.05$ . The statistical analyses were conducted using the software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software).

### Teste de exposição de *Artemia salina* a CMAgPs

Os testes foram realizados de acordo com o protocolo descrito e validado por Kos et al. (25). Os ovos desidratados de *Artemia salina* foram eclodidos em meio salino (sal marinho 38 g L<sup>-1</sup>) a pH 8,0. Os ovos foram dispersos no meio (100 mg de ovos por 100 mL de meio) e incubados por 24 h sob luz e aeração.

A toxicidade aguda foi determinada pela medição do número de *Artemia* mortas. Os náuplios com 24 horas de idade, foram transferidos para placas de 24 poços, com 10 náuplios cada, que foram colocadas em contato com os materiais e NPs (2 mL) nas concentrações de 5, 10, 15, 25, 50 e 100 mg L<sup>-1</sup>. Dez réplicas foram usadas para cada tratamento. Meio salino foi utilizado como controle negativo e solução de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 60 mg L<sup>-1</sup> como controle positivo. As placas foram incubadas no escuro a 24 °C. O número de náuplios mortos foi avaliado após 24 e 48 h, sendo os náuplios imóveis considerados mortos. O teste só foi considerado válido quando menos de 10% dos náuplios de controle estivessem imóveis.

A taxa de mortalidade foi calculada seguindo a equação:

$$\% \text{ Mortalidade} = \frac{\text{Número de mortos } A. \text{ salina}}{\text{Número inicial de } A. \text{ salina}} \times 100$$

### Análise estatística

Para cada ensaio, as médias foram calculadas a partir das réplicas e as barras de erro corresponderam ao desvio padrão da média. Foi utilizada análise de variância de uma via (ANOVA de uma via), seguida pelo método de Dunnett e teste de Tukey, para determinar a significância estatística de cada parâmetro entre os tratamentos, com diferença significativa em  $p < 0,01$  ou  $0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas por meio do software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software).

## Results and Discussion

### *Characterization of materials*

The CM was previously prepared and characterized. It presented saturation magnetization, at room temperature, of  $11.78 \text{ emu g}^{-1}$  and the weight fraction of  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  particles was estimated at  $\sim 18.6 \text{ wt \%}$  (1).

### *Silver and extract content*

As the  $\text{AgNO}_3$  was mixed with the solution plant extract, the initial color changed from brown to black. The secondary metabolites present in the plants, such as phenols, terpenoids, alkaloids, carbohydrates, and proteins, which reduce  $\text{Ag}^+$  to  $\text{Ag}^0$ , play an important role in the synthesis (26, 27). The relatively high levels of the eupomatenoid-3, eupomatenoid-5, conocarpan and orientin (18, 19), isoelemicin, syringaldehyde, 3,4,5-trimethoxy-benzoic acid, sitosterol, grandisin, rel-(7R,8R,70R,80R)-30,40-methylenedioxy-3,4,5,50-tetramethoxy-7,70-epoxylignan, rel-(7R,8R,70R,80R)-3,4,30,40-dimethylenedioxy-5,50-dimethoxy-7,70-epoxylignan (21); rel-(7R,8S,70S,80R)-3,4,5,30,40,50-hexamethoxy-7,70-epoxylignan, rel-(7R,8S,70S,80R)-30,40-methylenedioxy-3,4,5,50-tetramethoxy-7,70-epoxylignan (28) may be act as reducing agents, or capping agents that provide stability to the silver nanoparticles.

The amount of silver present in the different materials is shown in Table 1. The results show that the amount of silver incorporated in the magnetic material increases as the amount of silver added to the reaction medium is increased. When the amount of silver added is small, the amount added to the extract has no influence on the amount of silver incorporated. The alkaline medium, the presence of free amino groups of O-carboxymethylchitosan, and a temperature of  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  provide conditions for the formation of silver nanoparticles (1). The silver ions initially diffused into the CM, then they were uniformly anchored in the polymer network by many  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ , and  $-\text{NHCOCH}_3^0$  groups on the main chains of CM via coordination and electrostatic interactions and subsequent reduction to  $\text{Ag}^0$ . The chitosan fraction present in O-carboxymethylchitosan (16%) may act as a reducing agent. In the reaction system, the nitrogen atom in the amines may lose one electron to generate its oxidized form, while the  $\text{Ag}^+$  ions may receive the electron to become  $\text{Ag}^0$  (29).

## Resultados e Discussões

### *Caracterização dos materiais*

O CM foi previamente preparado e caracterizado. O mesmo apresentou magnetização de saturação, à temperatura ambiente, de  $11,78 \text{ emu g}^{-1}$  e a fração ponderal das partículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  foi estimada em  $\sim 18,6 \text{ \%}$  em peso (1).

### *Conteúdo de prata e extrato*

Como o  $\text{AgNO}_3$  foi misturado com a solução de extrato vegetal, a cor inicial mudou de marrom para preto. Os metabólitos secundários presentes nas plantas, como fenóis, terpenoides, alcaloides, carboidratos e proteínas, que reduzem  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$ , desempenham um papel importante na síntese (26, 27). Os níveis relativamente elevados de eupomatenoid-3, eupomatenoid-5, conocarpano e orientina (18, 19), isoelemicina, siringaldeído, ácido 3,4,5-trimetoxi-benzóico, sitosterol, grandisina, rel-(7R,8R,70R,80R)-30,40-metilenodioxo-3,4,5,50-tetrametoxi-7,70-epoxilignan, rel-(7R,8R,70R,80R)-3,4,30,40-dimetilenodioxo-5,50-dimetoxi-7,70-epoxilignano (21); rel-(7R,8S,70S,80R)-3,4,5,30,40,50-hexametoxi-7,70-epoxilignan, rel-(7R,8S,70S,80R)-30,40-metilenodioxo-3,4,5,50-tetrametoxi-7,70-epoxilignan (28), podem atuar como agentes redutores, ou agentes de cobertura (capeamento) que conferem estabilidade às nanopartículas de prata.

A quantidade de prata presente nos diferentes materiais é apresentada na Tabela 1. Os resultados mostram que a quantidade de prata incorporada no material magnético, aumenta com o aumento da quantidade de prata adicionada ao meio reacional. Quando a quantidade de prata adicionada foi pequena, a quantidade adicionada ao extrato não influenciou na quantidade de prata incorporada. Em meio alcalino, a presença de grupos amino livres de O-carboximetilquitosana e a temperatura de  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ , fornecem condições para a formação de nanopartículas de prata (1). Os íons de prata inicialmente se difundiram no CM, então eles foram uniformemente ancorados na rede polimérica por muitos grupos  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$  e  $-\text{NHCOCH}_3^0$  nas cadeias principais do CM, via coordenação e interações eletrostáticas e subsequente redução para  $\text{Ag}^0$ . A fração quitosana presente na O-carboximetilquitosana (16%) pode atuar como agente redutor. No sistema de reação, o átomo de nitrogênio nas aminas pode perder um elétron para gerar sua forma oxidada, enquanto os íons de  $\text{Ag}^+$  podem receber o elétron para se tornar  $\text{Ag}^0$  (29).

**Table 1** - Amount of silver and *Piper solmsianum* extract present in eight different nanocomposites.

**Tabela 1** - Quantidade de prata e extrato de *Piper solmsianum* em oito diferentes nanocompósitos.

Material	AgNO <sub>3</sub> (mg)	CE* (g)	Ag (mg g <sup>-1</sup> )	CE* (mg g <sup>-1</sup> )	Ratio CE: Ag (w:w) <sup>†</sup>
CMAgPs1	85	100	39.5	135	3.4:1
CMAgPs2	340	100	115.8	138	1.2:1
CMAgPs3	600	100	131	126	0.96:1
CMAgPs4	85	200	25.2	215	8.5:1
CMAgPs5	340	200	126.1	147	1.1:1
CMAgPs6	600	200	137	190	1.4:1
CMAgPs7	85	300	28.5	261	9.2:1
CMAgPs9	600	300	171.1	216	1.3:1
CMPs	-	300	-	175	-

\*Crude Methanolic Extract; <sup>†</sup>Ratio CE: Ag (w:w) / \* Extrato Metanólico Bruto; <sup>†</sup>Proporção CE: Ag (p:p).

On the other hand, as the amount of silver added to the medium is increased, the amount of added extract has a direct influence on the amount of silver incorporated. In these cases, the presence of phytoconstituents with reducing properties is fundamental for the reduction of Ag<sup>+</sup> to Ag<sup>0</sup>.

The amount of extract incorporated in the magnetic material varied between 12.6-26.1% (Table 1). When the materials were prepared with 0.1 g of extract, the total incorporation of the extract occurred. The resulting filtration solution was colorless (data not shown). When larger concentrations were used (0.2 and 0.3 g) the resulting solution had a greenish color, indicating the presence of soluble extract.

#### Structural characterization TEM

The detailed morphology and structural studies of O-carboxymethylchitosan/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocomposite (CM), previously described, have shown that  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles have an average diameter of 9.2 nm (1). The TEM image of the prepared CMAgPs with both Ag and  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles in the O-carboxymethylchitosan/extract matrix is shown in Figure 1A.

A histogram of particle sizes is shown in Figure 1B for CMAgPs9. It can be satisfactorily described by a lognormal distribution of particle diameters, giving an average grain size of 28.1 + 9.7 nm, and with broad size distribution (10-60 nm). The amount of extract present in the particles does not alter the particle size (Figure 2). The particle sizes found are larger than those reported when extracts from *Eugenia umbelliflora*, sucrose and NaBH<sub>4</sub> (1) were used as a

Por outro lado, à medida que aumentou a quantidade de prata adicionada ao meio, a quantidade de extrato adicionada influenciou diretamente na quantidade de prata incorporada. Nesses casos, a presença de fitoconstituintes com propriedades redutoras é fundamental para a redução de Ag<sup>+</sup> a Ag<sup>0</sup>.

A quantidade de extrato incorporado ao material magnético variou entre 12,6-26,1% (Tabela 1). Quando os materiais foram preparados com 0,1 g de extrato, ocorreu a incorporação total do extrato. A solução de filtração resultante era incolor (dados não mostrados). Quando maiores concentrações foram utilizadas (0,2 e 0,3 g) a solução resultante apresentou coloração esverdeada, indicando a presença de extrato solúvel.

#### Caracterização estrutural TEM

A morfologia detalhada e os estudos estruturais do nanocompósito O-carboximetilquitosana/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (CM), descritos anteriormente, mostraram que as nanopartículas de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> têm um diâmetro médio de 9,2 nm (1). A imagem TEM dos CMAgPs preparados com partículas Ag e  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na matriz O-carboximetilquitosana/extrato é mostrada na Figura 1A.

Um histograma de tamanhos de partícula CMAgPs9 é mostrado na Figura 1B. Pode ser descrito satisfatoriamente por uma distribuição *log* normal de diâmetros de partícula, dando um tamanho médio de 28,1 + 9,7 nm, e com ampla distribuição de tamanho (10-60 nm). A quantidade de extrato presente nas partículas não alterou o tamanho das partículas (Figura 2). Os tamanhos de partícula encontrados foram maiores do que os relatados para os extratos de *Eugenia umbelliflora*, sacarose e NaBH<sub>4</sub> (1) que foram



silver-reducing agent. Particle size depends on the amount of silver salt, the amount and type of capping, and the reducing agent (30, 31).

### Antimicrobial Activity

The antibacterial activity of the CMAgPs materials was quantitatively evaluated by determining the MIC against the pathogens. The results are shown in Table 2. As can be seen, all silver NP showed activity against all strains of organisms tested (bacteria and yeast), but the activity varied according to the silver and *P. solmsianum* CE concentrations in each sample.

The minimum inhibitory concentration of the samples ranged from 125 to 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , and the most sensitive organism was *E. coli*. As can be seen, the increased amount of extract employed in the complexation of CM with  $\text{AgNO}_3$  did not potentiate the antimicrobial effect of the extract, but its addition acted as a silver reducing agent.

The concentration of *P. solmsianum* extract in the NP was 175  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , which was sufficient for good antimicrobial activity, as it is reported that CE has an activity of between MIC 6-30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for gram-positive bacteria and between MIC 20-30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for fungi (18, 19). However, the silver-free NP showed poor activity against *S. aureus*, and was inactive for the other tested microorganisms.

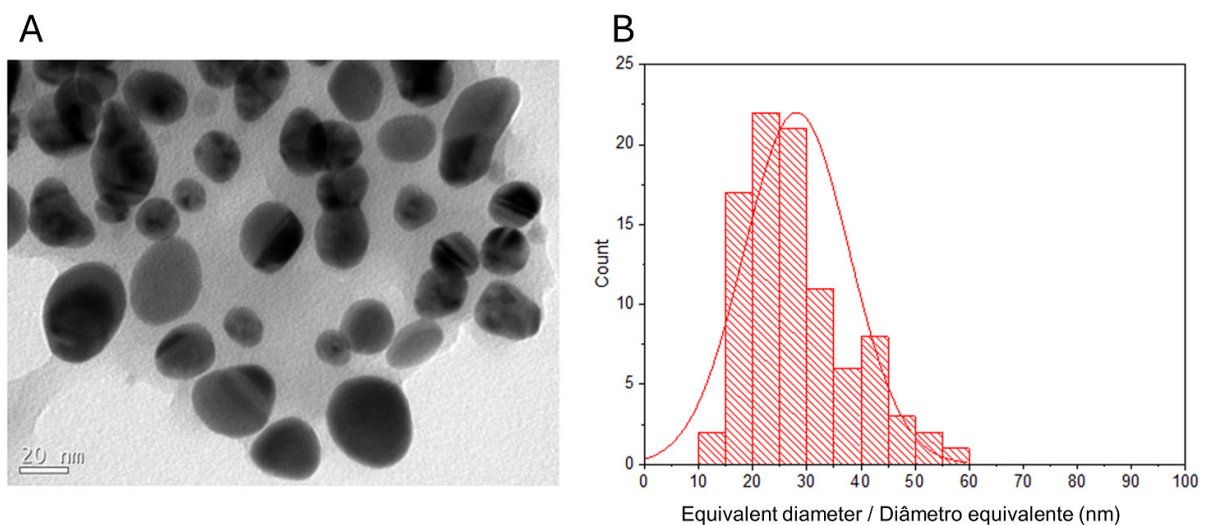
usados como agente redutor de prata. O tamanho da partícula depende da quantidade de sal de prata, da quantidade e tipo de capeamento e do agente redutor (30, 31).

### Atividade Antimicrobiana

A atividade antibacteriana dos materiais CMAgPs foi avaliada quantitativamente pela determinação da CIM contra os patógenos. Os resultados são mostrados na Tabela 2. Como pode ser visto, todas as NPs de prata apresentaram atividade contra todas as cepas de organismos testadas (bactérias e levedura), mas a atividade variou de acordo com as concentrações de prata e CE de *P. solmsianum* em cada amostra.

A concentração inibitória mínima das amostras variou de 125 a 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e o organismo mais sensível foi a *E. coli*. Como pode ser observado, o aumento da quantidade de extrato empregado na complexação do CM com  $\text{AgNO}_3$  não potencializou o efeito antimicrobiano do extrato, mas sua adição atuou como agente redutor de prata.

A concentração do extrato de *P. solmsianum* no NP foi de 175  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , o que foi suficiente para uma boa atividade antimicrobiana, pois é relatado que o CE tem atividade entre CIM entre 6 e 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para bactérias gram-positivas e CIM entre 20 e 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para fungos (18, 19). No entanto, a NP livre de prata apresentou atividade fraca contra *S. aureus*, e inativa para os demais micro-organismos testados.



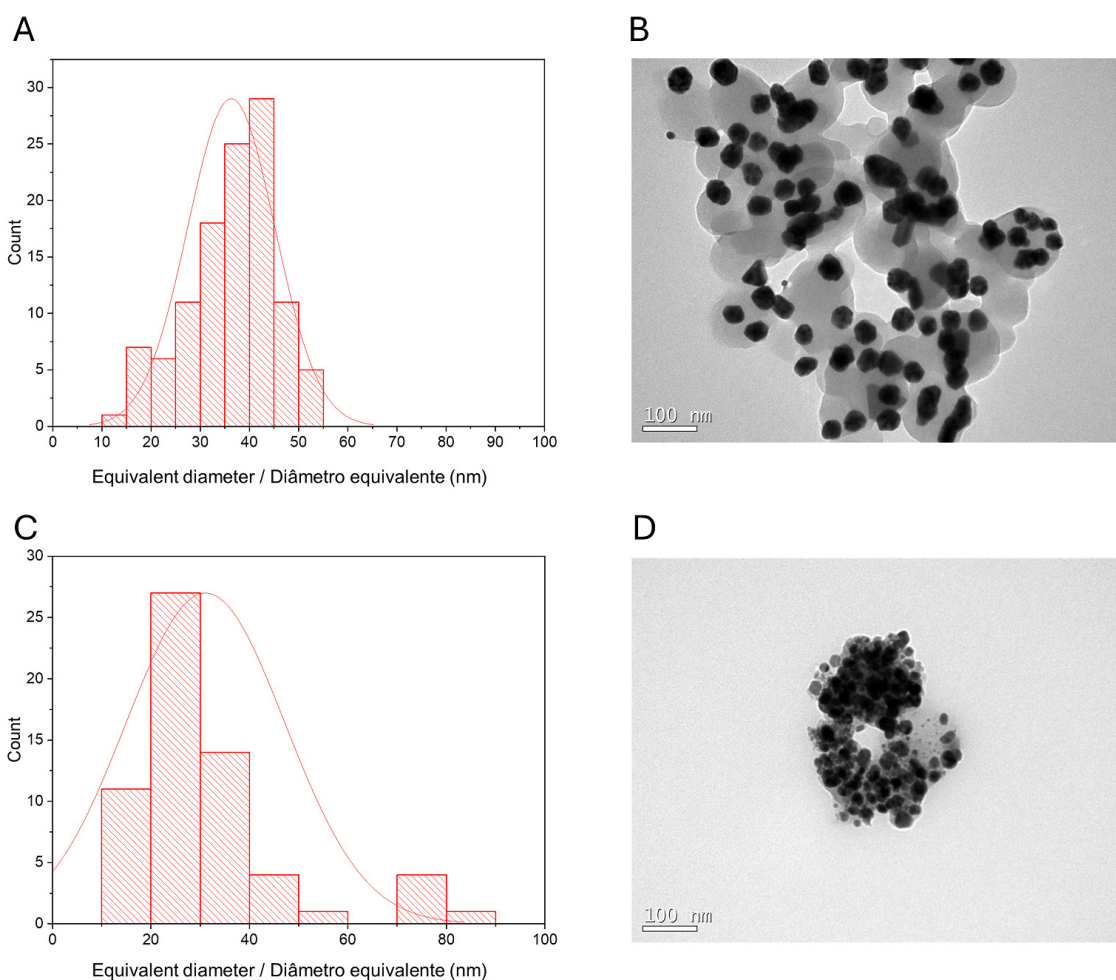
**Figure 1** - TEM image of CMAgPs9 nanocomposite (A) and histogram of particle size distribution (Ag and  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) with a log-normal function (solid black line) obtained for  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  particles in CMAgPs9 (B).

**Figura 1** - Imagem TEM do nanocompósito CMAgPs9 (A) e histograma de distribuição de tamanho de partícula (Ag e  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) com função log-normal (linha preta sólida) obtida para partículas  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  em CMAgPs9 (B).

**Table 2** - Minimum inhibitory concentration (MIC) of eight nanoparticles samples associated with different concentrations of *Piper solmsianum* extract.

**Tabela 2** - Concentração inibitória mínima (CIM) de oito amostras de nanopartículas associadas a diferentes concentrações de extrato de *Piper solmsianum*.

Material	MIC / CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )			
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
CMAgPs1	500	250	250	500
CMAgPs2	125	250	250	500
CMAgPs3	250	250	250	500
CMAgPs4	500	250	250	1000
CMAgPs5	250	250	125	125
CMAgPs6	500	250	125	500
CMAgPs7	1000	500	500	500
CMAgPs9	500	500	250	500
CMPs	>1000	1000	>1000	>1000



**Figure 2** - Histogram of particle size distribution (Ag and  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) with a log-normal function (solid black line) obtained for  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  particles in CMAgPs5 (A) and TEM image of CMAgPs5 nanocomposite (B), and in CMAgPs1 (C) and TEM image of CMAgPs1 nanocomposite (D).

**Figura 2** - Histograma de distribuição do tamanho de partícula (Ag e  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) com função log-normal (linha preta contínua) obtido para partículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  em CMAgPs5 (A) e imagem TEM do nanocompósito CMAgPs5 (B) e em CMAgPs1 (C) e imagem TEM do nanocompósito CMAgPs1 (D).

The results of the antimicrobial activity presented by CMAgPs NP suggest that there is no relationship between the amount of silver and residual CE from *P. solmsianum* and antimicrobial activity, since it did not vary proportionally to the amount of silver and CE present.

There was no correlation between the MIC NP samples with the respective concentrations of CE and Ag. However, when the relationship between these two components in the NP samples is added to the analysis, it can be inferred that the NP with the best activity profiles (CMAgPs2, CMAgPs5 and CMAgPs6) were those in which the ratios of CE and Ag were between 1.1:1 and 1.4:1, suggesting that higher concentrations of CE may be disrupting the activity by covering the active sites of the Ag. The results also showed that low concentrations of Ag in PN are not sufficient for good antimicrobial activity.

#### *Killing kinetics*

Killing kinetics assays were performed based on the selection of NP, which presented the best inhibition profile (CMAgPs5) against *E. coli* and *C. albicans*. For *E. coli*, the analyses were based on the MIC ( $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and sub-inhibitory ( $62.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) concentrations, and the results revealed that the NP (CMAgPs5) showed bactericidal action, where after the first hour, a marked reduction in viability was seen and after the fourth hour, cell viability for the concentration of  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$  was no longer seen. Also, as can be seen in Figure 3A, after 24 h, for both NP concentrations, there was a reduction in viability in the order of  $\leq 6 \text{ Log}_{10}$ , relative to the control. Based on the result of the sub-inhibitory concentration, which still has a bactericidal effect, a concentration equivalent to  $\frac{1}{4}$  of the MIC ( $15.62 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) was also evaluated. At this concentration, the compound showed a reduction in the number of viable cells in the order of  $\leq 3 \text{ Log}_{10}$  until the eighth hour of incubation, compared to the control, and after this time there was an increase in the number of viable cells, showing that at this concentration, inhibition does occur, but the microorganism remains viable. A similar study was conducted by Haque *et al.* (32) with NPAg, which also obtained similar results against *E. coli*. Therefore, considering the concentration of the active principle against the microorganism, the inhibition time, and the unfeasibility, the results found for CMAgPs5 can be considered very promising.

Os resultados da atividade antimicrobiana apresentados pelos CMAgPs NP sugerem que não houve relação entre a quantidade de prata e CE de *P. solmsianum* residual e a atividade antimicrobiana, uma vez que não variou proporcionalmente à quantidade de prata e CME presentes.

Não houve correlação entre a CIM das amostras de NP com as respectivas concentrações de CE e Ag. No entanto, quando a relação entre esses dois componentes nas amostras NP foi adicionada à análise, pode-se inferir que o NP com os melhores perfis de atividade (CMAgPs2, CMAgPs5 e CMAgPs6) foram aqueles em que as proporções de CE e Ag ficaram entre 1,1:1 e 1,4:1, sugerindo que maiores concentrações de CE podem estar atrapalhando a atividade cobrindo os sítios ativos do Ag. Os resultados também mostraram que baixas concentrações de Ag em NP não foram suficientes para uma boa atividade antimicrobiana.

#### *Cinética de morte microbiana*

Os ensaios de avaliação da cinética de morte foram realizados empregando-se a NP que apresentou o melhor perfil de inibição (CMAgPs5) contra *E. coli* e *C. albicans*. Para *E. coli*, as análises foram baseadas nas concentrações CIM ( $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e sub-inibitória ( $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), para o qual os resultados revelaram que o NP (CMAgPs5) apresentou ação bactericida, onde após a primeira hora, houve redução acentuada da viabilidade e após a quarta hora, a viabilidade celular, para a concentração de  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ , não foi mais observada. Além disso, como pode ser visto na Figura 3A, após 24 h, para ambas as concentrações de NP, houve uma redução na viabilidade da ordem de  $\leq 6 \text{ Log}_{10}$ , em relação ao controle. Com base no resultado da concentração subinibitória, que ainda tem efeito bactericida, também foi avaliada uma concentração equivalente a  $\frac{1}{4}$  da CIM ( $15,62 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Nesta concentração, o composto apresentou redução no número de células viáveis na ordem de  $\leq 3 \text{ Log}_{10}$  até a oitava hora de incubação, em relação ao controle, e após este tempo, houve aumento no número de células viáveis, mostrando que nesta concentração, a inibição ocorre, porém o microorganismo permanece viável. Um estudo semelhante foi conduzido por Haque *et al.* (32) com NPAg, que também obteve resultados semelhantes contra *E. coli*. Portanto, considerando a concentração do princípio ativo sobre o micro-organismo, o tempo de inibição e a sua inviabilidade, os resultados encontrados para CMAgPs5 podem ser considerados bastante promissores.

For *C. albicans*, the analysis of killing kinetics data revealed a fungistatic effect of this NP against yeast, as it reduced the viable population (CFU mL<sup>-1</sup>) by  $\leq 2 \text{ Log}_{10}$ , when compared to the control (Figure 3B). However, it was not able to completely kill this organism. Compounds with this type of action only inhibit microbial growth without necessarily rendering it inviable.

In general, the fungistatic effect is caused by some reversible metabolic damage in yeast and may grow back over time. In this experiment, for CMAgPs5, growth occurred after 4 h. Based on these results, the supra-inhibitory concentration was evaluated as twice the MIC (250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). It was observed that at this dose, the yeast kept the number of viable cells stable for 8 h without considerable growth, however, after this period, the viable number increased to control levels, and after this period, the number of viable increased, as did the control.

#### Toxicity associated with nanocomposite in *Artemia salina* nauplii

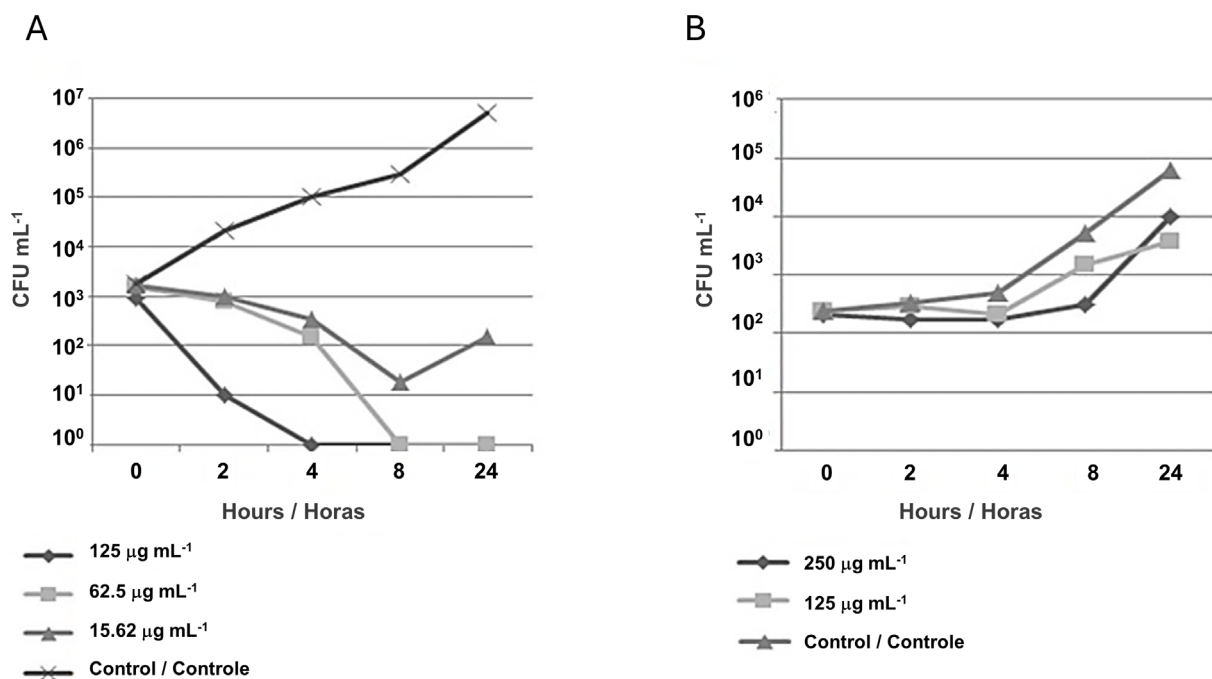
*A. salina* cytotoxicity is one of the most reliable methods of screening and detecting the cytotoxicity of a product. For this test, the compounds with the

Para *C. albicans*, a análise dos dados da cinética de morte revelou um efeito fungistático da NP sobre a levedura, pois reduziu a população viável (CFU mL<sup>-1</sup>) em  $\leq 2 \text{ Log}_{10}$  quando comparado ao controle (Figura 3B). No entanto, não foi capaz de inviabilizar completamente este organismo. Compostos com este tipo de ação apenas inibem o crescimento microbiano sem necessariamente inviabilizá-lo.

Em geral, o efeito fungistático é causado por algum dano metabólico reversível na levedura que pode voltar a crescer com o tempo. Neste experimento, para CMAgPs5, o crescimento ocorreu após 4 h. Com base nesses resultados, a concentração suprainibitória foi avaliada como duas vezes a CIM (250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Observou-se que nesta dose, a levedura manteve o número de células viáveis estável por 8 h sem crescimento considerável, porém, após este período, o número de células viáveis aumentou para os níveis semelhantes ao controle. E após esse período, o número de viáveis aumentou, assim como o controle.

#### Toxicidade associada ao nanocompósito em náuplios de *Artemia salina*

A citotoxicidade sobre *A. salina* é um dos métodos de triagem e detecção de citotoxicidade para diversos produtos. Para este teste, os compostos com



**Figure 3** - Time-kill curve of *Escherichia coli* (A) and *Candida albicans* (B) against the action of nanoparticle CMAgPs5.

**Figura 3** - Curva de tempo de morte de *Escherichia coli* (A) e *Candida albicans* (B) submetidas à ação da nanopartícula CMAgPs5.

**Table 3** - Cytotoxicity of four selected nanocomposites and *Piper solmsianum* extract on *Artemia salina*.**Tabela 3** - Citotoxicidade de quatro nanocompósitos selecionados e do extrato de *Piper solmsianum* sobre *Artemia salina*.

Material	(-) control / controle		25 mg L <sup>-1</sup>		50 mg L <sup>-1</sup>		100 mg <sup>-1</sup>	
	24 h	48 h	24 h	48h	24 h	48h	24 h	48h
CMAgPs1	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	3±1	0±0	0±0
CMAgPs5	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
CMAgPs9	0±0	0±0	0±0	3±1	0±0	2±1	0±0	0±0
CMPs	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	3±1	0±0	46±5
CE	0±0	0±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0

best antimicrobial activity results, as well as those that could cover from the lowest concentrations of Ag (CMPs and CMAgPs1) to the highest (CMAgPs9), passing through an intermediate concentration (CMAgPs5) and the same criterion for the concentration of CE. The respective results are shown in Table 3.

No nauplii died during the toxicity tests in the control group. After exposure for 24 h, no effect on survival of nauplii was observed for CMAgPs in the concentration range used. When the nauplii were in contact with CE, 100% death was observed within 24 h, over the entire concentration range. After exposure for 48 h, with the CMAgPs, 46% of the nauplii died at the concentration of 100 mg L<sup>-1</sup> and the death of all nauplii was observed ( $p < 0.001$ ) for CE in the concentration range used.

The EC<sub>50</sub> of *P. solmsianum* CE for nauplii has been reported to be 89.9 µg L<sup>-1</sup> (18). This concentration is well below that presented in the present study, which was between 3.4 and 26.6 mg L<sup>-1</sup>. This result reveals that the incorporation of the extract in the magnetic material decreases its toxicity, which may be attributed to the decreased solubility of the extract incorporated into the magnetic material. The toxicity of CMPs and CE to *A. salina* nauplii may be linked to the cytotoxic activity of conocarpan, which has an IC<sub>50</sub> of 2.9 µg L<sup>-1</sup> (18), however, more studies are needed to elucidate what types of interactions are occurring so that toxicity is reduced. It is noteworthy that although the number of studies using the *A. salina* test has increased, due to several factors, as well as showing a good correlation of cytotoxicity (33), it does not replace other more specific and sensitive tests (34).

melhores resultados atividade antimicrobiana, bem como, àqueles pudessem cobrir desde as menores concentrações de Ag (CMPs e CMAgPs1) até as maiores (CMAgPs9), passando por uma concentração intermediária (CMAgPs5) e mesmo critério para a concentração de CE. Os respectivos resultados são mostrados na Tabela 3.

Nenhum náuplio morreu durante os testes de toxicidade no grupo controle. Após exposição por 24 h, nenhum efeito na sobrevivência dos náuplios foi observado para CMAgPs na faixa de concentração utilizada. Quando os náuplios estiveram em contato com o CE, 100% de morte foi observada em 24 h, em toda a faixa de concentração. Após exposição por 48 h, com os CMAgPs, 46% dos náuplios morreram na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> e a morte de todos os náuplios foi observado ( $p < 0,001$ ) para CE na faixa de concentração utilizada.

O EC<sub>50</sub> do CE *P. solmsianum* para os náuplios tem sido relatado como 89,9 µg L<sup>-1</sup> (18). Essa concentração está bem abaixo da apresentada no presente estudo, que ficou entre 3,4 e 26,6 mg L<sup>-1</sup>. Este resultado revela que a incorporação do extrato no material magnético diminui sua toxicidade, o que pode ser atribuído à diminuição da solubilidade do extrato incorporado ao material magnético. A toxicidade das CMPs e CE aos náuplios de *A. salina* pode estar ligada à atividade citotóxica do conocarpano, que possui IC<sub>50</sub> de 2,9 µg L<sup>-1</sup> (18), porém são necessários mais estudos para elucidar que tipos de interações estão ocorrendo para que a toxicidade esteja sendo reduzida. Ressalta-se que embora o número de pesquisas que utilizem o teste de *A. salina* tenha aumentado, devido a vários fatores, e tenha apresentado boa correlação de citotoxicidade (33), ele não substitui outros testes mais específicos e sensíveis (34).

## Conclusions

All the silver nanoparticles (NPs) obtained showed antimicrobial activity. The best results for antibacterial activity were obtained with CMAgPs2 against *B. subtilis*, CMAgPs5 and CMAgPs6 against *E. coli* (MIC 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). The NPs from CMAgPs1 to CMAgPs6 showed good antibacterial activity against *S. aureus* (MIC of 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), and CMAgPs5 also showed good activity on *C. albicans* (125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). The evaluation of killing kinetics revealed that CMAgPs5 showed bactericidal and fungistatic effects. Despite the recognized activity of CE, its potentiating effect of antimicrobial activity was not observed, but it has proven to be a potential reducing agent for green synthesis. In the toxicity test against *Artemia salina*, none of the NPs (CMAgPs) proved to be toxic.

## Author contributions

The manuscript was produced through the contributions of all authors. F. Molinett, C.A. Rodrigues and A. Bella Cruz designed and performed the experiments and analysed the obtained results. The other authors conducted experiments for this study. F. Molinett wrote the manuscript and all co-authors provided constructive feedback on the manuscript.

## Funding

This study was funded in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Finance Code 001 and the Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico- Brasil (CNPq). This work was partly conducted in a laboratory funded by POIG.02.02.00-00-025/09.

## Acknowledgements

The authors would like to thank the LCME-UFSC for the technical support during the electron microscopy work.

## Conflict of Interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Conclusões

Todas as nanopartículas de prata (NPs) obtidas apresentaram atividade antimicrobiana. Os melhores resultados para atividade antibacteriana foram obtidos com CMAgPs2 contra *B. subtilis*, enquanto que CMAgPs5 e CMAgPs6 contra *E. coli* (CIM 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). As NPs de CMAgPs1 a CMAgPs6 apresentaram boa atividade antibacteriana contra *S. aureus* (CIM de 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), e CM-AgPs5 também apresentou boa atividade sobre *C. albicans* (CIM 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A avaliação da cinética de morte revelou que CMAgPs5 apresentou efeitos bactericidas e fungistáticos. Apesar da reconhecida atividade do CE, não foi observado seu efeito potencializador da atividade antimicrobiana, mas provou ser um potencial agente redutor para a síntese verde. No teste de toxicidade contra *Artemia salina*, nenhuma das NPs (CMAgPs) se mostrou tóxica.

## Contribuições dos autores

O manuscrito foi produzido através das contribuições de todos os autores. F. Molinett, C.A. Rodrigues e A. Bella Cruz, que projetaram e realizaram os experimentos e analisaram os resultados obtidos. Os outros autores também realizaram experimentos para este estudo. F. Molinett escreveu o manuscrito e todos os co-autores forneceram feedback construtivo sobre o manuscrito.

## Financiamento

Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código Financeiro 001 e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-Brasil (CNPq). Este trabalho foi parcialmente realizado em laboratório financiado pelo POIG.02.02.00-00-025/09.

## Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao LCME-UFSC pelo apoio técnico durante o trabalho de microscopia eletrônica.

## Conflito de interesses

Os autores declaram que não têm interesses financeiros concorrentes conhecidos ou relacionamentos pessoais que possam parecer influenciar o trabalho relatado neste artigo.

## References / Referências

- Demarchi, C.A., Bella Cruz, A., Ślowska-Waniewska, A., Nedelko, N., Dłużewski, P., Kaleta, A., Trzciński, J., Magro, J.D., Scapinello, J. & Rodrigues, C.A. (2018). Synthesis of Ag@Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocomposite based on o-carboxymethylchitosan with antimicrobial activity. *International journal of biological macromolecules*, 107(Pt A), 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.147>
- Arivizhivendhan, V., Mahesh, M., Boopathy, R., Karthikeyan, S., Mary, R.R. & Sekaran, G. (2018). Functioned silver nanoparticle loaded activated carbon for the recovery of bioactive molecule from bacterial fermenter for its bactericidal activity. *Applied Surface Science*, 427, 813–824. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.08.128>
- Shahriary, M., Veisi, H., Hekmati, M. & Hemmati, S. (2018). In situ green synthesis of Ag nanoparticles on herbal tea extract (*Stachys lavandulifolia*) modified magnetic iron oxide nanoparticles as antibacterial agent and their 4-nitrophenol catalytic reduction activity. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 90, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.044>
- Ahmad, S., Munir, S., Zeb, N., Ullah, A., Khan, B., Ali, J., Bilal, M., Omer, M., Alamzeb, M., Salman, S.M. & Ali, S. (2019). Green nanotechnology: a review on green synthesis of silver nanoparticles — an ecofriendly approach. *International journal of nanomedicine*, 14, 5087–5107. <https://doi.org/10.2147/IJN.S200254>
- Abdelghany, T.M., Al-Rajhi, A.M.H., Al Abboud, M.A., Alawlaqi, M.M., Magdah, A.G., Helmy, E.A.M. & Mabrouk, A.S. (2018). Recent advances in green synthesis of silver nanoparticles and their applications: About future directions. A review. *BioNanoScience* 8, 5–16. <https://doi.org/10.1007/s12668-017-0413-3>
- Majeed, A., Ullah, W., Anwar, A.W., Shuaib, A., Ilyas, U., Khalid, P., Mustafa, G., Junaid, M., Faheem, B. & Ali, S. (2018). Cost-effective biosynthesis of silver nanoparticles using different organs of plants and their antimicrobial applications: A review. *Materials Technology: Advanced Performance Materials*, 33, 313-320. <https://doi.org/10.1080/10667857.2015.1108065>
- Shahid, M., Zhou, Y., Cheng, X-W., Zar, M.S., Chen, G. & Tang, R-C. (2018). Ferulic acid promoted in-situ generation of AgNPs@silks as functional colorants. *Journal of Cleaner Production*, 176, 736-744. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.12.171>
- Veisi, H., Azizi, S. & Mohammadi, M. (2018). Green synthesis of the silver nanoparticles mediated by *Thymra spicata* extract and its application as a heterogeneous and recyclable nanocatalyst for catalytic reduction of a variety of dyes in water. *Journal of Cleaner Production*, 170, 1536-1543. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.09.265>
- Rafique, M., Sadaf, I., Tahir, M.B., Rafique, M.S., Nabi, G., Iqbal, T. & Sughr, K. (2019). Novel and facile synthesis of silver nanoparticles using Albizia procera leaf extract for dye degradation and antibacterial applications. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 99, 1313-1324. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.02.059>
- WHO - World Health Organization. (2022). Drinking-water. UpToDate. Retrieved June 30, 2023, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>
- Fan, M., Gong, L., Huang, Y., Wang, D. & Gong, Z. (2018). Facile preparation of silver nanoparticle decorated chitosan cryogels for point-of-use water disinfection. *Science of The Total Environment* 613-614, 1317-1323. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.256>
- Sahbaz, D.A., Yakar, A. & Gündüz, U. (2019). Magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan micro- and nanoparticles for wastewater treatment. *Particulate Science and Technology* 37, 728-736. <https://doi.org/10.1080/02726351.2018.1438544>
- Guimarães, E.F. & Carvalho-Silva, M. (2012). Piperaceae. In: Wanderley, M.G.L., Martins, S.E., Romanini, R.P., Melhem, T.S., Shepherd, G.J., Giulietti, A.M., Pirani, J.R., Kirizawa, M., Melo, M.M.R.F., Cordeiro, I., Kinoshita, L.S. (Eds.), *Flora fanerogâmica do estado de São Paulo*, v. 7, Instituto de Botânica, São Paulo, pp 263–320.
- Reitz, R. (2003). Piperaceae. In: *Flora Ilustrada Catarinense*. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, Brazil.
- Moreira, D.L., Kaplan, M.A. & Guimarães, E.F. (1995). Constituintes químicos de *Piper solmsianum* C.DC. (Piperaceae). *Revista Brasileira de Farmácia*, 76, 106-109.
- Martins, R.C., Latorre, L.R., Sartorelli, P. & Kato, M.J. (2000). Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. *Phytochemistry* 55, 843-846. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00295-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00295-8)
- Moreira, D.L., Souza, P.O., Kaplan, M.A., Pereira, N.A., Cardoso, G.L. & Guimarães, E.F. (2001). Effect of leaf essential oil from *Piper solmsianum* C.DC. in mice behaviour. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 73, 33-37. <http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37652001000100004>
- Campos, M.P., Chechin Filho, V., Silva, R.Z., Yunes, R.A., Zacchino, S., Juarez, S., Cruz, R.C.B. & Bella Cruz, A. (2005). Evaluation of antifungal activity of *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28, 1527-1530. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.1527>
- Campos, M.P., Chechin Filho, V., Silva, R.Z., Yunes, R.A., Monache, F.D. & Bella Cruz, A. (2007). Antibacterial activity of extract, fractions and four compounds extracted from *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62, 173-178. <https://doi.org/10.1515/znc-2007-3-404>
- Lopes, M.A., Ferracioli, K.R.C., Siqueira, V.L.D., de Lima Scodro, R.B., Cortez, D.A.G., da Silva, R.Z. & Cardoso, R.F. (2014). In vitro interaction of eupomatenoide-5 from *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* and anti-tuberculosis drugs. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 18, 1513-1515. <https://doi.org/10.5588/ijtld.14.0229>
- Martins, R.C., Lago, J.H., Albuquerque, S. & Kato, M.J. (2003). Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. *Phytochemistry* 64, 667-670. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00356-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00356-X)
- CLSI (2015). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 10<sup>th</sup> ed. Document M07-A10, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLSI (2008). Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 3<sup>th</sup> ed. Document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLSI (1999). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved guideline, Document M26-A. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Kos, M., Kahru, A., Drobne, D., Singh, S., Kalčíková, G., Kühnel, D., Rohit, R., Gotvajn, A.Ž. & Jemec, A. (2016). A case study to optimise and validate the brine shrimp *Artemia franciscana* immobilisation assay with silver nanoparticles: The role of harmonisation. *Environmental Pollution*, 213, 173–183. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.02.015>
- Sajjadi, G., Amini, J., Arani, A.S. & Nezamhaleh, H. (2018). Extracellular synthesis of silver nanoparticles using four fungal species isolated from lichens. *IET Nanobiotechnology* 12, 64-70. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2017.0170>

27. Mazumder, J.A., Perwez, M., Noori, R. & Sardar, M. (2019). Development of sustainable and reusable silver nanoparticle-coated glass for the treatment of contaminated water. *Environmental science and pollution research international*, 26(22), 23070–23081. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05647-4>
28. Ramos, C.S., Linnert, H.V., Moraes, M.M., Amaral, J.H., Yamaguchi, L.F. & Kato, M.J. (2017). Configuration and stability of naturally occurring all-cis-tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. *RSC Advances*, 7, 46932–46937. <https://doi.org/10.1039/c7ra09262h>
29. Biao, L., Tan, S., Wang, Y., Guo, X., Fu, Y., Xu, F., Zu, Y. & Liu, Z. (2017). Synthesis, characterization and antibacterial study on the chitosan-functionalized Ag nanoparticles. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 76, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.154>
30. Ebrahimzadeh, M.A., Derazkola, S.M. & Zazoul, M.A. (2019). Eco friendly green synthesis and characterization of novel Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/Cu<sub>2</sub>O–Ag nanocomposites using *Crataegus pentagyna* fruit extract for photocatalytic degradation of organic contaminants. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 30, 10994–11004. <https://doi.org/10.1007/s10854-019-01440-8>
31. Dizaji, A.N., Yilmaz, M. & Piskin, E. (2016). Silver or gold deposition onto magnetite nanoparticles by using plant extracts as reducing and stabilizing agents. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44(4), 1109–1115. <https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1019672>
32. Haque, M.A., Imamura, R., Brown, G.A., Krishnamurthi, V.R., Niyonshuti, I.I., Marcelle, T., Mathurin, L.E., Chen, J. & Wang, Y. (2017). An experiment-based model quantifying antimicrobial activity of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *RSC Advances*, 7, 56173–56182. <https://doi.org/10.1039/C7RA10495B>
33. Rajabi, S., Ramazani, A., Hamidi, M. & Naji, T. (2015). *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *Daru Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0105-x>.
34. Santos Filipe, M., Isca, V.M.S., Ntungwe, N.E., Princiotta, S., Díaz-Lanza, A.M. & Rijo, P. Lethality Bioassay using *Artemia salina* L. (2022). *Journal of Visualized Experiments*, 188, e64472. <https://doi.org/10.3791/64472>.