

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

ANA CRISTINA OLTRAMARI TOLEDO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DE OURO, OBTIDAS POR SÍNTESE
VERDE, A PARTIR DO EXTRATO AQUOSO DAS SEMENTES DE *Pterodon emarginatus*
Vogel (Fabaceae) ASSOCIADAS À GENTAMICINA E AO ÁCIDO HIALURÔNICO**

PONTA GROSSA

2021

ANA CRISTINA OLTRAMARI TOLEDO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DE OURO, OBTIDAS POR SÍNTESE
VERDE, A PARTIR DO EXTRATO AQUOSO DAS SEMENTES DE *Pterodon emarginatus*
Vogel (Fabaceae) ASSOCIADAS À GENTAMICINA E AO ÁCIDO HIALURÔNICO**

Tese apresentada para a obtenção do título de doutora na
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Fármacos,
Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Josiane de Fátima Padilha de Paula

**PONTA GROSSA
2021**

T649 Toledo, Ana Cristina Oltramari

Desenvolvimento, caracterização e avaliação das atividades biológicas de nanopartículas de prata e de ouro, obtidas por síntese verde, a partir do extrato aquoso das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae) associadas à gentamicina e ao ácido hialurônico / Ana Cristina Oltramari Toledo. Ponta Grossa, 2021.

169 f.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Josiane de Fátima Padilha de Paula.

1. *Pterodon emarginatus* Vogel. 2. Síntese verde. 3. Nanopartículas metálicas. 4. Atividades biológicas. I. Paula, Josiane de Fátima Padilha de. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. III.T.

CDD: 615.321

Ponta Grossa, 04 de março de 2021.

ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 03/2021 DA DOUTORANDA ANA CRISTINA OLTRAMARI TOLEDO REALIZADA NO DIA 04 DE MARÇO DE 2021, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos quatro dias de março de dois mil e vinte e um, às 14h00min, via videoconferência, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão pública sob a presidência da Professora Doutora Josiane de Fátima Padilha de Paula reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da doutoranda Ana Cristina Oltramari Toledo, na linha de pesquisa: Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos, constituída pela Professora Doutora Josiane de Fátima Padilha de Paula (UEPG/PR) e demais Doutores (membros titulares): Daniela Gaspardo Folquitto (CESCAGE/PR), Patricia Mathias Doll Boscardin (UEPG/PR), Patrícia Mazureki Campos (UEPG/PR) e Vanessa Cristina Godoy Jasinski (CESCAGE/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de tese de Doutorado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.

O título do trabalho foi: **“DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DE OURO, OBTIDAS POR SÍNTESE VERDE, A PARTIR DO EXTRATO AQUOSO DAS SEMENTES DE *Pterodon emarginatus* Vogel (FABACEAE) ASSOCIADAS À GENTAMICINA E AO ÁCIDO HIALURÔNICO”.**

Encerrada a defesa, a banca considerou APROVA DA a tese, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da tese de Doutorado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

Pró – Reitoria de Pesquisa e Pós- Graduação

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia – Fone (42)
3220-3337 – ppgcf@hotmail.com

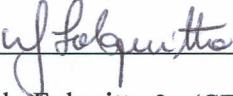
Av. Carlos Cavalcanti, 4748 – Ponta Grossa – Paraná – Brasil – CEP: 84030-900

Alteração de título: sim ☐ não ☒

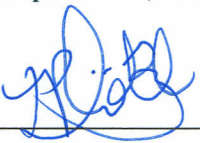
Novo título: _____



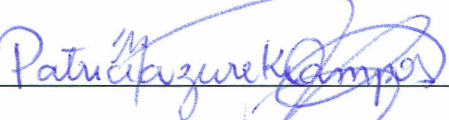
Josiane de Fátima Padilha de Paula 1 - (DEFAR - UEPG) Presidente



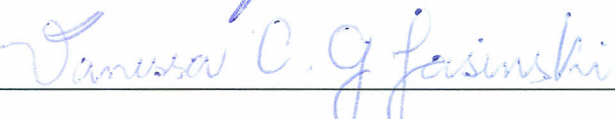
Daniela Gaspardo Folquitto 2 - (CESCAGE - PR) – Titular



Patricia Mathias Doll Boscardin 3 - (DEFAR-UEPG) – Titular



Patrícia Mazureki Campos 4 – (DEFAR-UEPG) – Titular



Vanessa Cristina Godoy Jasinski 5 - (CESCAGE - PR) – Titular

Pró – Reitoria de Pesquisa e Pós- Graduação

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia – Fone (42)
3220-3337 – ppgcf@hotmail.com

Av. Carlos Cavalcanti, 4748 – Ponta Grossa – Paraná – Brasil – CEP: 84030-900

Dedico à minha família.

*Meu esposo Alceu
pelo suporte emocional e técnico, presença
constante e compreensão.*

*Ao filho Mateus que colaborou com seu
conhecimento em física, matemática e
química na solução de dúvidas surgidas
durante a pesquisa, também pela
compreensão pelas minhas ausências, meu
amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

A Deus (Pai, Filho e Espírito Santo) pelo dom da vida, pela presença contínua em todos os momentos dando forças e iluminando meu caminho.

Às minhas mães Maria, a do Céu pela sua intercessão junto a Deus pelos meus pedidos, a da terra que na experiência singela de seus 90 anos me ensinou a nunca desistir de orar e confiar, todos os dias com seu terço nas mãos.

Ao meu Anjo da Guarda, minha doce companhia que nunca me abandonou e, naqueles momentos em que tudo parecia dar errado, no silêncio de meu coração, ele indicava o caminho.

Ao meu querido pai, Alonso (*in memorian*) que com sacrifícios sempre procurou dar a melhor educação tanto para a formação de minha personalidade quanto a intelectual, muitas saudades meu pai.

À professora Dra. Josiane de Fátima Padilha de Paula por aceitar ser minha orientadora e sempre me conduzir com toda a paciência, experiência e amizade pelos difíceis caminhos da pesquisa.

À professora Dra. Patrícia Mathias Döll Boscardin sempre disponível a auxiliar ensinando, disponibilizando materiais e corrigindo todas as etapas dos ensaios de viabilidade celular.

À professora Dra. Carla Cristine Kanunfre, do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Ponta Grossa, que disponibilizou o Laboratório de Biologia Celular a fim de me auxiliar no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Luis Antonio Esmerino, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, que possibilitou as análises da atividade antibacteriana no laboratório de Microbiologia Clínica bem como forneceu as cepas e auxiliou nas análises.

Ao professor Prof. Dr. André Mauricio Brinatti, do Departamento de Física da Universidade Estadual de Ponta Grossa por ter gentilmente cedido o laboratório de Física Aplicada a Solos e Ciências Ambientais para uma etapa de minha pesquisa.

Ao professor Dr. Paulo Vitor Farago pela disponibilidade de fornecer equipamentos e reagentes para o desenvolvimento de algumas análises, bem como seu otimismo.

À professora Dra. Jessica Mendes Nadal pelo incentivo e colaboração no desenvolvimento e avaliação das análises térmicas.

À Colega de pós-graduação e de trabalho Luciane Mendes Monteiro pelo auxílio com a triagem fitoquímica e atividade antioxidante.

À colega de pós-graduação Luiza Stolz Cruz pela disponibilidade em auxiliar em todas as etapas dos testes de viabilidade celular, seu otimismo, paciência e dedicação em todos os momentos foram imprescindíveis para que tudo funcionasse corretamente.

Às Colegas - amigas de pós-graduação Bárbara Justus, Daniele Priscila da Silva Fardin de Assunção, pela presença, suporte e amizade em todos os momentos.

Às colegas de pós-graduação Mackelly Simionatto pelo auxílio com equipamentos e reagentes no teste da atividade hemolítica e Marilú Swiech pelas trocas de experiência na pesquisa.

Aos colegas de pós-graduação Joel Toríbio Espinoza e Guilherme dos Anjos Camargo pelo auxílio na interpretação de algumas análises.

À Bruna de Lima Diniz por estar sempre disposta a auxiliar com seu conhecimento na formatação da tese.

À funcionária e amiga de laboratório Miriam Soares que nunca mediu esforços para me ajudar no desenvolvimento da pesquisa, até mesmo na árdua tarefa de abrir os frutos de *P. emarginatus*.

Ao técnico Maurício de Carvalho por ter auxiliado na etapa de preparação para as análises microbiológicas.

Aos técnicos do LABMU e LABMU-SEBISA, Ana, Raquel, Sílvio, Vanessa, Virgínia, Traudi e Janaína, pelo atendimento cordial e pelas análises realizadas.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas UNICENTRO-UEPG, pela oportunidade de crescimento técnico-científico.

Ao DEFAR pela liberação parcial de minhas atividades para poder realizar o doutorado.

À toda a equipe, professores e técnicos, da Farmácia Escola Prof. Horácio Droppa pelo incentivo e apoio em minha pesquisa.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste estudo.

Muito obrigada!

*Nada te perturbe, nada te espante.
Tudo passa, Deus permanece,
A paciência tudo alcança.
Quem tem Deus nada falta.
Só Deus basta!*

Santa Tereza D'Ávila

RESUMO

A síntese de nanopartículas metálicas por sistemas biológicos é conhecida como síntese verde ou biossíntese, sendo caracterizada pelo desenvolvimento de nanopartículas biocompatíveis e ambientalmente seguras. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar as atividades antioxidante, hemolítica, bactericida e citotóxica de nanopartículas de prata e de ouro, obtidas a partir do extrato aquoso das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae) associadas à gentamicina e ao ácido hialurônico. O extrato aquoso das sementes apresentou na triagem fitoquímica e na espectrometria de massas com ionização por *electrospray* a presença de taninos, flavonoides, heterosídeos cardiotônicos e foi eficiente na síntese verde das nanopartículas de prata (AgNPs-PE) e das nanopartículas de ouro (AuNPs-PE). As nanopartículas obtidas foram caracterizadas por métodos espectroscópicos e morfológicos como UV-Vis, determinação do diâmetro hidrodinâmico (DH), potencial zeta (PZ) e índice de polidispersão (IP), microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-EC), espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDE) e espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier (EITF). Todas as nanopartículas metálicas, de prata e de ouro, foram obtidas com sucesso e apresentaram formato esférico, tamanho médio, características uniformes e estabilidade no período de 30 dias. Tanto as AgNPs-PE quanto as AuNPs-PE e suas respectivas associações apresentaram atividade antioxidante comparadas com o padrão de ácido ascórbico, bem como não foram citotóxicas para os eritrócitos. Já a toxicidade frente a *Artemia salina* foi dose dependente para as AgNPs-PE e associações, apenas em altas concentrações, para as AuNPs-PE e associações não houve toxicidade mesmo em altas concentrações. Na avaliação da atividade antimicrobiana as AgNPs-PE e suas associações foram eficientes contra *E. faecalis*, *E. coli*, *E. coli* resistente à gentamicina, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans*; o extrato e as AuNPs-PE e associações não apresentaram atividade bactericida para os microrganismos testados. A viabilidade celular das AgNPs-PE e das AuNPs-PE e respectivas associações, e do extrato foi realizada com as linhagens de fibroblastos 3T3 e células A549 pelo método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). Nenhuma delas apresentou toxicidade para ambas as linhagens nas concentrações utilizadas na avaliação das atividades biológicas. Considerando os resultados, pode-se sugerir que as AgNPs-PE e as AuNPs-PE e suas associações com gentamicina e ácido hialurônico possuem potencial para aplicações farmacêuticas e biotecnológicas.

Palavras-chave: *Pterodon emarginatus* Vogel. Síntese verde. Nanopartículas metálicas. Atividades biológicas.

ABSTRACT

Metallic nanoparticles synthesis by biological systems is known as green synthesis or biosynthesis, being characterized by the development of biocompatible and environmentally safe nanoparticles. The objective of the present work was to develop, characterize and evaluate the antioxidant, hemolytic, bactericidal, and cytotoxic activities of silver and gold nanoparticles, obtained from aqueous extract of the seeds of *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae) associated with gentamicin and hyaluronic acid. Seeds aqueous extract showed in phytochemical screening and mass spectrometry with electrospray ionization the presence of tannins, flavonoids, cardiotonic heterosides. It also was efficient in the green synthesis of AgNPs-PE and AuNPs-PE. Obtained nanoparticles were characterized by spectroscopic and morphological methods such as UV-Visible, determination of the hydrodynamic diameter (HD), zeta potential (ZP) and polydispersity index (PDI), field-emission scanning electron microscopy (FEG-SEM), energy dispersion X-ray spectroscopy (EDS) and fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. All metal nanoparticles containing silver or gold were successfully obtained and presented spherical shape, average size and uniform characteristics, in addition to excellent stability within 30 days periods. Both AgNPs-PE and their associations and AuNPs-PE and their associations showed excellent antioxidant activity compared to the standard of ascorbic acid, and did not show erythrocyte cytotoxicity. Toxicity to *Artemia salina* was dose-dependent for AgNPs-PE and associations only at high concentrations, for AuNPs-PE and associations there was no toxicity even at high concentrations. In the evaluation of bactericidal activity, AgNPs-PE and their associations were effective against *E. faecalis*, *E. coli*, *E. coli* gentamicin resistant, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *C. albicans*; AuNPs-PE and associations did not show bactericidal activity. Cell viability of AgNPs-PE and associations, AuNPs-PE and associations, and the extract was carried out with the 3T3 fibroblast lines and A549 cells by the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide reduction method (MTT). None of them showed toxicity for both strains at the concentrations used as standard in the other biological activities tests. Based on this works' results, it can be suggested that AgNPs-PE and AuNPs-PE and their gentamicin and hyaluronic acid associations hold potential for pharmaceutical and biotechnological applications.

Keywords: *Pterodon emarginatus* Vogel. Green synthesis. Metallic nanoparticles. Biological activities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Árvore (A), folhas e flores (B) de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel (Fabaceae)	28
Figura 2 – Características do fruto de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel (Fabaceae)	29
Figura 3 – Aspectos macroscópicos dos frutos e frutos maduros do <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel (Fabaceae)	30
Figura 4 – Estrutura química dos esqueletos vouacapanos	32
Figura 5 – Esquema do mecanismo generalizado de 3 passos para a formação de nanopartículas metálicas por síntese verde	47
Figura 6 – Fragmento da estrutura molecular do Ácido Hialurônico (AH) mostrando os principais sítios para modificações químicas	48
Figura 7 – Diferença entre a parede celular de bactérias Gram-negativa e Gram-positiva	53
Figura 8 – Mecanismos de resistência bacteriana	54
Figura 9 – Estrutura molecular da gentamicina e de seus componentes	59
Figura 10 – Fluxograma das etapas experimentais do estudo	63
Figura 11 – EM-IE no modo de íon positivo para o EAPE de 200 m/z a 300 m/z e compostos sugeridos	83
Figura 12 – EM-IE no modo de íon positivo para o EAPE de 800 m/z a 900 m/z e compostos sugeridos	83
Figura 13 – Espectros UV-Vis de AgNPs-PE BM 60-70 °C e de AgNPs-PE A + BM 60-70 °C com leituras a cada 10 minutos até completa redução	87
Figura 14 – Comparativo entre as absorbâncias (B) e a coloração das AgNPs-PE BM (A) e das AgNPs-PE A + BM (C)	87
Figura 15 – Comparativo entre as absorbâncias das AgNPs-PE BM, das AgNPs-PE A+BM, das AgNPs-PEG BM e das AgNPs-PEG A+BM associadas com sulfato de gentamicina	89
Figura 16 – Espectro UV-Vis do sulfato de gentamicina 1%	90

Figura 17 – Espectros UV-Vis de AgNPs-PE associadas com AH em duas concentrações diferentes, sendo AH1= 0,01 mmol/L e AH2= 0,001 mmol/L e AgNPs-PEG-AH2= sulfato de gentamicina 1% associado ao AH2	91
Figura 18 – Espectros UV-Vis AuNPs-PE (B), após 40 minutos de reação, com leituras a cada 10 minutos (A).....	92
Figura 19 – Espectros UV-Vis das AuNPs-PE associadas ao sulfato de gentamicina (AuNPs-PEG).....	94
Figura 20 – Espectros UV-Vis das AuNPs-PEG e associadas aos AH2 (AuNPs-PEG-AH2)	95
Figura 21 – Fotomicrografias das AgNPs-PE BM (A) e das AgNPs-PE A+BM (B)	100
Figura 22 – Fotomicrografias das AgNPs-PEG BM (A) e AgNPs-PEG A+BM (B) ..	100
Figura 23 – Fotomicrografias das AgNPs-PE-AH1 (A); AgNPs-PE-AH2 (B); AgNPs-PEG-AH2 (C).....	101
Figura 24 – Fotomicrografias das AuNPs-PE sintetizadas a partir do extrato aquoso de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel (A, B e C)	101
Figura 25 – Fotomicrografias das AuNPs-PEG associadas ao sulfato de gentamicina (A e B)	102
Figura 26 – Fotomicrografias das AuNPs-PEG associadas ao AH2 (AuNPs-PEG-AH2 – A, B e C).....	102
Figura 27 – Espectroscopia por dispersão de energia de raios X das AgNPs-PE com histograma e quantificação da prata.....	103
Figura 28 – Espectroscopia por dispersão de energia de raios X das AuNPs-PE com histograma e quantificação do ouro.....	104
Figura 29 – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (EITF) do ácido hialurônico (AH)	105
Figura 30 - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (EITF) do sulfato de gentamicina.....	106

Figura 31 - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (EITF) do extrato de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel 2,5 %.....	107
Figura 32 - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (EITF) do nitrato de prata (AgNO_3) 1 mmol/L.....	107
Figura 33 - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (EITF) das AgNPs-PE, AgNPs-PEG, AgNPsPEG-AH2 e AgNO_3	108
Figura 34 - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (EITF) das AuNPs-PE, AuNPs-PEG, AuNPs-PEG-AH2 e HAuCl_4	108
Figura 35 – Curvas de ATG de (A) EAPE, AgNPs-PE, AgNPs-PEG, AgNPs-PEG-AH2, AH, sulfato de gentamicina e de ATG de (B) EAPE, AuNPs-PE, AuNPs-PEG, AuNPS-PEG-AH2, AH e sulfato de gentamicina	113
Figura 36 – Termogramas obtidos por CED de (A) EAPE, AgNPs-PE, AgNPs-PEG, AgNPs-PEG-AH2, AH, sulfato de gentamicina e de (B) EAPE, AuNPs-PE, AuNPs-PEG, AuNPS-PEG-AH2, AH e sulfato de gentamicina (B).....	114
Figura 37 – Espectros UV-Vis do estudo da estabilidade das AgNPs-PE (A), das AgNPs-PEG (B) e das AgNPs-PEG-AH2 (C)	115
Figura 38 – Espectro UV-Vis do estudo da estabilidade das AuNPs-PE (A), das AuNPs-PEG (B) e das AuNPs-PEG-AH2 (C).....	117
Figura 39 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo da atividade bactericida das AgNPs-PE contra <i>E. coli</i>	132
Figura 40 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo, em diferentes aumentos, da atividade bactericida das AgNPs-PE contra <i>P. aeruginosa</i>	132
Figura 41 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo, em diferentes aumentos, da atividade bactericida das AgNPs-PE contra <i>S. aureus</i>	132
Figura 42 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo da atividade bactericida das AgNPs-PE contra <i>E. faecalis</i>	133

Figura 43 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo, em diferentes aumentos, da atividade fungicida das AgNPs-PE contra <i>C. albicans</i>	133
Figura 44 – Viabilidade celular das linhagens 3T3 e A549 após tratamento de 24 horas com AgNPs-PE, AgNPs-PEG e AgNPs-PEG-AH2.....	138
Figura 45 - Viabilidade celular das linhagens 3T3 e A549 após tratamento de 24 horas com AuNPs-PE, AuNPs-PEG e AuNPs-PEG-AH2.....	139
Figura 46 – Viabilidade celular das linhagens 3T3 e A549 após tratamento de 24 horas com extrato aquoso das sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel.....	140

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identificação de grupos de substâncias do metabolismo secundário presentes no extrato aquoso a 2,5 % de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel..	79
Tabela 2 – Alguns compostos encontrados na análise qualitativa por EM-IE no modo de ionização positiva no extrato aquoso de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel.....	84
Tabela 3 – Valores médios do Diâmetro hidrodinâmico (DH), Potencial Zeta (PZ), índice de polidispersão (IP), diâmetro pelo MEV-EC e comprimento de onda pelo UV-Vis das AgNPs-PE BM e AgNPs-PE A+BM; AgNPs-PEG BM e AgNPs-PEG A+BM; AgNPs-PE-AH1, AgNPs-PE-AH2.....	95
Tabela 4 – Valores médios do Diâmetro hidrodinâmico (DH), Potencial Zeta (PZ), índice de polidispersão (IP), diâmetro pelo MEV-EC e comprimento de onda pelo UV-Vis das AuNPs-PE, AuNPs-PEG e AuNPs-PEG+AH2.....	96
Tabela 5 – Atividade antioxidante (AAO %) e concentração inibitória (CI ₅₀) das AgNPsPE, AgNPs-PEG, AgNPs-PEG-AH2 e do Ácido Ascórbico	119
Tabela 6 – Atividade antioxidante (AAO %) e concentração inibitória (CI ₅₀) das AuNPsPE, AuNPs-PEG, AuNPs-PEG-AH2 e do Ácido Ascórbico	120
Tabela 7 – Porcentagem de hemólise das AgNPs-PE, AgNPs-PEG, AgNPs-PEG-AH2	125
Tabela 8 – Porcentagem de hemólise das AuNPs-PE, AuNPs-PEG, AuNPs-PEG-AH2	126
Tabela 9 – Toxicidade das AgNPs-PE, AgNPs-PEG, AgNPs-PEG-AH2 e AgNO ₃ frente à <i>A. salina</i>	128
Tabela 10 – Toxicidade das AuNPs-PE, AuNPs-PEG, AuNPs-PEG-AH2 e HAuCl ₄ frente à <i>A. salina</i>	130
Tabela 11 – Atividade bactericida do EAPE, das AgNPs-PE, das AgNPs-PEG, das AgNPs-PEG-AH2, do sulfato de gentamicina 1 % e do AgNO ₃ 1 mmol/L contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e levedura.....	131

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Cálculo da porcentagem de atividade antioxidante (% AAO)	72
Equação 2 – Cálculo da porcentagem de hemólise dos eritrócitos	73
Equação 3 – Cálculo da porcentagem de mortalidade dos náuplios de <i>Artemia salina</i>	74
Equação 4 – Cálculo da porcentagem de viabilidade celular pelo método de redução do MTT	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Agitação
Ag	Prata
AgNO ₃	Nitrato de prata
AgNPs	Nanopartículas de prata
AgNPs-PEG	Nanopartículas de prata associadas com sulfato de gentamicina
AgNPsPEG-AH2	Nanopartículas de prata associadas com sulfato de gentamicina e ácido hialurônico
AgNPs-PE	Nanopartículas de prata associadas com Extrato de <i>Pterodon emarginatus</i>
AH	Ácido hialurônico
AMG	Aminoglicosídeo
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Au	Ouro
AuHCl ₄	Ácido cloroáurico
AuNPs	Nanopartículas de ouro
AuNPs-PEG	Nanopartículas de ouro associadas com sulfato de gentamicina
AuNPs-PEG-AH2	Nanopartículas de prata associadas com sulfato de gentamicina e ácido hialurônico
AuNPs-PE	Nanopartículas de prata associadas com Extrato de <i>Pterodon emarginatus</i>
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
BM	Banho maria
CO ₂	Dióxido de carbono
DH	Diâmetro hidrodinâmico
DMEM	Dulbecco's modified eagle médium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EAPE	Extrato aquoso de <i>Pterodon emarginatus</i>
EDE	Espectroscopia de raios X por dispersão de energia
EM-IE	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESBL	<i>Extended-spectrum β-lactamase-producing</i>
MEV-EC	Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo
EITF	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
HCl	Ácido clorídrico
KBr	Brometo de potássio
LPS	Lipopolissacarídeo
LPSs	Lipopolissacarídeos
Mg	Miligrama

mL	Mililitro
MTT	(3- Brometo de (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
NAG	N-acetilglicosamina
NAM	Ácido N-acetilmurâmico
NaOH	Hidróxido de sódio
NCCLS	<i>National committee for clinical laboratory standards</i>
Nm	Nanômetro
NP	Nanopartícula
NPMs	Nanopartículas metálicas
NPs	Nanopartículas
PAA	Poli (ácido acrílico)
PBP	<i>Penicillin binding protein</i>
IP	Índice de polidispersão
pH	Potencial hidrogeniônico
PLP	Proteína de ligação da penicilina
PSs	Polissacarídeos
PVAL	Poli (álcool vinílico)
PVP	Poli (vinilpirrolidona)
PZ	Potencial zeta
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
SF	Sulfato de gentamicina
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
TA	Temperatura ambiente
TTC	2,3,5 cloreto de trifeniltetrazólio
UV-Vis	Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	REVISÃO DA LITERATURA	26
3.1	PLANTAS MEDICINAIS	26
3.1.1	<i>Pterodon emarginatus</i> Vogel.....	27
3.2	NANOPARTÍCULAS	32
3.3	SÍNTESE VERDE.....	41
3.4	ÁCIDO HIALURÔNICO (AH).....	48
3.5	BACTÉRIAS E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....	51
3.6	AMINOGLICOSÍDEOS.....	57
4	MATERIAL E MÉTODOS	60
4.1	EQUIPAMENTOS	60
4.2	REAGENTES E SOLVENTES	61
4.3	MATERIAIS.....	62
4.4	DESENHO EXPERIMENTAL	63
4.5	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	64
4.5.1	Material Vegetal	64
4.5.2	Obtenção do Extrato Aquoso de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel	64
4.5.3	Triagem Fitoquímica.....	64

4.5.3.1	Alcalóides	65
4.5.3.2	Flavonóides	65
4.5.3.3	Heterosídeos cardiotônicos	66
4.5.3.4	Saponinas.....	67
4.5.3.5	Taninos.....	67
4.5.4	Análise Qualitativa do EAPE por Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray (EM-IE).....	67
4.5.5	Síntese das AgNPs por Meio do Extrato Aquoso de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel (AgNPs-PE).....	68
4.5.6	Síntese das AuNPs por Meio do Extrato Aquoso de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel (AuNPs-PE).....	68
4.5.7	Associação das AgNPs-PE e AuNPs-PE com Sulfato de Gentamicina a 1 % (AgNPs-PEG e AuNPs-PEG)	68
4.5.8	Associação das AgNPs-PEG e AuNPs-PEG com AH (AgNPs-PEG-AH e AuNPs-PEG-AH)	69
4.5.9	Caracterização das Nanopartículas	69
4.5.9.1	Espectroscopia na região do ultravioleta visível (UV-Vis).....	69
4.5.9.2	Determinação do diâmetro hidrodinâmico (DH), potencial zeta (PZ) e índice de polidispersão (IP)	69
4.5.9.3	Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-EC)	69
4.5.9.4	Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDE).....	70
4.5.9.5	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (EITF)	70
4.5.9.6	Análise termogravimétrica (ATG)	70
4.5.9.7	Calorimetria exploratória diferencial (CED)	71
4.5.10	Estudo da estabilidade das nanopartículas	71
4.5.11	Avaliação da atividade antioxidante pelo método de redução do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)	71
4.5.12	Determinação da Atividade Hemolítica	72

4.5.13	Ensaio de Toxicidade com Náuplios de <i>Artemia salina</i>	72
4.5.14	Avaliação da Atividade Antimicrobiana pelo Método da Microdiluição em Caldo.....	74
4.5.15	Análise da Viabilidade Celular.....	75
4.5.15.1	Linhagens celulares.....	75
4.5.15.1.1	Fibroblastos 3T3.....	75
4.5.15.1.2	Células A549.....	76
4.5.15.2	Cultura celular	76
4.5.14.3	Ensaio de viabilidade celular por meio da redução do MTT	76
4.5.16	Análises Estatísticas	78
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
5.1	TRIAGEM FITOQUÍMICA	79
5.2	ANÁLISE QUALITATIVA DO EAPE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR ELECTROSPRAY (EM-IE)	82
5.3	SÍNTESE DAS AgNPs POR MEIO DO EXTRATO AQUOSO DE <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel (AgNPs-PE).....	87
5.3.1	Associação das AgNPs-PE com Sulfato de Gentamicina (AgNPs-PEG)	89
5.3.2	Associação das AgNPs-PEG com AH (AgNPs-PEG-AH2)	90
5.4	SÍNTESE DAS AuNPs POR MEIO DO EXTRATO AQUOSO DE <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel (AuNPs-PE)	90
5.4.1	Associação das AuNPs-PE com Sulfato de Gentamicina (AuNPs-PEG)	93
5.4.2	Associação das AuNPs-PEG com AH2 (AuNPs-PEG-AH2)	94
5.5	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	95
5.5.1	Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico (DH), Potencial Zeta (PZ) e Índice de Polidispersão (IP).....	95
5.5.2	Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-EC) das AgNPs-PE e AuNPs-PE por Meio do Extrato Aquoso de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel	98

5.5.3	Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDE)	102
5.5.4	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (EITF)	104
5.5.5	Análise Termogravimétrica (ATG)	113
5.5.6	Calorimetria Exploratória Diferencial (CED)	114
5.6	ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS.....	115
5.6.1	Estudo da Estabilidade das AgNPs-PE e suas Associações	115
5.6.2	Estudo da Estabilidade das AuNPs-PE e suas Associações	117
5.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH (2,2-DIFENIL-1-PICRIL- HIDRAZILA).	118
5.8	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	125
5.9	ENSAIO DE TOXICIDADE COM NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i>	128
5.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DA MICRODILUIÇÃO EM CALDO.....	130
5.11	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR MEIO DA REDUÇÃO DO MTT	137
6	CONCLUSÃO	146
	REFERÊNCIAS.....	149

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido usadas há séculos na história da humanidade e têm grande importância na medicina popular de muitos países, especialmente nos países em desenvolvimento, onde se reporta que até 80% das pessoas dependem da medicina popular como fonte de tratamento primário nos cuidados de saúde (MENDES *et al.*, 2017).

Os produtos naturais há muito demonstram seu importante papel como uma rica fonte de novos alvos para a descoberta de medicamentos. A enorme diversidade de compostos naturais gerou aplicações promissoras nos campos da medicina, farmácia e biologia. Entre os desafios encontrados no resultado do produto está a padronização de insumos vegetais para a indústria farmacêutica. (LLORET *et al.*, 2016).

E, quando se procura obter substâncias ativas de plantas, um dos principais aspectos a serem observados consiste nas informações da medicina popular; onde é muito mais provável encontrar atividade biológica do que em plantas escolhidas ao acaso (YUNES; CALIXTO, 2001).

A árvore conhecida como sucupira, com nome científico *Pterodon emarginatus* Vogel é nativa do Cerrado do Brasil Central. Todas as suas partes são utilizadas na medicina popular, desde a raiz até as folhas, sob a forma de infusão e decocção, tendo como principais usos: tratamento do diabetes, do reumatismo e como anti-inflamatório (FERREIRA; DANTAS; CATÃO, 2014; LORENZI; MATOS, 2008; MENDES *et al.*, 2017).

Diante das informações populares, crescentes estudos têm demonstrado diferentes atividades farmacológicas para a espécie *P. emarginatus*, as quais podemos citar: cicatrizante, antimicrobiana, leishmanicida, antiulcerogênica, anti-inflamatória e analgésica (DUTRA, 2008).

Análises fitoquímicas demonstraram várias substâncias com propriedades farmacológicas no gênero como alcaloides, terpenoides, isoflavonas, sesquiterpenos, esteroides, flavonóides, taninos, flavonas, xantonas e compostos fenólicos (OLIVEIRA, 2016).

A síntese de nanopartículas metálicas mediada por extratos de plantas, denominada de síntese verde, tem sido cada vez mais estudada. Ela acontece devido à presença nos extratos de biomoléculas como proteínas, aminoácidos, vitaminas,

polissacarídeos, polifenóis, terpenos, ácidos orgânicos entre outros compostos. Essas biomoléculas não apenas desempenham um papel na redução dos íons para tamanhos nanométricos, como também desempenham papel importante na estabilização de nanopartículas (GAVADE *et al.*, 2015).

Esse método de síntese geralmente envolve processo de uma etapa com produtos biocompatíveis e não tóxicos, baixas concentrações de íons metálicos, condições reativas leves e o uso de compostos solúveis em água. Portanto, todos esses fatores reduzem o risco de toxicidade para vários organismos vivos e o meio ambiente e, também incentiva a utilização dos recursos naturais (OLIVEIRA *et al.*, 2019; SENA *et al.*, 2019).

A aplicação de polissacarídeos e fitoquímicos na síntese verde de nanopartículas de ouro e prata é muito útil para fornecer biocompostos com novos usos em nanomedicina (PARK *et al.*, 2011).

O ácido hialurônico que é um polissacarídeo aniônico linear biocompatível, pode desempenhar papel importante tanto na redução quanto na estabilização de nanopartículas metálicas, por possuir grupos hidroxila, um final redutor de hemiacetal e outras funcionalidades sendo altamente eficiente na entrega direcionada de fármacos (KOGAN *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2015).

O uso inadequado qualitativo e/ou quantitativo dos antimicrobianos, como foi o caso do sulfato de gentamicina, associado a um investimento insuficiente em tecnologia e investigações microbiológicas, conduziu a um declínio constante e limítrofe na eficácia das terapias atuais e a uma escassez de novas classes estruturais, as quais devem ser substituídas ou terem um agente complementar em sua utilização (O'CONNELL *et al.*, 2013).

Com essa finalidade as nanopartículas metálicas, como as de prata e ouro, desenvolvidas por síntese verde associadas a antibióticos e outras substâncias têm sido cada vez mais empregadas como um dos principais sistemas de liberação de fármacos para alvos específicos (ABOUBAKAR *et al.*, 2000). Tendo como função aumentar o potencial terapêutico do fármaco, impedindo que esse se degrade ou se inative no trajeto ao local específico, além de evitar simultaneamente a ocorrência de efeitos secundários nocivos em outra parte do organismo (SANTOS; CASTANHO, 2002).

O desenvolvimento atual de novos antimicrobianos representa um investimento desinteressante para as grandes indústrias farmacêuticas, tendo como

principal matriz a "auto-obsolescência" dos mesmos; pois se um antimicrobiano é eficaz e rapidamente cura uma infecção, obviamente descontinua-se o protocolo terapêutico e assim a necessidade em consumir o produto, sem contar a rápida resistência dos microrganismos. (FISCHBACH; WALSH, 2009; PROJAN; SHLAES; 2004; SPELLBERG *et al.*, 2004).

Por estas razões, pode ser que os avanços na investigação de novos fármacos derivarão nesse momento dos estudos acadêmicos quer em pequenos ou médios laboratórios de biotecnologia (O'CONNELL *et al.*, 2013).

Considerando o exposto, este trabalho visa a obtenção e a caracterização de nanopartículas de prata e de ouro, pelo método de síntese verde a partir do extrato aquoso das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel, associadas ao sulfato de gentamicina e ao ácido hialurônico e sua posterior avaliação de suas atividades biológicas como atividade antimicrobiana, antioxidante, hemolítica, toxicidade e viabilidade celular.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar nanopartículas de prata e nanopartículas de ouro obtidas pelo método de síntese verde a partir do extrato aquoso das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel associadas ao sulfato de gentamicina e ao ácido hialurônico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter o extrato aquoso das sementes de *P. emarginatus* - EAPE;
- b) Realizar a triagem fitoquímica;
- c) Caracterizar os compostos fitoquímicos presentes no EAPE por EM-IE;
- d) Realizar a síntese das AgNPs-PE e das AuNPs-PE pelo extrato aquoso das sementes de *P. emarginatus*;
- e) Realizar caracterizações físico-químicas e morfológicas das AgNPs-PE e das AuNPs-PE;
- f) Realizar associação das AgNPs-PE e das AuNPs-PE com gentamicina e AH;
- g) Verificar as características físico-químicas e morfológicas das associações de AgNPs-PE e AuNPs-PE com gentamicina e AH;
- h) Avaliar a atividade antioxidante das AgNPs-PE e associações e das AuNPs-PE e associações;
- i) Determinar a atividade hemolítica das AgNPs-PE e associações e das AuNPs-PE e associações;
- j) Realizar ensaio de toxicidade com náuplios de *Artemia salina* com as AgNPs-PE e associações e das AuNPs-PE e associações;
- k) Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* das AgNPs-PE e AuNPs-PE com e sem associações;
- l) Avaliar a citotoxicidade *in vitro* das AgNPs-PE e AuNPs-PE com e sem associações frente às linhagens celulares de fibroblastos de camundongos 3T3 e células A549.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas para o tratamento de doenças foi documentado em todas as sociedades humanas, sendo parte da cultura de cada povo, caracterizando a etnomedicina. Inúmeras pesquisas têm demonstrado a eficiência e confiabilidade de preparações à base de plantas medicinais (SIMÕES; ALMEIDA, 2015); elas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (SIMÕES *et al.*, 2004); sendo consideradas terapias alternativas por programas oficiais de saúde, pela classe médica e pela população de baixa renda, a qual recorre às plantas medicinais para o tratamento de seus males e enfermidades (DUTRA, 2008; KHARAT; MENDHULKAR, 2016; SIMÕES; ALMEIDA, 2015).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80 % da população mundial recorre ao tratamento com plantas medicinais para atender suas necessidades primárias de assistência médica. Entre os 252 fármacos essenciais selecionados pela OMS, 11 % são de origem exclusivamente vegetal e uma parcela significativa é preenchida por medicamentos semissintéticos, obtidos a partir de precursores naturais. Inegavelmente, as plantas medicinais e os fitoterápicos apresentam um papel importante na terapêutica: cerca de 25 % dos medicamentos prescritos mundialmente são de origem vegetal (KIATKOSKI, 2011).

Ao se considerar a perspectiva de obtenção de novos fármacos, através de plantas medicinais, dois aspectos distinguem os produtos de origem natural dos sintéticos: a diversidade molecular e a função biológica. A diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese, que, apesar dos avanços consideráveis, ainda é limitada. Além disso, como produtos de organismos que possuem muitas similaridades com os metabolismos dos mamíferos, os produtos naturais muitas vezes exibem propriedades adicionais às antimicrobianas a elas associadas (SIMÕES *et al.*, 2004).

As fontes de metabólitos secundários, em uma planta, parecem ser inesgotáveis em relação às possibilidades de se encontrar novas e diferentes estruturas com atividades de extrema importância à química medicinal e à agricultura, dentre elas, a atividade antimicrobiana e anti-inflamatória (YUNES; CALIXTO, 2001).

Espera-se que programas de triagem possam descobrir compostos candidatos para o desenvolvimento de novos fármacos, a fim de fornecer alternativas para o combate de microrganismos resistentes aos fármacos disponíveis atualmente (FERREIRA; DANTAS; CATÃO, 2014).

A rica biodiversidade, ampla distribuição, e fácil disponibilidade das plantas têm sido altamente exploradas para a síntese de nanomateriais. O extrato bruto das plantas contém metabólitos secundários tais como ácido fenólico, flavonoides, alcaloides e terpenoides sendo que esses compostos são os principais responsáveis pela redução na formação de nanopartículas iônicas em metálicas. Estes metabólitos primários e secundários estão constantemente envolvidos na reação redox para sintetizar partículas nanométricas ecologicamente corretas (GHRAMH; KHAN; IBRAHIM, 2019; KUPPUSAMY *et al.*, 2016; TEIMURI-MOFRAD *et al.*, 2017)

As plantas são naturalmente agraciadas com vários fitoquímicos que podem ser úteis para a síntese de nanopartículas e reações químicas, esforços para investigar as diferentes propriedades biológicas devem ser conduzidos para aplicações na indústria farmacêutica (GHRAMH; KHAN; IBRAHIM, 2019).

O Brasil possui uma diversificada flora, rica em compostos bioativos de origem vegetal (OLIVEIRA, 2016), conta com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 sendo de suma importância que se busque nestas plantas uma fonte alternativa de medicamentos, visando no futuro à obtenção de novos fármacos mais eficazes e específicos (KIATKOSKI, 2011).

O Cerrado Brasileiro (savana) compreende centenas de espécies de plantas que apresentam potencial de uso e viabilidade para exploração econômica e terapêutica. Várias dessas espécies são usadas pela população para tratar várias doenças que afetam humanos e animais (VERDE *et al.*, 2018).

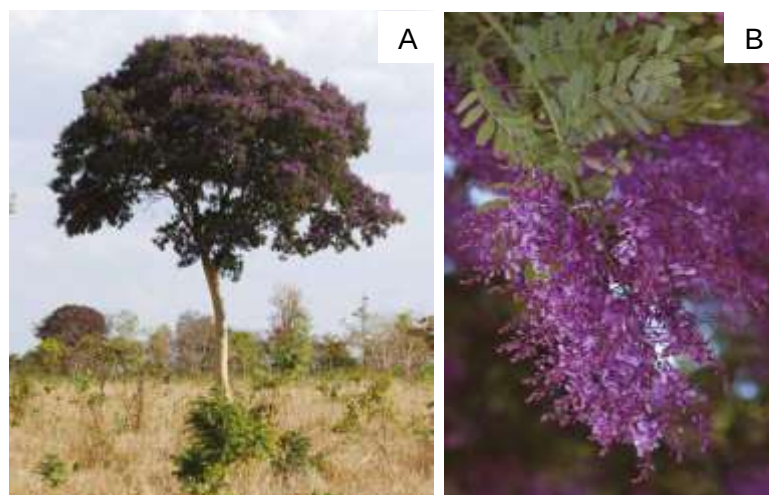
3.1.1 *Pterodon emarginatus* Vogel

O gênero *Pterodon* Vogel (1837) pertence à família Fabaceae Lindl., uma das mais representativas das Angiospermas, possui seis espécies descritas até o presente, sendo elas *P. apparicioi* Pedersoli, *P. macrophyllus* Klotzsch, *P. abruptus* (Moric.) Benth, *P. pubescens* (Benth.) Benth, *P. polygalaeiflorus* (Benth.) Benth. e *P. emarginatus* Vogel. No entanto, esse número não é consenso e varia de acordo com a fonte consultada. Grande parte dessa variação no número de espécies aceitas

para o gênero é devida à incerteza na delimitação das espécies *P. emarginatus*, *P. pubescens* e *P. polygalaeflorus*. Lorenzi (2014) considerou essas duas morfos como variação dentro de uma espécie, *P. emarginatus*. Essa incerteza é gerada pela ocorrência de indivíduos apresentando folhas pubescentes com 6-19 folíolos e flores variando do róseo claro a róseo escuro, bem como indivíduos com folhas glabras com 4 a 10 folíolos e flores roxas de acordo com Figura 1 (OLIVEIRA, 2016; PINTO, 2017).

Rocha (2006) concluiu que as duas morfos de *P. emarginatus* sensu Lewis são duas espécies distintas. As comparações entre o material de herbário e de campo, com os fototipos, mostraram que a morfo rósea corresponde à espécie *P. pubescens* (Benth.) Benth. e que *P. polygalaeflorus* (Benth.) Benth. e *P. emarginatus* Vogel são a mesma espécie, correspondendo à morfo roxa, Figura 1. Neste caso, considerando-se a prioridade de publicação, o nome válido para a espécie é *P. emarginatus* sendo *P. polygalaeflorus* (Benth.) Benth. um sinônimo desta. Essas duas espécies podem ser distinguidas pelas seguintes características morfológicas: *P. emarginatus*, possui folhas com 4 a 10 folíolos (geralmente 6 a 8), glabros, ovados, folíolos com ápice de truncado a fortemente emarginado; ráquis glabra ou glabrescente, flores roxas e os botões apresentam forma obovada, ápice bem arredondado e mais largo que a base. O *P. pubescens*, possui folhas com 6 a 19 folíolos (geralmente 11 a 13), pubescentes em ambas as faces, elípticos a levemente ovados, folíolos com ápice de levemente retuso a arredondado; ráquis denso pubescente, flores variando de róseo claro, quase branco, a róseo escuro, botões com forma alongada, o ápice e base apresentando a mesma largura.

Figura 1 – Árvore (A), folhas e flores (B) de *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae)



Fonte: FONTES; CAMILLO e CORADIN (2018)

A *P. emarginatus* popularmente conhecida como “sucupira branca”, “faveira”, “faveiro”, “fava-de-Santo-Inácio”, “fava-de-sucupira”, “sucupira”, “sucupira-lisa”, pertencente à família Fabaceae e a subfamília Faboideae, é uma árvore de porte médio podendo chegar à 15 metros, nativa das áreas de cerrado do Brasil Central estando distribuída geograficamente nas regiões Norte (Rondônia e Tocantins), Nordeste (Bahia, Ceará, Maranhão, Piauí), Centro-Oeste (Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) e Sudeste (Minas Gerais e São Paulo). De acordo com a medicina popular apresenta propriedades anti-inflamatórias, antirreumáticas e analgésicas (DUTRA, 2008; LORENZI; MATOS, 2008; MIRANDA *et al.*, 2014; PINTO, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2019) e, é catalogada como espécie medicinal nativa da região Centro-Oeste (FONTES; CAMILLO; CORADIN, 2018).

O nome *Pterodon emarginatus* vem do grego-latino e significa “sementes com asas que circundam sua periferia”. Os frutos da espécie são sâmaras (pterocarpos) indeiscentes e aladas que caem espontaneamente e se dispersam por longas distâncias devido ao seu formato circular que permite um voo estável com ventos unidirecionais como representado na Figura 2 (MASCARO; TEIXEIRA; GILBERT, 2004).

Figura 2 – Características do fruto de *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae)

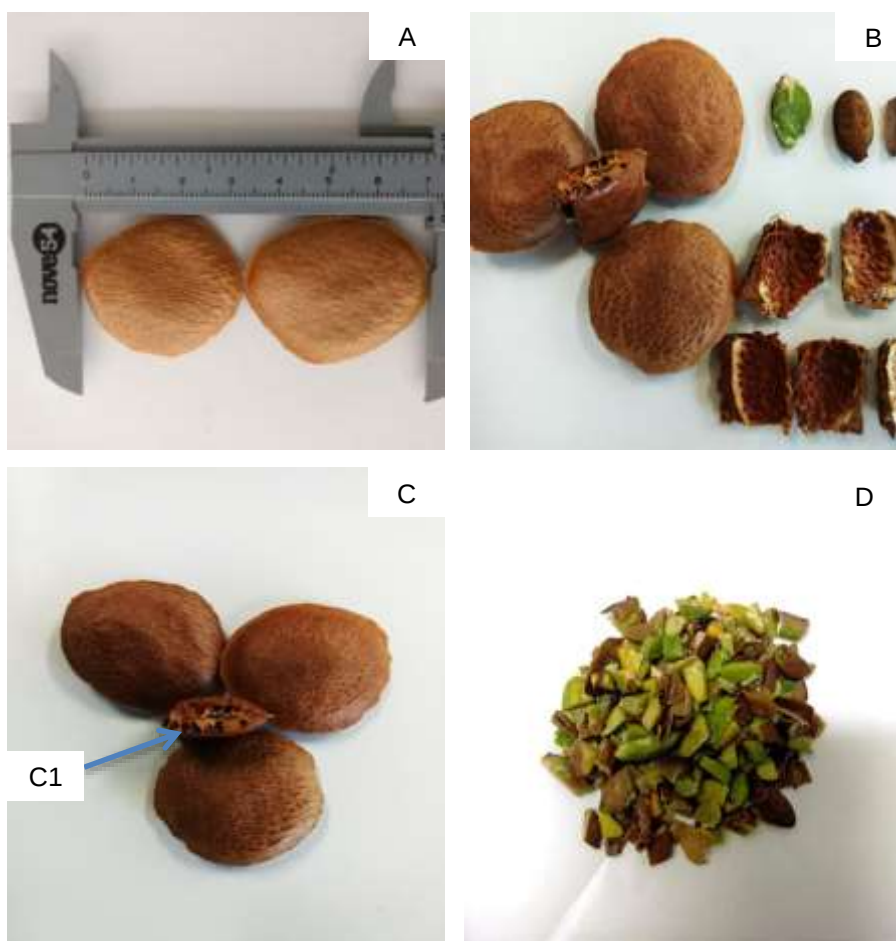


Fonte: Marcivan Barreto, coletor dos frutos (2017)

Nota: A: fruto verde; B: fruto maduro pronto para ser levado pelo vento; C: como o fruto cai e D: coletor retirando a casca.

Cada fruto possui uma, ou mais raramente, duas sementes imaturas, onde se observa o acúmulo de compostos fenólicos em pequenos vacúolos na exotesta das células. A elevada quantidade desses compostos fenólicos confere às sementes, alta dureza, baixa permeabilidade a água e proteção ao ataque de patógenos. Os frutos alcançam suas dimensões finais com cerca de 4 a 5 cm, onde se observam embriões com cotilédones carnosos, ricos em lipídios e proteínas acumuladas e grãos de amido raros (HANSEN; HARAGUCHI; ALONSO, 2010; LORENZI, 2014; OLIVEIRA; PAIVA, 2005;). As sementes são fortemente protegidas dentro de uma cápsula fibro-lenhosa e envolvidas externamente por uma substância oleosa amarga numa estrutura esponjosa como favos de mel. A planta multiplica-se apenas por frutos, Figura 3 (LORENZI, 2014; LORENZI; MATOS, 2008).

Figura 3 – Aspectos macroscópicos dos frutos e frutos maduros do *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae)



Fonte: A autora.

Nota: A: medida dos frutos; B: frutos parte externa, interna e sementes; C: frutos; C1: estrutura alveolar cheia de óleo; D: sementes trituradas.

Todas as partes da planta de *P. emarginatus* são utilizadas na medicina popular, desde a raiz até as folhas, sob a forma de infusão e decocção, tendo como principais usos: no tratamento do diabetes e reumatismo, como anti-inflamatório e como anti-infecciosa. (BUSTAMANTE *et al.*, 2010; FERREIRA; DANTAS; CATÃO, 2014).

Estudos etnobotânicos mostram que as preparações dos frutos da espécie vegetal *P. emarginatus* têm demonstrado eficácia significativa quanto ao seu uso em medicina popular. Eles são usados pela população em macerações hidroalcoólicas para o tratamento de afecções da laringe, disfunção respiratória, como estimulante do apetite e fortificante, principalmente em crianças. Além disso, são bastante utilizados para o tratamento de reumatismo, em osteopatias, como anti-inflamatório, e até mesmo para fins depurativos. Os frutos são usados para o tratamento de dores musculares, entorses, artrite e artrose, apresentando ação anti-inflamatória e analgésica (DUTRA *et al.*, 2009; MASCARO; TEIXEIRA; GILBERT, 2004; SANTOS *et al.*, 2010).

As diversas atividades biológicas verificadas podem ser atribuídas à variedade de substâncias identificadas no gênero. Análises fitoquímicas demonstraram a presença de alcaloides e terpenoides na casca, isoflavonas e terpenoides na madeira do tronco, isoflavonas e terpenoides no alburno e cerne, sesquiterpenos, esteroides, flavonoides, taninos catequínicos, flavonas e xantonas nas folhas. Na oleoresina obtida a partir de frutos, também foi relatada uma grande variedade de substâncias como terpenoides do tipo furanoditerpenos, sesquiterpenos, diterpenos de esqueleto vouacapânico, constituintes fenólicos e flavonoides (OLIVEIRA, 2016).

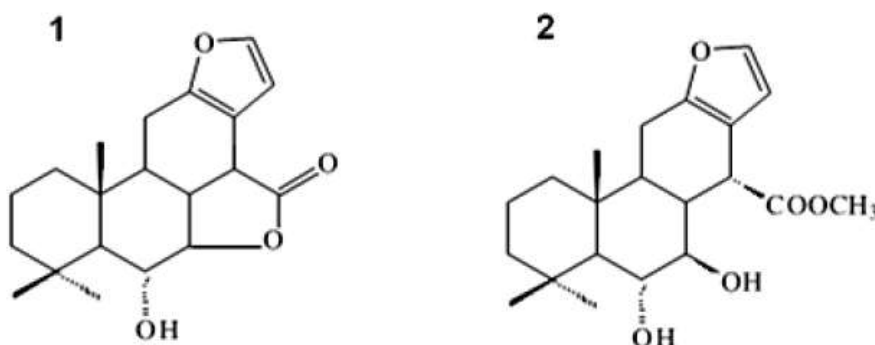
Santos *et al.* (2010) avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos da casca de *P. emarginatus* contra bactérias patogênicas e detectaram na avaliação farmacognóstica a presença de flavonoides, heterosídeos saponínicos, resinas, traços de esteróides e triterpenóides.

Conforme Santos *et al.* (2018) muitos estudos levaram ao isolamento de substâncias dos frutos de *P. emarginatus*. Todo o conteúdo isolado foi caracterizado como pertencente à classe dos terpenos, com uma grande variedade de derivados de diterpenos dos esqueletos de vouacapano, como o ácido 6 α , 7 β -dihidroxi-vouacapan-17 β -oico. A partir do conhecimento de algumas atividades deste composto, houve interesse na síntese de alguns derivados, o 21 α -Fluoro-7-norvouacapan-17 β , 21 α -lactona sendo obtida para aplicação como anti-inflamatório. Também foram isolados

do extrato etanólico dos frutos de *P. polygalaeflorus* os diterpenos ácido 6 α , 7 β -dihidroxivouacapan-17 β -óico, 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -oato de metila e o novo 6 α -hidroxi-7 β -acetoxivouacapo-14 (17)-eno.

Grando *et al.* (2017) identificaram no extrato aquoso de *P. pubescens*, 11,7 % de éster metílico de 6 α , 7 β di-hidroxivouacapan-17 β -oate; 7,0 % de éster metílico de 6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-vouacapan-17 β -oato; 9,6 % de éster metílico de 6 α , 7 β -di-hidroxivouacapan-17 β -oato e no extrato de diclorometano além destes composto citados encontraram geranilgeraniol. Os diterpenos 6 α -hidroxivouacapan-7 β -17 β -lactona e 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17 β -oato metil éster como mostra a Figura 4, estão presentes em sementes de *P. emarginatus* e *P. polygalaeflorus*, respectivamente, os quais foram previamente descritos como substâncias associadas às atividades anti-inflamatórias destas espécies (KIATKOSKI, 2011).

Figura 4 – Estrutura química dos esqueletos vouacapanos



Fonte: KIATKOSKI (2011)

Nota: 1: 6 α -hidroxivouacapan-7 β -17 β -lactona; 2: 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17 β -oato metil éster

Investigações comprovaram que as sementes de sucupira da espécie *P. emarginatus* possuem flavonoides, cumarinas, saponinas, triterpenos, esteroides e óleo essencial, em seu óleo é encontrado elementos como o β -cariofileno, substância química com atividade anti-inflamatória, antibiótica, antioxidante, anticarcinogênico e anestésico local, o que comprova as propriedades medicinais da sucupira (BAVARESCO *et al.*, 2016).

Também Dutra, Leite e Barbosa (2008) constataram a presença de compostos fenólicos e flavonoides nas sementes de *P. emarginatus* e testaram a atividade antioxidante destes compostos chegando à conclusão que os flavonoides possuem

uma estrutura ideal para a eliminação de espécies reativas (ERs), uma vez que apresentam uma série de hidroxilas atuando como doadoras de hidrogênio que os torna um importante agente antioxidante.

E, por fim o Sistema Único de Saúde (SUS) oferece, desde 2010, medicamentos fitoterápicos na sua rede. Um deles é a base de sucupira branca que é indicada para o tratamento de quadros reumáticos acompanhados de dor, como artrite reumatóide, fibromialgia, artrose e febre reumática (BAVARESCO *et al.*, 2016).

3.2 NANOPARTÍCULAS

O termo nanopartícula (NP) não possui uma única definição e por isso são normalmente referidas como sendo partículas com pelo menos uma dimensão na faixa nanométrica de 1 nm a 100 nm. No entanto, pela definição das grandes agências regulatórias como o FDA (*Food Drug Administration*), as nanopartículas (NPs) são estruturas que apresentam propriedades, incluindo as físicas, as químicas, os efeitos biológicos ou fenômenos, que podem ser atribuídos à sua dimensão (BALLOTTIN, 2014; HUANG *et al.*, 2016; KALPANA *et al.*, 2018; KHAN *et al.*, 2016; MELO JÚNIOR *et al.*, 2012; MENDES, 2015; NUNES, 2012).

Desta maneira, as partículas menores que 1 µm podem ser consideradas nanoestruturas desde que apresentem propriedades completamente novas ou melhoradas baseadas em suas características específicas, como tamanho, distribuição, fase, morfologia (flocos, esferas, formas dendríticas, e outras formas), cristalinidade, composição das NPs (sem impurezas), além da distância interpartículas, da natureza da camada superficial orgânica (*shell*) e da estrutura da banda eletrônica entre outros, quando comparadas com partículas de maiores dimensões provenientes da mesma fonte. É, no mínimo, um tópico intrigante devido aos efeitos impressionantes que pequenas modificações no tamanho e nas formas das NPs podem provocar nas propriedades físicas e na reatividade de determinado composto (BALLOTTIN, 2014; MELO JÚNIOR *et al.*, 2012; MENDES, 2015; NUNES, 2012).

Outro consenso é que NPs baseiam suas propriedades no fato de que as superfícies envolvidas são muito maiores em comparação aos volumes propiciando maiores áreas de contato. Na verdade, quando uma partícula decresce em tamanho uma grande proporção de seus átomos é encontrada na superfície comparada às

camadas mais internas. Por exemplo, uma partícula com tamanho de 30 nm possui cerca de 5 % de seus átomos na superfície. Deduz-se então que NPs possuem uma superfície muito maior por unidade de massa comparada a partículas maiores. Como reações químicas ocorrem nas superfícies, significa que NPs são extremamente mais reativas do que uma massa de material feito de partículas maiores (GARCIA, 2011; KHARAT; MENDHULKAR, 2016).

Essas NPs podem ser amplamente classificadas como (i) inorgânicas e (ii) orgânicas. As inorgânicas incorporam as semicondutoras como (óxido de zinco - ZnO, sulfeto de zinco - ZnS e sulfeto de cádmio - CdS), as metálicas como (ouro - Au, prata - Ag, cobre - Cu e alumínio - Al) e as magnéticas como (cobalto - Co, ferro - Fe e níquel - Ni); enquanto que as orgânicas englobam as de carbono como (fulerenos, pontos quânticos, nanotubos de carbono) (MATHUR *et al.*, 2018).

A sua utilização em métodos para diagnóstico por imagem, entrega e terapêutica de fármacos / substâncias, nas indústrias cosmética, alimentar e química, no controle do meio ambiente, em dispositivos óticos, eletrônicos, em estudos catalíticos, nos emissores de luz não lineares e em aplicações fotoeletroquímicas se deve às propriedades ópticas únicas, a facilidade na funcionalidade da superfície e à sua eficiente absorção da luz (CANCINO; MARANGONI; ZUCOLOTTI, 2014; COSTA, 2012; MENDES, 2015).

Com relação ao número de produtos, as NPs são um dos nanomateriais com maior grau de comercialização. Atualmente, de todos os produtos registrados em banco de dados de produtos que contenham algum material nano, cerca de 30 % apresentam as NPs em sua composição. Além da crescente aplicação comercial, recentemente o número de publicações em revistas internacionais relacionados com nanopartículas metálicas cresceu exponencialmente (LOPES, 2017).

As NPs de metais nobres, como ouro (AuNPs) e prata (AgNPs), têm atraído muito interesse devido à sua versatilidade, simplicidade e propriedades físico-químicas adequadas para muitas aplicações biológicas, como interagir com microrganismos e exibir atividade antibacteriana e antifúngica; estas propriedades são principalmente dependentes da sua forma, tamanho e composição (ALJABALI *et al.*, 2018; MELO JÚNIOR *et al.*, 2012).

As AuNPs e as AgNPs são de particular importância em biologia, química e física devido às suas propriedades químicas, magnéticas, ópticas, mecânicas e eletrônicas (ERDOĞAN *et al.*, 2016; HAMELIAN *et al.*, 2018), características

exclusivas, como grande área de superfície em relação ao volume, alta reatividade química e superfície biocompatível, são vantagens importantes das nanopartículas metálicas (NPMs) que atraem grande interesse (HAMELIAN *et al.*, 2018; HUANG *et al.*, 2016; MATHUR *et al.*, 2018).

De acordo com Cancino, Marangoni e Zucolotto (2014) algumas destas propriedades advêm da interação com o campo eletromagnético, que, em frequências específicas, podem induzir uma oscilação ressonante e coerente dos elétrons livres na superfície destas nanoestruturas. Esta oscilação é conhecida como ressonância plasmônica de superfície (SPR, do inglês *Surface Plasmon Resonance*). A posição espectral dessas bandas de SPR depende tanto da distribuição do tamanho e forma das NPs (esferas, bastões, cubos ou triângulos) ou meio dispersante (viscosidade, constante dielétrica, moléculas ou íons ligados à superfície das nanopartículas), sendo responsáveis pelas diferentes colorações das dispersões aquosas ou filmes das NPs (ANDRADES, 2015; LOPES, 2017; MENDES, 2015).

As oscilações à superfície do metal ocorrem principalmente na região do ultravioleta (UV), no entanto, no caso do ouro, prata e cobre, o plasma muda perto do domínio da luz visível. E é possível verificar que o aumento do tamanho das nanopartículas altera esta ressonância, promovendo a alteração da posição da banda SPR para comprimentos de onda maiores, em que a energia (frequência) é menor (MENDES, 2015).

Estas variações observadas para o comprimento de onda, da banda de absorção, correspondem à absorção de diferentes cores, no espectro visível, fazendo com que as soluções apresentem cores distintas. Por exemplo, uma solução coloidal de AgNPs com o valor máximo da banda SPR perto de 400 nm absorve a cor azul da luz visível e as partículas prata transmitem a cor amarela (cor complementar ao azul). Assim, e através da banda SPR das NPs é possível concluir sobre o seu tamanho e formato, pela cor que as soluções apresentam. Uma vez que a banda SPR reflete as diferentes propriedades das NPs, este efeito também está relacionado com as aplicações das NPs (MENDES, 2015).

Entre as nanoestruturas metálicas mais conhecidas encontram-se as partículas de forma esférica, em forma de bastões, e as películas com núcleo dielétrico (ANDRADES, 2015).

Uma das principais dificuldades na realização do experimento de síntese de nanopartículas metálicas (NPMs) é a obtenção de suspensões coloidais estáveis, já

que essas NPs possuem uma alta energia superficial, favorecendo termodinamicamente a imediata agregação destas para a formação de ligações metal-metal. Para evitar a agregação das NPs, a preparação de sistemas coloidais geralmente é efetuada em presença de espécies denominadas estabilizadores, que se adsorvem sobre as superfícies das NPs, formando uma camada auto-organizada que impede a coalescência. Para este fim, alguns dos estabilizadores mais eficazes são os poliméricos, como, por exemplo, poli (vinilpirrolidona) (PVP), poli (álcool vinílico) (PVAL), poli (ácido acrílico) (PAA), ácido hialurônico (AH) que possuem, em suas estruturas, sítios básicos de Lewis com alta afinidade pelas NPs, e cadeias orgânicas suficientemente compridas que criam um impedimento estérico, evitando interações entre as mesmas (MELO JÚNIOR *et al.*, 2012).

Materiais de prata, como prata metálica e sais de prata, são poderosos agentes antimicrobianos na medicina há séculos. (HUANG *et al.*, 2016)

De acordo com Mathur *et al.* (2018), que descreve uma breve narrativa, a prata tem uma longa história de uso em diferentes formas e para finalidades diferentes. Durante séculos, as propriedades antibacterianas da prata foram usadas para fumigar água potável por armazenamento em recipientes de prata. Os macedônios usaram placas de prata para melhorar a cicatrização de feridas e Hipócrates usava prata no tratamento de úlceras. Em 1520, Paracelsus usou prata internamente e também aplicou nitrato de prata como cáustico para o tratamento de feridas, uma prática que continua até o tempo atual. Em 1614, Angelo Sala administrou nitrato de prata internamente como um contra irritante, como um purgante e para o tratamento de infecções cerebrais. C. S. F. Crede é creditado como a primeira publicação científica a descrever o uso médico da prata no final do século XIX. Crede usou colírio contendo solução de nitrato de prata a 1 % para tratar as infecções dos olhos de recém-nascidos. Nos Estados Unidos, a utilização de AgNPs coloidal, ou seja, suspensões de partículas de prata em líquido, foi registrada em 1954 como um material biocida em medicamentos, há quase cem anos, como também cita Oliveira (2018).

Particularmente, a prata é de grande interesse por causa de suas propriedades distintas como condutividade, estabilidade química, atividades catalíticas, antimicrobianas, antioxidantes, antivirais, anti-inflamatórias, antibiofilme e ainda na potencialização da cicatrização de feridas (HAMELIAN *et al.*, 2018; HUANG *et al.*, 2016; KALPANA *et al.*, 2018; KHAN *et al.*, 2016). Por isso, é o metal mais

importante na síntese de bionanopartículas por ser um agente antimicrobiano que protege contra a ameaça crescente representada por microrganismos resistentes aos antibióticos (ERDOĞAN *et al.*, 2016; HAMELIAN *et al.*, 2018).

Os estados de oxidação da prata mais estáveis são Ag^0 e Ag^{+1} , sendo que no caso das sínteses de AgNPs vários sais de prata solúveis em água podem ser utilizados para fornecimento de íons de prata para síntese de AgNPs, mas em métodos químicos do tipo *bottom-up*, o mais comumente empregado em publicações da área é o nitrato de prata (AgNO_3) em concentrações tipicamente variando de 0,1 mmol/L a 10 mmol/L, embora a concentração de 1 mmol/L seja a mais comumente adotada, mas há diversos agentes redutores como citrato de sódio (método de Turkevich), borohidreto de sódio (métodos de Brust e de Martin), hidroquinona, entre outros (MENDES, 2015; OLIVEIRA, 2018).

Assim, AgNPs têm conquistado o interesse de muitos pesquisadores (SILVA, 2014). Além disso, as AgNPs obtidas por síntese verde têm uma aplicação extensa, como entrega de fármacos, terapia genética, revestimentos espectralmente seletivos para absorção de energia solar e material de intercalação para baterias de energia solar, como receptores ópticos, catalisadores em reações químicas, biomarcação, como agentes antimicrobianos, antifúngicos e antioxidantes (KALPANA *et al.*, 2018). Também podem ser usadas em curativos de feridas, tratamento de queimaduras, materiais dentários e loção para proteção solar (LEE *et al.*, 2019) para tratamento do câncer e desinfecção de água (LEE; JUN, 2019) no tratamento de doenças de pele como acne, dermatite e colite ulcerosa; marcação de células; revestimento de dispositivos cirúrgicos e médicos, imagem molecular de células cancerosas e sprays antissépticos (PATIL; KUMBHAR, 2017).

Para todas essas aplicações as propriedades físicas, ópticas e catalíticas das AgNPs podem ser modificadas por diversos métodos sintéticos, agentes redutores e estabilizadores que influenciam fortemente no tamanho, distribuição, forma e propriedades da superfície (LEE; JUN, 2019).

O tamanho das AgNPs pode ser ajustado de acordo com sua aplicação - por exemplo, as AgNPs preparadas para a entrega de medicamentos são na maior parte superiores a 100 nm para acomodar a quantidade de medicamento a ser entregue (LEE; JUN, 2019).

Desde a antiguidade o ouro é conhecido como um símbolo de poder e riqueza. O metal dourado é usado em diferentes formas para melhorar a saúde

humana desde então. Ainda hoje, os aspectos biológicos das AuNPs são muito úteis para saúde humana e aplicações em cosméticos. No século 18, os egípcios usavam ouro solubilizado em água para purificação mental e espiritual. A propriedade restauradora de ouro ainda é honrada em vilas rurais, onde os camponeses cozinham seu arroz com uma bolinha de ouro para substituir os minerais no corpo através da ingestão de alimentos (KUPPUSAMY *et al.*, 2016).

O ouro metálico é considerado quimicamente inerte e não tóxico, a redução do ouro de seu tamanho macroscópico para o tamanho em nanoescala é considerado muito eficaz na catálise e o torna um material atraente (AHMED *et al.*, 2014; LI, K. X. *et al.*, 2019).

As AuNPs são utilizadas no diagnóstico e terapêutica devido às suas exclusivas propriedades como tamanho pequeno, área de superfície grande em proporção ao volume, alta reatividade às células vivas, estabilidade em altas temperaturas e translocação para as células. As AuNPs foram consideradas úteis para estudar o direcionamento, o aumento da biodisponibilidade, a proteção, a bioatividade e a estabilidade dos medicamentos (AHANGARI *et al.*, 2013).

Os mecanismos de ação dos fármacos com ouro na sua composição, ainda não são bem compreendidos. Atualmente acredita-se que é o Au^0 que possui atividade, e que os compostos de ouro que possuem as espécies Au^{1+} e Au^{3+} são reduzidas a Au^0 em determinadas condições biológicas. Em relação à ação do ouro nas doenças reumáticas, pensa-se que está relacionada com a sua interação com os grupos tióis das proteínas e as membranas celulares (FARIA, 2010).

As AuNPs com diâmetro entre 2,5 nm e 100 nm possuem comprimento de onda de SPR entre em 520 nm e 580 nm (HAISS *et al.*, 2007), são tema de um grande número de artigos e se constituem em perspectivas interessantes para aplicações biomédicas, catalíticas, magnéticas e eletrônicas. A razão para tal, está relacionada com a sua estabilidade e a extraordinária diversidade de seus modos de preparação (CASANOVA, 2010).

A afinidade de grupos funcionais tais como tióis (-SH), nitrilos (-CN) e aminas (-NH₂) pela superfície das NPMs têm sido bastante úteis no âmbito da funcionalização das mesmas (SHIMMIN; SCHOCH; BRAUN, 2004; TEMPLETON *et al.*, 2000).

As ligações formadas com estes grupos funcionais apresentam um caráter covalente e são, por isso, mais estáveis, em comparação com as interações eletrostáticas que se verificam com a maioria dos agentes de revestimento. Neste

contexto, o tipo de ligação do agente de revestimento à superfície da NP, deixa de ser física (adsorção do agente de revestimento por interações de Van der Waals à superfície das NPMs para ser uma ligação química (quimissorção) na qual há uma certa partilha dos elétrons da camada de valência do elemento em questão (FARIA, 2010; TEMPLETON *et al.*, , V., 2000).

Elas são amplamente utilizadas como agente de contraste, especialmente imagem molecular, como tomografia computadorizada, tomografia por emissão de pósitrons, ressonância magnética e ultrassom. A aplicabilidade das nanopartículas de ouro em sistemas de entrega de fármacos é devido a sua estrutura e *design* que permite o revestimento das superfícies com vários agentes de direcionamento, além de serem atóxicas e biocompatíveis, sendo formas inovadoras de controlar o transporte de compostos farmacêuticos. Por causa de suas propriedades eletrônicas as AuNPs têm sido comumente utilizadas em métodos analíticos e usadas como sensor de eletrodo de amostras, também são aplicadas como biomarcadores direcionados para diagnóstico médico e tratamento de câncer. As AuNPs funcionalizadas com biomoléculas podem efetivamente destruir células cancerosas ou bacterianas (ALAQAD; SALEH, 2016).

A eficácia das AuNPs associadas com vários antibióticos também foi objeto de alguns estudos onde foi descoberto que essas NPs conjugadas foram mais eficientes na inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em comparação com a mesma dose de antibióticos usados isoladamente. Seus resultados sugerem que as AuNPs podem atuar como um transportador e distribuidor eficaz de fármacos como de antibióticos para o foco de infecção (AHANGARI *et al.*, 2013).

Também Rai, Prabhune e Perry (2010) constataram que AuNPs se ligam fortemente com moléculas orgânicas contendo grupos amina e, que a amina primária presente em alguns antibióticos, como o cefaclor, atua como agente de redução e de proteção para a síntese de AuNPs deixando o anel β -lactâmico disponível para atuar contra os microrganismos.

Ainda os mesmos autores explicam que a vantagem de usar tanto antimicrobianos e nanopartículas inorgânicas associadas é que se as bactérias têm resistência contra um dos componentes, um componente maior poderia matá-las de uma maneira diferente (RAI; PRABHUNEB; PERRY, 2010).

Geralmente para fins terapêuticos, a quantidade de antimicrobianos frequentemente administrada para o tratamento é muito maior do que a dose necessária para matar os agentes patogênicos. Isso, por sua vez, produz efeitos tóxicos, que foram demonstrados em várias pesquisas. Para uma terapia antimicrobiana bem sucedida, a dose deve ser reduzida ao mínimo necessário para evitar seus efeitos colaterais (BHATTACHARYA *et al.*, 2012).

Os antimicrobianos associados com AgNPs e AuNPs podem, portanto, ser usados para resolver o problema relacionado ao tratamento antimicrobiano convencional. Nessa tentativa, relatou-se que as nanopartículas carregadas com ampicilina utilizadas para o tratamento da infecção por salmonela em ratos reduziram a quantidade do fármaco em 40 vezes em comparação com a ampicilina livre (BHATTACHARYA *et al.*, 2012).

Como transportadoras, as AuNPs, também foram consideradas mais eficazes para as drogas como gentamicina, drogas para tratamento da tuberculose, ampicilina, fármacos contra o câncer, fármaco antifúngico, Anfotericina B e outros. Na maioria dos casos, a associação foi feita por AuNPs funcionalizadas, onde aminoácidos, glutatona, polietilenoglicol e outros agentes foram utilizados como ligantes. Mas para evitar os possíveis efeitos desses agentes no sistema biológico, o ideal seria usar antimicrobianos conjugados diretamente sem agentes ligantes no momento da síntese de AuNPs (SAHA *et al.*, 2007).

A versatilidade das AgNPs e das AuNPs em campos como a catálise, de biossensores, de fotônica, de sistemas de distribuição de fármacos, de agentes antimicrobianos, em ensaios imunológicos, ensaios clínicos, na detecção e fototermólise de microrganismos e células cancerígenas torna-as as mais estudadas. Estas nanopartículas têm sido propostas para utilização em praticamente todas as etapas médicas, incluindo o diagnóstico, a terapia e a profilaxia, e também em processos de purificação de águas residuais (MENDES, 2015).

Para finalizar, as AuNPs e as AgNPs podem ser preparadas por vários métodos e usadas em diferentes campos. Essas NPMs associadas com diferentes biomoléculas, como proteínas, DNA, aminoácidos e ácidos carboxílicos têm sido usadas na terapia do câncer e fornecem excelente sistema de entrega de fármacos. Os efeitos colaterais dos medicamentos convencionais têm sido minimizados por conjugação com as AuNPs. As AgNPs têm comprovado inibir a proliferação e infecção microbiana. Além disso, as AgNPs adicionaram uma nova dimensão no campo da

medicina sobre curativo e da contaminação causada por microrganismos e, desempenham um papel fundamental e são consideradas ingredientes importantes na preparação de produtos de uso comercial nas indústrias (ALAQAD; SALEH, 2016).

Sob a perspectiva biomédica, as células vivas da maioria dos organismos variam em tamanho de 10 μm a 50 μm , e suas organelas estão dentro da escala sub-mícron; a diferença de tamanho entre NPs e células é muito grande e pode levar a maiores interações biofísicas entre moléculas celulares internas e externas (DANG; FAWCETT; POINERN, 2019).

Desta forma a nanotecnologia é potencialmente útil para aplicações médicas, pois utiliza as propriedades e as características físicas dos nanomateriais para o diagnóstico e tratamento de doenças ao nível molecular (KIM; RUTKA; CHAN, 2010).

3.3 SÍNTESE VERDE

Existem várias técnicas que podem ser utilizadas na preparação de nanopartículas, porém em todos os métodos algumas características devem ser consideradas e obedecidas: maior reprodutibilidade; controle do tamanho de partícula, distribuição de tamanho, forma, estrutura cristalina e distribuição da composição química, melhoria da pureza das NPs, controle de agregação, estabilização de propriedades físicas, estruturas e reagentes (LOPES, 2017).

Em geral, os métodos de síntese de NPMs são divididos principalmente em descendente (*top-down*) e ascendente (*bottom-up*). Os métodos *top-down* consistem na remoção de matéria de estruturas originalmente maiores, o chamado material *bulk* para obter a nanoestrutura desejada. Por outro lado, no método *bottom-up*, os componentes do material presentes inicialmente em escala atômica, se auto-organizam em materiais nanoestruturados. Particularmente no que diz respeito à preparação de NPMs, as técnicas *bottom-up* são mais usuais (BASAVEGOWDA *et al.*, 2013; LEE; JUN, 2019; LOPES, 2017; MATA *et al.*, 2009; MENDES, 2015).

Mais recentemente, as abordagens são categorizadas em físicas, químicas e em síntese verde (BASAVEGOWDA *et al.*, 2013; LEE; JUN, 2019).

Os métodos físicos de síntese de NPs incluem formação de arco de plasma, moagem de esferas, evaporação térmica, spray pirólise, filmes ultrafinos, dessorção de laser pulsado, técnicas litográficas, deposição por pulverização catódica, crescimento por camada, epistaxe do feixe molecular e chama de difusão

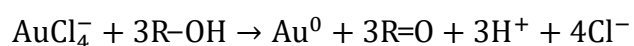
(DJAHANIANI *et al.*, 2017; KUPPUSAMY *et al.*, 2016), ultrassom de alta frequência, irradiação, método sonoquímico, radiação ultravioleta e infravermelha, ablação por laser e, processo termolítico, fotoquímico e micro-ondas (LOPES, 2017; MATA *et al.*, 2009; MENDES, 2015).

Similarmente, os métodos químicos usados para sintetizar NPs são por eletrodeposição, processo sol-gel, deposição de solução química, deposição de vapor químico, química suave, rota catalítica, hidrólise, coprecipitação e método químico úmido (DJAHANIANI *et al.*, 2017; KUPPUSAMY *et al.*, 2016).

As NPMs também podem ser formadas pela redução química dos íons metálicos no interior de micelas (ou micelas reversas) formadas por tensoativos e usadas como nanorreatores. Adicionalmente, na síntese micelar, o tensoativo também auxilia na estabilização das NPs formadas (MENDES, 2015).

Com o objetivo de impedir a agregação das NPs e garantir a estabilidade, utilizam-se duas abordagens de estabilização: a eletrostática e a estérica. A primeira se baseia na repulsão elétrica causada por cargas de mesmo sinal que circundam as partículas, enquanto a segunda consiste no uso de moléculas aderidas à superfície para impedir a agregação com nanopartículas vizinhas. Os extratos de origem vegetal são uma opção interessante para a síntese de NPMs, pois desempenham a função de agentes redutores e estabilizantes (SULIANI, 2018).

No entanto, o tamanho, a morfologia, a estabilidade e a funcionalidade da superfície das nanopartículas dependem não só do método de síntese empregado como também das condições experimentais (concentração do íon metálico, velocidade de redução, temperatura, uso e concentração de agentes estabilizantes, etc.). Entre os métodos químicos, no caso de AuNPs a maioria usa o ácido cloroáurico (HAuCl_4), como fonte de íons Au^{3+} . Pesquisadores sugeriram que a redução de Au^{3+} para Au^0 ocorre através da oxidação de grupos hidroxila para grupos carbonila como mostrado na sequencia (LOPES, 2017; MATA *et al.*, 2009; MENDES, 2015).



Os métodos físicos e químicos têm usado alta radiação e redutores altamente concentrados e agentes estabilizadores que são prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana, em comparação com a síntese verde de NPs que exhibe propriedades atrativas, como alto rendimento, solubilidade e estabilidade (DJAHANIANI *et al.*, 2017; KUPPUSAMY *et al.*, 2016; LEE; JUN, 2019).

Visando o uso de técnicas de preparação ambientalmente compatíveis, NPMs têm sido obtidas via biossíntese usando materiais naturais como extrato de plantas, microrganismos como bactérias, fungos, leveduras, algas e biomoléculas como enzimas tanto para reduzir quanto para estabilizar as NPs (COURA *et al.*, 2018; LEE, *et al.*, 2019; MATHUR *et al.*, 2018; PATIL; KUMBHAR, 2017; SILVA, A. 2016; SINHA; PAUL, 2014).

De acordo com Park *et al.* (2011) atualmente, iniciativas de sustentabilidade que usam química verde para melhorar e / ou proteger nosso meio ambiente global estão tornando-se questões focais em muitos campos de pesquisa. Em vez de usar produtos químicos tóxicos para a redução e estabilização de nanopartículas metálicas, o uso de várias entidades biológicas tem recebido considerável atenção no campo da nanobiotecnologia, como exemplo, temos os polissacarídeos.

Nos métodos em que são utilizados polissacarídeos as AgNPs são preparadas empregando água como solvente e polissacarídeo como agente redutor e, em alguns casos, o polissacarídeo atua como agente redutor e agente estabilizante (LOPES, 2017).

As moléculas de polissacarídeos têm muitas funcionalidades incluindo grupos hidroxila e um final redutor hemiacetal que são capazes de reduzir os sais precursores. A oxidação de grupos hidroxila de polissacarídeos a grupos carbonila desempenha um papel importante na redução de sais de ouro (MATA *et al.*, 2009).

A redução final de polissacarídeos também pode ser usada para introduzir um aminoácido, funcionalidade capaz de complexar e estabilizar nanopartículas (NADKARNI; PERVIN; LINHARDT, 1994).

Carboidratos com tais grupos amino ligam-se firmemente às superfícies das AuNPs e AgNPs dando a elas uma superfície hidrofílica. (KEMP *et al.*, 2009).

Atualmente, os polissacarídeos são amplamente empregados na engenharia de tecidos e na entrega de medicamentos (como micelas, partículas ou hidrogéis), por serem considerados polímeros biocompatíveis (PARK *et al.*, 2011).

Lopes (2017) lista doze princípios fundamentais, que regem a química verde, e que devem ser seguidos na implantação de processos sustentáveis: 1) Prevenção; 2) Economia de átomos; 3) Síntese de produtos menos perigosos. 4) Desenho de produtos seguros; 5) Solventes e auxiliares mais seguros; 6) Busca pela eficiência de energia; 7) Uso de fontes renováveis de matéria-prima; 8) Evitar a formação de derivados; 9) Catálise; 10) Desenho para a degradação 11) Análise em tempo real

para a prevenção da poluição; 12) Química intrinsecamente segura para a prevenção de acidentes.

Na síntese verde de nanopartículas, a água é comumente usada como solvente ambientalmente seguro substituindo os solventes orgânicos tóxicos (THAKKAR; MHATRE; PARIKH, 2010). Para o desenvolvimento da química verde, Lopes (2017) e também Raveendran, Fu, Wallen (2003) sugeriram três fatores principais na preparação de nanopartículas que devem ser considerados: escolha do solvente, o uso de um agente redutor ambientalmente seguro, e o uso de material não tóxico para estabilização de nanopartículas e, Mendes (2015) acrescenta que a síntese verde, idealmente seria realizada à pressão atmosférica e à temperatura ambiente e que para isso se desenvolver é necessário criar sinergias entre a nanotecnologia e a natureza.

A síntese de NPMs por meio de plantas medicinais é um processo recente da biomedicina. Ela tem sido recomendada por ser econômica, ecologicamente correta e facilmente replicável para síntese em grande escala e também não necessita do uso de produtos químicos tóxicos, alta pressão, temperatura e energia; em comparação com métodos químicos e físicos. (ERDOĞAN *et al.*, 2016; HAMELIAN *et al.*, 2018; KHARAT; MENDHULKAR, 2016)

Entre todos os sistemas biológicos, a síntese mediada por extrato de plantas é preferida por ser rápida, permitir a manipulação na morfologia variando diferentes parâmetros e ser mais estável em comparação com as sínteses utilizando microrganismos, com menos risco biológico e sem necessidade de processo extenuante de manutenção de culturas de células (LEE. *et al.*, 2019; MATHUR *et al.*, 2018; PATIL; KUMBHAR, 2017; SINHA; PAUL, 2014).

A síntese de nanopartículas por fitoquímicos é uma área de pesquisa com grande potencial. Desde os tempos antigos, tanto metabólitos primários como secundários de plantas, os chamados fitoquímicos, demonstraram sua importância em aplicações de saúde humana. A medicina tradicional chinesa, muito popular nos países asiáticos, investiga ativamente o papel e atividades biológicas dos fitoquímicos. Por exemplo, o chá preto é conhecido por conter compostos antioxidantes poderosos, como polifenóis (MENDES, 2015; WANG; HO, 2009).

A utilização do extrato de diferentes partes da planta, incluindo folhas, caules, raízes, sementes, frutos, cascas, calos, flores, látex, bem como a biomassa seca e morta da planta, com seus constituintes biológicos desempenham papel pioneiro na

redução do sal no extrato vegetal por atuarem como agentes redutores e estabilizadores na síntese das NPMs com diferentes formas e tamanhos (ERDOĞAN *et al.*, 2016; HAMELIAN *et al.*, 2018; KHARAT; MENDHULKAR, 2016; KUPPUSAMY *et al.*, 2016; LOPES, 2017).

As biomoléculas, presentes nos extratos das plantas, como proteínas e enzimas, alcaloides, taninos, polifenóis, flavonoides, ácido ascórbico, esteróis, polissacarídeos, saponinas, terpenoides, compostos alcoólicos, β -feniletilaminas, glicose, frutose e vitaminas entre outras, apresentam propriedades medicinais, são seguras ao ambiente e suas estruturas químicas complexas podem atuar como redutoras do metal levando à formação de NPs (ALJABALI *et al.*, 2018; LOPES, 2017).

Este método baseado na química verde pode fornecer uma grande variedade de tipos, tamanhos e formas de NPs. O método começa misturando uma solução aquosa de um sal metálico com um extrato à base de água. A redução bioquímica da solução do sal de metal converte íons metálicos de seus estados de oxidação mono, bi ou trivalente para estados de valência zero e é iniciada a nucleação das NPs. Isto é seguido por menores partículas vizinhas que se aglomeram em formações maiores dando origem as NPs termodinamicamente estáveis. Durante o crescimento, as NPs formam em sua maioria formas energeticamente favoráveis e estáveis que podem incluir cubos, esferas, triângulos, hexágonos, pentágonos, hastes e fios. Também durante esta fase, as biomoléculas presentes no extrato atuam como agentes de cobertura para revestir e estabilizar as NPs (DANG *et al.*, 2019).

As vantagens deste método baseado na química verde incluem: (1) o extrato aquoso da planta atua como agente estabilizador e agente redutor durante a formação da NP; (2) o processo de síntese de base aquosa é ecológico, e (3) o método é simples, direto e não requer equipamento especializado (DANG *et al.*, 2019).

De acordo com Kuppusamy *et al.* (2016) os mecanismos de biorredução da prata e do ouro por extratos de plantas são os seguintes; o AgNO_3 reage bioquimicamente com o extrato da planta levando à formação de AgNPs desta maneira:



Da mesma forma as biomoléculas existentes no extrato da planta agem na redução dos íons Au^+ para Au^0 a reação é a seguinte:



Diversas plantas já foram utilizadas na produção de nanopartículas: Skunkvine (*Paederia foetida*) – planta ornamental nativa de Bangladesh e com forte odor de compostos de enxofre; Mamão Papaia – fruto do mamoeiro, árvore da espécie do gênero *Carica* (*Carica papaya*); Coentro (*Coriandrum sativum*) – planta com origem no Mediterrâneo e Oriente Médio, porém já era conhecida pelos egípcios que a utilizavam como planta medicinal; o Figo-da-Índia (*Opuntia ficus-indica*) – uma espécie de cacto muito comum em regiões semi-áridas; Árvore do Caril (*Murraya koenigii*) – planta originária da Índia, da família das Rutáceas (LOPES, 2017).

Extratos de folhas de chá preto, ricos em polifenóis, como flavonoides, são agentes redutores poderosos para a produção de AuNPs e AgNPs (PARK *et al.*, 2011). Na natureza, os polifenóis são compostos mais importantes em diversas reações biológicas de redução muito frequentes em plantas. Os flavonoides atuam como antioxidantes pois têm a capacidade de doar átomos de hidrogênio (MENDES, 2015). A planta Gerânio (*Pelargonium graveolens*) foi usada na forma de extrato como um agente redutor para a geração de produtos estáveis e cristalinos de íons Ag com tamanho médio de 27 nm, para formação de AgNPs (SHANKAR; AHMAD; SASTRY, 2003).

As AuNPs de forma triangular e as AgNPs de forma esférica foram sintetizadas usando um extrato de *Aloe vera* (CHANDRAN *et al.*, 2006). O extrato de folhas de chá preto e da erva Barbatana (*Scutellaria barbata*) foram eficientemente utilizados para reduzir os íons AuNPs, com aplicações em eletroquímica (BEGUM *et al.*, 2009; WANG; HO, 2009). Pinho (*Pinus desiflora*), Caqui (*Diopyros kaki*), Ginko (*Ginko biloba*), Magnólia (*Magnolia kobus*) e extratos de folhas de *Platanus orientalis* foram utilizados com sucesso para sintetizar AgNPs estáveis com uma faixa de tamanho de 15 nm a 500 nm de íons Ag⁺ (SONG; KIM, 2009). Os fitoquímicos presentes no chá Darjeeling foram usados para a produção de AuNPs, como agente redutor efetivo e como um estabilizador, essas AuNPs exibiram notável estabilidade *in vitro* e afinidade para as células do câncer de próstata e mama. E, não apresentaram toxicidade como determinado por um ensaio de viabilidade celular com MTT (3- Brometo de (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) e podem fornecer excelentes aplicações na imagem molecular e terapia (NUNES *et al.*, 2009).

As AgNPs sintetizadas por extratos de folhas de chá de *Camellia sinensis* também mostraram atividade antibacteriana contra *Vibrio harveyi* sugerindo uma alternativa para antibióticos no controle da infecção por *V. harveyi* (VASEEHARAN; RAMASAMY; CHEN, 2010). Em outro estudo o extrato da casca e do pó da canela (*Cinnamomun zeylanicum*) foram comparados na síntese de AgNPs cristalinas. O extrato da casca foi mais eficaz do que o pó na produção de AgNPs, sugerindo uma grande disponibilidade de agentes redutores no extrato da casca. As nanopartículas sintetizadas mostraram atividade antibacteriana contra a estirpe BL-21 de *E. coli* (HUANG; YANG, 2004). Gardea-Torresdey *et al.* (2002) relataram a síntese de AuNPs e AgNPs usando alfafa (*Medicago sativa*) como agente redutor.

As NPs metálicas sintetizadas pelo método de síntese verde são, de forma geral, esféricas (LOPES, 2017) e, normalmente o mecanismo de síntese de nanopartículas metálicas em plantas e extratos vegetais inclui três fases principais: 1) a fase de ativação durante a qual ocorre a redução dos íons metálicos e a nucleação dos átomos do metal reduzidos, pelas interações eletrostáticas entre as cargas positivas dos íons prata Ag^+ e as cargas negativas dos grupos carboxílicos das biomoléculas; 2) a fase de crescimento durante a qual as pequenas nanopartículas adjacentes se fundem espontaneamente em partículas de tamanho maior, que é acompanhado por um aumento na estabilidade termodinâmica das nanopartículas, isto é a redução desses íons é iniciada pelos componentes dos materiais biológicos, favorecendo a geração dos núcleos de prata metálica neutros (Ag^0) que irão se aglomerar e desencadear um fenômeno chamado nucleação 3) a continuação desse processo proporciona o crescimento das AgNPs e determina a forma final das nanopartículas (OLIVEIRA, 2018; ALBERNAZ, 2014). O processo de formação das nanopartículas é mostrado esquematicamente na Figura 5.

Figura 5 – Esquema do mecanismo generalizado de 3 passos para a formação de nanopartículas metálicas por síntese verde



Fonte: ALBERNAZ (2014)

À medida que a duração da fase de crescimento aumenta, as nanopartículas se agregam para formar nanoesferas, nanotubos, nanoprismas, nanohexaedros e uma variedade de outras nanopartículas de forma irregular. Na fase de formação da nanopartícula, as nanopartículas adquirem a conformação mais energeticamente favorável, sendo este processo fortemente influenciado pela capacidade estabilizadora do extrato da planta. Portanto, o processo de redução dos íons metálicos para a formação de nanopartículas, é afetado por uma grande quantidade de fatores; além da natureza do extrato contendo biomoléculas ativas em diferentes combinações e concentrações, incluem outras variáveis como o pH da mistura de reação, temperatura, tempo de reação, concentração e potencial eletroquímico de um íon metálico (KATAS *et al.*, 2019; SENA *et al.*, 2019).

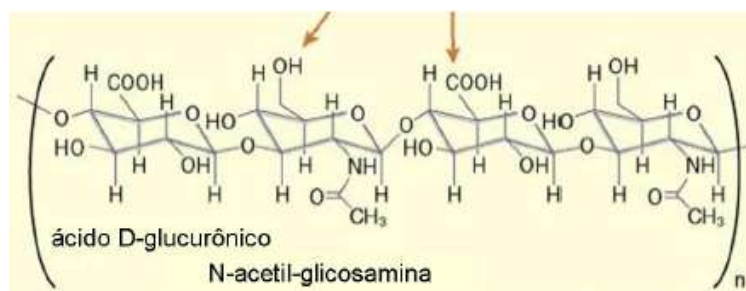
Este método de síntese para NPMs com extrato de planta ou biomassa exemplifica a aplicação promissora dos recursos biológicos vegetais onde a cobertura da superfície das NPMs com metabólitos secundários de plantas de interesse medicinal pode gerar escopo sugestivo para pesquisas na área de metabolômica vegetal assistida por NPs (KALPANA *et al.*, 2018; KEIJOK, 1991; SILVA, A. 2016).

E, sob essa perspectiva, utilizamos o extrato aquoso de sementes de *P. emarginatus* na síntese de AuNPs e de AgNPs de prata sendo que uma das vantagens é o seu baixo custo, disponibilidade e ser um método verde, isto é, não tóxico.

3.4 ÁCIDO HIALURÔNICO (AH)

Segundo Pan *et al.* (2013) o AH é um polissacarídeo linear de alta massa molar constituído de unidades dissacarídicas polianiónicas de ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina unidos alternadamente (Figura 6).

Figura 6 – Fragmento da estrutura molecular do Ácido Hialurônico (AH) mostrando os principais sítios para modificações químicas



Fonte: BICUDO (2011)

O AH pertence a um grupo de polissacarídeos denominados polissacarídeos do tecido conjuntivo, mucopolissacarídeos ou glicosaminoglicanos. O AH pode conter em torno de 30.000 unidades dissacarídicas repetidas na molécula extraída de tecidos animais, o que significaria uma massa molar superior a 10^7 Da (WEIGEL; HASCALL; TAMMY, 1997). A massa molar do AH é um dos principais critérios de avaliação de sua qualidade, sendo responsáveis pela caracterização de suas propriedades físico-químicas e fisiológicas. Consequentemente, o desempenho e aplicação do produto dependem diretamente da sua massa molar que varia de 10^4 Da a 10^7 Da, dependendo da sua fonte. Além disso, o AH é o único glicosaminoglicano que não é sulfatado e não está ligado covalentemente a uma proteína central. Quando estendida, a molécula de ácido hialurônico pode apresentar comprimento de aproximadamente $15\ \mu\text{m}$ e diâmetro de $0,5\ \text{nm}$ (COWMAN; MATSUOKA, 2005).

Em solução, o AH apresenta consistência gelatinosa com alta viscoelasticidade e alto grau de hidratação devido às características estruturais da molécula. O AH interage com a água por ligações de hidrogênio conferindo ao polímero alta capacidade de retenção de água e rigidez conformacional. Por conseguinte, o AH assume uma estrutura enovelada randômica semiflexível, ocupando um grande domínio hidrodinâmico com uma baixa densidade de segmentos de cadeia. Essas propriedades combinadas à alta massa molar fazem com que soluções de AH apresentem um comportamento não newtoniano (PAN *et al.*, 2013).

Hardingham (2004) afirmou que os átomos de hidrogênio axiais formam uma face relativamente hidrofóbica apolar, enquanto as cadeias laterais equatoriais formam uma face hidrofílica de maior polaridade, criando uma estrutura de fita torcida. Além disso, hélices de AH em solução podem ser energeticamente e estericamente capazes de formar cadeias duplas de AH por meio de interações entre as regiões hidrofóbicas da cadeia. Estas regiões são responsáveis não apenas por estabilizar a formação de cadeias duplas, como também pela formação de rede e agregação lateral de cadeias de AH (WEISSMAN; MEYER, 1954).

A propriedade viscoelástica do AH no estado hidratado é uma de suas principais características. Tanto a elasticidade quanto a viscosidade são anômalas, ou seja, não são constantes e variam com a taxa de cisalhamento ou movimento oscilatório. Tal comportamento indica que o AH é um lubrificante biológico ideal, reduzindo a carga de trabalho em movimentos rápidos, sendo, por isso, abundante

nos fluidos e bolsas sinoviais e nas bainhas dos tendões (FRASER; LAURENT; LAURENT, 1997).

Pan *et al.* (2013) afirmam que o AH desempenha diferentes funções, tais como lubrificação, hidratação e manutenção da estrutura tecidual. Além disso, está envolvido em eventos de proliferação e migração celular, bem como angiogênese. Devido às propriedades hidrofílicas e viscoelásticas, o AH tem sido extensivamente utilizado na viscosuplementação de fluido sinovial de pacientes com artrite, reparo tecidual, cirurgias oftalmológicas, e em preparações de microcápsulas para liberação controlada de fármacos. Além disso, o AH constitui-se um componente indispensável em uma grande variedade de cosméticos.

A viscosuplementação, segunda maior aplicação de AH ocorre em articulações afetadas por artrite. Pesquisas revelaram que, em 2005, esse mercado movimentou cerca de US\$ 407 milhões no Japão, US\$ 380 milhões nos Estados Unidos e US\$ 120 milhões na Europa (KOGAN *et al.*, 2007; MARCELLIN; CHEN; NIELSEN, 2009).

Dentre os diferentes tipos de artrite, a osteoartrite e a artrite reumatoide são as principais condições crônicas que afetam a população mundial, afetando e aproximadamente 0,5 % a 1 % da população, estando entre as principais causas das deficiências de adultos caracterizadas por limiares de dor reduzidos e maior sensibilidade a pressão e temperatura. Embora, não se conheça a causa exata dessas patologias, a degradação de carboidratos poliméricos, principalmente o AH, no fluido sinovial é observada durante o desenvolvimento destas doenças (GRANDO *et al.*, 2017; KOGAN *et al.*, 2007).

A doença geralmente é tratada com medicamentos anti-inflamatórios e imunossupressores que causam efeitos colaterais importantes, portanto novas estratégias para o tratamento da artrite são necessárias (GRANDO *et al.*, 2017). Buscando por tratamentos eficazes contra a artrite, em 1987, Seikagaku utilizou pela primeira vez o AH em aplicações intra-articulares. Desde então, administrações de preparações contendo o AH têm melhorado os sintomas e diminuído a utilização de anti-inflamatórios em pacientes com artrite (CHONG *et al.*, 2005). Segundo Pan *et al.*, (2013) a massa molar do AH no fluido sinovial de um adulto saudável encontra-se na faixa de 2×10^6 Da a 6×10^6 Da. Soluções de AH de alto peso molecular são úteis em grande número de aplicações médicas devido à sua compatibilidade e propriedades reológicas úteis (HUANG; YANG, 2004).

O AH constitui-se um dos mais atraentes glicosaminoglicanos encontrados na natureza. O mercado mundial do AH movimentava quase US\$ 1 bilhão a cada ano, e as indústrias da área médico-farmacêutica faturam até US\$ 40.000/kg a 60.000/kg de AH. Portanto, o número de aplicações do AH e o seu alto valor agregado justificam os esforços em buscar alternativas para sua produção (PAN *et al.*, 2013).

Compostos de NPs baseados em AH aproveitam compatibilidade biológica de AH. O AH foi usado para a formação de AuNPs e AgNPs com tamanhos variando de 5 nm a 30 nm por tratamento térmico, onde o AH foi usado como agente redutor e estabilizador (KEMP *et al.*, 2009).

As AgNPs associadas ao AH (AgNPs-AH) exibiram potente atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e atividade modesta contra *E. coli* (KEMP *et al.*, 2009). Por si só, o polissacarídeo bioativo AH exibe excelente biocompatibilidade, dando-lhe vários cuidados médicos e aplicações cosméticas, incluindo a sua utilização biológica como no tratamento e cicatrização de feridas. A prata, os íons de prata, e mais recentemente AgNPs, são conhecidas por possuírem propriedades antibacterianas e antimicrobianas. Juntos, AgNPs sintetizadas por AH possuem uma atividade antibacteriana e biocompatibilidade que os torna bons candidatos para uso em aplicações médicas. Estes nanocompostos AgNPs-AH podem muito bem se tornar parte de dispositivos médicos, integrados em instrumentos cirúrgicos para as ligaduras que usamos para pequenos cortes e arranhões (PARK *et al.*, 2011).

3.5 BACTÉRIAS E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

As bactérias são microrganismos unicelulares, constituindo-se em seres vivos simples estruturalmente, embora complexos e diversificados do ponto de vista bioquímico e metabólico. São encontradas em vários ecossistemas terrestres e aquáticos, tanto na forma livre quanto associadas a outros seres vivos. Grande parte das bactérias são inofensivas aos seus hospedeiros, algumas encontram-se em estado de simbiose, fornecendo assim nutrientes e/ou proteção contra patógenos, predadores e doenças, limitando a habilidade de colonização das bactérias nocivas (KOLLEF; FRASER, 2001).

Devido à composição química e integridade da parede celular bacteriana, as bactérias podem ser divididas em dois grandes grupos: Gram-positivas e Gram-

negativas, dependendo da cor que adquirirem, as bactérias serão classificadas em Gram-positivas (quando ficam roxas) ou Gram-negativas (quando avermelhadas) (KOLLEF; FRASER, 2001).

A diferença básica entre um tipo e outro de bactéria está na sua parede celular, conforme Figura 7. A parede celular é uma estrutura rígida que recobre a membrana plasmática e ajuda a manter a forma das células, além de proteção, mantendo a pressão osmótica dentro da bactéria e prevenindo expansão e eventual rompimento da célula. Também é o sítio receptor para proteínas e outras moléculas que interagem com a bactéria. Sua composição é: peptidoglicano (mucopeptídeo ou mureína) – estrutura rígida da parede: N-acetilglicosamina (NAG) ácido N- acetilmurâmico (NAM) tetrapeptídeo - 4 aminoácidos (SILVA, V., 2016).

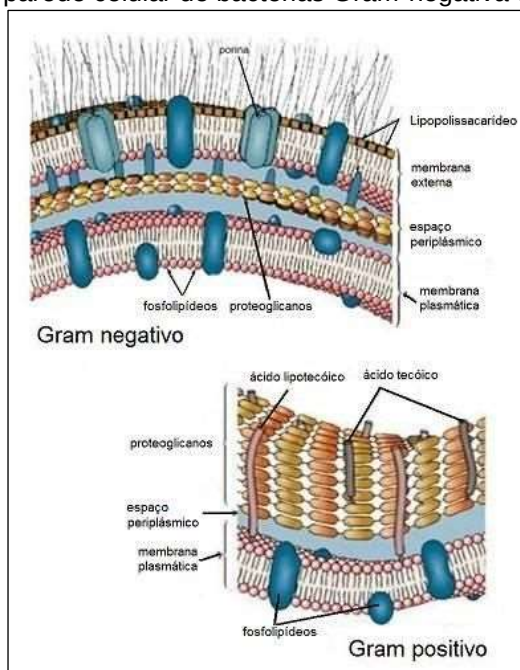
A parede das Gram-positivas possui maior quantidade de peptidoglicano, o que a torna mais espessa e rígida. Composta por peptidoglicano e ácidos teicoicos (cadeias de polifosfato com resíduos de ribitol e glicerol) ou ácidos lipoteicoicos. Os ácidos teicoicos/lipoteicoicos estão ligados ao peptidoglicano apenas nas bactérias Gram-positivas, nunca nas Gram-negativas. A camada de peptidoglicano nas Gram-positivas possui carga negativa e espessura de aproximadamente 30 nm (LEE; JUN, 2019; SILVA, , V., 2016).

A parede das Gram-negativas é mais complexa, a quantidade de peptidoglicano é menor, com apenas 3 nm a 4 nm de espessura, e possui uma membrana externa envolvendo a fina camada de peptidoglicano, que se situa no espaço periplasmático. A membrana externa serve como barreira seletiva que controla a passagem de algumas substâncias. Sua estrutura é uma bicamada assimétrica, contendo fosfolipídios: internamente a camada é composta de fosfolipídios e lipoproteína, que está ancorada ao peptidoglicano e externamente possui uma camada impermeável de lipopolissacarídeo (LPS) que é uma molécula anfipática. A membrana externa das bactérias Gram-negativas contém proteínas que formam canais pelos quais penetram diversas substâncias. Essas proteínas presentes na membrana externa das Gram-negativas constituem aproximadamente 50 % da membrana e não estão relacionadas com as proteínas da membrana plasmática, possuindo diversas funções (LEE; JUN, 2019; SILVA, V., 2016).

As bactérias Gram-negativas produzem uma diversidade de polissacarídeos (PSs) que são particularmente importantes para sua interação com o sistema imune do hospedeiro. Contudo, esses polissacarídeos são diferenciados quanto às suas

localizações na parede celular bacteriana e por suas funções. Enquanto LPSs estão ancorados na membrana bacteriana externa de Gram-negativas através de sua camada lipídica e atuam como moléculas padrão associadas ao patógeno, estimulando a resposta do hospedeiro, PSs são liberados no meio extracelular e podem formar barreiras físicas (biofilmes e estruturas capsulares), as quais favorecem a evasão da resposta imune do hospedeiro (KOLLEF; FRASER, 2001).

Figura 7 – Diferença entre a parede celular de bactérias Gram-negativa e Gram-positiva



Fonte: BRASIL (2013)

Os *S. aureus* são cocos Gram-positivos não esporulados que mais resistem no meio ambiente. Podem sobreviver por meses em amostras clínicas secas, são relativamente resistentes ao calor e podem tolerar uma concentração aumentada de cloreto de sódio no meio onde se desenvolvem. No entanto, apesar dos antimicrobianos existentes, da melhora nas condições sanitárias e de medidas de controle de infecção relacionada à assistência à saúde, esse microrganismo continua a ser um dos mais importantes patógenos para o homem. Indivíduos saudáveis são colonizados intermitentemente por *S. aureus* desde a amamentação e podem albergar o microrganismo na nasofaringe, ocasionalmente na pele e raramente na vagina. A partir desses sítios, o *S. aureus* pode contaminar a pele e membranas mucosas do paciente, objetos inanimados ou outros pacientes por contato direto e/ou por aerossol, ocasionando infecções letais por conta dos fatores de virulência ou através de resistência aos antimicrobianos atualmente utilizados (BRASIL, 2013).

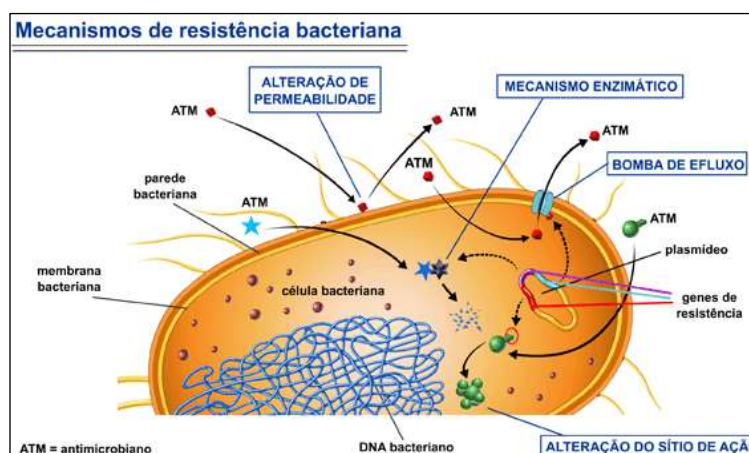
Apesar deste microrganismo ser comumente considerado um patógeno nosocomial onde a internação por longo período sempre foi fator determinante para o surgimento desta infecção, atualmente são encontrados causando infecções graves também na comunidade, sobretudo nos casos em que existe uma doença de base grave, como diabetes ou ainda devido ao uso descontrolado de antimicrobiano (QUEIROZ *et al.*, 2012).

As enterobactérias produtoras de enzimas hidrolíticas capazes de inativar antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos são denominadas *Extended-spectrum β -lactamase-producing* (ESBL). Inúmeros estudos têm identificado este que é considerado um dos mecanismos mais importantes de resistência bacteriana em Gram-negativos em todo o mundo. A alta prevalência em vários representantes da família de Enterobacteriaceae, particularmente em *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade, vem causando graves problemas de saúde pública. Existem também achados de ESBL em bactérias Gram-negativas não fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. Este aumento de resistência em bactérias Gram-negativas se explica principalmente pela presença de genes móveis em plasmídeos que se disseminam facilmente e ao uso empírico de antimicrobianos (QUEIROZ *et al.*, 2012).

Atualmente, bactérias gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* desenvolveram resistência crescente para os antibióticos convencionais (KATAS *et al.*, 2019).

Os mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos estão elencados a seguir e resumidos na Figura 8:

Figura 8 – Mecanismos de resistência bacteriana



Fonte: BRASIL (2013)

- a) Alteração de permeabilidade: a permeabilidade limitada constitui uma propriedade da membrana celular externa de lipopolissacarídeo das bactérias Gram-negativas. A permeabilidade dessa membrana reside na presença de proteínas especiais, as porinas, que estabelecem canais específicos pelos quais as substâncias podem passar para o espaço periplasmático e, em seguida, para o interior da célula. A permeabilidade limitada é responsável pela resistência intrínseca dos bacilos Gram-negativos à penicilina, eritromicina, clindamicina e vancomicina e pela resistência de *P. aeruginosa* ao trimetoprim. As bactérias utilizam esta estratégia na aquisição de resistência.
- b) Alteração do sítio de ação do antimicrobiano: a alteração do local-alvo onde atua determinado antimicrobiano, de modo a impedir a ocorrência de qualquer efeito inibitório ou bactericida, constitui um dos mais importantes mecanismos de resistência. As bactérias podem adquirir um gene que codifica um novo produto resistente ao antimicrobiano, substituindo o alvo original; *S. aureus* resistente à oxacilina e estafilococos coagulase-negativos adquiriram o gene cromossômico Mec A e produzem uma proteína de ligação da penicilina (PLP) ou *penicillin binding protein* (PBP) resistente aos β -lactâmicos, denominada 2a ou 2', que é suficiente para manter a integridade da parede celular durante o crescimento, quando outras PBPs essenciais são inativadas por antibióticos β -lactâmicos.
- c) Bomba de efluxo: o bombeamento ativo de antimicrobianos do meio intracelular para o extracelular, isto é, o seu efluxo ativo, produz resistência bacteriana a determinados antimicrobianos. A resistência às tetraciclina codificada por plasmídeos em *E. coli* resulta deste efluxo ativo;
- d) Mecanismo enzimático: o mecanismo de resistência bacteriano mais importante e frequente é a degradação do antimicrobiano por enzimas. As β -lactamases hidrolisam a ligação amida do anel beta-lactâmico, destruindo, assim, o local onde os antimicrobianos β -lactâmicos ligam-se às PBPs bacterianas e através do qual exercem seu efeito antibacteriano. Foram descritas numerosas β -lactamases diferentes. Essas enzimas são codificadas em cromossomos ou sítios extracromossômicos através de plasmídeos ou transposons, podendo ser produzidas de modo constitutivo ou ser induzido. A resistência quase universal de *S. aureus* à penicilina é mediada por uma β -lactamase induzível, codificada por plasmídeo.

A resistência a múltiplas fármacos é um problema crescente em todo o mundo. Inúmeros são os estudos que apontam o tratamento empírico inadequado com atraso na correta terapia e o uso irracional de antimicrobianos como as principais causas do surgimento de microrganismos multirresistentes que elevam as taxas de morbidade e mortalidade causando sérios problemas de saúde pública (QUEIROZ *et al.*, 2012; SAEB *et al.*, 2014).

O surgimento de bactérias multirresistentes aos antibióticos tornou-se uma grave ameaça à saúde pública. De acordo com um relatório publicado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA as bactérias multirresistentes causam milhões de infecções e milhares de mortes todos os anos nos EUA. Além disso, a significativa diminuição no número de antibióticos aprovados na última década contribuiu para a crescente ameaça que resultou em uma urgente necessidade de descoberta de novos antibacterianos e estratégias de tratamento. Há um número de estratégias ativamente buscadas, incluindo a pesquisa de novos antimicrobianos de produtos naturais, modificação das classes de antibióticos existentes e o desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos (LI *et al.*, 2014).

Segundo Mims *et al.* (1995) a velocidade com que as respostas adaptativas do hospedeiro podem ser mobilizadas é crucial, pois toda infecção é uma competição, entre a capacidade do microrganismo em multiplicar e disseminar-se causando a doença e a habilidade do hospedeiro em controlar, limitar e finalmente debelar a infecção. A demora na mobilização das defesas adaptativas do hospedeiro pode levar a situações que agravem o quadro inicial, criem sequelas ou mesmo promovam o óbito.

O problema da resistência microbiana é crescente e nenhuma nova classe de antimicrobiano foi descoberta nos últimos anos, apesar das intensas pesquisas das indústrias farmacêuticas. Desse modo, a perspectiva de uso de drogas antimicrobianas no futuro é incerta (FERREIRA; DANTAS; CATÃO, 2014).

Lopes (2017) e também Li *et al.* (2005) acreditam que a associação de NPs metálicas com antibióticos aumenta a ação destes e diminuem a resistência das bactérias aos mesmos; eles sugerem que a mudança causada na parede celular e nuclear (DNA/RNA) pelas NPs é a principal causa pelo retardamento do crescimento de células bacterianas e, que três possíveis mecanismos podem ser a causa da morte de células bacterianas por AgNPs, são listados a seguir: 1. O crescimento e proliferação das células bacterianas são inibidos pela adesão das AgNps (devido ao

pequeno tamanho das partículas) na parede celular das bactérias e, conseqüentemente, alterações na parede celular com a formação de “pits”; podendo ser pela oxidação catalítica de íons de prata, com oxigênio, reagindo com as membranas celulares bacterianas, levando à morte 2. As AgNPs penetram através da parede celular bacteriana, causam danos ao DNA, pela quelação da prata (I) impedindo que o DNA se desenrole levando a morte da célula. 3. Os íons Ag^+ interagem com o enxofre de proteínas presentes na parede celular das bactérias, levando ao mau funcionamento da parede celular bacteriana.

A resistência microbiana é um grave problema mundial, estando associada ao aumento do tempo de internação, dos custos do tratamento, das falhas na antibioticoterapia e das taxas de morbidade e mortalidade dos pacientes. O uso indiscriminado e incorreto dos antimicrobianos na comunidade e no ambiente hospitalar é reconhecidamente um importante fator de risco para o aparecimento e a disseminação da resistência microbiana (BRASIL, 2013).

Portanto, o desenvolvimento de agentes antimicrobianos eficazes é urgentemente necessário para tratar as infecções por estes microrganismos (KATAS *et al.*, 2019).

3.6 AMINOGLICOSÍDEOS

Os aminoglicosídeos (AMG) são utilizados principalmente para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas aeróbicas, atuando como bactericidas inibindo a síntese proteica na subunidade 30S dos ribossomos, que consiste em 21 proteínas e uma única molécula 16S de RNA. Esses antimicrobianos rompem o ciclo normal de função ribossômica ao interferir, pelo menos em parte, na iniciação da síntese de proteínas; também causam uma leitura errada do modelo mRNA, bem como a incorporação de aminoácidos incorretos nas cadeias polipeptídicas em crescimento (CHAMBERS, 2010).

Esses agentes bactericidas são cátions altamente polares (CHAMBERS, 2010), solúveis em água e podem ser cristalizados sob a forma de sulfatos ou cloridratos (TRABULSI; SOARES, 2002).

Em combinação com um agente ativo contra a parede celular, como a penicilina ou a vancomicina, o AMG produz um efeito bactericida sinérgico *in vitro* contra enterococos, estreptococos e estafilococos (CHAMBERS, 2010). Esse

sinergismo é decorrência do aumento de entrada do aminoglicosídeo através da parede incompleta (TRABULSI; SOARES, 2002).

A modificação enzimática é o mecanismo mais comum de resistência aos AMG, tal mecanismo pode resultar em alto grau de resistência a estes agentes antimicrobianos. Os genes responsáveis por esta resistência encontram-se geralmente em plasmídeos ou transposons. Atualmente, mais de 50 enzimas modificadoras de aminoglicosídeos já foram descritas e classificadas como: a N-acetiltransferases, a O-adeniltransferases e a O-fosfotransferases (BRASIL, 2013).

Os aminoglicosídeos contêm em sua estrutura grupos amino ou hidroxila, os quais podem ser modificados pelas enzimas acima, produzidas por isolados bacterianos. Os AMGs modificados nestes grupamentos perdem a habilidade de se ligar ao ribossomo e, conseqüentemente, de inibir a síntese proteica bacteriana (BRASIL, 2013).

Outros mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos como alteração no sítio de ação (subunidade 30S do RNA ribossomal) e alterações na permeabilidade da membrana celular externa também são descritos (BRASIL, 2013).

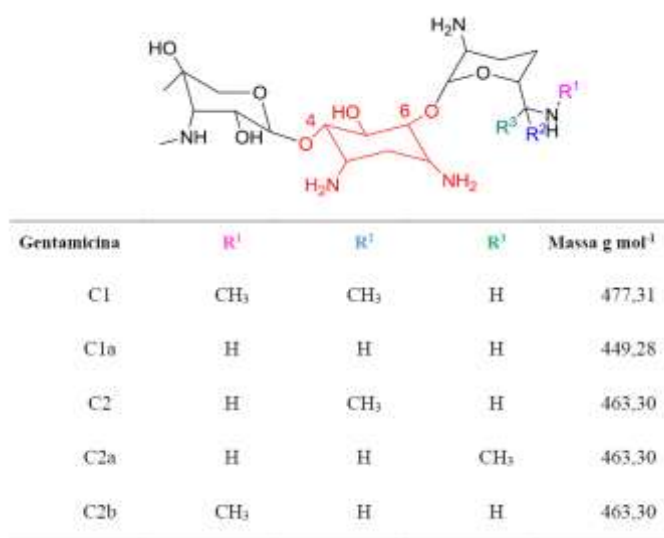
Na prática clínica, a presença de resistência aos aminoglicosídeos leva à perda de sinergismo com β -lactâmicos para tratamento de infecções por Gram-negativos, não produzindo efeito bactericida. Adicionalmente, já foram descritas amostras de *P. aeruginosa* contendo genes que codificam metalo- β -lactamases adjacentes a determinantes de 6'-N-acetiltransferases (BRASIL, 2013).

A gentamicina é um complexo de antibióticos produzido por um actinomiceto, a *Micromonospora purpúrea*. Este AMG é composto por dois aminoaçúcares unidos por ligação glicosídica a posições 4 e 6 do 2-desoxi-estreptamina. A gentamicina é constituída por uma mistura de substâncias designadas como gentamicina C1, C1a, C2, C2a e, ainda, por um componente em menor quantidade, o C2b, conforme mostra a Figura 9 (ANDRADES, 2015).

O sulfato de gentamicina, forma em que é utilizado, é solúvel em água, em formamida, etilenoglicol, NaOH 0,1 N e HCl 0,1 N. É praticamente insolúvel em solventes orgânicos como metanol, etanol, acetona e outros. A solução de sulfato de gentamicina é bastante estável, podendo inclusive ser autoclavada por curto período de tempo. Sua atividade é também conservada em pH de 2,2 a 10 (CHAMBERS, 2010).

O sulfato de gentamicina é utilizado no tratamento de infecções por bacilos Gram-negativos, com ação contra *P. aeruginosa* ou *S. marcescens* e a dose convencional recomendada para adultos é de 1-2,5 mg/kg/dose a cada 8 a 12 horas. Também usada em esquemas combinados com β -lactâmicos para infecções mais graves por enterococos (BRASIL, 2013; LACY *et al.*, 2009).

Figura 9 – Estrutura molecular da gentamicina e de seus componentes



Fonte: ANDRADES (2015)

Nesta pesquisa escolhemos o sulfato de gentamicina para associação com as AgNPs-PE e AuNPs-PE porque é um aminoglicosídeo com amplo espectro de atividade antibacteriana (SALOUTI *et al.*, 2016).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético (QUIMIS, modelo 235, Diadema, Brasil);
- Analisador de potencial zeta, peso molecular e tamanho de partícula ZETASIZER NANO SERIES (MALVERN, modelo NANO ZS90);
- Autoclave vertical (STERMAX);
- Banho-maria (BIOMATIC);
- Balança semi-analítica de prato único (SHIMADZU. Modelo UX420H);
- Capela de fluxo laminar (VECO, MANOMETER MM 200600);
- Centrífuga (BIO ENG, modelo BE-4004)
- Lavadora Ultrassônica (MAXICLEAN, modelo USC-1600A);
- Espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR PRESTIGE 21);
- Espectrofotômetro UV-VIS (NIR VARIAN CARY 50);
- Espectrofotômetro BTS-330 (Byosystems);
- Espectrômetro de massas Waters (Zspray ESI/APCI/ESCI) Xevo TQD;
- Estufa (QUIMIS, modelo Q316M4);
- Estufa de CO₂ (SANYO, modelo MCO-19AIC;
- Leitor de microplacas Synergy H1-Hybrid Reader (Biotek);
- Liofilizador (TERRONI, modelo LD1500A);
- Metalizador (QUORUM TECHNOLOGIES, modelo SC7620 Mini Sputter Coater);
- Microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo FEG-SEM (TESCAN, modelo MYRA3);
- Microscópio invertido (QUIMIS, modelo Q7301);
- Microscópio óptico (AMERICAN OPTICAL ONE FIFTY);
- pHmetro (HANNA, modelo HI 221, São Paulo, Brasil);
- Ultracentrífuga refrigerada (HITACHI, modelo HIMAC CR21GII);
- Ultrafreezer (NUAIRE, modelo GLACIER -86 °C);
- Ultrassom (Sonics-Vibra Cell);
- Sistema ultrapurificador de água (MILLIPORE);

- Sistema de Osmose reversa (QUIMIS);

4.2 REAGENTES E SOLVENTES

- Água purificada Milli-Q (MILLIPORE);
- Ácido clorídrico - HCl;
- Ácido cloroáurico - HAuCl_4 ;
- Ácido hialurônico pó - AH;
- Ácido nítrico – HNO_3 ;
- Álcool 70 °INPM;
- Azul de tripan (SIGMA CHEMICAL);
- Bicarbonato de sódio PA (BIOTEC);
- Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-terazólio – MTT (AMRESCO);
- Brometo de potássio grau FTIR, $\geq 99\%$ - KBr;
- Caldo Mueller Hinton;
- Cepa de *Escherichia coli* ATCC;
- Cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC;
- Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC;
- Cloreto de 2,3,5 – Trifeniltetrazólio - TTC (SIGMA ALDRICH);
- Dimetilsulfóxido – DMSO (BIOTEC);
- Meio de cultivo celular Dulbecco Mem – DMEM (VITROCELL EMBRIOLIFE);
- Nitrato de prata 99,8 % - AgNO_3 (BIOTEC);
- OLIGO HA pó 5,5 KDa (SK Bioland);
- Ouro metálico (OMDTVM);
- Penicilina/Estreptomicina 10000 U.I. (VITROCELL EMBRIOLIFE);
- Tripsina (GIBCO BRL);
- Soro fetal bovino estéril inativado (VITROCELL EMBRIOLIFE);
- Sulfato de gentamicina pó;

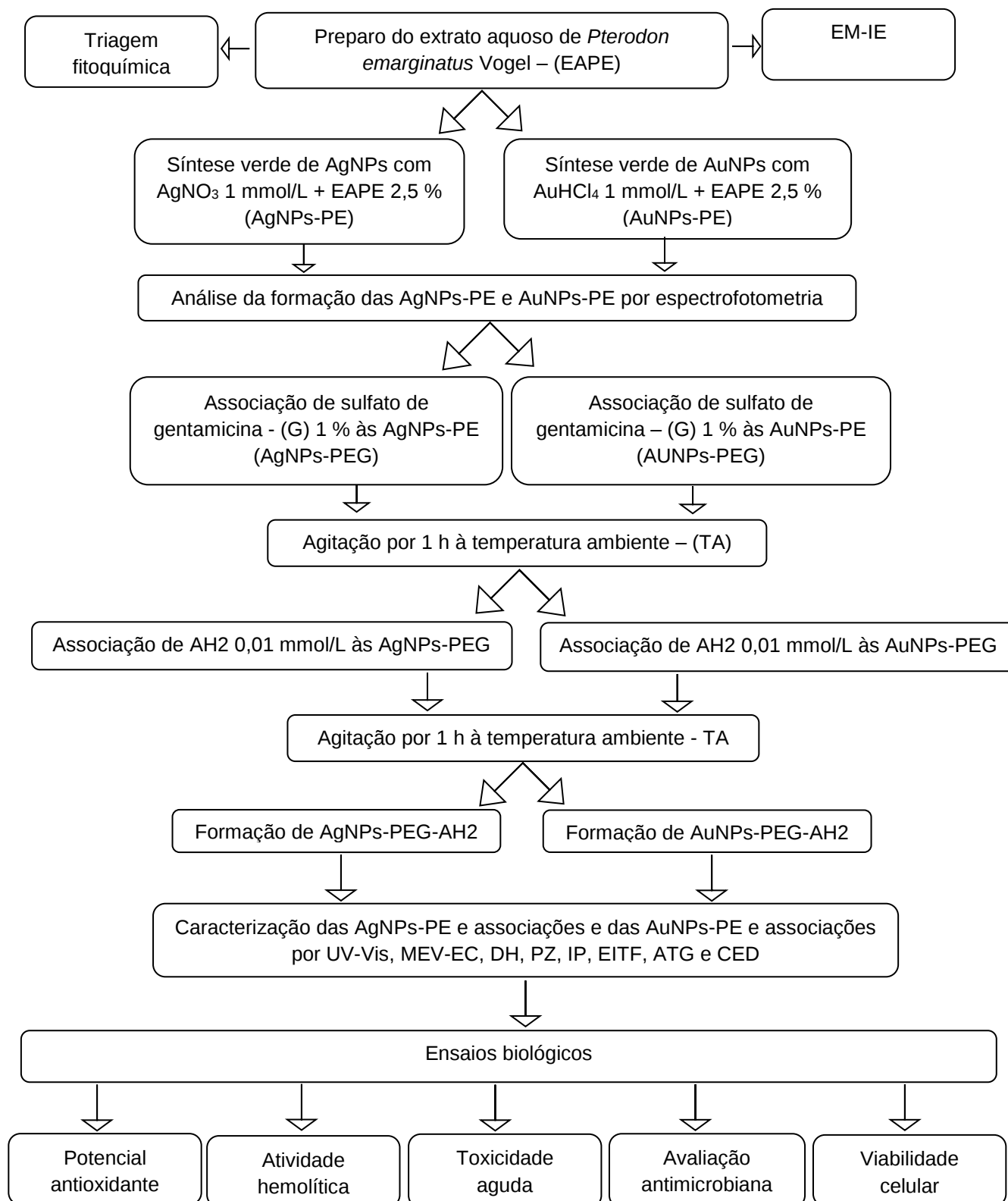
4.3 MATERIAIS

- Balões volumétricos de 10 mL e 25 mL;
- Béqueres de vidro de 25 mL, 50 mL, 100 mL e 250 mL;
- Câmara de Neubauer (KASVI);
- Filtro de seringa tamanho de poro 0,22 μm K18-230 (KASVI);
- Frasco coletor universal (J. PROLAB);
- Frascos de 50 mL para meio de cultivo celular;
- Funil de vidro com 12,5 cm de diâmetro;
- Garrafas de cultivo celular de 50 mL e 250 mL;
- Micropipetas de 20 μL , 50 μL , 100 μL e 1000 μL K1-1000B (KASVI);
- Microplaca com 96 poços K30-5096 (PROLAB);
- Papel filtro qualitativo tamanho de poro 14 μm (QUALY);
- Pipetas estéreis de 5 mL e 10 mL;
- Provetas de 50 mL e 250 mL;
- Seringa de 5 mL;
- Tubos FALCON de 15 mL e 50 mL;
- Tubos de EPPENDORF 2 mL.

4.4 DESENHO EXPERIMENTAL

As etapas da pesquisa foram resumidas no fluxograma ilustrado na Figura 10.

Figura 10 – Fluxograma das etapas experimentais do estudo



Fonte: A autora.

4.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.5.1 Material Vegetal

Os frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel foram coletados por Marcivan Barreto em julho de 2017, na Serra Boca D' Água de Uibaí – Região de Irecê – Bahia, com as seguintes coordenadas geográficas: Latitude: 11° 20' 24" Sul, Longitude: 42° 7' 56" Oeste. Foram identificados pela Dra. Rosangela Capuano Tardivo do Departamento de Biologia Geral - UEPG, Brasil. As amostras do fruto foram depositadas na Carpoteca do Herbário - HUPG da Universidade Estadual de Ponta Grossa/PR-Brasil sob o número 22.422.

4.5.2 Obtenção do Extrato Aquoso de *Pterodon emarginatus* Vogel

O extrato aquoso foi preparado de acordo com a recomendação de uso popular (FERREIRA; DANTAS; CATÃO, 2014). Os frutos de sucupira foram abertos e suas sementes foram selecionadas e particionadas. Foram adicionados 100 mL de água ultrapura em um béquer e posto para aquecimento até fervura em um agitador magnético com aquecimento, enquanto isso foram pesados 2,5 g de sementes em balança semi-analítica, quando a água entrou em ebulição as sementes pesadas foram colocadas em decocção por 10 minutos. Decorrido o tempo, o decocto foi retirado do aquecimento e resfriado à temperatura ambiente. Completamente frio, foi filtrado com auxílio de funil de vidro e de papel de filtro Whatmann® número 1 diretamente em uma proveta, após verificação do volume final, foi acrescentado água ultrapura até 100 mL. O extrato então foi transferido para um frasco de vidro âmbar identificado e armazenado sob refrigeração, mantido entre 4 °C a 8 °C, ao abrigo da luz, e posteriormente utilizado como agente redutor e estabilizador das AgNPs e das AuNPs.

4.5.3 Triagem Fitoquímica

Para esta análise foi utilizado 50 mL do extrato preparado conforme descrito no item 4.5.2 e realizada a pesquisa qualitativa de alguns metabólitos secundários,

descritos na literatura como presentes em outros extratos do *P. emarginatus* (MATOS, 1997; MOREIRA, 1979).

4.5.3.1 Alcaloides

Foi fervido 10 mL do extrato aquoso de *P. emarginatus* a 2,5 % com 40 mL de ácido sulfúrico 1 %, filtrado, resfriado e alcalinizado até pH 10 com hidróxido de amônia a 40 %; transferido para um funil de separação e feita a extração dos alcaloides com 20 mL de clorofórmio agitando cautelosamente; foi coletada a camada clorofórmica em cápsula de porcelana e evaporada em banho-maria, o resíduo foi dissolvido em 2 mL de ácido sulfúrico a 1 %; distribuídos em tubos de ensaio pequenos; em cada tubo foi gotejado os reativos gerais (tubo 1- Dragendorff, tubo 2- Mayer e tubo 3- Bouchardat). A reação será considerada positiva se houver turvação à formação de precipitado.

4.5.3.2 Flavonóides

Para a Reação de Taubouk foram utilizados 3 mL do extrato *P. emarginatus* a 2,5 % em uma cápsula de porcelana e levados ao banho-maria até a secura; após foram resfriados e o resíduo foi umedecido com algumas gotas de acetona e foram adicionados alguns cristais de ácido bórico e de ácido oxálico, com subsequente evaporação novamente em banho-maria até a secura, evitando aquecimento prolongado o resíduo foi dissolvido em 3 mL de éter etílico e observado sob a luz ultravioleta em 365 nm. Pesquisa positiva: fluorescência amarelo esverdeado.

Na Reação de Pew foram utilizados 3 mL do extrato *P. emarginatus* a 2,5 % em uma cápsula de porcelana e levado ao banho-maria até secura; adicionados 3 mL de metanol e o conteúdo foi transferido para um tubo de ensaio e adicionada uma pequena porção de zinco metálico e três gotas de ácido clorídrico concentrado o resultado foi anotado, reação positiva desenvolvimento de cor rosa avermelhada.

Reação de hidróxido alcalino 3 mL do extrato aquoso de *P. emarginatus* a 2,5 % e acrescentado pelas paredes do tubo de ensaio gotas de solução de hidróxido de sódio a 1 N e anotado o resultado, pesquisa positiva a base aumenta a cor amarela do extrato.

Reação com ácido clorídrico concentrado: no tubo de ensaio onde foi realizada a reação de hidróxido alcalino foram colocadas pelas paredes gotas de ácido

clorídrico concentrado e anotado o resultado. Reação realizada na sequência da reação com NaOH, positiva com a adição das gotas de HCl a cor amarela intensa volta ao amarelo original.

4.5.3.3 Heterosídeos cardiotônicos

Inicialmente a amostra foi preparada colocando-se 1 mL do extrato aquoso de *P. emarginatus* a 2,5 % em um tubo de ensaio; foram, então, adicionados 10 mL de solução de etanol a 50 %; agitado e fervido em banho-maria por 2 minutos; adicionados 10 mL de água destilada e 0,2 mL (duas gotas) de solução de acetato de chumbo a 10 %; novamente foi agitado fortemente e deixado em repouso; filtrado por papel de filtro pregueado; adicionado ao filtrado 15 mL de clorofórmio; procedida a extração em funil de separação por 4 vezes; foi decantada a camada clorofórmica e distribuída em quatro cápsulas de porcelana; evaporado o solvente em banho-maria até a secura e executadas as reações de identificação.

Reação de Liebermann-Buchard: em uma das cápsulas foi adicionado 1 mL de anidrido acético e dissolvido o resíduo com bastão de vidro; o conteúdo da cápsula foi vertido para um tubo de ensaio contendo 1 mL de ácido sulfúrico concentrado pelas paredes do tubo gota a gota sem agitar. O aparecimento de um anel castanho-avermelhado na zona de contato entre as camadas, indica presença do núcleo esteroidal.

Reação de Keller-Killiani: o conteúdo de uma das cápsulas foi dissolvido com 3 mL do reativo de Keller-Killiani e vertido cuidadosamente, gota a gota para um tubo de ensaio contendo 2 mL de ácido sulfúrico concentrado sem agitar, a reação será positiva se houver o aparecimento de anel na cor avermelhada na zona de contato.

Reação de Kedde: o reativo de Kedde foi preparado na hora (4 mL da solução metanólica de ácido 3,5 dinitrobenzóico a 2 % + 6 mL da solução metanólica de hidróxido de potássio 1N); foi adicionado ao resíduo de outra cápsula 2 mL de etanol 50 %, 2 mL de água destilada, 2 mL do reativo de Kedde, 2 mL de hidróxido de potássio 1 N, a pesquisa será positiva se for visível cor castanho-avermelhada a vermelho violeta.

Reação de Pesez: foi adicionado a outra cápsula 3 gotas de ácido fosfórico concentrado, misturado com bastão de vidro e observado sob luz UV em 366 nm. Nesta reação o resultado será positivo se houver fluorescência amarela esverdeada.

4.5.3.4 Saponinas

Nesta reação foram utilizados 5 mL do extrato aquoso de *P. emarginatus* a 2,5 %, adicionados 10 mL de água destilada, essa mistura foi fervida por 2 minutos, resfriada, filtrada e agitada energicamente no sentido vertical por 15 segundos e observado o resultado, reação positiva presença de espuma persistente por mais de 15 minutos.

4.5.3.5 Taninos

Para identificação genérica dos taninos foram realizadas duas reações: 1. Acetato de chumbo: a 2 mL do extrato aquoso de *P. emarginatus* a 2,5 % (m/v) foram adicionados 5 mL de ácido acético a 10 % e gota a gota 5 mL de acetato de chumbo, resultado positivo aparecerá precipitado. 2. Gelatina a 2,5 % em três tubos de ensaio respectivamente foram adicionados 0,5 mL, 1 mL e 2 mL do extrato aquoso de *P. emarginatus* Vogel a 2,5 % juntamente com uma gota em cada tubo de ácido clorídrico a 10 % em seguida foram adicionados 2 mL da solução de gelatina a 2,5 % em cada tubo e observadas as reações, para resultado positivo a solução deve turvar.

Para a identificação dos taninos também foram realizadas duas reações: 1. Cloreto férrico a 1 %: em um tubo de ensaio foi adicionado 1 mL do extrato aquoso de *P. emarginatus* Vogel a 2,5 % e 3 gotas de solução de cloreto férrico a 1 % e observada a reação, resultado positivo para taninos hidrolisáveis a solução ficará azul, resultado positivo para taninos condensados a solução ficará verde. 2. Acetato ácido de chumbo a 10 %: foram pipetados em um tubo de ensaio 3 mL de extrato aquoso de *P. emarginatus* Vogel a 2,5 % mais 5 mL de ácido acético glacial a 10 % e 3 mL da solução de acetato de chumbo a 10 % e observada a reação; resultado positivo para taninos hidrolisáveis a solução precipitará, resultado positivo para taninos condensados não haverá precipitação.

4.5.4 Análise Qualitativa do EAPE por Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray (EM-IE)

O extrato foi diluído em metanol:água (50:50 v/v) acidificado com 0,1 % de ácido fórmico na concentração de 12,5 mg/mL. A amostra foi filtrada com filtro de seringa 0,22 µm e as massas foram obtidas por infusão direta no espectrômetro de

massas Waters (Zspray ESI/APCI/ESCI) Xevo TQD, no modo de ionização positivo. O equipamento foi operado em: tensão da fonte a 3 kV; tensão capilar de 30 V; temperatura de dessolvatação de 600 °C com um fluxo de nitrogênio de 450 L/Hr; com energia de colisão 0 e com uma varredura de 20 m/z a 1500 m/z. Os espectros de massa obtidos nesta análise foram identificados com base nos dados descritos na literatura.

4.5.5 Síntese das AgNPs por Meio do Extrato Aquoso de *Pterodon emarginatus* Vogel (AgNPs-PE)

As AgNPs-PE foram obtidas por meio da adição de 90 mL de extrato aquoso de *P. emarginatus* a 2,5 %, à 10 mL de AgNO₃ 1 mmol/L. Em seguida a mistura, foi colocada em banho maria (BM) entre 60 °C a 70 °C, com e sem agitação (A). A cada 10 minutos foi feita a análise em espectrofotômetro UV-Vis, em comprimento de onda entre 200 nm a 800 nm, até a visualização de mudança de cor para amarelo acastanhado e pico entre 400 nm a 500 nm.

4.5.6 Síntese das AuNPs por Meio do Extrato Aquoso de *Pterodon emarginatus* Vogel (AuNPs-PE)

Para obtenção das AuNPs-PE, sobre 90 mL do extrato aquoso de *P. emarginatus* a 2,5 % aquecido a 60 °C e sob agitação foram gotejados 10 mL de HAuCl₄ 1 mmol/L. A suspensão foi retirada do aquecimento e agitação a cada 10 minutos para leitura do comprimento de onda no espectrofotômetro UV-Vis, com intervalo entre 200 nm a 800 nm. Esse procedimento foi repetido até a mudança de cor para roxo e pico entre 500 nm a 600 nm.

4.5.7 Associação das AgNPs-PE e AuNPs-PE com Sulfato de Gentamicina a 1 % (AgNPs-PEG e AuNPs-PEG)

Às AgNPs-PE e as AuNPs sintetizadas foi gotejado sobre cada frasco contendo as NPs sintetizadas 1 mL de sulfato de gentamicina 1 % sob agitação e deixadas sob agitação, em agitador magnético, protegidas da luz por 18 horas. Decorrido o tempo, foi feita a leitura no UV-Vis para verificação da associação.

4.5.8 Associação das AgNPs-PEG e AuNPs-PEG com AH (AgNPs-PEG-AH e AuNPs-PEG-AH)

Às AgNPs-PEG e AuNPs-PEG sintetizadas foram adicionadas partes iguais das soluções de AH1 (0,01 mmol/L) e de AH2 (0,001 mmol/L), sob agitação magnética, à 60 °C por 50 minutos. A cada 10 minutos foi realizada a leitura em UV- Vis.

4.5.9 Caracterização das Nanopartículas

4.5.9.1 Espectroscopia na região do ultravioleta visível (UV-Vis)

As análises das AgNPs e das AuNPs e suas associações foram analisadas em espectrofotômetro UV-Vis Varian modelo Cary 50. Todas as amostras, sem diluições ou tratamentos prévios, foram colocadas em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Todos os espectros de absorção das soluções em função do tempo foram obtidos e registrados em comprimentos de onda no intervalo de 200 nm a 800 nm. O branco foi calibrado com água ultrapura, também utilizada no preparo das amostras.

4.5.9.2 Determinação do diâmetro hidrodinâmico (DH), potencial zeta (PZ) e índice de polidispersão (IP)

O DH, o PZ e o IP foram determinados por espalhamento dinâmico de luz. Após o preparo de uma suspensão das nanopartículas (1:20, v/v) em água ultrapura. As medidas, em triplicata, foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer Nano series ZS90 (MALVERN INSTRUMENTS, Worcestershire, Reino Unido), com ângulo de detecção de 90 °C a 25 °C.

4.5.9.3 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-EC)

A avaliação morfológica e análise da superfície das AgNPs-PE e AuNPs-PE e suas associações foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca). As amostras foram diluídas 1:20 (v/v) e 20 µL colocadas sobre os suportes metálicos e secos por 24 horas em estufa a 36 °C. As amostras foram, então, metalizadas com ouro no equipamento SC7620 mini sputter Coater. Para obtenção das eletromicrografias, foi

empregada voltagem de aceleração de 15 kV e utilizado *software* específico (*Electron Optical Design*).

4.5.9.4 Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDE)

A técnica de EDE foi realizada no microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo MEV-EC (TESCAN®, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca), sem a metalização das amostras. É uma análise elementar, pois uma vez que o feixe de elétrons é incidido, os elétrons e íons mais externos mudam de nível energético, no entanto ao retornarem, há a liberação de energia que poderá ser mensurada através do detector. Os elétrons de cada átomo possuem energias distintas, possibilitando dessa forma determinar quais são os elementos químicos presentes na amostra.

4.5.9.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (EITF)

As AgNPs-PE e AuNPs-PE e suas associações foram analisadas por EITF, utilizando pastilhas de KBr, empregando 1 mg de cada amostra liofilizada e 196 mg de KBr grau espectroscópico 2 % (m/m), no equipamento IR Prestige 21 (SHIMADZU, Quito, Japão), na faixa de 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 scan.min^{-1} . Os espectros obtidos foram avaliados para verificar os grupos funcionais envolvidos na formação das nanopartículas e suas associações.

4.5.9.6 Análise termogravimétrica (ATG)

A análise termogravimétrica foi realizada em equipamento STA 6000 (PERKIN ELMER, Waltham, MA, Estados Unidos), utilizando célula calorimétrica de alumina, onde $5\text{ mg} \pm 0,1\text{ mg}$ das amostras de EAPE, AgNPs-PE, AgNs-PEG, AgNPs-PEG-AH2, AuNPs-PE, AuNPs-PEG, AuNPS-PEG-AH2, AH e sulfato de gentamicina foram aquecidas a uma taxa constante de 10 °C/min , de 20 a 800 °C , sob fluxo de nitrogênio de 50 mL/min constantes. O equipamento foi previamente aferido com sulfato de cobre penta-hidratado.

4.5.9.7 Calorimetria exploratória diferencial (CED)

Para a curva de calorimetria exploratória as amostras de EAPE, AgNPs-PE, AgNs-PEG, AgNPs-PEG-AH2, AuNPs-PE, AuNPs-PEG, AuNPS-PEG-AH2, AH e sulfato de gentamicina, $5 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$, foram colocadas em célula calorimétrica de alumina. Foram aquecidas a uma taxa de $10 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob fluxo de nitrogênio de $50 \text{ mL}/\text{min}$ com temperatura na faixa de 20 a $800 \text{ }^{\circ}\text{C}$. O instrumento STA 6000 (PERKIN ELMER, Waltham, MA, Estados Unidos) foi previamente calibrado usando índio (P.F.= $156,6 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,54 \text{ J/g}$) como padrão.

4.5.10 Estudo da Estabilidade das Nanopartículas

As amostras de AgNPs e AuNPs e suas associações foram armazenadas ao abrigo da luz e sob refrigeração a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e analisadas por espectroscopia UV-Vis no dia da síntese, em 30 dias, em 180 dias e em 365 dias.

4.5.11 Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Radical Livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

A atividade antioxidante das amostras foi mensurada utilizando o método descrito por Pires *et al.* (2017) e Furlan *et al.* (2015), com algumas modificações. O ensaio DPPH foi realizado em microplacas plásticas com 96 poços. Sendo para isso preparada solução a $32 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL}$ de DPPH em metanol, e $180 \text{ } \mu\text{L}$ desta solução foram adicionados a $20 \text{ } \mu\text{L}$ da solução de todas as amostras nas seguintes concentrações para as AgNPsPE, AgNPsPEG e AgNPsPEG-AH ($5,4 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL}$; $2,7 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL}$; $1,35 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL}$; $0,675 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL}$ e $0,3375 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL}$) e, para as AuNPsPE, AuNPsPEG e AuNPsPEG-AH ($9,85 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL}$; $4,925 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL}$; $2,463 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL}$; $1,232 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL}$ e $0,616 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL}$). As misturas foram incubadas no escuro e em temperatura ambiente a $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. A leitura foi efetuada em escala de absorbância a 517 nm no leitor de microplaca Synergy H1-Hybrid Reader (Biotek). Foram preparadas soluções de ácido ascórbico nas mesmas concentrações das amostras e este foi utilizado como controle positivo (padrão), metanol foi utilizado como branco do controle DPPH e para cada concentração de cada uma das amostras foi realizada uma leitura de fundo branco, para assim evitar as interferências das colorações das nanopartículas.

biossintetizadas. Os valores de absorbância usados nos cálculos foram corrigidos, considerando-se seus respectivos brancos. As determinações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão (DP).

Equação 1 – Cálculo da porcentagem de atividade antioxidante (% AAO)

$$\% \text{ AAO} = \left(\frac{\text{Abs. Controle DPPH} - \text{Abs. Amostra}}{\text{Abs. Controle DPPH}} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

Para o cálculo do CI_{50} , concentração inibitória ou (*inhibitory concentration*), que representa a concentração efetiva de substância antioxidante que induz metade (50 %) do efeito máximo, foi utilizada a equação da reta, substituindo o valor de y por 50 %, para a obtenção da concentração da amostra com capacidade de reduzir 50 % da concentração de DPPH adotada.

4.5.12 Determinação da Atividade Hemolítica

A determinação da atividade hemolítica *in vitro* das AgNPsPE, AgNPsPEG, AgNPsPEGAH e das AuNPsPE, AuNPsPEG e AuNPsPEGAH foi realizado conforme Chen *et al.* (2015), Mendes *et al.* (2012) e Brasil (2010) com algumas modificações. Para este ensaio utilizamos amostra de sangue de carneiro desfibrinado – NewProv, com o qual foi preparado uma suspensão de eritrócitos a 5 % em uma solução de tampão fosfato (NaCl 150 mmol/L, KH_2PO_4 0,58 mmol/L e Na_2HPO_4 3,4 mmol/L, pH 7,4). Em seguida, foram adicionados 450 μL da suspensão de eritrócitos a 5 % a 10 μL de cada amostra preparada nas seguintes concentrações para as AgNPsPE, AgNPsPEG e AgNPsPEG-AH (5,4 $\mu\text{g/mL}$; 2,7 $\mu\text{g/mL}$; 1,35 $\mu\text{g/mL}$; 0,675 $\mu\text{g/mL}$ e 0,337 $\mu\text{g/mL}$) e, para as AuNPsPE, AuNPsPEG e AuNPsPEG-AH (9,85 $\mu\text{g/mL}$; 4,925 $\mu\text{g/mL}$; 2,463 $\mu\text{g/mL}$; 1,232 $\mu\text{g/mL}$ e 0,616 $\mu\text{g/mL}$) e de 40 μL de solução tampão fosfato pH 7,4. Para o controle positivo foi adicionado à suspensão de eritrócitos 5 % água ultrapura que leva a 100 % de lise pois causa hemólise completa devido à osmose (BANERJEE *et al.*, 2008; SELVAKUMAR *et al.*, 2018) e como controle negativo foi usado solução tampão fosfato pH 7,4 que foi adicionada à suspensão de eritrócitos a 5 % e considerado como 0 % de hemólise.

Os tubos foram homogeneizados e incubados por 24 horas a temperatura de 37 °C. Decorrido este tempo, as amostras foram centrifugadas a 4000 RPM por 5 minutos em centrífuga Hermle Labortechnik GmbH – Z 326 K, Germany. Em

microplacas de 96 poços foram adicionados 200 µL do sobrenadante de cada amostra e realizada a leitura de suas absorvâncias em 540 nm em um leitor de microplacas Synergy H1 Hybrid Reader – Biotek. As absorvâncias foram anotadas e a porcentagem de hemólise dos eritrócitos foi calculada de acordo com a equação 2. O teste foi realizado em triplicata e os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão (DP).

Equação 2 – Cálculo da porcentagem de hemólise dos eritrócitos

$$\% \text{ De Hemólise} = \left(\frac{\text{Abs. Amostra} - \text{Abs. Controle Negativo}}{\text{Abs. Controle Positivo} - \text{Abs. Controle Negativo}} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

4.5.13 Ensaio de Toxicidade com Náuplios de *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* L. (Artemiidae) foi realizado através da adaptação da metodologia de Meyer *et al.* (1982). Preparou-se uma solução com sal marinho na concentração de 30 g/L. O pH foi ajustado para ficar entre 8,0 e 9,0, por meio de uma solução de NaOH 0,1 mmol/L. Os ovos de *A. salina*, aproximadamente 80 mg, foram colocados para eclodir na solução salina, em um aquário por 48 horas, com aeração constante e temperatura controlada de 25 °C. Após 48 horas, dez larvas de *A. salina* foram transferidas com auxílio de uma micropipeta para tubos de ensaio contendo a solução salina e as amostras a serem testadas em diferentes concentrações. Para as amostras de AgNPs-PE, AgNPS-PEG, AgNPs-PEG-AH as concentrações usadas foram 86,4 µg/mL, 43,2 µg/mL, 21,6 µg/mL e 10,8 µg/mL; as concentrações testadas para as de AuNPs-PE, AuNPs-PEG, AuNPs-PEG-AH2 foram 156,8 µg/mL, 78,4 µg/mL, 39,2 µg/mL, 19,6 µg/mL e para o EAPE as concentrações testadas 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL e 31,25 µg/mL. Também foram testados AgNO₃ 1 mmol/L, HAuCl₄ 1 mmol/L; a solução salina foi utilizada como controle negativo. O ensaio foi realizado em triplicata. Os tubos foram mantidos por 48 horas em temperatura e iluminação ambientes e protegidos de poeira e insetos. Decorrido o tempo o número de náuplios mortos em cada tudo foram contados e a mortalidade foi calculada em porcentagem, conforme Equação 3 (ANTONYSAMY; THANGIAH; IRULAPPAN, 2015).

Equação 3 – Cálculo da porcentagem de mortalidade dos náuplios de *Artemia salina*

$$\% \text{ De Mortalidade} = \left(\frac{\text{N}^{\circ} \text{ de Náuplios Mortos}}{\text{N}^{\circ} \text{ Total de Náuplios}} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

4.5.14 Avaliação da Atividade Antimicrobiana pelo Método da Microdiluição em Caldo

As suspensões bacterianas foram preparadas adicionando-se algumas colônias do microrganismo à solução de salina estéril, até atingir turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida foi realizada a leitura em um espectrofotômetro BTS-330 (Byosystems) em 590 nm para confirmação da concentração. Todos os ensaios foram realizados em triplicata utilizando bactérias relevantes na área da saúde, foram testadas cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* RG (Resistente à Gentamicina), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Proteus mirabilis* ATCC 29906, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Candida albicans* ATCC 10231. O teste de microdiluição foi realizado em placas de 96 poços de acordo com o protocolo M7-A6 do NCCLS (2003) adaptado, utilizando 100 µL de caldo BHI (brain heart infusion). Foram utilizadas 100 µL da suspensão de AgNPs-PE e suas associações que foram filtradas com filtro 0,22 µm. As concentrações testadas foram 5,4 µg/mL; 2,7 µg/mL; 1,35 µg/mL; 0,675 µg/mL e 0,337 µg/mL, levando em consideração a concentração de prata utilizada no preparo das nanopartículas. As AgNPs-PEG e AgNPs-PEG-AH2 foram testadas nas mesmas concentrações acima, em relação à massa da prata e nas concentrações: 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml e 6,25 µg/ml, referentes à concentração de gentamicina associada à AgNPs-PE. Para a comparação foi testada uma solução de sulfato de gentamicina nas concentrações de 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml e 125 µg/ml e 62,5 µg/ml, também foi testada uma solução da AgNO₃ a 1 mmol/L na concentração de 170 µg/ml. Para a avaliação da atividade antimicrobiana das AuNPs-PE e suas associações todas as condições foram as mesmas, somente foram alteradas as concentrações das NPs para 9,85 µg/mL; 4,925 µg/mL; 2,463 µg/mL; 1,232 µg/mL e 0,616 µg/mL porque foi levado em consideração a concentração de ouro utilizada no preparo das nanopartículas, também foi testada uma solução da HAuCl₄ a 1 mmol/L na concentração de 340 µg/ml. Em seguida, foram adicionados 10 µL da suspensão

de microrganismos inoculada em salina com concentração final de aproximadamente 1×10^5 UFC/mL. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. Após as 24 horas, para confirmação de microrganismos viáveis em concentrações não inibitórias, foram utilizados 15 µL do corante cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 1 % e aguardado 30 minutos em estufa a 35 °C. A concentração bactericida mínima (CBM) foi obtida semeando o conteúdo dos poços, que não apresentaram coloração, em ágar Mueller-Hilton. Após a semeadura, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas para visualização do crescimento ou não.

4.5.15 Análise da Viabilidade Celular

Geralmente, a viabilidade celular é definida como a porcentagem de células vivas em relação ao total de células testadas. É um dos métodos mais comumente usados na análise de cito ou genotoxicidade sob diferentes tipos de substâncias químicas, físicas ou fatores ambientais (KWOLEK-MIREK; ZADRAG-TECZA, 2014).

4.5.15.1 Linhagens celulares

4.5.15.1.1 Fibroblastos 3T3

As células 3T3 são provenientes de uma linhagem celular estabelecida em 1962 por dois cientistas - George Todaro e Howard Green - do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Nova York. Todaro e Green obtiveram as células 3T3 de tecido de embrião de camundongo suíço albino e, é considerada uma linhagem de fibroblastos padrão, com características de célula normal. A designação “3T3” se refere ao fato de que esta linhagem celular cresceu originalmente em uma concentração de 3×10^5 células por cm^2 (primeiro “3”), com um intervalo de transferência (“T”) de 3 dias (segundo “3”) (ATCC, 2020; ABREU, 2008; TODARO; GREEN, 1963). Os fibroblastos 3T3 utilizados nessa pesquisa foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Patrícia Mathias Doll Boscardin (UEPG), oriundas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

4.5.15.1.2 Células A549

E as células A549 são derivadas de carcinoma humano do epitélio de pulmão. Esta linhagem foi iniciada em 1972 por D.J. Giard *et al.*, através de cultura de explante de tecido carcinomatoso pulmonar de um homem caucasiano de 58 anos. Elas têm sido o modelo celular de escolha para experimentos de laboratório em áreas de doenças como câncer de pulmão, asma e síndrome do choque tóxico e são ferramentas essenciais para avaliar a toxicologia de compostos exógenos e a eficácia de muitos medicamentos (ATCC, 2020; BAGWELL *et al.*, 2014; FOLDBJERG; DANG; AUTRUP, 2011). As células A549 utilizadas nessa pesquisa foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Carla Cristine Kanunfre (UEPG), oriundas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

4.5.15.2 Cultura celular

As linhagens celulares de fibroblastos 3T3 e as células A549 foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 34 mmol/L de bicarbonato de sódio, 10.000 UI de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina; sendo que o meio DMEM para as células A549 também foi suplementado com 3,5 g/L de glicose. As células foram mantidas a 37 °C em estufa umidificada com 5 % de CO₂.

Os meios de cultura foram trocados a cada 2 dias. Após a monocamada celular atingir confluência o meio foi retirado e as células foram incubadas por 15 minutos com 3 mL de tripsina a 0,25 % para o desprendimento das mesmas. Após as células serem destacadas do fundo da garrafa foi adicionado 7 mL de meio DMEM. Foram retirados 20 µL da suspensão celular e acrescentados 20 µL de azul de Tripán e realizada a contagem das células em câmara de Neubauer para determinação da proporção de células por poço.

4.5.15.3 Ensaio de viabilidade celular por meio da redução do MTT

Esse ensaio determina a capacidade das células reduzirem o sal solúvel ou brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio(MTT), formando cristais insolúveis de coloração violeta, denominados cristais de formazan. É uma reação de cor para medida do número de células viáveis, e está baseado na capacidade de células metabolicamente ativas reduzirem, no meio intracelular, o sal

solúvel de tetrazólio a cristais insolúveis de formazan de coloração violeta, que após serem solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) podem ser lidos por espectrofotometria (MOSMANN, 1983).

Para avaliar a viabilidade celular do EAPE, das AgNPs-PE e das AuNPs-PE e suas associações, 100 µL de meio DMEM contendo os fibroblastos 3T3 ou as células A549 foram semeadas na concentração de 1×10^5 células/mL em placas de 96 poços e incubadas em estufa umidificada a 37 °C com atmosfera a 5 % de CO₂. Após 24 horas o meio foi retirado dos poços e foram adicionados 200 µL de meio de cultura com diferentes concentrações das amostras analisadas. Para o EAPE as concentrações utilizadas foram 0,616 µg/mL; 1,232 µg/mL; 2,463 µg/mL; 4,925 µg/mL; 9,8 µg/mL; 31,25 µg/mL; 62,5 µg/mL; 125 µg/mL; 250 µg/mL; 500 µg/mL e 1000 µg/mL. Para as AgNPs e suas associações as concentrações testadas foram 0,337 µg/mL; 0,675 µg/mL; 1,35 µg/mL; 2,7 µg/mL; 5,4 µg/mL; 10,8 µg/mL e 21,6 µg/mL e, para as AuNPs e suas associações as concentrações analisadas foram 0,616 µg/mL; 1,232 µg/mL; 2,463 µg/mL; 4,925 µg/mL; 9,8 µg/mL; 19,6 µg/mL; 39,2 µg/mL. Foram utilizados 200 µL de meio DMEM como controle negativo. As amostras foram incubadas por 24 horas em estufa umidificada a 37 °C com atmosfera a 5 % de CO₂.

Decorrido o tempo de incubação, o sobrenadante foi descartado e foi preparada uma solução de MTT 0,5 mg/mL em meio DMEM. Em seguida foram adicionados em cada poço 200 µL desta solução. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa umidificada com 5 % de CO₂ por uma hora, até a observação da formação dos cristais de formazan. Novamente o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 µL de dimetilsulfóxido – DMSO para solubilização dos cristais formados. A leitura da absorvância foi feita em espectrofotômetro, com leitor de microplacas (BIO TEK), utilizando o comprimento de onda de 570 nm. Para o cálculo da viabilidade celular (%) foi utilizada a equação 4.

Equação 4 – Cálculo da porcentagem de viabilidade celular pelo método de redução do MTT

$$\% \text{ De Viabilidade Celular} = \left(\frac{\text{Abs. Média Amostra}}{\text{Abs. Média Controle}} \right) \cdot 100 \quad (4)$$

4.5.16 Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* foram analisados pela diferença de significância estatística experimental utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de Dunnett. O nível de significância estatística foi de $p < 0,05$. Os dados foram analisados usando o software Graph Pad Prism 7.0 (San Diego, CA, EUA). Os ensaios foram realizados em triplicata com exceção da viabilidade celular cque foi realizada em sextuplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TRIAGEM FITOQUÍMICA

Os resultados da análise fitoquímica qualitativa do *P. emarginatus* estão elencados na Tabela 1. Foi possível verificar a presença de compostos do metabolismo secundário encontrados, por outros autores, em diversos tipos de extratos de *P. emarginatus* ou mesmo do gênero *Pterodon*. Autores como Dutra (2008), Hoscheid e Cardoso (2015) e Rocha e Kaplan (2006) em suas pesquisas com o gênero *Pterodon* demonstraram uma composição semelhante à encontrada neste trabalho.

Tabela 1 – Identificação de grupos de substâncias do metabolismo secundário presentes no extrato aquoso a 2,5 % de *Pterodon emarginatus* Vogel

Classes de Substâncias	Ação farmacológica	Reações químicas	Resultados
Alcalóides		Draggendorf, Mayer e Bouchardat	-
Flavonoides (isoflavonoides)	Antitumoral	Reação de Taubouk	+
Família Fabaceae	Anti-inflamatório	Reação de Pew	+
	Antioxidante	NaOH 1 N	+
	Antiviral	HCl concentrado	+
Heterosídeos cardiotônicos	Insuficiência	Liebermann-Buchard	+
	Cardíaca	Keller-Killiani	+
	Congestiva	Kedde	+
		Pesez	+
Saponinas		Reação geral	-
Taninos (proantocianidinas)	Anti-inflamatório	Acetato básico de chumbo	+
	Bactericida	Cloreto férrico	+
	Fungicida	Acetato ácido de chumbo	+
		Gelatina	+

Fonte: A autora.

Nota: - negativo; + positivo

Plantas fotossintéticas, contêm uma complexa rede biológica de metabólitos antioxidantes e enzimas que trabalham coletivamente para evitar danos oxidativos aos componentes celulares. Os extratos vegetais das várias partes das plantas, como folha, tubérculo, casca, brotos, frutos e sementes contêm biomoléculas, incluindo polifenóis, flavonoides, ácido ascórbico, esteróis, triterpenos, alcaloides, compostos alcoólicos, saponinas, polissacarídeos, glicose, frutose, proteínas e enzimas, que

podem atuar como redutores de metais levando à formação de NPs e fornecendo tenacidade em relação à aglomeração das nanopartículas formadas (ALJABALI, *et al.*, 2018; ARUNACHALAM *et al.*, 2014).

Devido à sua atividade metabólica secundária, os vegetais superiores são capazes de produzir substâncias antibióticas utilizadas como mecanismo de defesa contra predação por microrganismos, insetos e herbívoros. As propriedades antimicrobianas dessas substâncias também são reconhecidas empiricamente há séculos e estão sendo comprovadas cientificamente apenas recentemente. Estudos sobre as atividades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de plantas nativas têm sido relatados em muitos países, inclusive no Brasil, o qual possui flora diversificada e rica tradição na utilização de plantas medicinais como antibacteriano, antifúngico, anti-inflamatório, entre outros (FERREIRA; DANTAS; CATÃO, 2014).

Os metabólitos secundários podem ser classificados com base na sua estrutura química (p.ex. possuir anel, com ou sem unidades de açúcar), composição (p.ex. conter ou não nitrogênio), a via pela qual é biossintetizado, origem da planta ou sua solubilidade em vários solventes. Uma classificação simples inclui três grupos principais: 1. Terpenoides (originários da via do mevalonato, compostos quase que inteiramente de carbono e hidrogênio). 2. Fenólicos (originários de açúcares simples, contendo anéis benzênicos, hidrogênio e oxigênio). 3. Compostos contendo nitrogênio ou também contendo enxofre (KIATKOSKI, 2011).

A pesquisa fitoquímica tem como objetivo conhecer os compostos químicos das espécies vegetais e avaliar sua presença nos mesmos, identificando grupos de metabólitos secundários relevantes úteis enquanto marcadores químicos no monitoramento das plantas medicinais em processo de domesticação na qualidade da matéria prima medicinal e na prospecção da biodiversidade ou bioprospecção. A composição química de um extrato pode ser conhecida inicialmente através de testes químicos qualitativos rápidos e de baixo custo, que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característicos, sugerindo a presença de possíveis classes de metabólitos secundários de interesse (BESSA *et al.*, 2013; KIATKOSKI, 2011; SACCARO JÚNIOR, 2011).

Para a pesquisa de metabólitos em plantas que são utilizadas como chás, a extração é com água quente e o extrato aquoso deve ser, o mais rápido possível, remetido para os testes, a fim de evitar-se o desenvolvimento de fungos ou a degradação de substâncias pela ação da água. Pode-se evitar estes contratempos

conservando-se o extrato sob refrigeração por um curto período em atmosfera estéril, evaporando-o sob pressão reduzida ou procedendo-se à liofilização após congelamento, sendo este o método de escolha, quando possível (BARBOSA, 2004).

O precipitado na cor verde na pesquisa de taninos é característico de taninos condensados também denominados de proantocianidinas. As plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversas doenças, como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, azia, náusea, gastrite e úlcera gástrica, problemas renais, do sistema urinário, processos inflamatórios em geral, atividade bactericida e fungicida (SIMÕES *et al.*, 2004).

Essas atividades farmacológicas são devidas às características gerais comuns em maior ou menor grau aos dois grupos de taninos, condensados e hidrolisáveis, são elas: 1- complexação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, entre outros); 2- atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e; 3- habilidade de complexar com outras incluindo macromoléculas como proteínas e polissacarídeos (SIMÕES *et al.*, 2004).

Os flavonoides possuem importância farmacológica como por exemplo, antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, entre outras. Os isoflavonoides, ao contrário das outras classes de flavonoides, possuem sua distribuição taxonômica restrita à família Fabaceae, salvo raríssimas exceções. As três propriedades biológicas mais importantes dos isoflavonóides são: atividade estrogênica das isoflavonas e cumestanos, atividades antifúngicas e antibacterianas (fitoalexinas) dos isoflavonoides e as propriedades inseticidas dos rotenoides. Quando encontrados nas folhas podem ser diferentes daqueles presentes nas flores, nos caules ou ramos, raízes ou frutos. (SIMÕES *et al.*, 2004). Os flavonoides na forma de heterosídeos são constituintes com caráter polar, por isso a extração é mais eficaz com solventes polares (DUTRA, 2008).

Os heterosídeos cardiotônicos são caracterizados por sua alta especificidade e poderosa ação que exercem no músculo cardíaco, é a classe de medicamento de eleição para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva (SIMÕES *et al.*, 2004).

Jafarizad *et al.* (2015) como também Mendes (2015) em suas pesquisas com extratos vegetais e nanopartículas metálicas citam que os taninos, flavonoides e ácidos fenólicos encontrados em seus extratos por possuírem grupos funcionais como hidroxil atuam como agentes redutores e, também anéis benzílicos e grupos carboxila agem como agentes estabilizadores.

Também Katas *et al.* (2019) cita que extratos de cogumelos contêm constituintes como terpenóides, taninos, polissacarídeos, carboidratos, fenólicos compostos e flavonóides podem potencialmente reduzir agentes na biossíntese de nanopartículas metálicas.

Foi relatado que a formação de NPs por polióis é devido à oxidação dos compostos hidrossolúveis com participação aparente do hidrogênio de seus grupos hidroxila. O tamanho da partícula é controlado *in situ* por alguns polifenóis presentes nos extratos vegetais que atuam como agentes naturais de cobertura. A síntese de NPS usando extratos de plantas é mais vantajosa do que a síntese química, por simples, fácil de usar, econômica e com menos tempo de reação (ARUNACHALAM, *et al.*, 2014).

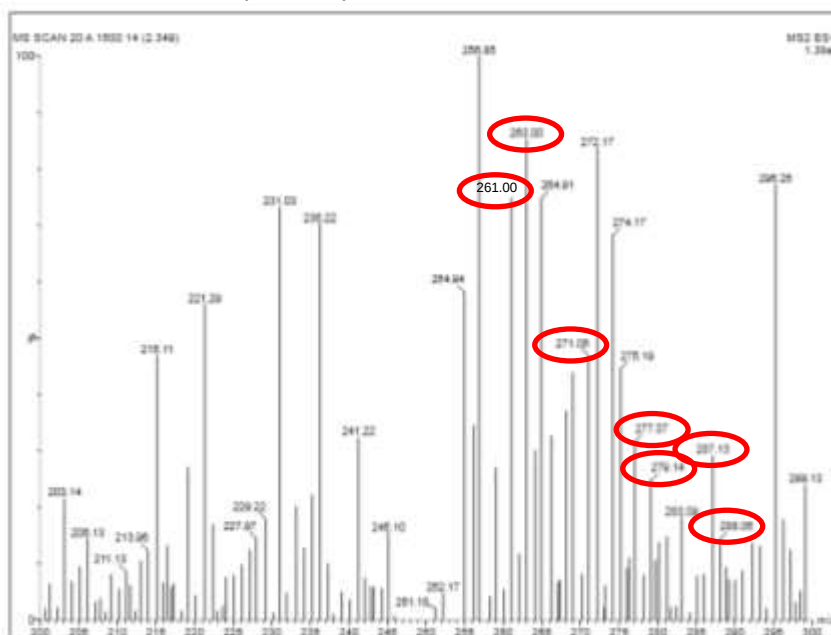
Satyavani *et al.* (2011) relataram a formação de pequenas NPs cobertas com polifenóis por extrato foliar de *Citrullus colocynthis*.

Além de todas as atividades terapêuticas citadas, o *P. emarginatus*, apresenta grande potencial como agente redutor na síntese verde de AgNPs e AuNPs, devido ampla variedade de metabólitos com potenciais redox em sua composição.

5.2 ANÁLISE QUALITATIVA DO EAPE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR ELECTROSPRAY (EM-IE)

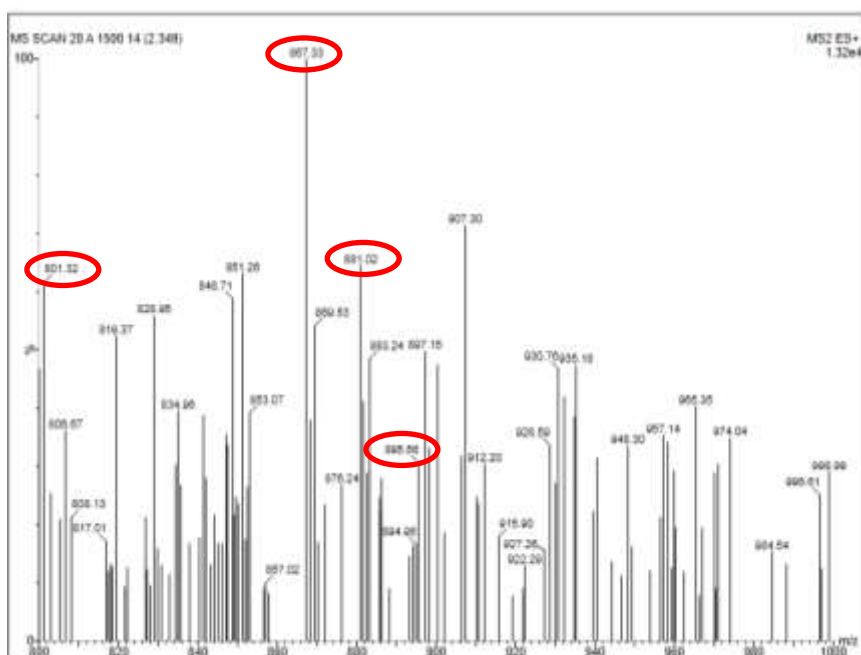
Os compostos detectados no EAPE foram caracterizados experimentalmente por meio de dados de EM, juntamente com a interpretação dos espectros de EM / EM observados com aqueles encontrados na literatura. Os fitoquímicos anteriormente identificados da mesma família botânica ou espécie também foram utilizados na identificação quando aplicável (Figuras 11 e 12).

Figura 11 – EM-IE no modo de íon positivo para o EAPE de 200 m/z a 300 m/z e compostos sugeridos



Fonte: A autora.

Figura 12 – EM-IE no modo de íon positivo para o EAPE de 800 m/z a 900 m/z e compostos sugeridos



Fonte: A autora.

O espectrômetro de massa é considerado um instrumento padrão em laboratório analítico para caracterizar estruturalmente e calcular os valores m/z dos compostos conhecidos e desconhecidos presentes em amostras de plantas. A análise qualitativa é feita calculando a massa e suas informações estruturais relevantes, as massas moleculares de biomoléculas grandes podem ser determinadas com uma precisão de 0,01 % da massa molecular total da amostra por este método. A amostra

fica ionizada quando introduzida no espectrômetro de massa e a massa molecular do composto de interesse é calculada com base na razão m/z . Os padrões de fragmentação dos íons são determinados principalmente por ionização por electrospray (IE) (ABRANKÓ; GARCÍA-REYES; MOLINA-DÍAZ, 2011; BONTA, 2017; DINIZ, 2011).

A IE é o método de escolha na análise de produtos naturais, é uma técnica de ionização suave capaz de produzir pequenos padrões de fragmentação por meio de energia elétrica, que permitem que os íons sejam transferidos da fase líquida para a fase gasosa antes de serem analisados no espectrômetro de massa. Os modos de ionização positivo e negativo são usados na análise de produtos naturais. É um dos métodos de ionização bem-sucedidos usados para coletar informações sobre os padrões de fragmentação de metabólitos secundários de plantas, principalmente flavonoides (ABRANKÓ; GARCÍA-REYES; MOLINA-DÍAZ, 2011; BONTA, 2017; DINIZ, 2011).

Na análise qualitativa do EAPE alguns constituintes encontrados foram sugeridos com base nos espectros de EM-IE no modo de ionização positivo de acordo com literatura consultada, citados na Tabela 2.

Tabela 2 – Alguns compostos encontrados na análise qualitativa por EM-IE no modo de ionização positiva no extrato aquoso de *Pterodon emarginatus* Vogel

Composto sugerido	[M+H] ⁺ (m/z)	Fitoquímico	Referência
Ácido moróctico = Ácido estearidônico	277	Ácido graxo ômega 3	ABU-REIDAH <i>et al.</i> , 2015
Apigenina-6-C-glicosídeo-8-C-arabinosídeo (schaftoside)	443	Flavona	NEGRI; MATTEI; MENDES, 2014
Criseoeriol-8-C-glucosil-2-O-glucuronídeo-6-C-arabinosídeo	545	Flavona	NEGRI; MATTEI; MENDES, 2014
Digalato de procianidina (tipo B) dímero	881	Tanino condensado	ROCKENBACH <i>et al.</i> , 2012
Galoil pirogalol	279	Tanino hidrolisável	ABU-REIDAH <i>et al.</i> , 2015
Geranilgeraniol	288	Diterpeno	GRANDO <i>et al.</i> , 2017
Ginsenoside Rf	801	Triterpenoide	TSUGAWA <i>et al.</i> , 2019
Kaempferol	287	Flavonol	ROUTABOUL <i>et al.</i> , 2006
Mangiferina	261	Heterosídeo xantônico	ABU-REIDAH <i>et al.</i> , 2015
O-galoil norbergenina (isômero)	467	Tanino hidrolisável	ABU-REIDAH <i>et al.</i> , 2015
O-metil ésteres de davidigenina	271	Flavanona	ABU-REIDAH <i>et al.</i> , 2015
Procianidina (trímero)	867	Tanino condensado	ROUTABOUL <i>et al.</i> , 2006
Quercetina-ramnosídeo (dímero)	895	Flavonol	ROUTABOUL <i>et al.</i> , 2006

Fonte: A autora.

Nessa pesquisa procurou-se através da análise qualitativa, do EAPE, por EM-IE encontrar compostos citados na literatura como constituintes do gênero, da espécie aqui estudada.

De acordo com Abrankó, García-Reyes e Molina-Díaz (2011) a análise qualitativa de flavonoides representa uma tarefa difícil, uma vez que esses compostos são encontrados, conjugados, em plantas e alimentos de origem vegetal. Portanto, o diversificado grupo de flavonoides agliconas combinadas com glicosilação em vários locais com uma variedade de sacarídeos diferentes e acilação adicional dos sacarídeos produzem um grupo extremamente diverso de mais de 5 mil compostos quimicamente distinguíveis. Nesta diversidade de flavonoides, mesmo as mais complexas estruturas podem ser consideradas uma molécula construída de subunidades (como partes de açúcar e vários ácidos orgânicos). Em métodos de criação de perfil baseados em MS, esta característica dos flavonoides é utilizada na estratégia analítica. Um protocolo amplamente aplicado é realizar experimentos de EM no modo de íons $[M + H]^+$ ou $[M - H]^-$ e, com base no açúcar típico ou outra subunidade típica do flavonoide glicoconjugado, o analista pode propor uma estrutura provisória do flavonoide sob investigação.

Em resumo, a EM-IE é um método simples e robusto para a análise qualitativa de constituintes químicos, podendo ser empregada para a triagem rápida de compostos alvos, como também para identificação química e controle de qualidade (YE *et al.*, 2012).

Os flavonoides, de acordo com Behling *et al.* (2004) são uma classe de compostos naturais de considerável interesse científico e terapêutico que possuem estrutura fenólica variável e, podem ocorrer como agliconas, glicosídeos ou como parte de outras estruturas que contenham flavonoides, como as flavolignanas, porém frequentemente ocorrem como glicosídeos. Eles podem ser subdivididos em 13 classes, as subclasses dos flavonoides são: calconas, dihidrocalconas, auronas, flavonas (apigenina, luteolina, diosmetina), flavonois (quercetina, miracetina, kaempferol), dihidroflavonol, flavanonas (naringina, hesperidina), flavanol, flavandiol, antocianidina, isoflavonoides (genisteína, daizdeína), bioflavonoides e proantocianinas.

Todas as plantas contêm ubiquamente um grupo de compostos químicos chamados de flavonoides que possuem ação antimicrobiana contra uma variedade de

bactérias, fungos e vírus. Flavonoides, como flavonas, isoflavona, isoflavonona, glicosídeos de flavona, quercetina, glicosídeos de quercetina, kaempferol, chalconas, apigenina, galangina, soforaflavanona G, e seus derivados são conhecidos por terem atividade contra uma variedade de patógenos bacterianos, como *E. coli*, *S. aureus* e *S. typhi* (VO *et al.*, 2019).

Na pesquisa de Grando *et al.* (2017) foi constatada a presença de geranilgeraniol na composição do extrato diclorometano do fruto de *P. pubescens*, este constituinte também foi encontrado no extrato aquoso da semente de *P. emarginatus*. Estes autores verificaram que a presença de geranilgeraniol pode atuar na redução da dor neurogênica induzida por estímulos de substâncias químicas como a formalina e também na intensidade da atividade anti-inflamatória sob mecanismos edematogênicos. Além disso, avaliaram se o extrato poderia ser ativo em um modelo de artrite em ratos induzida por adjuvante por ser amplamente aceito como um modelo experimental apropriado para triagem de potenciais fármacos antirreumático, pela presença de geranilgeraniol foi demonstrada a eficácia, diminuindo a alodinia e o inchaço da pata quando comparado com seu grupo controle, de uma forma dependente da dose.

No estudo de Negri, Mattei e Mendes (2014) que pesquisaram compostos extraídos do extrato etanólico de *P. emarginatus*, verificaram que atividade antinoceptiva pode ser atribuída aos derivados de flavonas e hederagina. Ainda os mesmos autores citam que vários flavonoides e outros compostos fenólicos têm sido descritos como agentes antioxidantes, analgésicos e anti-inflamatórios; como o schaftoside e a luteolina encontrados neste trabalho.

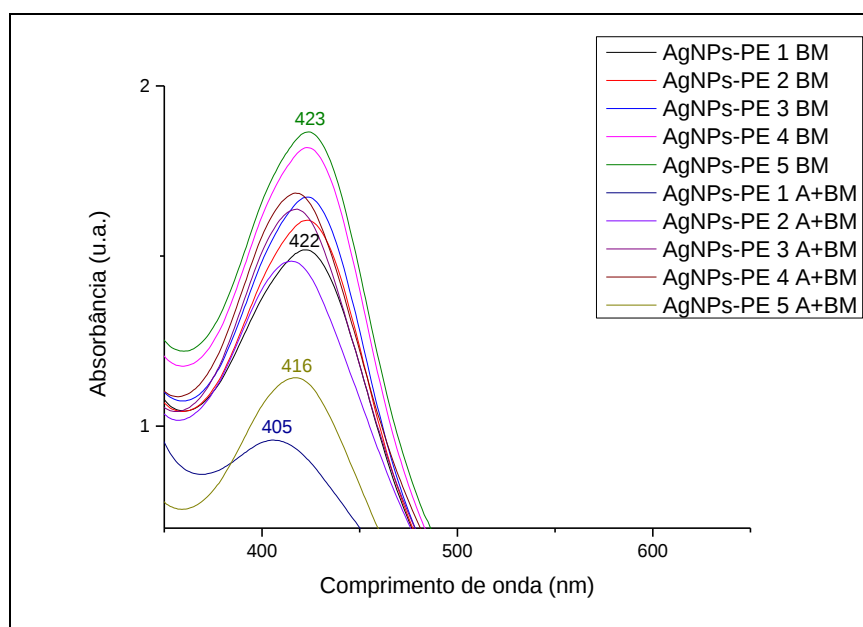
A análise relatada nesta pesquisa forneceu um perfil abrangente do EAPE, o qual apresentou uma quantidade grande de compostos sintetizados por este extrato. Desta forma foi aberta a oportunidade futura para a identificação e quantificação dos compostos que não foram pesquisados neste momento.

Os resultados aqui encontrados corroboram com o uso tradicional da espécie, de acordo com os metabólitos secundários que são utilizados como analgésico, anti-inflamatório e também antioxidante.

5.3 SÍNTESE DAS AgNPs POR MEIO DO EXTRATO AQUOSO DE *Pterodon emarginatus* Vogel (AgNPs-PE)

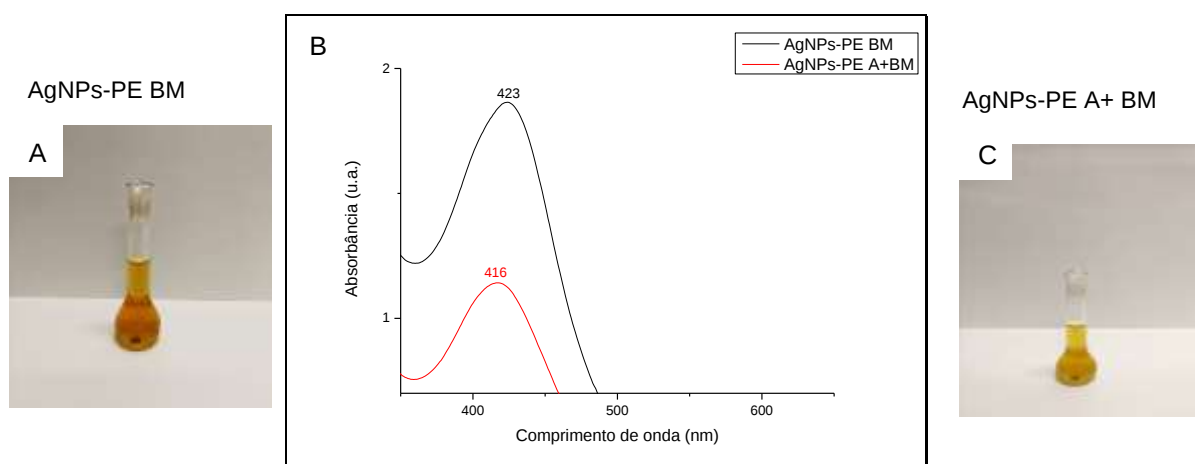
Foi utilizada a técnica de espectroscopia UV-Vis, para confirmar a formação de AgNPs, através da observação das bandas características de SPR das AgNPs na região do visível, que varia conforme o tamanho e a forma das NPs sintetizadas, conforme Figuras 13 e 14 (KHARAT, MENDHULKAR, 2016; MENDES, 2015).

Figura 13 – Espectros UV-Vis de AgNPs-PE BM 60-70 °C e de AgNPs-PE A + BM 60-70 °C com leituras a cada 10 minutos até completa redução



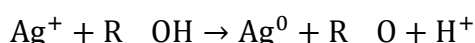
Fonte: A autora.

Figura 14 – Comparativo entre as absorvâncias (B) e a coloração das AgNPs-PE BM (A) e das AgNPs-PE A + BM (C)



Fonte: A autora.

A formação das AgNPs foi observada pela mudança na cor passando de amarelo palha para castanho, o que se deve à redução do sal metálico (AgNO_3) pelas biomoléculas presentes no EAPE, pelo efeito plasmônico de superfície apresentado pelas nanopartículas de prata quando expostas a luz visível (KHAN *et al.*, 2016; KATVA *et al.*, 2017). Acredita-se que pelo EAPE possuir compostos fenólicos e de acordo com Lee. *et al.* (2019), os grupos hidroxila abundantes e disponíveis nestes compostos promoveram a biorredução da Ag^+ pela oxidação das hidroxilas, que pode ser representado da seguinte forma:



As NPs obtidas através da redução por extratos de plantas são na sua maioria esféricas, mas através de outros agentes químicos podem apresentar formatos variados como cubos, triângulos, bastões e até dendritos (SENA *et al.*, 2019).

As análises de Uv-Vis nos diferentes tempos de leitura (0 a 50 minutos) bem como com utilização de banho maria e agitação (A+BM) e somente banho maria (BM) mostraram, pequenas, mas diferentes intensidades de absorbância obtidas através do extrato aquoso das sementes de *P. emarginatus*.

A maior absorção em UV-Vis, para as NPs tratadas com aquecimento no banho maria, sem agitação (AgNPs-PE BM) foi em 423 nm e para as NPs tratadas com agitação e aquecimento (AgNPs-PE A+BM) foi em 416 nm, no tempo de 50 minutos, como mostram as figuras 13 e 14. Esses comprimentos de onda estão de acordo com Oliveira (2018) que encontrou resultados entre 400-425 AgNPs de extrato aquoso de folhas de *P. emarginatus*.

De acordo com Solomon *et al.* (2007) a espectroscopia no comprimento de onda de 420 nm a 435 nm condiz com AgNPs de tamanho em torno de 35 nm a 50 nm e no comprimento de onda de 438 nm a 450 nm as AgNPs possuem tamanho entre 60 nm a 80 nm.

O pico único, observado também por Khan *et al.* (2016), é indicativo de morfologia regular e nano-suspensão estabilizada. Os mesmos autores ainda sugerem que o espectro de absorção de UV-Vis na faixa de comprimento de onda entre 400 nm e 530 nm corresponde à morfologia esférica de AgNPs, tais características foram encontradas nesta pesquisa.

Tem-se conhecimento de que a largura das bandas está relacionada com a distribuição dos tamanhos das NPs, enquanto o comprimento de onda máximo da

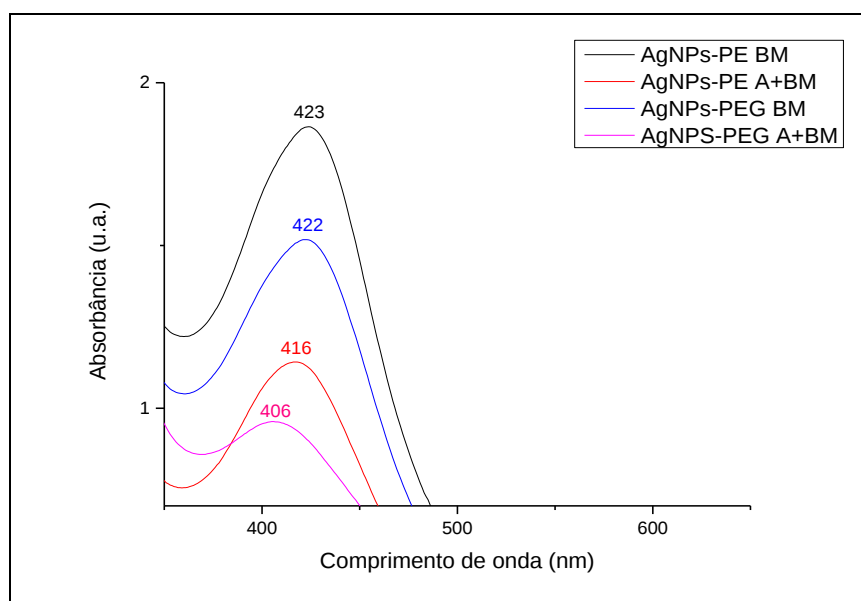
banda SPR está relacionado com o tamanho médio das NPs, sendo que comprimentos de onda maiores são indicativos de NPs maiores (MENDES, 2015).

Os resultados obtidos na síntese das AgNPs-PE BM e das AgNPs-PE A+BM indicam a formação de nanopartículas de tamanhos homogêneos e, estão dentro dos comprimentos de onda citados por Ashraf *et al.* (2016) e Lee *et al.* (2019) que dizem que a ressonância plasmônica de superfície para a prata ocorre entre 400 nm e 500 nm. E, de acordo com Sena *et al.* (2019) este padrão de curva monomodal evidencia a obtenção das nanopartículas em formato esférico e, conforme Mendes (2015) com uniformidade de tamanho.

5.3.1 Associação das AgNPs-PE com sulfato de gentamicina (AgNPs-PEG)

As AgNPs-PE quando associadas à gentamicina e preparadas com aquecimento (AgNPs-PEG BM), apresentaram um pico de absorção em 422 nm, bastante próximo ao pico de absorção das AgNPs-PE, entretanto de menor intensidade. Em contrapartida, as NPs associadas à gentamicina e preparadas com aquecimento e agitação (AgNPs-PEG A+BM) apresentaram absorção em 406 nm, com um pico de baixa intensidade, com características de elevada polidispersão (Figura 15).

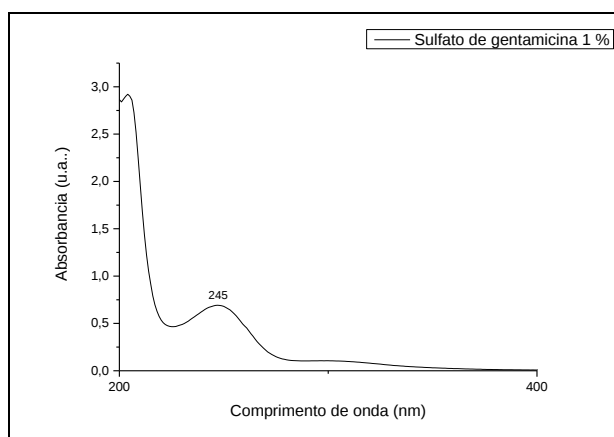
Figura 15 – Comparativo entre as absorbâncias das AgNPs-PE BM, das AgNPs-PE A+BM, das AgNPs-PEG BM e das AgNPs-PEG A+BM associadas com sulfato de gentamicina



Fonte: A autora.

A Figura 16 mostra o espectro de UV-Vis do sulfato de gentamicina, com um pico de absorção em 245 nm; que está de acordo com Anhangari *et al.*, (2013) que encontrou o mesmo comprimento de onda para o sulfato de gentamicina em seu trabalho. Este pico não é mais observado no espectro das NPs (Figura 15), o que pode ser indicativo da associação das AgNPs-PE com o sulfato de gentamicina a 1 % para a formação das AgNPs-PEG.

Figura 16 – Espectro UV-Vis do sulfato de gentamicina 1 %



Fonte: A autora.

Considerando os resultados acima, as AgNPs-PEG BM foram escolhidas para a realização dos testes biológicos e passaram a ser denominadas as AgNPs-PEG.

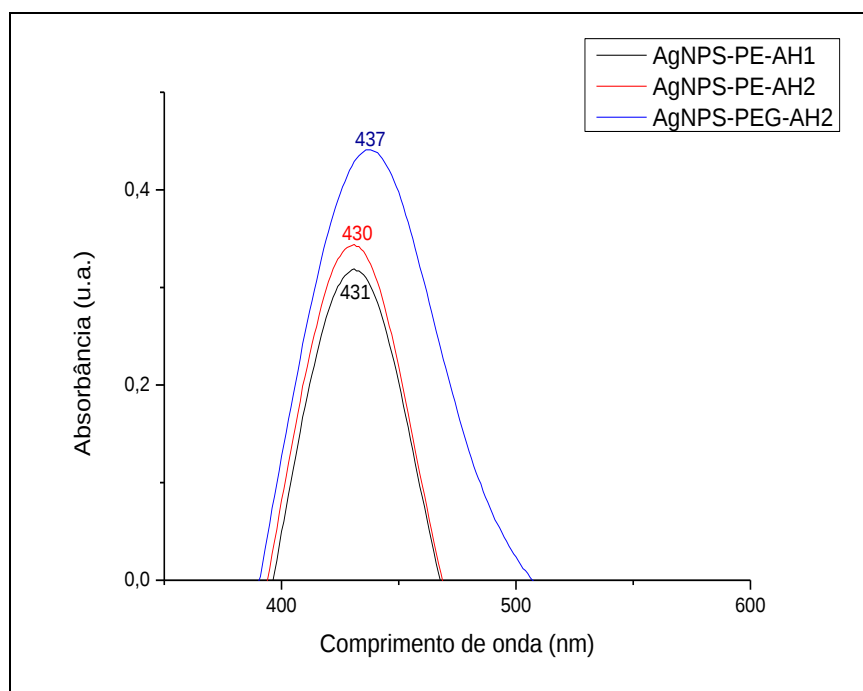
5.3.2 Associação das AgNPs-PEG com AH (AgNPs-PEG-AH2)

Na figura 17 observamos o espectro de absorção UV-Vis das AgNPs-PE associadas ao AH em duas concentrações diferentes, 0,01 mmol/L (AH1) e 0,001 mmol/L (AH2) e em 431 nm e 430 nm, respectivamente. Considerando que as AgNPs associadas ao AH2 apresentaram baixa viscosidade e um pico de absorção na faixa de 430 nm, optou-se por estas para continuar o estudo da sua associação com o sulfato de gentamicina 1 % e formação das AgNPs-PEG-AH2.

As AgNPs-PEG-AH2 apresentaram um discreto deslocamento no comprimento de onda, sendo o pico de absorção em 437 nm, acreditamos que devido à associação com o sulfato de gentamicina 1 %.

Essa associação com o ácido hialurônico se deve à sua utilização na viscosuplementação de fluido sinovial de pacientes com osteoartrite e o sulfato de gentamicina para ser utilizado junto com o AH no tratamento da osteomielite.

Figura 17 – Espectros UV-Vis de AgNPs-PE associadas com AH em duas concentrações diferentes, sendo AH1= 0,01 mmol/L e AgNPs-PEG-AH2= 0,001 mmol/L e G-AH2= sulfato de gentamicina 1% associado ao AH2



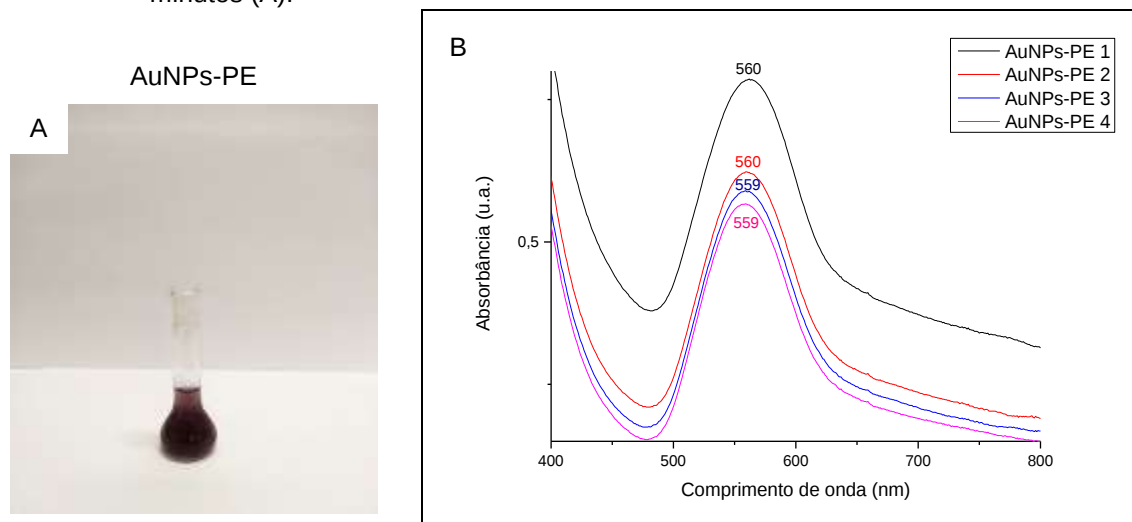
Fonte: A autora.

Para dar continuidade às pesquisas optamos pelas AgNPs-PEG BM e pelas AgNPs-PEG-AH2.

5.4 SÍNTESE DAS AuNPs POR MEIO DO EXTRATO AQUOSO DE *Pterodon emarginatus* Vogel (AuNPS-PE)

A síntese das AuNPs-PE foi comprovada pela mudança da cor de amarelo palha para roxo. Esta alteração na cor se deve à redução do sal de ouro pelas biomoléculas presentes no EAPE. Segundo Katas *et al.* (2019) a espectroscopia UV-Vis é um método indireto para examinar a bio-redução de AuNPs a partir da solução aquosa de HAuCl_4 , Figura 18.

Figura 18 – Espectros UV-Vis AuNPs-PE (B), após 40 minutos de reação, com leituras a cada 10 minutos (A).



Fonte: A autora.

O mecanismo hipotético aceito para a síntese de AuNPs dessa maneira é por uma reação fitoquímica em que o extrato da planta contém moléculas redutoras complexas como antioxidantes, enzimas e porções fenólicas, que reduzem cátions de ouro em AuNPs. A redução hipotética do HAuCl_4 é impulsionada pela presença dos fitoquímicos para formar ouro zerovalente, que subsequentemente levará à aglomeração das partículas de átomos de ouro, que são finalmente estabilizadas pelos fitoquímicos para fornecer AuNPs isotrópicos (esféricos) (ALJABALI *et al.*, 2018).

Na análise do UV-Vis, o pico de absorção das AuNPs estabilizadas foi em 559 nm, após 40 minutos de reação, comprimento de onda próximo ao relatado por Dang, Fawcett e Poinern (2019) que foi de 560 nm, sendo que as AuNPs encontradas por eles tiveram formato esférico com diâmetros variando de tamanho de 50 nm a 200 nm, estes mesmos autores mencionam que por causa do tamanho e forma das AuNPs vários estudos sugeriram que biomoléculas, como proteínas e metabólitos estejam envolvidos e que o próprio processo de síntese também pode ser influenciado pelo tipo de extrato vegetal usado para gerar essas AuNPs.

Observamos também que um único pico foi formado e, que de acordo com a teoria de Mie, citada no trabalho de Isaac, Sakthivel e Murthy (2013), as AuNPs e as AgNPs de forma esférica exibirão uma única banda SPR, enquanto as partículas anisotrópicas mostrarão 2 a 3 bandas de SPR.

No estudo realizado por Ghramh, Khan e Ibrahim (2019) com extrato etanólico das folhas de *Euphorbia peplus* obtiveram espectros de absorção das AuNPs, formadas na reação, pico máximo de absorbância em 561 nm, o alargamento do pico indicou que as NPs foram polidispersas. Eles sugerem que a biorredução dos íons de ouro por meio das biomoléculas presentes no extrato das folhas da planta foi a razão provável para esta observação.

Entende-se que as AuNPs apresentam uma banda a um comprimento de onda específico no espectro de UV-Vis, devido à ocorrência da banda SPR. Esta banda é característica para as AuNPs, na região do visível e no intervalo de 500-600 nm, variando com o tamanho das NPs (MENDES, 2015). No estudo realizado por este mesmo autor a banda SPR das AuNPs produzidas na concentração de 1 % de chá preto foi de 538 nm, que apresentaram tamanho entre 10 nm e 20 nm, enquanto que as AuNPs produzidas nas concentrações de 5 % e 10 % de chá preto apresentaram SPR respectivamente em 566 nm e 602 nm onde a porcentagem de tamanho maior de AuNPs ficou em torno de 57 nm a 94 nm, comprimento de onda próximo ao encontrado nesta pesquisa, também citado por.

No trabalho de Milaneze (2015) é citado que quando a formação de agregados é observada, são geradas ressonâncias em energias menores, levando ao surgimento de banda característica por volta de 650 nm e que nanopartículas com tamanho de 99 nm têm pico de absorbância em 575 nm, esses comprimentos de onda não foram encontrados nesta pesquisa.

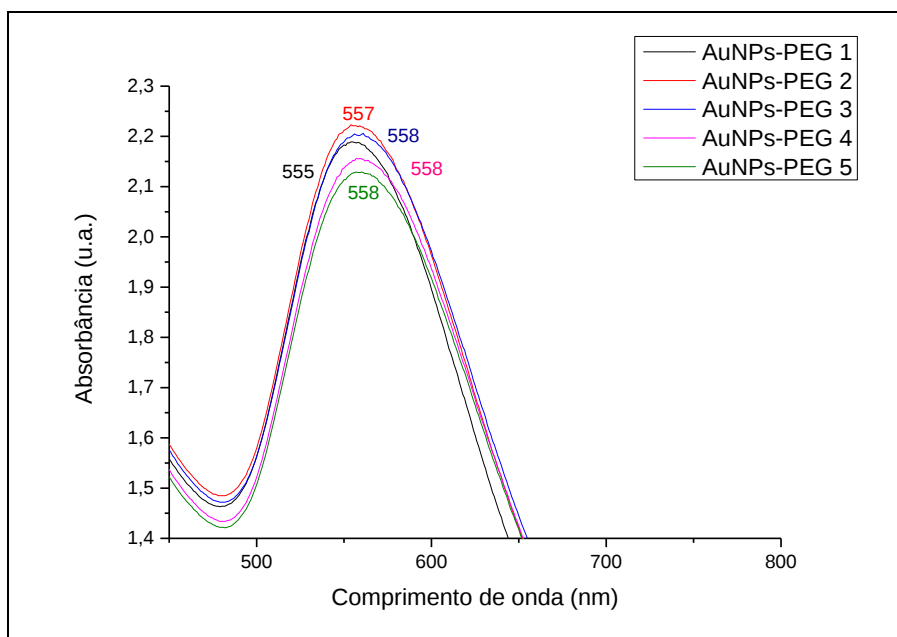
5.4.1 Associação das AuNPs-PE com Sulfato de Gentamicina (AuNPs-PEG)

Na Figura 19 está apresentado o espectro UV-Vis das AuNPs-PE associadas ao sulfato de gentamicina 1 %.

A gentamicina possui três grupos NH_2 e possui forte afinidade pela ligação às nanoesferas de ouro. As nanosferas de ouro reagem com a molécula de gentamicina por interação iônica entre grupo amino da gentamicina e a carga superficial negativa das nanoesferas de ouro. (AHANGARI *et al.*, 2013).

O espectro de UV-Vis das AuNPs-PE associadas com o sulfato de gentamicina não apresentou mudança na posição do pico e na cor da solução resultante, mesmo após a associação com antibióticos. Isso, de acordo com Roshmi *et al.*, (2015) indica a natureza não agregada da associação formada.

Figura 19 – Espectros UV-Vis das AuNPs-PE associadas ao sulfato de gentamicina (AuNPs-PEG)



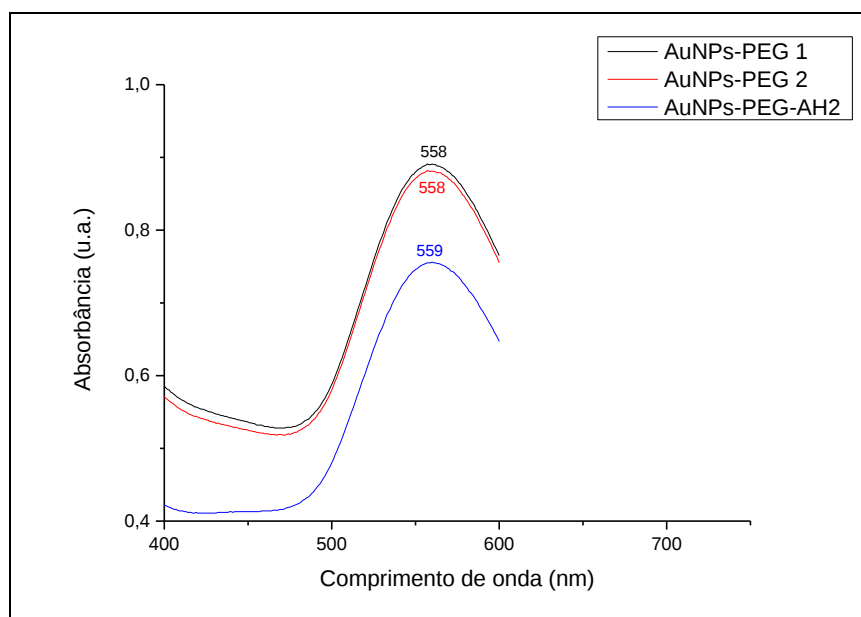
Fonte: A autora.

5.4.2 Associação das AuNPs-PEG com AH2 (AuNPs-PEG-AH2)

Para a síntese AuNPs-PEG-AH2 utilizamos a mesma concentração de AH 0,001 mmol/L (AH2) utilizada na preparação das AgNPs-PEG-AH2.

Na figura 20 observa-se o espectro de absorção UV-Vis das AuNPs-PEG-AH2, onde devido a associação com o ácido hialurônico apresentaram um pico de absorção de 560 nm, com discreto deslocamento para a direita com provável produção de NPs de diâmetro médio maior, essa mudança esperada sobre a associação das moléculas de AH2 na superfície das AuNPs-PEG, são explicadas, de acordo com Sanfilippo *et al.* (2020) pela interação entre as cadeias de hialuronano e as NPs, que influenciaram na SPR das AuNPs.

Figura 20 – Espectros UV-Vis das AuNPs-PEG e associadas aos AH2 (AuNPs-PEG-AH2)



Fonte: A autora.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

5.5.1 Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico (DH), Potencial Zeta (PZ) e Índice de Polidispersão (IP)

A Tabela 3 apresenta os resultados do diâmetro hidrodinâmico (DH), potencial zeta (PZ) e índice de polidispersão (IP), bem como o diâmetro médio obtido pelo MEV-EC e os picos de absorção das AgNPs-PE e suas associações.

Tabela 3 – Valores médios do Diâmetro hidrodinâmico (DH), Potencial Zeta (PZ), índice de polidispersão (IP), diâmetro pelo MEV-EC e comprimento de onda pelo UV-Vis das AgNPs-PE BM e AgNPs-PE A+BM; AgNPs-PEG BM e AgNPs-PEG A+BM; AgNPs-PE-AH1, AgNPs-PE-AH2

Amostra	DH / nm (média ± DP)	PZ / mV (média ± DP)	IP (média ± DP)	MEV-EC / nm (média ± DP)	UV-Vis/ λ (média ± DP)
AgNPs-PE BM	120,37±1,39	- 36,17±1,40	0,332±0,076	59,04±2,50	423±1,53
AgNPs-PE A+BM	128,77±1,21	- 36,10±2,05	0,480±0,135	50,94±4,81	416±1,76
AgNPs-PEG BM	132,63±2,25	- 39,73±1,47	0,339±0,070	62,72±2,25	425±1,53
AgNPs-PEG A+BM	148,24±2,94	- 36,80±1,30	0,543±0,063	55,75±3,95	406±1,51
AgNPs-PE-AH1	142,43±2,23	- 35,70±2,64	0,665±0,163	73,55±5,01	429±1,00
AgNPs-PE-AH2	140,67±1,65	- 34,43±3,15	0,652±0,116	56,05±5,07	427±0,80
AgNPs-PEG-AH2	134,33±1,85	- 27,15±1,15	0,524±0,091	65,56±3,70	430±1,00

Fonte: A autora.

Notas: λ = comprimento de onda.

Valores expressos como média ± desvio padrão (DP)

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados do diâmetro hidrodinâmico (DH), potencial zeta (PZ) e índice de polidispersão (IP), bem como o diâmetro médio obtido pelo MEV-EC e os picos de absorção das AuNPs-PE e suas associações.

Tabela 4 – Valores médios do Diâmetro hidrodinâmico (DH), Potencial Zeta (PZ), índice de polidispersão (IP), diâmetro pelo MEV-EC e comprimento de onda pelo UV-Vis das AuNPs-PE, AuNPs-PEG e AuNPs-PEG-AH2

Amostra	DH / nm (média ± DP)	PZ / mV (média ± DP)	IP (média ± DP)	MEV-EC / nm (média ± DP)	UV-Vis λ (média ± DP)
AuNPs-PE	121,60±1,05	- 25,10±0,40	0,338±0,02	50,35±5,74	555,5±0,58
AuNPs-PEG	151,63±1,03	- 24,97±0,81	0,488±0,08	56,01±5,05	557,6±0,55
AgNPs-PEG-AH2	160,23±0,85	- 27,07±0,40	0,605±0,02	64,62±0,67	560,1±0,58

Fonte: A autora.

Notas: λ = comprimento de onda.

Valores expressos como média ± desvio padrão (DP)

Pode-se observar uma grande diferença nos valores dos diâmetros médios hidrodinâmicos (DH) e os medidos nas imagens de MEV-EC possivelmente devido às diferentes condições da amostra (MOLDOVAN *et al.*, 2018).

Pela avaliação do DH todas as amostras de NPs apresentaram distribuição variada de tamanho, por exemplo, nas amostras de AgNPs-PE e suas associações o DH variou de 120,37 ± 1,39 nm a 134,33 ± 1,85 nm e para as AuNPs-PE e associações a variação foi de 121,60 ± 1,05 nm a 160,23 ± 0,85 nm. A diferença na distribuição granulométrica dos colóides são devidas à natureza multicomponente do EAPE que é responsável como agente de estabilização formador das NPs, isso está de acordo com Vo *et al.*, (2019) que encontraram em sua pesquisa resultados semelhantes.

A medida do DH é realizada por dispersão da luz, de forma que partículas que estejam aglomeradas promovem dispersão maior. Além do mais, a determinação do DH das partículas em suspensão pelo espalhamento de luz decorre do movimento Browniano destas partículas. Quando uma partícula é dispersa em um meio líquido, forma-se uma camada de solvatação em sua superfície, que faz com que esse dado seja superestimado quando comparado, por exemplo, com técnicas de microscopia (FEG), que medem o diâmetro das partículas secas de forma individualizada (ALBERNAZ, 2014; ELIA *et al.*, 2014; KATAS *et al.*, 2019).

Também de acordo com Lopes (2017) os diâmetros hidrodinâmicos foram afetados pelo ambiente que envolveu a NP e foram calculados partindo-se de uma partícula esférica isotrópica. Portanto, esses dados representam o diâmetro da partícula e não o tamanho real da partícula que deve ser determinado por outras

técnicas, por exemplo, Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-EC).

O IP é um parâmetro utilizado na avaliação da distribuição do tamanho das NPs, esse valor varia de 0 a 1 e, quanto menor, mais monodispersa e, conseqüentemente, mais homogênea serão as nanopartículas (ALBERNAZ, 2014; ALJABALI *et al.*, 2018; SENA *et al.*, 2019). Para Lopes (2017) um valor de IP > 0,7 significa uma alta distribuição de tamanho de partícula. De acordo com estas referências todas as amostras analisadas estão dentro de um IP que é mediano para a distribuição das NPs.

Dentre as nanopartículas AgNPs-PE BM e a AgNPs-PE A+BM observou-se resultados semelhantes em todos os índices, com exceção do IP, que foi menor para a AgNPs-PE BM. Este resultado está condizente com os resultados de UV-Vis.

Da mesma forma, as AgNPs-PEG BM apresentaram melhores resultados, também condizentes com o observado nos resultados de UV-Vis, onde se observou um maior pico de absorção e uma menor amplitude da curva, em concordância com os valores encontrados no IP onde a média foi de 0,339, apontando uma menor polidispersão.

Considerando as NPs associadas ao AH, as AgNPs-PE-AH2 obtiveram os melhores resultados que as AgNPs-PE-AH1, provavelmente por ter em sua formulação menor concentração de AH e, conseqüentemente, menor viscosidade, devido a menor concentração de ácido hialurônico.

Já as AgNPs-PEG-AH2 apresentaram o maior diâmetro, por ambas as técnicas empregadas (DH e MEV-EC), quando comparado com as AgNPs-PE e as AgNPs-PEG, provavelmente devido a grande associação de compostos. Estes resultados respaldaram o UV-Vis, onde se observou um deslocamento batocrômico no comprimento de onda, mostrado na curva do gráfico, indicando um aumento de tamanho, além de apresentarem um índice médio de polidispersão, evidenciada pelo valor do IP.

O Potencial Zeta (PZ) foi utilizado para avaliar a estabilidade das nanopartículas. A maioria das partículas, quando em contato com um líquido, adquire uma carga elétrica na sua superfície e esse potencial é denominado de PZ. A carga da partícula coloidal é na verdade uma carga efetiva, resultante do balanço da carga de íons e contra íons. O PZ se correlaciona com a repulsão eletrostática entre as partículas e com a estabilidade dos sistemas coloidais e, quanto maior o valor do PZ,

mais estável será o coloide, ou seja, a velocidade de formação dos agregados aumenta à medida que mais próximo de zero esteja o PZ. Quando o valor do PZ for menor que - 30 mV ou maior igual a + 30 mV, a partícula será estável (LOPES, 2017).

Todas as NPs obtidas apresentaram PZ negativo, isso pode ser atribuído à presença de polifenóis, flavonoides e proteínas provenientes do extrato vegetal. O valor negativo confirma a repulsão entre as partículas e prova que são muito estáveis (ANANDALAKSHMI; VENUGOBAL ; RAMASAMY, 2016; MOLDOVAN *et al.*, 2018).

Os valores obtidos variaram entre 27 mV a 39 mV para as AgNPs-PE e suas associações e de -25,97 mV a -27,07 mV para as AuNPs-PE e suas associações, o que indica um bom grau de estabilidade. Segundo Aljabali *et al.* (2018) e Ferreira (2016) uma suspensão coloidal com valor superior a 25 mV (positivo ou negativo) é considerado estável. Coloides com potencial zeta baixo tendem a flocular ou coagular, por não serem eletricamente estabilizados.

As NPs metálicas têm um potencial eletrostático muito pequeno e, de acordo com a Teoria de Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek (Teoria DLVO), quanto maior o PZ, mais provável que a dispersão coloidal seja estável, pois as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera as Forças Intermoleculares (Forças de Van der Waals), as quais são responsáveis pela agregação. A adição de AH2 que pode ter agido como agente estabilizante protegeu as AgNPs-PE e as AuNPs-PE (estabilização estérica) e aumentou a sua estabilidade em água. A estabilidade das AgNPs-PE e as AuNPs-PE em solução aquosa ocorre porque a macromolécula adsorve sobre a superfície das nanopartículas formadas e proporciona a repulsão estérica (LOPES, 2017).

5.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-EC) das AgNPs-PE e AuNPs-PE por Meio do Extrato Aquoso de *Pterodon emarginatus* Vogel

A microscopia (MEV-EC) foi realizada para reconhecer a morfologia e o tamanho das NPs. Observamos que a partir das imagens, ficou evidente que a morfologia das AgNPs-PE e associações como também das AuNPs-PE e associações foi predominantemente esférica e de tamanho variável (ERDOĞAN *et al.*, 2016; HAMELIAN *et al.*, 2018).

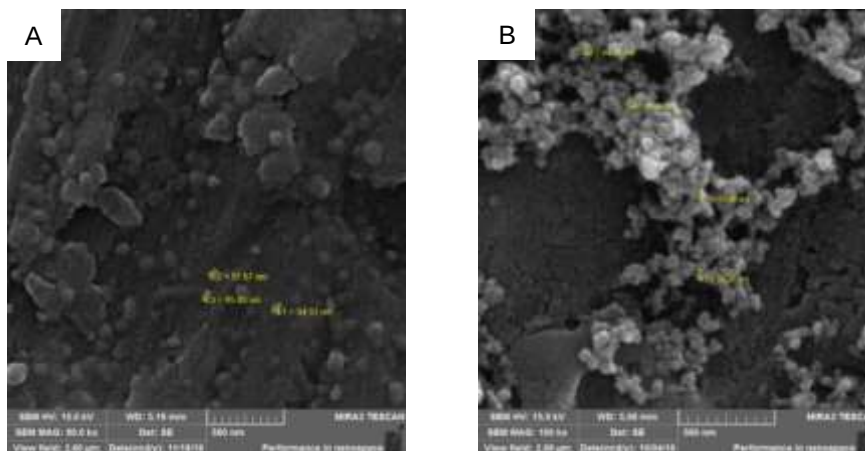
As variações de tamanho encontradas nesta pesquisa para as AgNPs-PE e suas associações, bem como para as AuNPs-PE e suas associações, também foram encontradas por Kharat e Mendhulkar (2016) em seu estudo com extrato das folhas de *Elephantopus scaber*, Hamelian *et al.* (2018) na produção de AgNPs com extrato de *Thymus kotschyanus*, Basavegowda *et al.* (2013) na síntese de AuNPs com extrato da fruta de *Punica granatum* e, ainda resultados semelhantes também foram relatados por Anandalakshmi, Venugobal e Ramasamy (2016) em sua pesquisa na produção AgNPs com extrato das folhas de *Pedaliium murex*, sugerindo que os extratos vegetais podem atuar como agente de redução e cobertura na produção de NPs.

Sobre a variação de tamanho Elia *et al.* (2014) argumentam que a razão para isso acontecer deve estar na composição do extrato. Três fatores podem influenciar este resultado: a taxa de redução de íons com os diferentes extratos, as concentrações dos agentes redutores nos extratos, e a identidade e concentração dos agentes de proteção em cada extrato. Esses três fatores influenciam a taxa de formação das NPs, os potenciais zeta e as taxas de aglomeração.

Para a obtenção de nanopartículas com distribuição de tamanho uniforme, é necessário que todos os núcleos sejam formados ao mesmo tempo. Uma vez formados sob as mesmas condições, os núcleos apresentam tamanhos muito próximos e crescem de maneira uniforme (FERREIRA, 2016). A ausência de aglomerados e dímeros foi confirmada também pela SPR, pois caso esses fenômenos ocorressem uma nova SPR localizada estaria presente, resultado da interação de duas ou mais nanopartículas de prata ou ouro juntas e em contato. A pequena aglomeração de partículas que aparece na Figuras 21B pode ser atribuída ao processo de secagem da água no suporte (LOPES, 2017).

A morfologia da superfície das AgNPs-PE BM e as AgNPs-PE A+BM mostrou natureza esférica. O tamanho médio foi de $59,04 \pm 2,50$ nm e $50,94 \pm 4,81$ nm, para as AgNPs-PE BM e as AgNPs-PE A+BM, respectivamente (Figura 21).

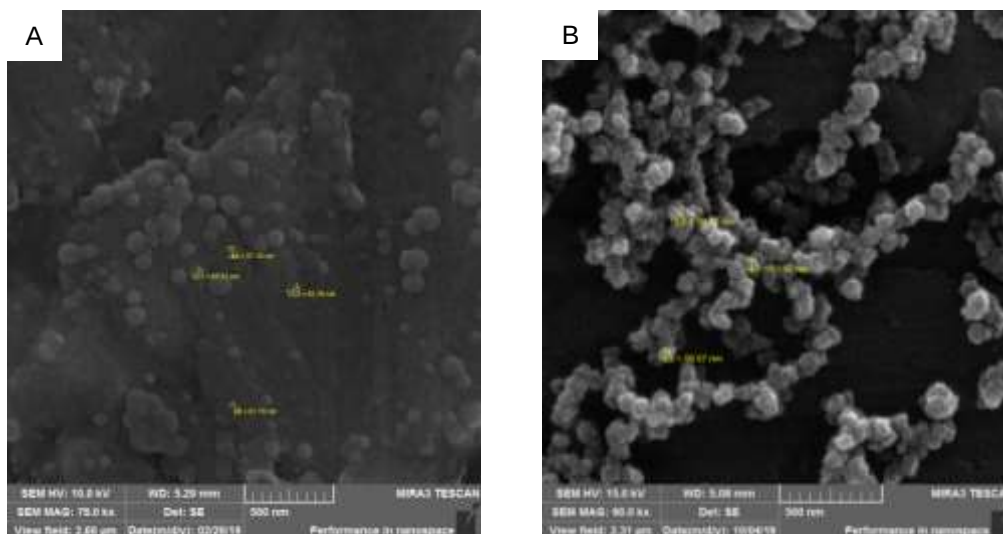
Figura 21 – Fotomicrografias das AgNPs-PE BM (A) e das AgNPs-PE A+BM (B)



Fonte: A autora.

De forma similar, as AgNPs-PEG BM e as AgNPs-PEG A+BM apresentaram formato esférico com diâmetro médio de $62,72 \pm 2,25$ nm e $55,75 \pm 3,95$ nm respectivamente (Figura 22).

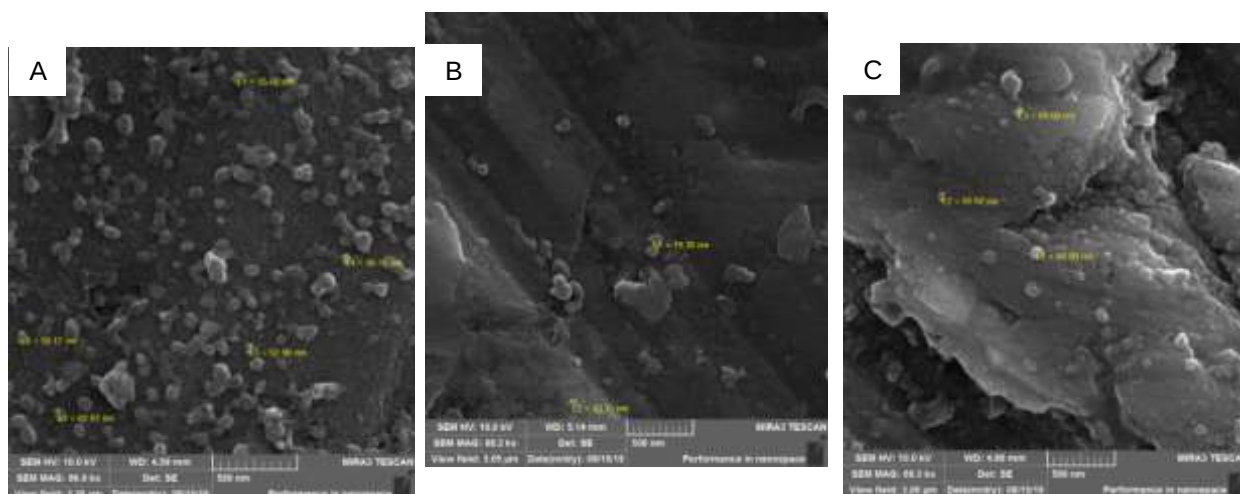
Figura 22 – Fotomicrografias das AgNPs-PEG BM (A) e AgNPs-PEG A+BM (B)



Fonte: A autora.

Na Figura 23 estão representadas as fotomicrografias das AgNPs-PE-AH1, das AgNPs-PE-AH2 e das AgNPs-PEG-AH2, seus diâmetros foram respectivamente, $56,01 \pm 5,07$ nm; $73,55 \pm 5,01$ nm; e $65,56 \pm 3,70$ nm. As NPs associadas ao AH apresentam-se dispersas, indicando uma possível estabilidade estérica em função da presença do AH (Figura 23 A, B e C).

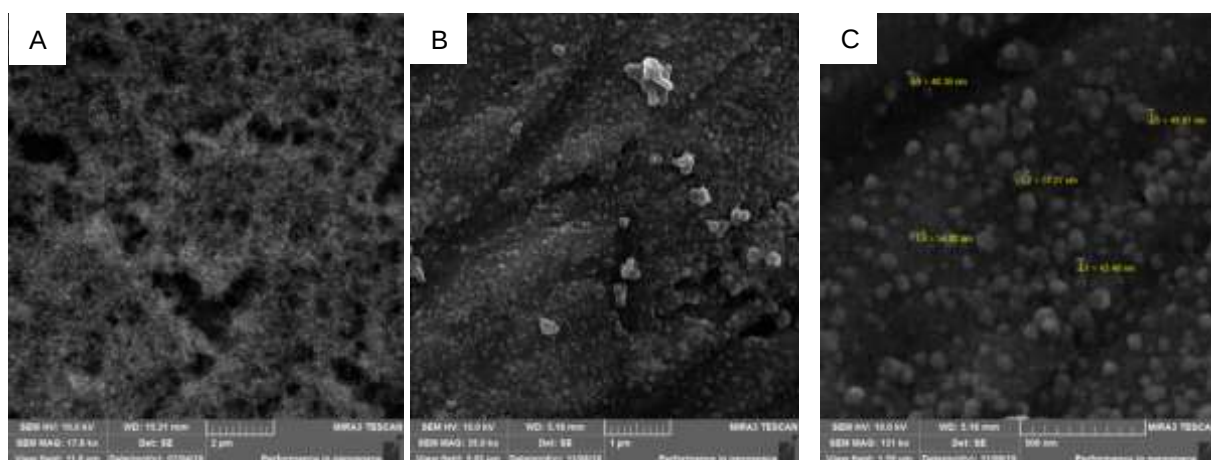
Figura 23 – Fotomicrografias das AgNPs-PE-AH1 (A); AgNPs-PE-AH2 (B); AgNPs-PEG-AH2 (C)



Fonte: A autora.

As AuNPs-PE apresentaram superfície lisa e formato esférico. O diâmetro médio (MEV-EC) foi de $50,35 \pm 5,74$ nm, conforme pode ser visto na Figura 24.

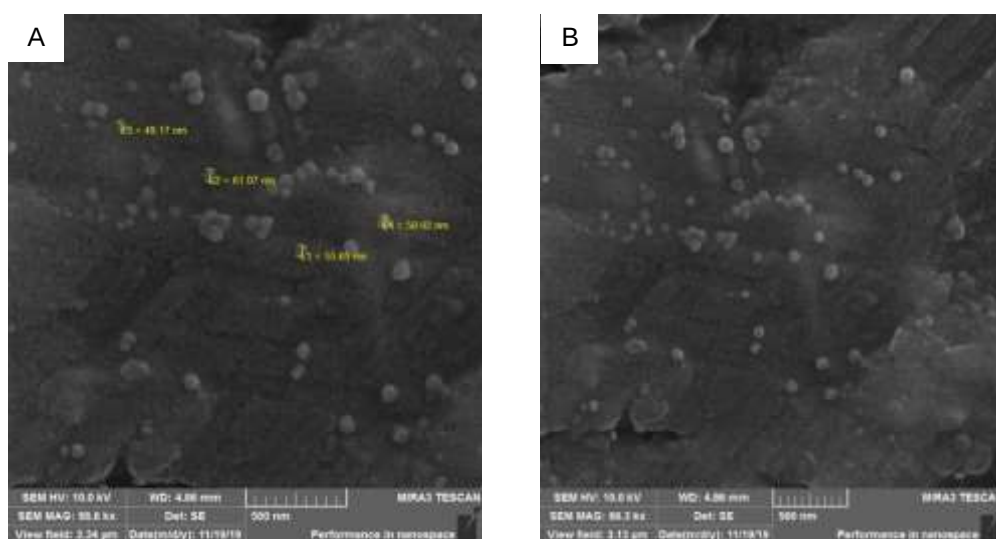
Figura 24 – Fotomicrografias das AuNPs-PE sintetizadas a partir do extrato aquoso de *Pterodon emarginatus* AuNPs-PE (A, B e C)



Fonte: A autora.

O formato das AuNPs-PE associadas ao sulfato de gentamicina também foi esférico com tamanho médio de $56,01 \pm 5,05$ nm conforme mostra a Figura 25.

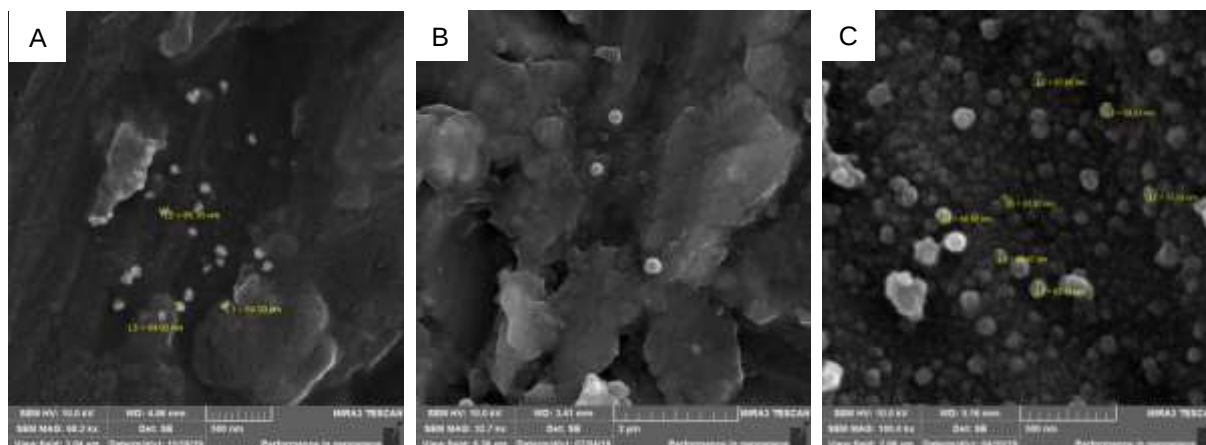
Figura 25 – Fotomicrografias das AuNPs-PE associadas ao sulfato de gentamicina (A e B)



Fonte: A autora.

Na Figura 26 pode-se observar o formato esférico bem delimitado das AuNPs-PEG associadas ao ácido hialurônico (AH2) com tamanho médio de $64,62 \pm 0,67$ nm.

Figura 26 – Fotomicrografias das AuNPs-PEG associadas ao AH2 (AuNPs-PEG-AH2 - A, B e C)



Fonte: A autora.

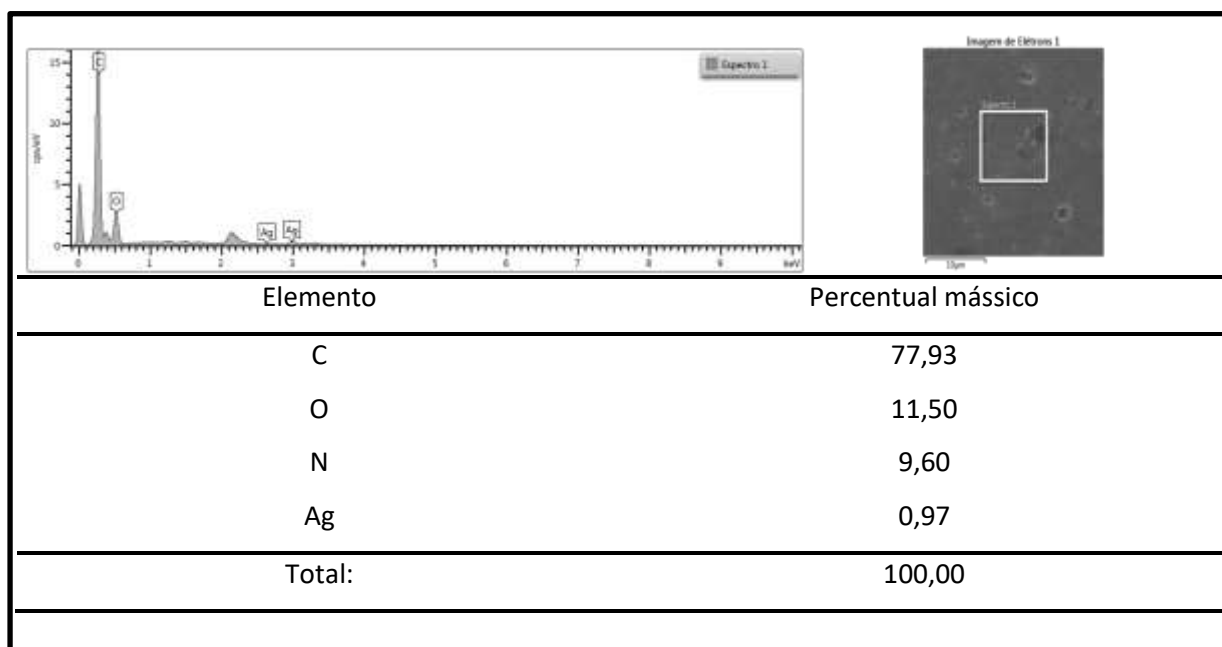
5.5.3 Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDE)

A espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDE) é uma técnica qualitativa e quantitativa microanalítica que fornece informação sobre a composição química da amostra. Uma vez que o feixe de elétrons incide na amostra, os elétrons e íons mais externos mudam de nível energético, no entanto, ao retornarem, há a liberação de energia que poderá ser mensurada através do detector, na forma de

espectros (histogramas) nos quais, elementos individuais podem ser identificados. Os elétrons de cada átomo possuem energias distintas, possibilitando dessa forma determinar quais são os elementos químicos presentes nas amostras, pois os espectros EDS correspondem a linhas de raios X característicos de um elemento específico. Assim, as energias características dos raios-X permitem a identificação dos elementos da amostra, enquanto a intensidade dos picos permite a quantificação da concentração dos elementos da amostra (MENDES, 2015).

A presença de Ag pura na amostra foi confirmada pelo EDE, aproximadamente e 3 Kev, conforme pode ser observado na Figura 27, devido à ressonância plasmônica de superfície como também foi demonstrado por Agarwal, Agrawal e Singh (2014); Anandalakshmi; Venugobal e Ramasamy (2016); Banala; Nagati e Karnati (2015) e por Mendes (2015) confirmando assim a biossíntese de AgNPs-PE. Os picos de O, N são correspondentes ao meio envolvente das AgNPs-PE, ou seja, dos componentes do extrato vegetal utilizado na síntese das NPs e o pico de C do suporte utilizado para fixar a amostra (MENDES, 2015).

Figura 27 – Espectroscopia por dispersão de energia de raios X das AgNPs-PE com histograma e quantificação da prata



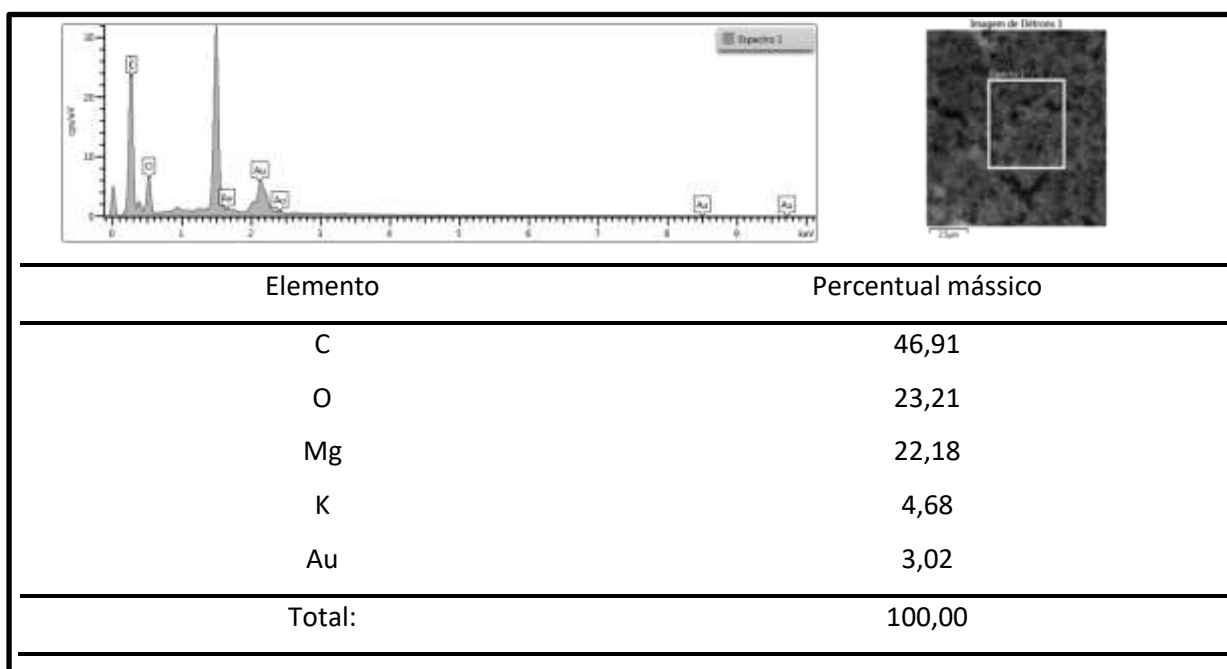
Fonte: A autora.

A presença de Au foi comprovada pelo EDE, conforme pode ser observado na Figura 28. Os outros elementos evidenciados são provenientes dos componentes, O, Mg, K, do extrato vegetal utilizado na síntese das NPs e que envolve as AuNPs-

PE, o pico correspondente ao C é originário do suporte metálico usado para fixar as amostras (MENDES, 2015). De acordo com Bindhu *et al.* (2014); Basavegowda *et al.* (2013) Ferreira (2016) e também Mendes (2015), os picos de 2,2 kV são característicos de ouro metálico, enquanto outros de menor intensidade são referentes ao ouro em outros estados de oxidação.

Os resultados mostram claramente que a composição das NPs era de fato de ouro, mostrando que as AuNPs-PE foram mantidas na matriz orgânica de *P. emarginatus* (BASAVEGOWDA *et al.*, 2013). As pequenas quantidades de elementos adicionais, incluindo C, O, Mg, K, foram associados ao conteúdo elementar do extrato da planta após a evaporação do solvente (ELIA *et al.*, 2014).

Figura 28 – Espectroscopia por dispersão de energia de raios X das AuNPs-PE com histograma e quantificação do ouro



Fonte: A autora.

5.5.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (EITF)

A técnica de EITF opera com base na determinação da transição entre os estados vibracionais das moléculas, que são induzidos através da irradiação da amostra com uma fonte de luz que emite na região do infravermelho. A maioria dos compostos apresenta um espectro com picos bem definidos a determinadas frequências, que corresponde a frequências vibracionais de grupos funcionais específicos ou a determinados tipos de ligação, presentes na amostra, e pode ser

pensado como uma impressão digital da amostra analisada (KATAS *et al.*, 2019; MENDES, 2015).

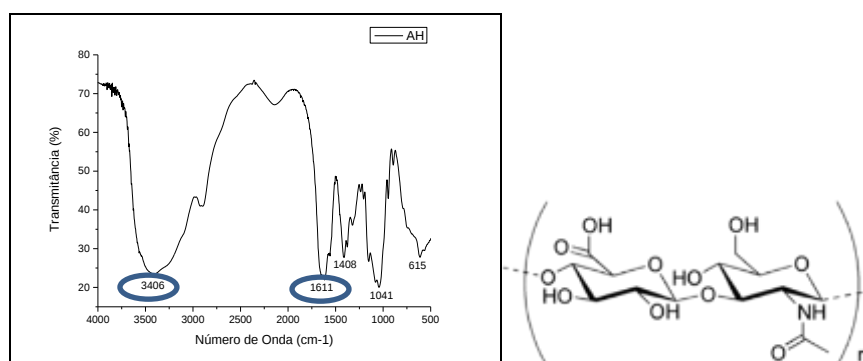
Esta técnica foi realizada com a finalidade de identificar a presença de vários grupos funcionais no extrato de *P. emarginatus* e nas NPs biossintetizados.

Uma análise comparativa entre os espectros na região do infravermelho indica a presença das principais bandas, com algumas pequenas distinções oriundas do processo de coordenação; todas as amostras apresentaram bandas de absorção semelhantes, indicando que as NPs metálicas podem ter sido estabilizadas pelos fitoconstituintes presentes no EAPE (VO *et al.*, 2019). Isso ocorre porque o mecanismo de síntese NPs metálicas é igual, ou seja, a redução dos íons metálicos (NORUZI, 2015).

Observamos em todas as amostras analisadas a presença de uma banda larga na região entre 3406 cm^{-1} – 3440 cm^{-1} que de acordo com a literatura consultada possivelmente esteja relacionada com vibrações de alongamento OH ou uma amida primária (ERDOĞAN *et al.*, 2016; HAMELIAN *et al.*, 2018; MILANEZE, 2015; NORUZI, 2015; SINGH *et al.*, 2018; VO *et al.*, 2019), grupo funcional hidroxila em álcoois e compostos fenólicos, flavonoides, bem como água absorvida que pode ter origem amostral ou do próprio KBr por ser altamente higroscópico (BANALA; NAGATI; KARNATI, 2015; BASAVEGOWDA *et al.*, 2013; ELIA *et al.*, 2014; NAGALINGAMA *et al.*, 2018; OLIVEIRA, 2018; RODRÍGUEZ-LEÓN *et al.*, 2019).

O ácido hialurônico (AH2) apresenta uma banda de absorção na região de 3406 cm^{-1} que se refere à OH e a banda na região de 1611 cm^{-1} corresponde à amida que podem ser visualizadas na Figura 29.

Figura 29 – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (EITF) do ácido hialurônico (AH)

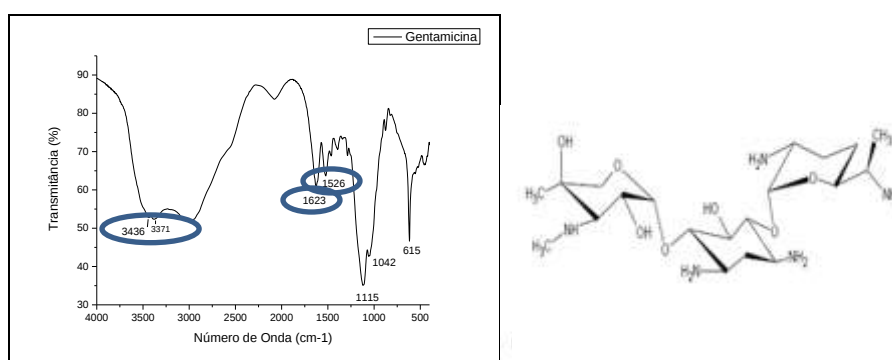


Fonte: A autora.

Na pesquisa de Rastogi, Kora e Arunachalam (2012) foi observado que todos os aminoglicosídeos (estreptomicina, kanamicina, neomicina e) apresentaram bandas de absorção características correspondentes, sendo uma delas na frequência de curvatura N – H em 1600 cm^{-1} – 1652 cm^{-1} . No trabalho de Agarwal, Agrawal e Singh (2014) é citado que a absorção em torno de 1605 cm^{-1} pode ser atribuída às amins primárias, como também no estudo de Elia *et al.* (2014) onde citam que essa banda é característica de amins primárias e secundárias.

Pode-se observar no espectro de absorção bandas características do sulfato de gentamicina, sendo a região de 1623 cm^{-1} e 1526 cm^{-1} referente a amida primária e amida secundária; uma banda em 3436 cm^{-1} correspondente ao grupo NH_2 e ao grupamento OH como está demonstrado na Figura 30.

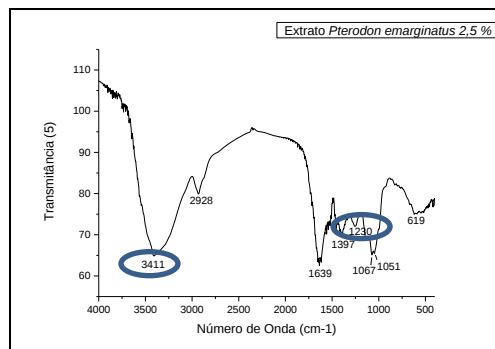
Figura 30 – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (EITF) do sulfato de gentamicina



Fonte: A autora.

Segundo Jafarizad *et al.* (2015) que associou extrato de *Mentha* e *Pelargonium* às AuNPs a banda na análise do extrato vegetal de *Pelargonium* a aproximadamente a 3500 cm^{-1} é devida à existência da banda O-H que comprova a propriedade redutora deste extrato; para o extrato de *Mentha* a banda em 3450 cm^{-1} indica a existência de ligações O-H que comprovam a propriedade redutora deste mesmo extrato, no extrato de *P. Emarginatus* essa banda foi visível em 3411 cm^{-1} como mostra a Figura 31.

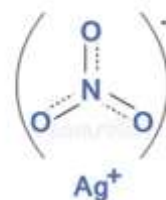
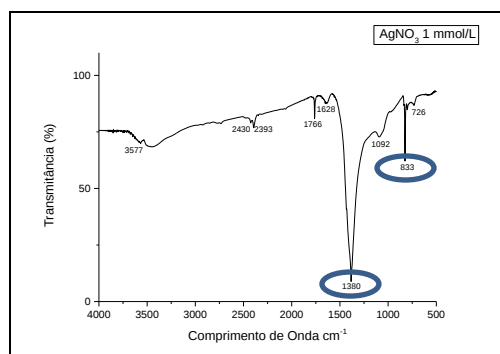
Figura 31 – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (EITF) do extrato de *Pterodon emarginatus* Vogel 2,5 %



Fonte: A autora.

Oliveira (2018) retrata que a banda em 1380 cm^{-1} na solução de nitrato de prata é bem característica de grupos nitro $-\text{NO}_2$ (1380 cm^{-1} - 1300 cm^{-1}) e com relação a banda em 833 cm^{-1} , este mesmo autor cita que é referente à vibração do ânion NO_3 do nitrato de prata visulaidzo na Figura 32, verificamos nesta pesquisa que esta banda de 833 cm^{-1} foi suprimida quando da formação das AgNPs-PE e associações como pode ser visto na Figura 33.

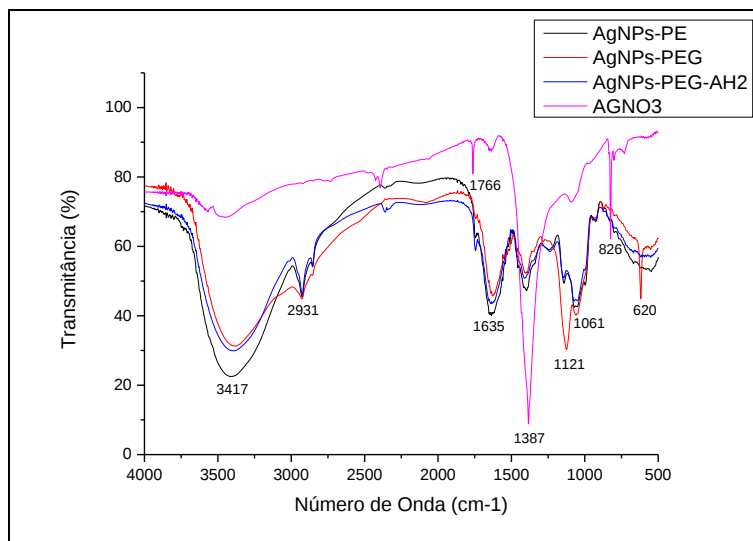
Figura 32 – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (EITF) do nitrato de prata (AgNO_3) 1 mmol/L



Fonte: A autora.

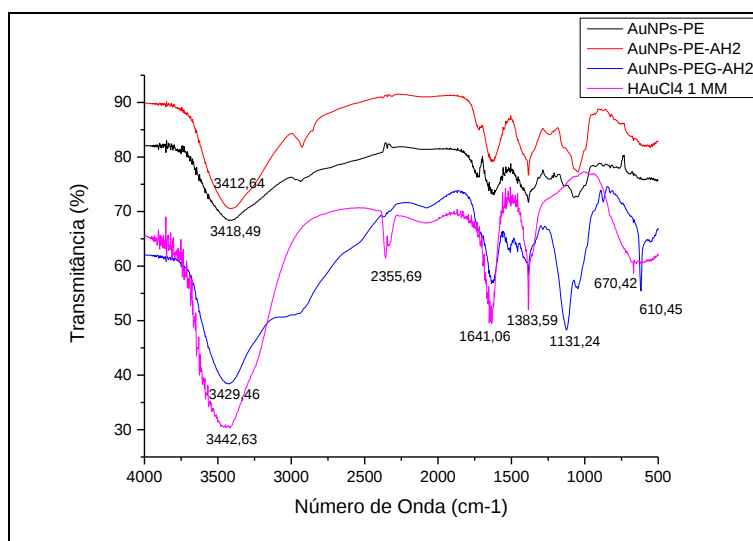
Na figura 33 podemos observar a EITF das AgNPs-PE, AgNPs-PEG, AgNPsPEG-AH2 e AgNO₃ e na Figura 34 a EITF das AuNPs-PE, AuNPs-PEG, AuNPsPEG-AH2 e HAuCl₄ e na sequência as observações sobre as bandas encontradas.

Figura 33 – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (EITF) das AgNPs-PE, AgNPs-PEG, AgNPsPEG-AH2 e AgNO₃



Fonte: A autora.

Figura 34 – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (EITF) das AuNPs-PE, AuNPs-PEG, AuNPs-PEG-AH2 e HAuCl₄



Fonte: A autora.

Observamos em todas as amostras analisadas a presença de uma banda larga na região entre 3406 cm⁻¹ – 3440 cm⁻¹ que de acordo com a literatura consultada

possivelmente esteja relacionada com vibrações de alongamento OH ou uma amida primária (ERDOĞAN *et al.*, 2016; HAMELIAN *et al.*, 2018; MILANEZE, 2015; NORUZI, 2015; SINGH *et al.*, 2018; VO *et al.*, 2019), grupo funcional hidroxila em álcoois e compostos fenólicos, flavonoides, bem como água absorvida que pode ter origem amostral ou do próprio KBr por ser altamente higroscópico (BANALA; NAGATI; KARNATI, 2015; BASAVEGOWDA *et al.*, 2013; ELIA *et al.*, 2014; NAGALINGAMA *et al.*, 2018; OLIVEIRA, 2018; RODRÍGUEZ-LEÓN *et al.*, 2019).

Da mesma forma no estudo de Katas *et al.* (2019) os espectros das AuNPs sintetizadas a partir de quitosana e extrato esclerótico de *Lignosus rhinocerotis* mostraram amplas e intensas bandas a $3264,92\text{ cm}^{-1}$ e $3262,48\text{ cm}^{-1}$ indicando que a ligação de hidrogênio foi aprimorada entre os grupos O-H. Os grupos hidroxila (OH) em $3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ podem estar relacionados às proteínas, polissacarídeos e oligossacarídeos que foram envolvidos na formação de AuNPs, reduzindo Au^{3+} para Au^0 através da oxidação do grupo hidroxil para formar um carbonil.

Isto pode ser visto a partir do deslocamento da banda característica correspondente ao grupo hidroxila de 3411 cm^{-1} do extrato de *P. emarginatus* 2,5 % para 3436 cm^{-1} para o resultado das AuNPs-PE e associações.

É explicado por Lee *et al.* (2019) que a superfície das AgNPs é carregada positivamente, de modo que os grupos OH^- carregados negativamente podem tomar parte no processo de estabilização dessas NPs.

Onde há associação com o sulfato de gentamicina essa banda entre 3406 cm^{-1} – 3440 cm^{-1} pode estar relacionada com as frequências de alongamento dos grupos amina - NH_2 ; que significa ligação direta de átomos de nitrogênio livres do grupo amino das moléculas de gentamicina para as AuNPs-PE (RASTOGI; KORA; ARUNACHALAM, 2012).

Uma longa faixa estreita foi vista no número de onda entre 2925 cm^{-1} – 2951 cm^{-1} indica a presença de grupos alcano alongados com CH de compostos aromáticos (HAMELIAN *et al.*, 2018; KHARAT; MENDHULKAR, 2016; LEE *et al.*, 2019; MOLDOVAN *et al.*, 2018; NAGALINGAMA *et al.*, 2018; NGUYEN *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2018;

A banda, visualizada a partir de 1600 cm^{-1} (1628 cm^{-1} - 1632 cm^{-1}) é característica de vibrações de flexão do grupo hidroxila, proveniente de composto aromático, mas também pode estar relacionada a um grupo carbonila – C=O – aldeídos, vibração do alongamento $\text{C} = \text{O}$ de aminas terciárias (ELIA *et al.*, 2014;

ERDOĞAN *et al.*, 2016; HAMELIAN *et al.*, 2018; KHAN *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2019; MILANEZE, 2015; NAGALINGAMA *et al.*, 2018; NORUZI, 2015; SINGH *et al.*, 2018). Como também essa banda pode ser devida à ligação amida proveniente do grupo carbonila de uma proteína (BANALA; NAGATI; KARNATI, 2015) ou ainda corresponda às bandas de amida terciária e amida primária, das proteínas e de piridina (BASAVEGOWDA *et al.*, 2013; OLIVEIRA, 2018).

Em contrapartida, Jain *et al.* (2009) como também Sasirekha *et al.* (2018) citam em sua pesquisa que a banda de 1226 cm^{-1} (1230 cm^{-1}) encontrada no extrato, assinalada na Figura 31, surge muito provavelmente do grupo C – O de polióis, como hidroxiflavonas e catequinas e, o desaparecimento total desta banda após a biorredução pode ser devido ao fato de que os polióis são os principais responsáveis pela redução de íons Ag, em que eles próprios são oxidados em grupos carbonil insaturados, levando a um pico amplo em 1650 cm^{-1} (1635 cm^{-1}) para redução de Ag.

Para Jafarizad *et al.* (2015) a banda mostrada em aproximadamente 1624 cm^{-1} , quando associou o extrato de *Pelargonium* às AuNPs, está relacionada as ligações C=C ligações que confirmam o efeito estabilizador do extrato. Como também os resultados da análise EITF para o extrato de *Mentha* mostram que as bandas de 1630 cm^{-1} podem ser atribuídas a C = C, que prova a característica estabilizadora da *Mentha*.

Para as bandas encontradas nesta pesquisa em torno de 1380 cm^{-1} , estudos como os de Anandalakshmi, Venugobal e Ramasamy (2016); Arunachalam *et al.* (2014) e Nguyen *et al.* (2018) sugerem que ela surge por causa do estiramento de carbonil e vibrações de estiramento –N – H nas ligações amida de proteínas, sendo que o grupo carbonil de resíduo de aminoácido e peptídeos de proteínas do extrato vegetal têm forte capacidade de ligar metal, e muito possivelmente pode ter formado uma camada nas NPs metálicas estes podem ser derivados de compostos tais como flavanoides e proteínas solúveis do extrato da planta e foram responsáveis pela estabilização das NPs metálicas.

Outros autores como Anandalakshmi, Venugobal e Ramasamy (2016) e Basavegowda *et al.* (2013) sugerem que essa banda, em torno de 1380 cm^{-1} , corresponde às vibrações de alongamento C – N de amins aromáticas.

Conforme Oliveira (2018) o aparecimento da banda em 1380 cm^{-1} , visualizada na Figura 33 em 1387 cm^{-1} em menor intensidade nas amostras de AgNPs-PE e associações, sinaliza que os grupos funcionais de algum metabólito dos extratos se

associaram aos íons prata Ag^+ , modificando o perfil de ligações e possivelmente promovendo a redução em Ag^0 .

A presença da absorção em 1121 cm^{-1} para as AgNPs-PEG e 1127 cm^{-1} para as AuNPs-PEG-AH2 possivelmente está relacionada com C-O das ligações de álcoois, isto de acordo com Milaneze (2015) que encontrou bandas semelhantes em sua pesquisa.

A banda fraca formada em torno de 1061 cm^{-1} pode corresponder ao alongamento C – N de aminas alifáticas (BASAVEGOWDA *et al.*, 2013; NAGALINGAMA *et al.*, 2018; NGUYEN *et al.*, 2018), como pode também corresponder ao alongamento do grupo funcional C – O alifático (RODRÍGUEZ-LEÓN *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2018) e também pode ser devida às ligações de éter e sugerindo a presença de flavanonas adsorvidas na superfície de NPs metálicas (ANANDALAKSHMI; VENUGOBAL; RAMASAMY, 2016).

Ainda sobre essa banda, Oliveira (2018) sugere que possa ser devido a estiramentos vibracionais de C-O-C e C-O em compostos fenólicos, os quais têm participação bem documentada nos processos de biorredução em rotas de síntese verde e, ainda que essas ligações do tipo C-O, são devidas a ésteres, éteres, álcoois ou ácido carboxílico. Essa hipótese, de acordo com o autor, pode ser fortalecida pela presença de bandas largas em todas as amostras analisadas no comprimento de onda de em torno de 3400 cm^{-1} , característica de álcoois, reforçando de fato a ocorrência de ácidos carboxílicos, pela comprovação anterior de carbonila. Contudo, tal banda também pode ser indicativa de compostos fenólicos e até da própria água, que pode ter origem amostral ou do próprio KBr por ser altamente higroscópico como já mencionado anteriormente.

Já as bandas em torno de 600 cm^{-1} , sugerem Nguyen *et al.* (2018), podem ser atribuídas ao alongamento da ligação C – Cl de halogenetos de alquila.

De acordo com o encontrado por Singh *et al.* (2018) e também em nossa pesquisa as bandas de EITF das NPs e associações sugerem que os compostos fenólicos foram provavelmente os responsáveis pela redução de HAuCl_4 e AgNO_3 em AuNPs-PE e associações e AgNPs-PE e associações, respectivamente.

Os flavonoides, os compostos fenólicos juntamente com outras biomoléculas foram sugeridos como responsáveis pela redução de íons prata e ouro em NPs, porque possuem vários grupos funcionais, que são capazes de reduzir íons metálicos em NPs. Compostos fenólicos ou fenóis são grupos de uma ou mais hidroxilas ligadas

diretamente a um anel aromático. Derivados funcionais (como ésteres, ésteres metálicos e glicosídeos) podem anexar a este composto fenólico (como fenóis simples, ácidos fenólicos, ácido hidroxicinâmico e flavonóides) que são encontrados na maioria dos agentes antioxidantes naturais. O mecanismo envolvido na síntese de NPs diz que após a adição de sais de metal à solução de extrato vegetal em condições otimizadas, os íons metálicos rapidamente se ligam às moléculas de proteína disponíveis no extrato da planta com grupos funcionais (como OH e COOH) e são aprisionados. Isso leva a mudanças conformacionais em proteínas e expõe seus resíduos hidrofóbicos em fases aquosas. Isso faz com que a introdução de agentes redutores de extratos vegetais favoreça as transformações de metal aprisionado em NPs metálicas. No caso do extrato aquoso de *P. emarginatus* usado neste estudo, também se pode supor que, juntamente com flavonoides, compostos fenólicos e biomoléculas solúveis em água desempenharam um papel importante como agente redutor e estabilizador (ANANDALAKSHMI; VENUGOBAL; RAMASAMY, 2016; LEE *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2018).

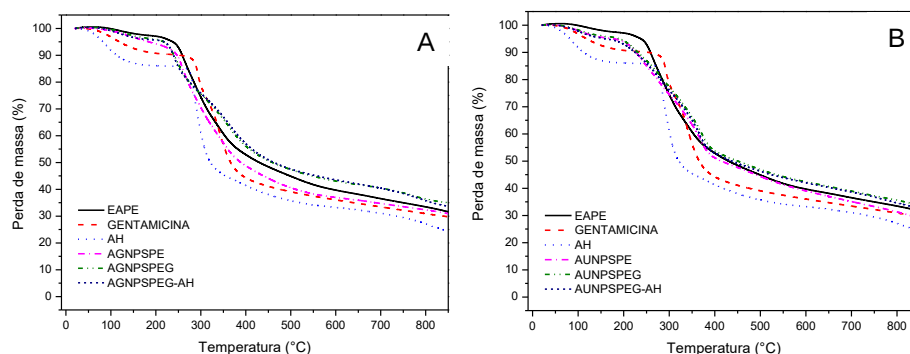
Todavia, é importante lembrar que como os extratos são compostos por diversos componentes bioativos, não é possível dizer com certeza, quais os princípios ativos estão relacionados diretamente com o processo de biorredução e estabilização das AgNPs-PE e associações e AuNPs-PE e associações. Para isso são necessários estudos posteriores que investiguem a natureza das moléculas dos extratos envolvidas nesses mecanismos (OLIVEIRA, 2018).

5.5.5 Análise Termogravimétrica (ATG)

Os comportamentos térmicos das nanopartículas foram investigados por medição simultânea de ATG e CED.

As curvas de ATG das amostras de EAPE, AgNPs-PE, AgNs-PEG, AgNPs- PEG-AH2, AH e sulfato de gentamicina estão representadas na Figura 35 (A) e das AuNPs-PE, AuNPs-PEG, AuNPS-PEG-AH2, e sulfato de gentamicina estão representadas na Figura 35 (B).

Figura 35 – Curvas de ATG de (A) EAPE, AgNPs-PE, AgNPs-PEG, AgNPs-PEG-AH2, AH, sulfato de gentamicina e de ATG de (B) EAPE, AuNPs-PE, AuNPs-PEG, AuNPS-PEG-AH2, AH e sulfato de gentamicina



Fonte: A autora.

Essas curvas mostraram que as propriedades térmicas das AgNPs-PE, AgNs-PEG, AgNPs-PEG-AH2 e das AuNPs-PE, AuNPs-PEG, AuNPS-PEG-AH2 biossintetizados com EAPE são semelhantes, o que está de acordo com Nguyen *et al.* (2018) que encontrou resultados semelhantes para as AgNPs e AuNPs sintetizadas com extrato aquoso da raiz de *Arctium lappa*.

Para as AgNPs-PE, AgNs-PEG, AgNPs-PEG-AH2 e das AuNPs-PE, AuNPs-PEG, AuNPS-PEG-AH2 foi observado que quase não há perda de peso abaixo de 150° C o que pode ser devido à perda de moléculas de água ligadas e não ligadas presentes nas nanopartículas obtidas (KHAN *et al.*, 2016; NGUYEN *et al.*, 2018). O comportamento destas amostras de AgNPs-PE, AgNs-PEG, AgNPs-PEG-AH2 e das AuNPs-PE, AuNPs-PEG, AuNPS-PEG-AH2 se manteve semelhante com a perda de peso em três etapas a primeira em torno de 150 °C, a segunda em torno de 375 °C essa perda de peso pode ser atribuída à degradação de compostos orgânicos, como ácidos fenólicos, flavonóides e carboidratos e a terceira em torno de 625 °C, provavelmente pela degradação térmica de compostos mais resistentes (MOLDOVAN *et al.*, 2018).

Ainda de acordo com Moldovan *et al.* (2018) o comportamento observado na ATG é consequência da degradação térmica dos compostos orgânicos do EAPE e dos fármacos AH2 e sulfato de gentamicina presentes no pó das NPs.

Os resultados indicaram que o AH2 também teve uma perda de peso em até 150 °C devido à perda de água absorvida. O ATG ainda exibiu decomposição térmica inicial do AH2 em torno de 230 °C, aumentando a temperatura aparecem mais dois

siniais de perda de peso um aproximadamente a 300 °C e outro em torno de 700 °C, essas observações foram de acordo com Elella, Mohamed e Saba (2018).

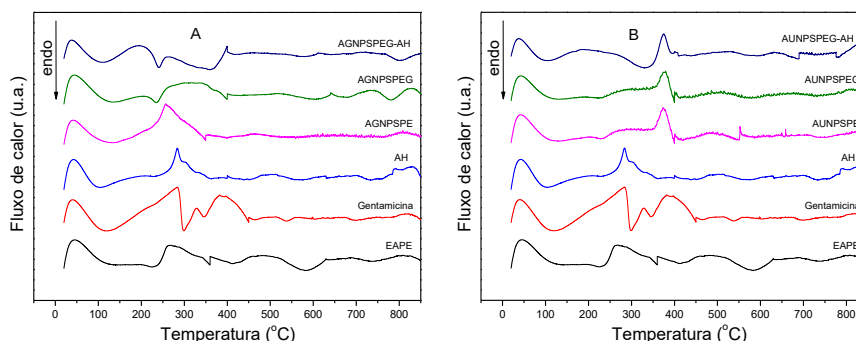
O fármaco puro sulfato de gentamicina, é uma mistura complexa de sulfatos de gentamicina C1 com ponto de fusão entre 94-100 °C, gentamicina C1a e gentamicina C2 compontos de fusão entre 107-124 °C. Algumas amostras comerciais podem conter quantidades significativas dos componentes menores de gentamicina C2a e gentamicina C2b. O ponto de fusão do complexo de sulfato de gentamicina C é dado como 218-237 °C (THAKUR; WANCHOO; SINGH, 2011).

A degradação térmica do sulfato de gentamicina ocorreu em três estágios. No primeiro estágio, ocorreu uma perda de massa em torno de 150 °C referente a perda de água, pois esse fármaco absorve água, em seguida por uma rápida perda de massa no segundo estágio em torno de 250 °C e no terceiro estágios em 405 °C, resultado semelhante foi encontrado por Thakur, Wanchoo e Singh (2011).

5.5.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (CED)

Os termogramas das EAPE, AgNPs-PE, AgNs-PEG, AgNPs-PEG-AH2, AH e sulfato de gentamicina estão representadas na Figura 36 (A) e das AuNPs-PE, AuNPs-PEG, AuNPS-PEG-AH2, e sulfato de gentamicina estão representadas na Figura 36 (B).

Figura 36 – Termogramas obtidos por CED de (A) EAPE, AgNPs-PE, AgPNs-PEG, AgNPs-PEG-AH2, AH, sulfato de gentamicina e de (B) EAPE, AuNPs-PE, AuNPs-PEG, AuNPs-PEG-AH2, AH e sulfato de gentamicina (B)



Fonte: A autora.

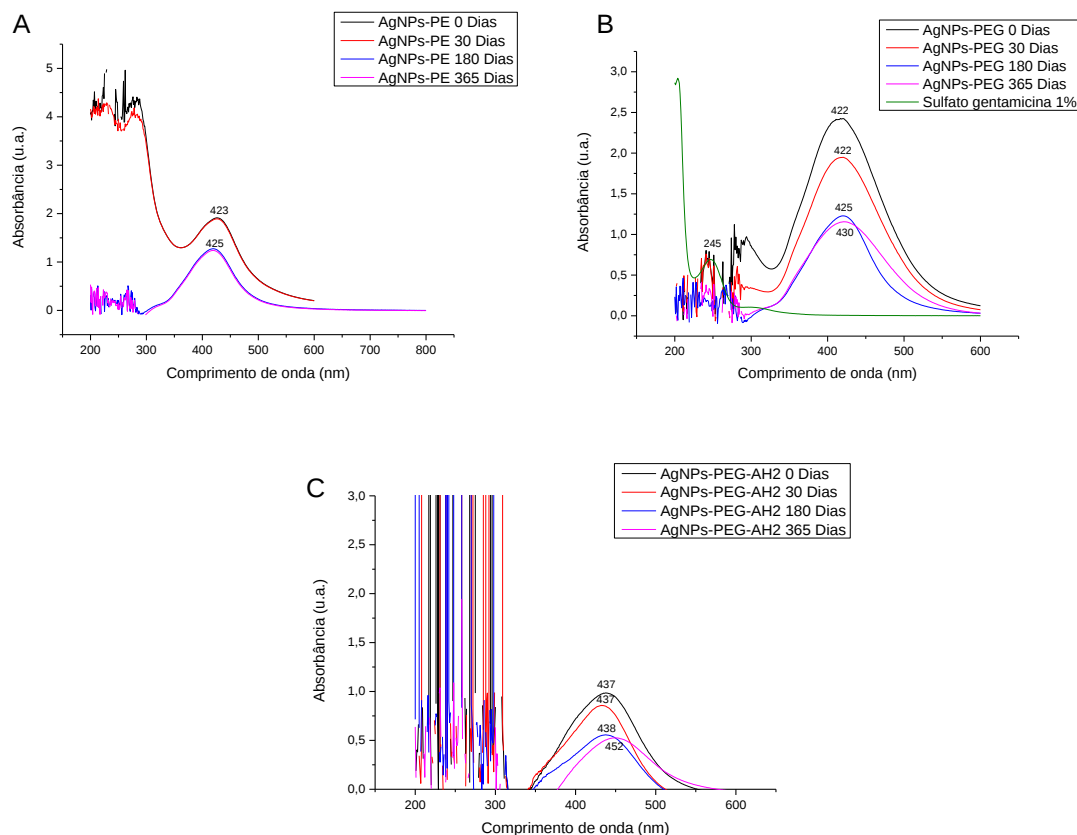
Os picos exotérmicos são atribuídos à oxidação de compostos orgânicos presentes nas NPs e associações (VO *et al.*, 2019). Foi também possível observar que o evento de fusão típico dos fármacos, AH2 e sulfato de gentamicina e do EAPE não foram evidenciados nas curvas de CED das AgNPs e associações bem como das AuNPs e associações. Este comportamento térmico sugere que ocorreu uma amorfização dos fármacos (MENDES, 2016).

5.6 ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS

5.6.1 Estudo da Estabilidade das AgNPs-PE e suas Associações

Os gráficos com os espectros do estudo da estabilidade das AgNPs-PE e suas associações está demonstrado na Figura 37.

Figura 37 – Espectros UV-Vis do estudo da estabilidade das AgNPs-PE (A), das AgNPs-PEG (B) e das AgNPs-PEG-AH2 (C)



Fonte: A autora.

O espectro de UV-Vis para as AgNPs-PE, Figura 37 A, mostra um pico centrado em 423 nm no dia da síntese e também após 30 dias de armazenamento ao abrigo da luz e em refrigeração, demonstrando que a estabilidade durante esse tempo foi mantida, sendo indicativo de que durante este período as AgNPs-PE mantiveram o tamanho e a homogeneidade das NPs. Entretanto, observa-se que na leitura do espectro UV-Vis para o dia 180 e para o dia 365, o valor foi de 425 nm havendo uma diminuição na intensidade e largura do pico nos dois intervalos de tempo avaliados, o que pode ser devido à uma redução na concentração de nanopartículas presentes na amostra.

Para as AgNPs-PEG, Figura 37 B, foi verificado que após 30 dias o pico de absorção no UV-Vis manteve-se na mesma faixa de absorção do dia da síntese, mas apresentou uma redução na intensidade, indicando redução das NPs na preparação. Para o período de 180 dias pode se observar que houve uma diminuição mais acentuada da intensidade do pico. Para o período de 365 dias é possível evidenciar uma redução na intensidade da absorção e um alargamento na amplitude no comprimento de onda, o que se deve à diminuição da quantidade e, também, aglomeração das nanopartículas.

E para as AgNPs-PEG-AH2, Figura 37 C, constatou-se que após 30 dias o pico de absorção diminuiu de intensidade, na avaliação decorridos 180 dias a diminuição da intensidade do pico foi maior além do que houve discreto alargamento da base do pico, o que também foi evidenciado no período de 365 dias, porém com maior comprimento de onda, o que pode estar relacionado com aumento da polidispersão.

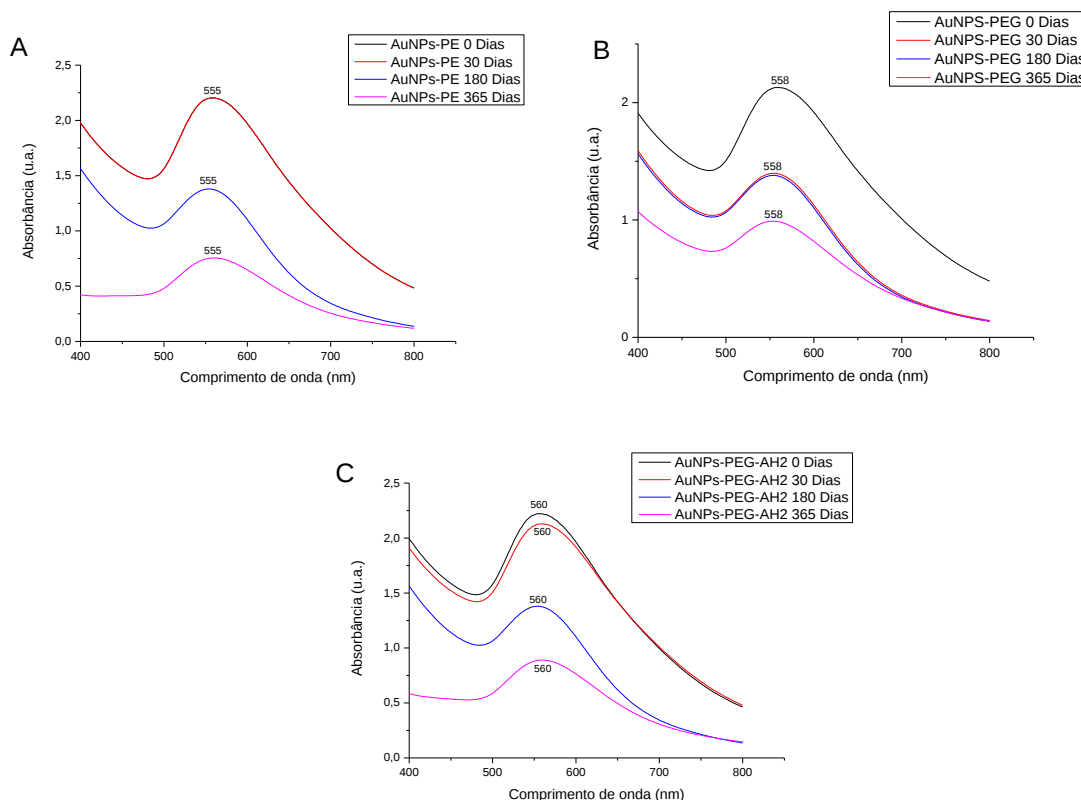
Como descrito as propriedades de uma nanopartícula dependem de sua forma e tamanho, que por sua vez dependem da metodologia escolhida para sua síntese. A reação de síntese de nanopartículas metálicas ocorre obedecendo aos passos básicos: nucleação, crescimento e estabilização. Na síntese de nanopartículas metálicas por síntese verde, normalmente os agentes redutores e estabilizadores estão presentes no extrato aquoso utilizado. Esses agentes têm também como função evitar a agregação das NPs (AHMED *et al.*, 2014; MOREIRA, 2018).

Conforme Cardoso *et al.* (2014) a presença da SPR, com comprimento de onda máximo de 440 nm, para as AgNPs, é indicativo de formato esférico das NPs e de tamanho reduzido. De acordo com Melo *et al.* (2012) quanto maior o tamanho da partícula, a SPR torna-se mais larga e atinge comprimentos de onda maiores.

5.6.2 Estudo da Estabilidade das AuNPs-PE e suas Associações

O estudo da estabilidade das AuNPs-PE e suas associações seguiu o mesmo critério utilizado para as AgNPs-PE e suas associações e podem ser visualizado na Figura 38.

Figura 38 – Espectro UV-Vis do estudo da estabilidade das AuNPs-PE (A), das AuNPs-PEG (B) e das AuNPs-PEG-AH2 (C)



Fonte: A autora.

Conforme pode ser observado no espectro de UV-Vis, Figura 38 A, o pico máximo de absorção se manteve em 550 nm durante todos os períodos avaliados, inclusive coincidindo intensidade e no período 0 dias e 30 dias, não houve deslocamento do comprimento de onda, o que é indicativo da estabilidade das AuNPs-PE. Porém nos períodos de 180 e 365 dias houve diminuição e alargamento da base do pico, levando consequentemente a diminuição da quantidade e alteração no tamanho das NPs.

Na avaliação das AuNPs-PEG na Figura 38 B, pode-se observar uma diminuição na intensidade dos picos de absorção e também um alargamento na curva,

mantendo o mesmo comprimento de onda 558 nm, o que indica diferença no tamanho das nanopartículas, mas mantendo a quantidade produzida.

Nos resultados obtidos para as AuNPs-PEG-AH2, Figura 38 C, durante os períodos avaliados, não houve mudança no comprimento de onda, somente na intensidade e largura da base do pico.

De modo geral, pode-se afirmar que todas as NPs se mantiveram estáveis por até 30 dias, o que está de acordo com Ahmed *et al.* (2014) e Singh *et al.* (2018). Esses mesmos autores sugerem que os fitoconstituintes presentes no extrato têm a capacidade de se coordenar com íons Ag^+ e Au^+ para manter a estabilidade das NPs.

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH (2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZILA).

As Tabelas 5 e 6 apresentam os resultados da atividade antioxidante (AAO %) e da concentração inibitória CI_{50} das amostras e do padrão testados.

Para as AgNPsPE e suas associações observamos, em comparação com o padrão de Ácido Ascórbico, que todas apresentaram atividade antioxidante próximas e parecidas com o padrão. Verificamos também que a capacidade antioxidante das amostras aumentou de maneira dependente em relação s concentrações testadas, isto é, foram dose-dependentes. No caso das AgNPsPE na concentração de 5,4 $\mu\text{g/mL}$ a atividade antioxidante foi de $84,40 \pm 0,06 \%$ enquanto que para a concentração de 0,3375 $\mu\text{g/mL}$ foi de $5,26 \pm 0,06 \%$. Já para as AgNPsPEG na maior concentração a atividade antioxidante foi de $85,55 \pm 0,08 \%$ e para a menor concentração foi de $5,34 \pm 0,08 \%$. Em contrapartida, as AgNPsPEG-AH foram as que apresentaram melhores resultados quando comparadas com as mesmas concentrações do padrão, na maior concentração a atividade antioxidante foi de $86,46 \pm 0,06 \%$ e na menor concentração foi de $5,44 \pm 0,07 \%$ enquanto na maior concentração do padrão de Ácido Ascórbico foi de $88,35 \pm 0,08 \%$ e na menor foi de $5,47 \pm 0,06 \%$.

Tabela 5 – Atividade antioxidante (AAO %) e concentração inibitória (CI₅₀) das AgNPs-PE, AgNPs-PEG, AgNPs-PEG-AH2 e do Ácido Ascórbico

Amostras	Concentração / µg/mL	AAO / %	CI ₅₀ / µg/ML
AgNPsPE	0,3375	5,260 ± 0,06	3,20 ± 0,005
	0,675	10,45 ± 0,07	
	1,35	21,18 ± 0,06	
	2,7	42,26 ± 0,08	
	5,4	84,40 ± 0,06	
AgNPsPEG	0,3375	5,340 ± 0,08	3,16 ± 0,005
	0,675	10,65 ± 0,05	
	1,35	21,35 ± 0,07	
	2,7	42,77 ± 0,08	
	5,4	85,55 ± 0,08	
AgNPsPEG-AH	0,3375	5,440 ± 0,07	3,12 ± 0,008
	0,675	10,61 ± 0,08	
	1,35	21,67 ± 0,07	
	2,7	43,47 ± 0,06	
	5,4	86,46 ± 0,06	
Ácido Ascórbico	0,3375	5,470 ± 0,06	3,05 ± 0,009
	0,675	10,85 ± 0,07	
	1,35	22,24 ± 0,09	
	2,7	44,35 ± 0,07	
	5,4	88,35 ± 0,08	

Fonte: A autora.

Da mesma maneira foi observado para as AuNPsPE e associações. A atividade antioxidante para as AuNPsPE na concentração de 9,8 µg/mL foi de 91,36 ± 0,08 % enquanto para a menor concentração 0,616 µg/mL foi de 5,59 ± 0,09 %. O resultado obtido para as AuNPsPEG na concentração maior foi de 92,23 ± 0,06 % e para a concentração menor foi de 5,64 ± 0,09 %. Como constatado nas AgNPsPEG-AH, as AuNPsPEG-AH foram as que apresentaram a atividade antioxidante melhor, sendo que para a concentração de 9,8 µg/mL o resultado encontrado foi de 94,35 ± 0,06 % e para a menor concentração 0,616 µg/mL foi de 5,85 ± 0,06 %; resultados bem próximos do padrão de Ácido Ascórbico onde na concentração de 9,8 µg/mL apresentou um valor de 96,53 ± 0,05 % e para a menor concentração 0,616 µg/mL foi de 6,07 ± 0,02 %.

Tabela 6 – Atividade antioxidante (AAO %) e concentração inibitória (Cl₅₀) das AuNPs-PE, AuNPs-PEG, AuNPs-PEG-AH2 e do Ácido Ascórbico

Amostras	Concentrações / µg/mL	AAO / %	Cl ₅₀ / µg/mL
AuNPsPE	0,616	5,59 ± 0,09	5,4 ± 0,005
	1,232	11,34 ± 0,06	
	2,463	22,74 ± 0,06	
	4,925	45,53 ± 0,05	
	9,85	91,36 ± 0,08	
AuNPsPEG	0,616	5,64 ± 0,09	5,35 ± 0,014
	1,232	11,39 ± 0,09	
	2,463	23,12 ± 0,08	
	4,925	46,15 ± 0,09	
	9,85	92,23 ± 0,06	
AuNPsPEG-AH	0,616	5,85 ± 0,06	5,21 ± 0,005
	1,232	11,73 ± 0,09	
	2,463	23,57 ± 0,08	
	4,925	47,35 ± 0,06	
	9,85	94,35 ± 0,06	
Ácido Ascórbico	0,616	6,07 ± 0,02	5,10 ± 0,004
	1,232	12,15 ± 0,06	
	2,463	24,24 ± 0,08	
	4,925	48,37 ± 0,08	
	9,85	96,53 ± 0,05	

Fonte: A autora.

Esse aumento na atividade antioxidante tanto das AgNPsPEG-AH quanto das AuNPsPEG-AH em comparação às AgNPsPE e as AuNPsPE pode estar relacionado a associação com o Ácido Hialurônico (AH). De acordo com Ke *et al.* (2011), várias pesquisas têm demonstrado que o AH tem propriedades antioxidantes *in vitro* e *in vivo*. Evidências crescentes indicam que muitos tipos de polissacarídeos, que são amplamente distribuídos em animais, plantas e microrganismos possuem potenciais ações na prevenção de danos oxidativos em organismos vivos eliminando EROs ou aumentando as atividades de enzimas antioxidantes. Esta pesquisa sugere que a associação dos polissacarídeos presentes no EAPE e do AH potencializaram a atividade antioxidante.

Quanto aos valores de Cl₅₀ Caffaro (2014) e Salari *et al.* (2019) e afirmam que os valores de Cl₅₀ são inversamente proporcionais à atividade antioxidante, isto é, quanto menor o valor, maior é a capacidade antioxidante. Constatamos que em nossas formulações os valores de Cl₅₀ foram promissores e bem próximos do valor de Cl₅₀ do padrão de Ácido Ascórbico, sendo que a Cl₅₀ das AgNPsPEG-AH foi de 3,12 ± 0,008 µg/mL e a Cl₅₀ Ácido Ascórbico foi de 3,05 ± 0,009 µg/mL e para as AuNPsPEG-AH a Cl₅₀ foi de 5,21 ± 0,005 µg/mL e a para o Ácido Ascórbico foi de 5,10 ± 0,004 µg/mL.

O oxigênio é uma molécula altamente reativa e pode ser parcialmente reduzido para formar agentes quimicamente reativos, num processo mediado por transferência de elétrons ou absorção de energia que pode gerar as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (DUTRA, 2008).

O estresse oxidativo está associado a produção de radicais livres potencialmente prejudiciais e envolvidos na patogênese de várias doenças, tais como: aterosclerose, estados neurodegenerativos, artrite reumatóide, *Diabetes mellitus 2*, doenças cardiovasculares e neoplasias além de estarem vinculados ao processo de envelhecimento; neste último causando danos e/ou mutações celulares. Esses efeitos são decorrentes da ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), genericamente denominadas como espécies reativas (ERs), as quais modificam o equilíbrio oxidativo celular, sendo também importantes mediadores de lesões inflamatórias (CHEN; BERTIN; FROLDI, 2013; HAMELIAN *et al.*, 2018; ROSA *et al.*, 2019; SENS, 2014).

As EROs e os radicais livres são facilmente gerados pelos produtos das vias metabólicas (via endógena) ou por elementos, tais como: poluição, estresse, radiação ionizante, luz ultravioleta, compostos clorados, fumo, xenobióticos, exposição a metais pesados entre outros (via exógena) (DUTRA, 2008; JUSTUS, 2016; SENS, 2014). Essas moléculas que contêm oxigênio, incluindo íon superóxido (O_2^-), oxigênio singlete (O^2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e íon hidroxil (OH^-), são altamente reativas quando expostas a outras biomoléculas: como proteínas, DNA, lípides e ácidos graxos (DUTRA, 2008; FURLAN *et al.*, 2015; JUSTUS, 2016).

Os radicais livres são moléculas com a deficiência de um elétron em sua camada mais externa, permanecendo com outro elétron desemparelhado que se encontra na molécula de oxigênio (EROs) ou nitrogênio (ERNs), o que os torna espécies altamente reativas. Sua ação, em ambientes celulares ocorre de forma cumulativa e em cadeia; sendo que um radical livre atua sobre uma determinada molécula retirando-lhe um elétron e fazendo com que esta se torne reativa; assim potencializando sua ação e de forma sucessiva sobre outras moléculas (BOSCARDIN 2009; DUTRA, 2008; SENS, 2014).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica e, quando produzidos em grande quantidade e/ou não eliminados de forma eficaz prejudicam ou danificam o funcionamento celular; podendo inclusive causar sua

morte. Mas há importantes aspectos nos quais os radicais livres participam; produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (DUTRA, 2008; ROSA *et al.*, 2019;).

Diferentes mecanismos, nos quais os compostos antioxidantes realizam suas propriedades de eliminação, foram documentadas; atuam como uma barreira física para impedir a geração de ERs, eles poderiam acessar sítios biológicos alvo, atuar como uma armadilha química capturando energia e elétrons quelantes; como uma espécie reativa eliminando o sistema catalítico e quebrando as cadeias redox e eliminando radicais; ou ligando-se a compostos de metal direcionados e evitando a formação da cadeia redox. A maioria deles depende da taxa de transferência do átomo de hidrogênio dos compostos para os radicais (FURLAN *et al.*, 2015).

As substâncias com atividade antioxidante ocorrem naturalmente nas plantas superiores e desempenham um papel significativo contra as ERs, há um crescente interesse no consumo de produtos naturais, tais como: cereais, leguminosas, nozes, frutas e vegetais com possível atividade antioxidante, bem como nas funções bioquímicas protetoras desenvolvidas por essas substâncias antioxidantes; muitas das quais ocorrem naturalmente nas células dos organismos que as contêm (HAMELIAN *et al.*, 2018; MENSOR *et al.*, 2001).

Os agentes antioxidantes compreendem uma ampla variedade de compostos que assumem a função de intervenção, mesmo em concentrações mínimas em relação ao substrato oxidável, capaz de estabilizar ou desativar, minimizar, retardar, prevenir ou impedir a oxidação de um substrato por radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (BOSCARDIN, 2009; DUTRA, 2008; SENS, 2014).

Os antioxidantes, provenientes da dieta, mais comumente utilizados pelo organismo a fim de combater os radicais livres, são α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos, dentre os quais se destacam os flavonoides (DUTRA, 2008).

De modo geral, os polifenóis, particularmente os flavonoides e taninos, possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais livres, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E. Essa mesma atividade sequestrante está diretamente ligada ao potencial de oxidação dos flavonoides e das espécies a serem sequestradas. Quanto menor o potencial de oxidação do flavonoide, maior é sua atividade como sequestrador de radicais livres. Quanto maior o número de hidroxilas,

maior a atividade como agente doador de hidrogênio (H^+) e de elétrons (DUTRA, 2008; SALARI *et al.*, 2019).

Dutra (2008) em sua pesquisa com sementes de *P. emarginatus* constatou a presença de compostos fenólicos, principalmente os constituintes flavônicos.

Há uma série de estudos, que estão citados no texto, realizados por pesquisadores na área de nanotecnologia com várias plantas medicinais, mas nenhum relato, até o momento está disponível sobre a síntese de nanopartículas de prata e ouro através do extrato aquoso de sementes de *P. emarginatus*.

Assim, esta análise teve como objetivo estudar a atividade antioxidante de nanopartículas mediadas por *P. emarginatus*.

As plantas contêm metabólitos específicos que são reconhecidos por realizar uma série de atividades necessárias para seu crescimento e manutenção metabólica. Compostos fenólicos e flavonoides, componentes biologicamente ativos, são os principais agentes que podem doar hidrogênio para radicais livres e, assim, reduzir ou impedir a cadeia de reação de oxidação lipídica. O alto potencial desses compostos para eliminar os radicais pode ser explicado pela presença de seus grupos hidroxila fenólicos. De acordo com Salari *et al.* (2019), Kharat e Mendhulkar (2016) compostos fenólicos e flavonoides são os fitoquímicos mais importantes responsáveis pela capacidade antioxidante das AgNPs e AuNPs biossintetizadas, porque o grupo fenólico facilita a conversão de nitrato de prata em AgNPs devido à sua capacidade de doação de elétrons. É bem conhecido e também relatado na literatura que a síntese de nanopartículas mediada por plantas envolve redução sequencial seguida por limitação com esses constituintes de plantas (EL-RAFIE; HAMED, 2014).

De acordo com Mensor *et al.* (2001) estudos demonstraram que a interação de um potencial antioxidante com DPPH depende de sua conformação estrutural. O número de moléculas de DPPH que são reduzidas parece estar correlacionado com o número de grupos hidroxila disponíveis. Há forte indicação que o radical livre DPPH abstrai o hidrogênio fenólico da molécula doadora de elétrons e este poderia ser o mecanismo geral da ação de eliminação de flavonóis antiperoxidativos, por exemplo. Com base no mecanismo de redução da molécula de DPPH amplamente descrita na literatura que está correlacionado com a presença de grupos hidroxila na molécula antioxidante, podemos inferir que a atividade muito boa dos extratos polares é provavelmente devido à presença de substâncias com um grupo hidroxila disponível, fenólico ou não (MENSOR *et al.*, 2001). Este requisito estrutural pode estar ligado à

presença de flavonoides ou taninos condensados, que encontramos na pesquisa fitoquímica do extrato aquoso de *P. emarginatus*.

Os resultados obtidos nesta pesquisa corroboram a pesquisa de Sutan *et al.* (2018); a qual sugere que os dois mecanismos envolvidos na fitossíntese de ouro e, respectivamente, prata não são idênticos e, provavelmente, as biomoléculas envolvidas têm uma contribuição ligeiramente diferente na redução da prata e, respectivamente do ouro. No entanto estudos adicionais são necessários para apoiar esta afirmação e propor um mecanismo mais consistente.

Estes resultados sugerem que a camada protetora das AgNPsPE e das AuNPsPE pelo extrato aquoso de *P. emarginatus* parece ser o principal contribuinte para a atividade de eliminação dos radicais livres, como propõe Oh *et al.* (2017) em sua pesquisa com *Chaenomeles sinensis* e, que de acordo com Furlan *et al.* (2015) e Sutan *et al.* (2018) a participação e sinergismos de flavonoides podem contribuir para a capacidade antioxidante das nanopartículas e suas interações com outros compostos e podem potencializar ou interferir na capacidade antioxidante.

Os resultados deste experimento mostraram que o EAPE pode conter compostos que pela ação sinérgica de várias biomoléculas que agem na formação das nanopartículas como agentes redutores e estabilizadores potenciais são capazes de doar átomos de hidrogênio aos radicais livres para se tornarem moléculas mais estáveis, e são responsáveis pela atividade antioxidante verificada.

Muitos extratos vegetais conjugados com NPs têm mostrado atividade antioxidante promissora e, portanto, também têm potencial para o desenvolvimento de novos candidatos terapêuticos contra lesões causadas por substâncias que causam estresse oxidativo. Esses bioconjugados têm demonstrado propriedades anti-inflamatórias *in vitro* e *in vivo*, como também atividade antimicrobiana. Além disso, a síntese verde de NPs pode aumentar a biodisponibilidade e biocompatibilidade das NPs (GHRAMH; KHAN; IBRAHIM, 2019).

Todos esses resultados sugerem que a associação de extratos vegetais com nanopartículas de prata e ouro podem servir como agentes anti-radicaís promissores. E, que de acordo com Furlan *et al.* (2015) a descoberta de compostos antioxidantes é crítica para novas pesquisas de drogas e tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

5.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

A hemólise induzida por AgNPsPE e suas associações está descrita na Tabela 7. Como podemos observar a porcentagem de hemólise para a concentração de 5,4 µg/mL para as AgNPsPE foi de $2,1 \pm 0,35$ % enquanto que para as AgNPsPEG nesta mesma concentração foi de $1,5 \pm 0,11$ % e para as AgNPsPEG-AH foi de $0,8 \pm 0,11$ %. Para a menor concentração 0,337 µg/mL os valores obtidos para as AgNPsPE e para as AgNPsPEG foi de $0,7 \pm 0,20$ % e para as AgNPsPEG-AH $0,4 \pm 0,23$ %.

Tabela 7 – Porcentagem de hemólise das AgNPs-PE, AgNPs-PEG, AgNPs-PEG-AH2

Amostras	Concentração / µg/mL	Porcentagem de Hemólise / %
AgNPsPE	0,337	$0,7 \pm 0,20$
	0,675	$1,1 \pm 0,17$
	1,35	$1,4 \pm 0,25$
	2,7	$1,5 \pm 0,30$
	5,4	$2,1 \pm 0,35$
AgNPsPEG	0,337	$0,7 \pm 0,20$
	0,675	$0,8 \pm 0,11$
	1,35	$1,0 \pm 0,11$
	2,7	$1,2 \pm 0,06$
	5,4	$1,5 \pm 0,11$
AgNPsPEG-AH	0,337	$0,4 \pm 0,23$
	0,675	$0,6 \pm 0,23$
	1,35	$0,7 \pm 0,20$
	2,7	$0,8 \pm 0,11$
	5,4	$0,8 \pm 0,11$

Fonte: A autora.

Os resultados obtidos no teste de hemólise das AuNPsPe e suas associações estão retratados na Tabela 8. Como podemos constatar a porcentagem de hemólise para as AuNPsPE e suas associações foi ligeiramente menor. Para a maior concentração 9,85 µg/mL nas AuNPsPE e AuNPsPEG foi de $1,1 \pm 0,17$ % e $1,1 \pm 0,06$ % respectivamente; para as AuNPsPEG-AH foi de $1,0 \pm 0,11$ %. Na menor concentração 0,616 µg/mL para as AuNPsPE foi de $0,5 \pm 0,20$ %, para as AuNPsPEG foi de $0,3 \pm 0,15$ % e para as AuNPsPEG-AH foi de $0,2 \pm 0,06$ %.

Tabela 8 – Porcentagem de hemólise das AuNPs-PE, AuNPs-PEG, AuNPs-PEG-AH2

Amostras	Concentração / $\mu\text{g/mL}$	Porcentagem de Hemólise / %
AuNPsPE	0,616	$0,5 \pm 0,20$
	1,232	$0,5 \pm 0,11$
	2,463	$0,8 \pm 0,11$
	4,925	$0,9 \pm 0,20$
	9,85	$1,1 \pm 0,17$
AuNPsPEG	0,616	$0,3 \pm 0,15$
	1,232	$0,5 \pm 0,11$
	2,463	$0,6 \pm 0,11$
	4,925	$0,8 \pm 0,11$
	9,85	$1,1 \pm 0,06$
AuNPsPEG-AH	0,616	$0,2 \pm 0,06$
	1,232	$0,3 \pm 0,15$
	2,463	$0,4 \pm 0,11$
	4,925	$0,7 \pm 0,20$
	9,85	$1,0 \pm 0,11$

Fonte: A autora.

O ensaio de hemólise é um procedimento rápido, eficiente, simples e de baixo custo para investigar o dano oxidativo induzido por espécies reativas de oxigênio na membrana dos eritrócitos e avaliar a atividade antioxidante de novos compostos por medição espectrofotométrica da liberação de hemoglobina (BANERJEE *et al.*, 2008; CÓTICA *et al.*, 2012).

A hemólise é a ruptura dos eritrócitos com a liberação de seu conteúdo, como a hemoglobina, para os arredores, levando a anemia, icterícia e insuficiência renal. Ela acontece devido ao estresse oxidativo que algumas substâncias, como as NPs, podem causar (BANERJEE *et al.*, 2008; GHRAH; KHAN; IBRAHIM, 2019; HUANG *et al.*, 2016; SELVAKUMAR *et al.*, 2018).

Os eritrócitos são células enucleadas, contendo em sua membrana celular ácidos graxos poli-insaturados e a principal proteína encontrada dentro dos eritrócitos é o pigmento vermelho chamado hemoglobina. São células frágeis e altamente suscetíveis a danos celulares induzidos por EROs na membrana, peroxidação lipídica, levando ao vazamento de hemoglobina, conhecido como hemólise (BANERJEE *et al.*, 2008; GHRAH; KHAN; IBRAHIM, 2019; SELVAKUMAR *et al.*, 2018).

A modificação oxidativa de constituintes celulares, incluindo lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, tem sido implicada na etiologia de diferentes condições patológicas e no envelhecimento. O dano causado pelo estresse oxidativo é exacerbado se as próprias enzimas antioxidantes são danificadas e inativadas por tais eventos. Enquanto oxigênio singleto (O_2) é considerado o principal mediador da

reação, as espécies de oxigênio como o (O_2^-) e íon hidroxila (OH^-) são conhecidos por induzirem efeitos deletérios, incluindo peroxidação lipídica e danos à membrana (ALI; GATASHEH; NASEEM, 2000).

Os eritrócitos possuem enzimas protetoras como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, que são eliminadoras de espécies reativas. Além disso, tanto a metahemoglobina quanto a oxihemoglobina podem reagir com O_2^- levando à precipitação de hemoglobina, promovendo hemólise. A hemoglobina parece ser o principal local de danos quando várias drogas oxidativas são usadas. Sob outras condições oxidativas, a membrana parece ser o alvo de lesão que leva à hemólise. A administração de certos medicamentos, comumente designados como oxidantes, estimula a geração de EROs, que pode sobrecarregar o mecanismo de proteção celular (ALI; GATASHEH; NASEEM, 2000).

Dentre as NPs metálicas, a prata coloidal é um dos nanomateriais mais notáveis principalmente devido às suas propriedades biológicas. Numerosas pesquisas demonstraram o potente efeito inibitório contra microorganismos, a eliminação de radicais livres e propriedades anti-inflamatórias, cicatrização de feridas, efeitos antitumorais e antiangiogênicos das AgNPs. Estudos recentes têm demonstrado que vários tipos de substâncias presentes em NPs podem agir como antioxidantes eficientes ou eliminadores de EROs. Portanto, a funcionalização de AgNPs com antioxidantes naturais poderia reduzir a produção de EROs e proteger as proteínas e lipídios celulares e assim neutralizar as reações adversas (MOLDOVAN *et al.*, 2018).

De acordo com Asharani *et al.* (2010) as AuNPs são hemocompatíveis e, que além do tamanho, a funcionalização da superfície é o principal parâmetro que controla a absorção e toxicidade. A funcionalização da superfície também pode estabilizar as NPs e prevenir a agregação, mantendo o tamanho da nanoescala em líquidos, mesmo com a adição de carga, pois estas podem controlar sua bioatividade e absorção.

De acordo com Chen *et al.* (2015) e Choi *et al.* (2011) o critério da norma ASTM E2524-08 é que a porcentagem de hemólise maior que 5 % indica que a nanopartícula de teste causa danos às hemácias. Portanto, os resultados deste ensaio de citotoxicidade demonstraram que as AgNPsPE e suas associações, bem como as AuNPsPE e associações obtidas não apresentaram propriedades hemolíticas em eritrócitos de carneiro. Esses resultados sugerem que as NPs testadas mostram

atividade antioxidante nas hemácias evitando hemólise acima dos padrões, indicando seu potencial para aplicações farmacêuticas e biotecnológicas.

5.9 ENSAIO DE TOXICIDADE COM NÁUPLIOS DE *Artemia salina*

A leitura foi realizada após 24 e 48 horas para verificação de microcrustáceos mortos, considerando-se mortos aqueles que não se movimentaram durante a observação, nem com a leve agitação do frasco, de acordo com Bueno e Piovezan (2019), a *A. salina* é um crustáceo ativo em água salina, a falta de movimento e sedimentação são os indicadores de morte do mesmo.

A taxa de mortalidade dos náuplios de *A. Salina* gerada pelas AgNPs-PE e suas associações está demonstrada na Tabela 9.

Tabela 9 – Toxicidade das AgNPs-PE, AgNPs-PEG, AgNPs-PEG-AH2 e AgNO₃ frente à *A. salina*

Concentração / µg/mL	AgNPs-PE / %	AgNPs-PEG / %	AgNPS-PEG-AH2 / %	AgNO ₃ / %
86,4	100	100	100	100
43,2	100	100	100	100
21,6	50	50	50	50
10,8	0	0	0	0

Fonte: A autora.

Como podemos constatar a mortalidade encontrada para as AgNPs-PE, suas associações e para o AgNO₃ nas concentrações de 86,4 µg/mL e 43,2 µg/mL foi de 100 %, já na concentração de 21,6 µg/mL baixou para 50 % e na concentração de 10,8 µg/mL foi para as AgNPs-PE e para as AgNPs-PEG, AgNPs-PEG-AH2 e AgNO₃ foi de 0 %.

Apesar de ser relativamente simples, este ensaio tem a capacidade de gerar informações de grande utilidade de forma rápida, econômica e com reprodutibilidade. Devido a estas características, esta metodologia vem sendo empregada além da linha de pesquisa em produtos naturais, na avaliação das propriedades antifúngicas, antiparasitárias bem como em áreas como síntese de medicamentos, farmacologia, neurologia, química, meio ambiente, ecologia, *screening* biológico, e outras pesquisas (HIROTA *et al.*, 2012; KASKA; MAMMADOV, 2019).

Muhammad *et al.* (2019), citam que um dos ensaios mais extensivamente aplicados no estudo de nanotoxicologia é o ensaio de letalidade de *A. salina*, usado

para rastrear o efeito tóxico de diferentes substâncias por ser um ensaio simples, de triagem, rápido e econômico.

Harada (2009) explica que esse ensaio está sendo utilizado em várias atividades biológicas, confirmando sua sensibilidade e versatilidade em estudos de toxicidade.

Importante destacar que o gênero *Artemia* sp. foi aceito como um modelo de organismo confiável para experiências de toxicidade aquática e nanotoxicidade, visto que a ISO TS 20787 foi publicada recentemente para padronizar os testes de nanotoxicidade com este microcrustáceo (LISH *et al.*, 2019).

Nesta pesquisa as concentrações testadas tanto para as AgNPs-PE e associações quanto para AuNPs-PE e associações foram acima das concentrações que apresentaram atividade no teste antimicrobiano, no teste de atividade antioxidante e no teste de hemólise.

Para o EAPE a mortalidade foi de 0 %, em todas as concentrações testadas, resultado semelhante foi encontrado por Lima *et al.* (2011) no estudo com os extratos do fruto de *Euterpe edulis* Martius.

Foi demonstrado que os primeiros estágios de desenvolvimento da *A. salina* são altamente vulneráveis a toxinas e que a taxa de letalidade é diretamente proporcional à concentração das amostras testadas, ou seja, é dependente da dose (ADEBAYO-TAYOA, SALAAMB; AJIBADE, 2019; KUMAR *et al.*, 2012).

Na pesquisa relatada por Rajakumar *et al.* (2017) com AgNPs sintetizadas a partir do extrato das flores de *Millettia pinnata* (L.) Panigrahi foi verificado efeito citotóxico frente aos náuplios de *A. salina*, na concentração de 36,41 µg/mL.

Semelhantes resultados também foram encontrados por Antonysamy; Thangiah e Irulappan (2015) com a observação de que a toxicidade aumentava de acordo com o aumento da concentração das AgNPs associadas ao extrato de *Dictyota bartayresiana* J.V.Lamouroux.

Na Tabela 10 podemos verificar que a taxa de mortalidade encontrada para as AuNPs-PE, suas associações e para o HAuCL₄ em todas as concentrações foi de 0 %.

Tabela 10 – Toxicidade das AuNPs-PE, AuNPs-PEG, AuNPs-PEG-AH2 e HAuCl₄ frente à *A. salina*

Concentrações /µg/mL	AuNPs-PE / %	AuNPs-PEG / %	AuNPS-PEG-AH2 / %	HAuCl ₄ / %
156,8	0	0	0	0
78,4	0	0	0	0
39,2	0	0	0	0
19,6	0	0	0	0

Fonte: A autora.

Equivalentes resultados foram encontrados por Balalakshmi *et al.* (2017) quando sintetizaram AuNPs com extrato das folhas de *Sphaeranthus indicus* Linn. em todas as concentrações testadas não houve mortalidade.

Da mesma forma Kesarla, Mandal e Bandapalli (2014) quando sintetizaram AuNPs a partir do extrato aquoso de *Terminalia bellirica* Gaertner não encontraram nenhuma toxicidade até a concentração de 1000 mg/L.

De acordo com Santos *et al.* (2014) produtos naturais que não apresentam toxicidade para *A. salina* podem ser tolerados através de sistemas biológicos.

E, ainda devido à natureza não tóxica, as AuNPs podem ser usadas em uma ampla gama de aplicações biológicas e orgânicas (KESARLA; MANDAL; BANDAPALLI, 2014).

As NPs metálicas têm alto impacto no campo da nanomedicina e também em outras áreas devido às vastas aplicações. Muitos compostos estão presentes em plantas medicinais que têm potencial para tratar diferentes doenças. Por isso, uma das técnicas indicadas para identificar toxicidade destas Nps metálicas sintetizadas por plantas é o ensaio com a *A. salina* (MUHAMMAD *et al.*, 2019).

Tanto as AgNPs-PE e suas associações como também as AuNPs-PE e suas associações apresentaram resultados que demonstraram a possibilidade de sua utilização em sistemas biológicos.

5.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DA MICRODILUIÇÃO EM CALDO

Os resultados obtidos na avaliação da atividade antimicrobiana estão indicados na Tabela 11.

Tabela 11 – Atividade bactericida do EAPE, das AgNPs-PE, das AgNPs-PEG, das AgNPs-PEG-AH2, do sulfato de gentamicina 1 % e do AgNO₃ 1 mmol/L contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e levedura

Microorganismos	EAPE / µg/mL	AgNPs- PE / µg/mL	AgNPs- PEG / µg/mL Ag + G	AgNPs-PEG- AH2 /µg/mL Ag + G	Sulfato Gentamicina / µg/mL	AgNO ₃ / µg/mL
<i>E. faecalis</i>	NAA	5,4	1,35 + 25	1,35 + 25	250	170
<i>E. coli</i>	NAA	5,4	0,675 + 12,5	0,675 + 12,5	125	170
<i>E. coli</i> RG	NAA	5,4	2,7 + 50	2,7 + 50	NAA	170
<i>K. pneumoniae</i>	NAA	5,4	0,675 + 12,5	0,675 + 12,5	125	170
<i>P. mirabilis</i>	NAA	5,4	0,675 + 12,5	0,675 + 12,5	125	170
<i>P. aeruginosa</i>	NAA	5,4	1,35 + 25	1,35 + 25	250	170
<i>S. aureus</i>	NAA	5,4	1,35 + 25	1,35 + 25	250	170
<i>C. albicans</i>	NAA	5,4	0,675 + 12,5	0,675 + 12,5	125	170

Fonte: A autora.

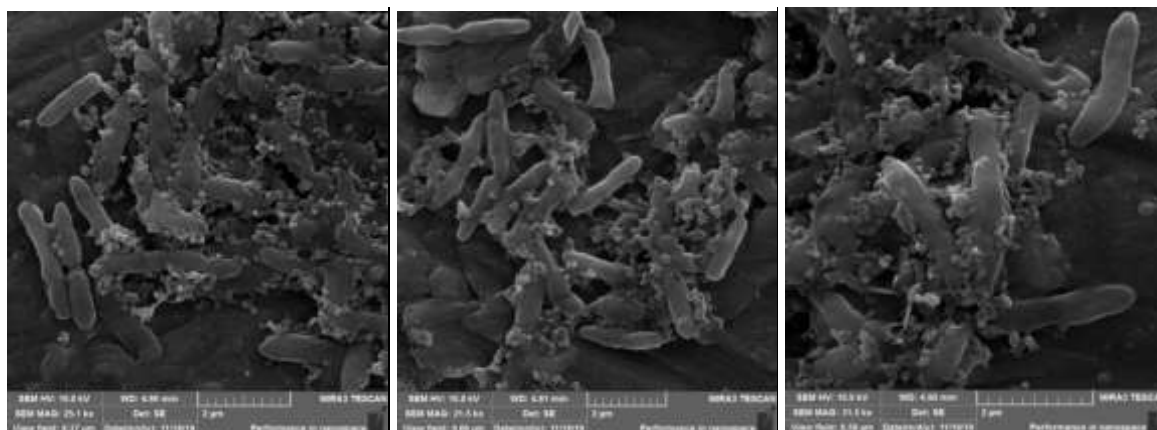
Notas: NAA: não apresentou ação; *E. coli* RG: *Escherichia coli* resistente a gentamicina; EAPE: extrato aquoso de *P. emarginatus* Vogel; AgNPs-PE: nanopartículas de prata associadas com EAPE; AgNPs-PEG: nanopartículas de prata associadas com EAPE e sulfato de gentamicina; AgNPs-PEG-AH2: nanopartículas de prata associadas com EAPE com sulfato de gentamicina e Ácido Hailurônico; AgNO₃: nitrato de prata; Ag + G: concentração de prata + concentração de sulfato de gentamicina

Conforme pode ser observado na Tabela 11, o EAPE não apresentou ação antimicrobiana contra nenhuma das cepas testadas, o que está de acordo com Oliveira (2018) que utilizou extrato aquoso de folhas de *P. emarginatus* frente às cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli* onde obteve resultados negativos para o extrato e, também Ahmed *et al.* (2014) que citam que o extrato de *Salicornia brachiata* Roxb. não mostrou atividade antibacteriana significativa, como também por Erdoğan *et al.*, (2016) no estudo da síntese de AgNPs por extrato das folhas de *Arbutus andrachne* L.

Já as AgNPs-PE apresentaram atividade antimicrobiana contra todas as cepas testadas, sendo mais eficientes que o sulfato de gentamicina atuando em concentrações mais baixas, podemos verificar nas Figuras 39, 40, 41, 42 a atividade bactericida das AgNPs-PE. Nestas imagens por MEV-EC podemos observar a aproximação das AgNPs-PE com as bactérias que permanecem próximas, aderem a parede celular causando danos nas células por distorcer a parede celular bacteriana dando origem a buracos e a deformações na membrana celular, perturbando assim as funções bacterianas, causando a lise e extravasamento de conteúdo celular. Na Figura 43 podemos averiguar a ação das AgNPs-PE frente aos esporos de *C.*

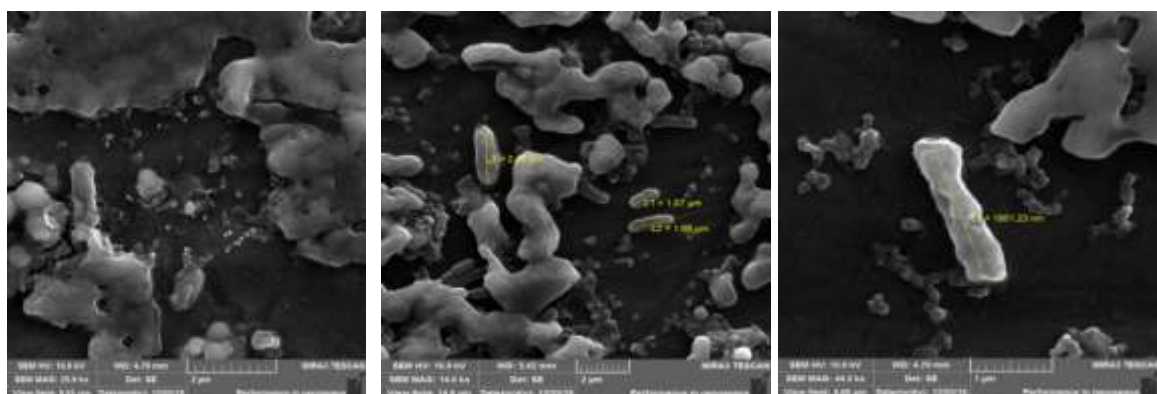
albicans, as setas indicam como as NPs podem inicialmente aderir e interagir com a parede do fungo causando a quebra de ligações e entrando no interior da célula fazendo perfurações.

Figura 39– Imagens de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo da atividade bactericida das AgNPs-PE contra *E. coli*



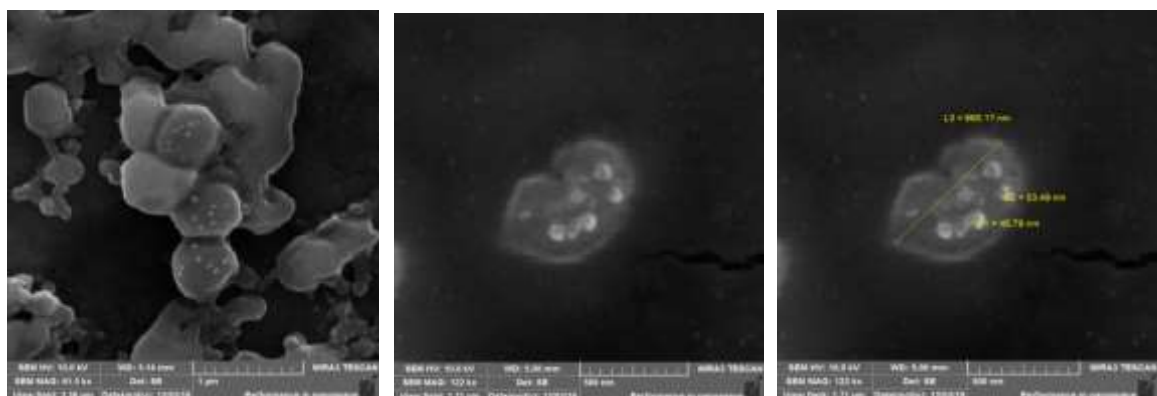
Fonte: A autora.

Figura 40 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo, em diferentes aumentos, da atividade bactericida das AgNPs-PE contra *P. aeruginosa*



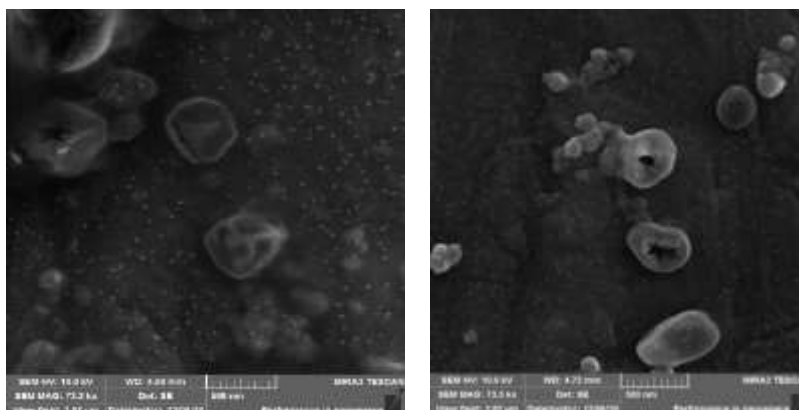
Fonte: A autora.

Figura 41– Imagens de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo, em diferentes aumentos, da atividade bactericida das AgNPs-PE contra *S. aureus*



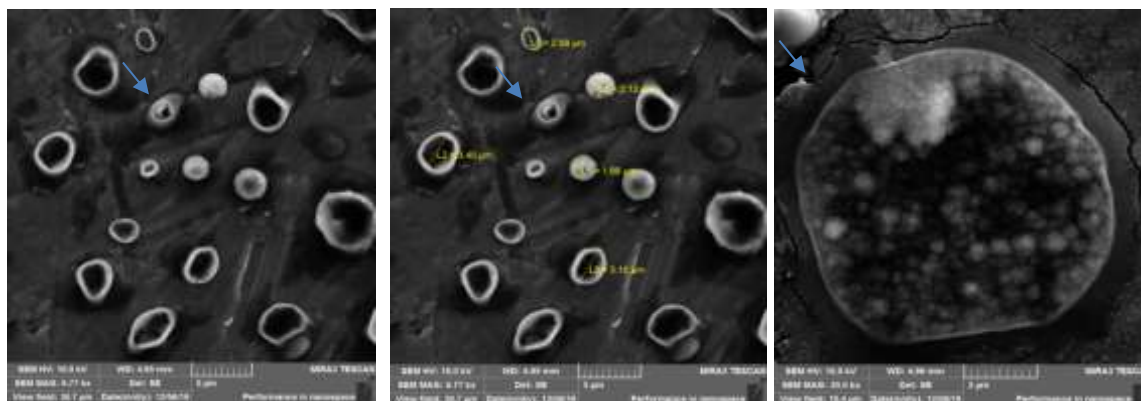
Fonte: A autora.

Figura 42 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo da atividade bactericida das AgNPs-PE contra *E. faecalis*



Fonte: A autora.

Figura 43 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo, em diferentes aumentos, da atividade fungicida das AgNPs-PE contra *C. albicans*



Fonte: A autora.

Comparando-se com o controle positivo, o sulfato de gentamicina, as AgNPs- PE, as AgNPs-PEG e as AgNPs-PEG-AH2 apresentaram atividade bactericida em concentrações mais baixas contra todas as bactérias testadas. Porém, AgNPs-PE, as AgNPs-PEG e as AgNPs-PEG-AH2 foram mais eficazes contra a bactéria *Escherichia coli* RG. Além disso, não foi observada atividade antimicrobiana no EAPE, que não apresentava as NPs, mostrando que a atividade antimicrobiana está diretamente relacionada com as AgNPs-PE, as AgNPs-PEG e as AgNPs- PEG- AH2.

Contudo, a presença do extrato e do sulfato de gentamicina associados às AgNPs pode influenciar neste processo de interação com a superfície das bactérias, assim, a influência desta bionanointerface na toxicidade precisa ser elucidada.

A natureza antibacteriana da prata é aprimorada na forma de NPs, as AgNPs são citadas em vários estudos por possuírem atividade antibacteriana contra várias

espécies de bactérias e, uma das causas é o aumento da área superficial das NPs o que propicia uma maior permeação nas membranas bacterianas. (BANALA; NAGATI; KARNATI, 2015; KATVA *et al.*, 2017; LOPES, 2017;).

Embora não seja uma regra, a atividade antimicrobiana das NPs depende do tamanho das AgNPs preparadas. Estudos sugerem que quanto menor o tamanho da partícula, maior a sua citotoxicidade. As AgNPs preparadas na faixa de tamanho de 20 nm (250 vezes menor que uma bactéria) é capaz de manter forma e tamanho constantes em solução, têm maior facilidade de absorção, mais fácil dissolução e a liberação dos íons prata ocorre mais lentamente quando em contato com micro-organismos (LI *et al.*, 2005; LOPES, 2017; OLIVEIRA, 2018).

De acordo com Banala, Nagati e karnati (2015), Lopes (2017) e Oliveira (2018) as AgNPs por apresentarem pequeno tamanho de partícula podem aderir e atravessar a parede celular das bactérias e, em seguida, as AgNPs podem ser oxidadas e formar íons metálicos Ag^+ , um ácido “soft” de Lewis ($\eta = 6,8$) que tem a tendência natural em reagir com bases. As células são compostas por átomos de enxofre e fósforo, que são bases “soft” de Lewis. Portanto, a interação entre os íons metálicos Ag^+ e os aminoácidos presentes nas células das bactérias foram do tipo ácido/base de Lewis. Essa forte interação acarreta danos às células e a morte celular.

Outro fator, segundo os mesmos autores, a ser considerado é a presença de enxofre e fósforo na constituição do DNA; os íons Ag^+ também podem ter interagido com essas bases “soft” de Lewis e destruído o DNA, o que teria causado a morte celular. A interação entre a prata e os átomos de enxofre/fósforo presentes no DNA podem levar a problemas na replicação do DNA das bactérias e ocasionar a morte desses micro-organismos. A interação das NPs com a parede celular das bactérias, DNA e enzimas pode causar um desequilíbrio no metabolismo celular, ocasionando o aumento na concentração das espécies reativas de oxigênio (EROs). Bem como podem resultar em danos na membrana com formação de poros, extravasamento do conteúdo intracelular, perda de viabilidade, lise e consequentemente morte celular.

No estudo da atividade antimicrobiana *in vitro* das AgNPs, AuNPs associadas com extrato de *Stereospermum suaveolens*, por Francis; Koshy e Mathew (2018), foi observado que as nanopartículas de prata possuíam um maior grau de inibição microbiana do que as nanopartículas de ouro, de acordo com o princípio HSAB (do inglês “hard” and “soft” acid and bases) descrito acima.

Observamos que houve efeito sinérgico maior na associação AgNPs-PEG e AgNPs-PEG-AH2 para *Enterococcus faecalis* do que somente com AgNPs-PE. O *Enterococcus faecalis* é um agente patogênico multirresistente associado às infecções adquiridas em hospitais, geralmente infecta pacientes com sistema imunológico debilitado, especialmente em unidades de terapia intensiva (KATVA *et al.*, 2017). Esse efeito sinérgico encontrado nesta pesquisa, sugere que a combinação de AgNPs-PEG e AgNPs-PEG-AH2 possa atuar no tratamento desta bactéria de forma mais consistente do que somente o sulfato de gentamicina ou AgNPs-PE isoladamente.

O mecanismo exato desta ação ainda está sob investigação; no entanto, vários mecanismos têm sido propostos. Foi relatado que, em comparação com as AgNPs isoladas a combinação/associação de complexos antibióticos + AgNPs liberará Ag^+ em uma taxa mais elevada, além disso, também foi proposto que a combinação de antibiótico com AgNPs através dos grupos ativos de antibióticos, como grupo hidroxila e grupo amina resultarão na conjugação de ambas as moléculas, resultando no aumento da concentração efetiva do antibiótico em um local específico (KATVA *et al.*, 2017).

Foi constatado por Jamaran e Zarif (2016) quando associaram AgNPs com gentamicina que houve efeito sinérgico melhor do que quando utilizado somente a gentamicina no tratamento de mastite causada por *S. aureus*. E, eles ainda argumentam que se as bactérias são resistentes a um dos antibióticos, outro agente antimicrobiano pode matar bactérias através de um mecanismo diferente. Este tipo de combinação de drogas é freqüentemente usado especialmente quando as bactérias se tornam resistentes.

Na pesquisa realizada por Agarwal; Agrawal e Singh (2014) as AgNPs sintetizadas a partir do extrato aquoso da folha de *Cicer arietinum* foram testadas quanto à atividade bactericida contra *E. coli* pelo método de difusão em disco demonstrando forte atividade antibacteriana em comparação com o antibiótico padrão Ampicilina.

Na investigação realizada por Anandalakshmi; Venugobal e Ramasamy (2016), o efeito antibacteriano de AgNPs preparadas com extrato aquoso das folhas de *Pedaliium murex* foi realizada usando: *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *Micrococcus flavus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *Bacillus pumilus*. As AgNPs sintetizadas apresentaram a maior atividade antibacteriana contra *E. coli* e *B. subtilis*,

respectivamente e menor atividade antibacteriana contra *K. pneumoniae*, *M. flavus*, *P. aeruginosa*, *B. pumilus* e *S. aureus*.

No ensaio antibacteriano realizado por Vo *et al.* (2019) com extrato aquoso de folhas de *Crinum latifolium* na produção de AgNPs contra *E. coli* e *Agrobacterium tumefaciens* e *Bacillus subtilis* e *S. aureus* foi constatado que as zonas de inibição bacteriana cresceram com o aumento da concentração de AgNPs. Esses autores ainda citam que a bioatividade de AgNPs biogênicas é fortemente afetada pela composição dos componentes bioativos do extrato da planta usada.

Ainda de acordo com Hamelian *et al.* (2018) os quais utilizaram extrato de *Thymus kotschyanus* para produção de AgNPs e avaliaram a atividade bactericida frente a *E.coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *B. subtilis*, verificaram que as AgNPs impediram o crescimento das bactérias mencionadas e que o aumento da concentração de AgNPs aumentou a zona de inibição, essas conclusões mostraram que as bactérias em uso têm uma diferença significativa, em termos de sensibilidade à concentração de Ag presente nas NPs sintetizadas, fato constatado nesta pesquisa.

Por fim, de acordo com Kuppusamy *et al.* (2016) o mecanismo fungicida de NP metálicas biossintetizadas tem mais potencial do que os fungicidas comerciais, como fluconazol e anfotericina. As AgNPs derivadas de plantas mostraram claramente os danos à membrana em *Candida* sp. e danos em componentes intercelulares de fungos e, finalmente, a função celular foi destruída. As multifuncionais AgNPs têm uma atividade promissora contra fungos produtores de esporos e destroem efetivamente o crescimento do fungo por mudanças significativas na estrutura da membrana celular fúngica, observamos nesta pesquisa a ação fungicida tanto das AgNPs-PE quanto suas associações.

Os resultados obtidos coincidiram com a literatura no campo das nanopartículas e certamente fornecem prova sobre a síntese de AgNPs e sua eficiência como agente antibacteriano (BANALA; NAGATI; KARNATI, 2015).

Nesta pesquisa foi verificado que não houve atividade bactericida do EAPE, das AuNPs-PE, das AuNPs-PEG, das AuNPs-PEG-AH2, e do HAuCl₄ 1mmol/L contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e levedura nas concentrações testadas.

Este resultado está de acordo com Vo *et al.* (2019) na pesquisa que realizaram com extrato aquoso de folhas de *Crinum latifolium* para produção de AgNPs e AuNPs observaram que atividade antibacteriana dos NPs metálicas é fortemente dependente do tamanho, forma, método de síntese e composições dos agentes de cobertura. A

atividade antibacteriana das NPs biossintetizadas foi avaliada com quatro microrganismos, incluindo *E. coli* e *A. tumefaciens* e *B. subtilis* e *S. aureus*. Os resultados mostraram que as AuNPs não exibiram atividade antibacteriana na faixa das concentrações testadas, enquanto as AgNPs inibiram fortemente todas as cepas bacterianas testadas.

Vo *et al.* (2019) propõem que para tornar a síntese verde de NPs mais eficiente e com melhor potencial antimicrobiano é necessário filtrar os princípios ativos presentes em extratos de plantas isoladamente ou em combinação. Isso poderia ajudar na descoberta de novos e potentes fármacos para lutar contra infecções por microrganismos multirresistentes. Do ponto de vista da ciência básica, seria interessante fracionar os metabólitos de plantas e investigar individualmente seu papel na formação das NPs. Eles sugerem que os avanços feitos na síntese verde de NPs é uma promessa ilimitada para o futuro próximo.

O mecanismo de ação microbiana em profundidade precisa de mais estudos, como métodos de citometria de fluxo com fluorescência, sugerido por Francis; Koshy e Mathew (2018) que estavam fora do escopo de nosso estudo.

O presente estudo indica claramente que as AgNPs-PE sintetizadas com EAPE e suas associações são eficazes na inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungo por causa de sua atividade antibacteriana considerável nas bactérias testadas. Então as AgNPs-PE sintetizadas e associadas podem ser uma alternativa aos antimicrobianos tradicionais para contornar o problema da resistência bacteriana (BINDHU *et al.*, 2014; GHRAMH; KHAN; IBRAHIM, 2019).

5.11 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR MEIO DA REDUÇÃO DO MTT

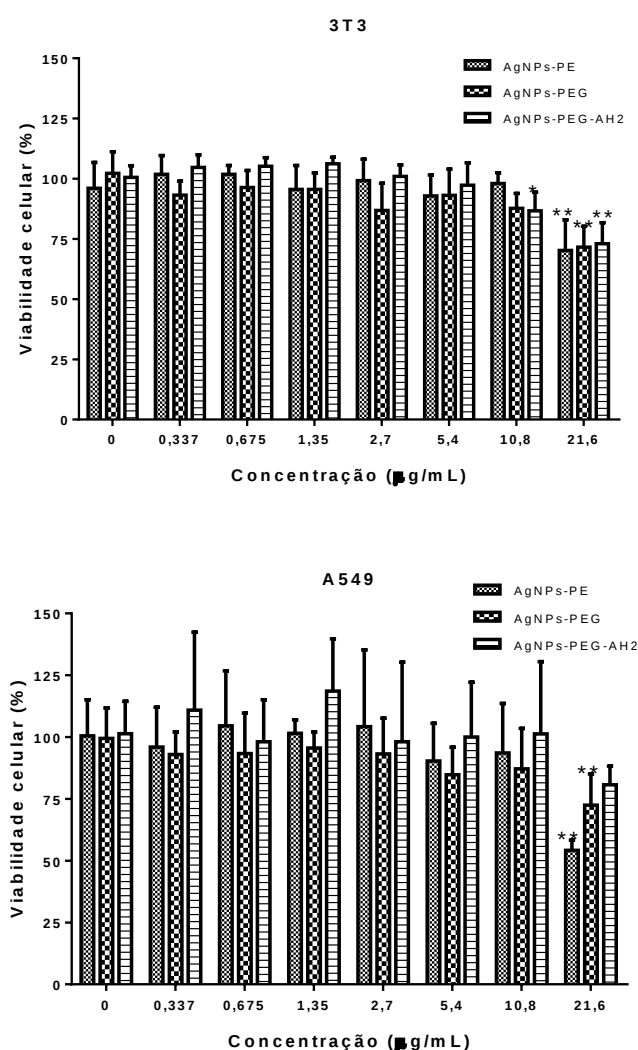
A viabilidade celular das AgNPs e associações, das AuNPs e associações e do EAPE sobre as linhagens de fibroblastos 3T3 e células A549 foi avaliada por meio do ensaio do MTT no período de 24 horas.

Os efeitos das AgNPs e associações sobre a viabilidade celular das linhagens de fibroblastos 3T3 e células A549 estão demonstrados na Figura 44. Observamos que houve uma redução da viabilidade celular para a linhagem 3T3 na concentração de 10,8 µg/mL para as AgNPs-PEG-AH2 redução significativa ($P < 0,01$) com valor de $86,68 \pm 7,675$ % de viabilidade celular e na concentração de 21,6 µg/mL para as AgNPs-PE, AgNPs-PEG e para as AgNPs-PEG-AH2 com redução significativa

($P < 0,001$) onde os valores são de $72,24 \pm 12,740 \%$; $73,18 \pm 13,580 \%$ e $74,29 \pm 8,798 \%$ de viabilidade celular respectivamente, quando comparadas com as células que receberam apenas o veículo (controle).

Para a linhagem A549 os efeitos das AgNPs e suas associações na viabilidade celular somente foi observado na concentração de $21,6 \mu\text{g/mL}$ onde tanto as AgNPs-PE e as AgNPs-PEG apresentaram diferença significativa ($P < 0,001$), em relação ao controle negativo, e a porcentagem de viabilidade celular apresentou valores de $54,20 \pm 4,113 \%$ e $72,44 \pm 12,680 \%$ respectivamente.

Figura 44 – Viabilidade celular das linhagens 3T3 e A549 após tratamento de 24 horas com AgNPs-PE, AgNPs-PEG e AgNPs-PEG-AH2

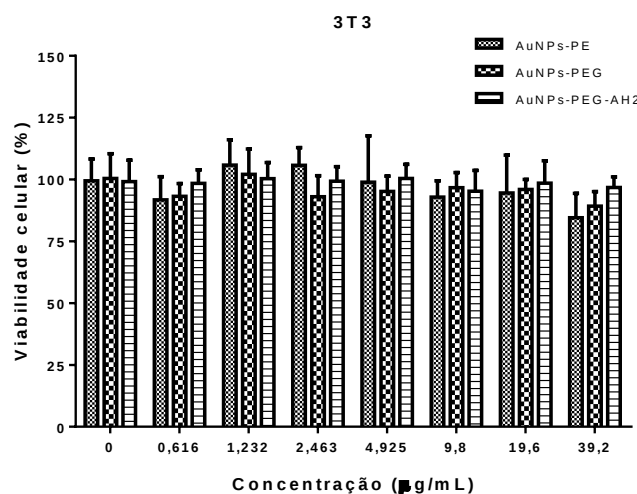


Fonte: A autora.

Nota: Dados expressos como média + desvio padrão ($n=6$). Análise estatística determinada por ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni, onde * indica diferença significativa $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ em relação ao controle negativo (meio de cultivo DMEM).

Para as AuNPs-PE e suas associações a linhagem celular 3T3 apresentou resistência em todas as concentrações testadas não havendo alteração significativa na viabilidade celular. Na linhagem celular A549 observamos que houve redução da viabilidade celular na concentração de 39,2 µg/mL com alteração significativa, ($P < 0,01$). Quando comparadas ao grupo controle as AuNPs-PE apresentaram viabilidade celular de $71,50 \pm 4,236 \%$; conforme podemos verificar na Figura 45.

Figura 45 – Viabilidade celular das linhagens 3T3 e A549 após tratamento de 24 horas com AuNPs-PE, AuNPs-PEG e AuNPs-PEG-AH2

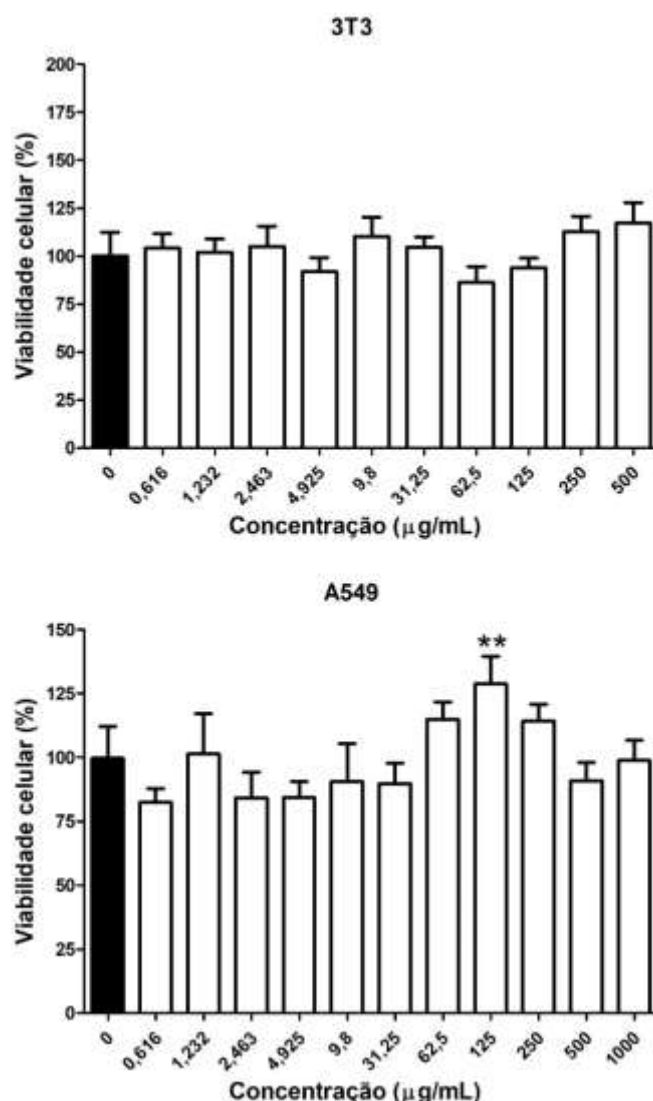


Fonte: A autora.

Nota: Dados expressos como média + desvio padrão (n=6). Análise estatística determinada por ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni, onde * indica diferença significativa $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ em relação ao controle negativo (meio de cultivo DMEM).

Os efeitos do EAPE sobre a viabilidade celular das linhagens 3T3 e A549 estão sintetizados na Figura 46 foi observado que em nenhuma das concentrações testadas houve redução significativa da viabilidade celular nas linhagens utilizadas. Na linhagem 3T3 não foi verificada diferença significativa em nenhuma das concentrações testadas, quando comparadas ao grupo controle. Para a linhagem A549 houve alteração significativa de ($P < 0,001$) para a concentração de 125 µg/mL com viabilidade celular de $127,6 \pm 4,521 \%$ em comparação ao controle.

Figura 46 – Viabilidade celular das linhagens 3T3 e A549 após tratamento de 24 horas com extrato aquoso das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel



Fonte: A autora.

Nota: Dados expressos como média + desvio padrão (n=6). Análise estatística determinada por ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni, onde * indica diferença significativa $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ em relação ao controle negativo (meio de cultivo DMEM).

A utilização de testes *in vitro*, por meio de ensaios de viabilidade celular, constitui o primeiro passo para a avaliação da compatibilidade biológica de uma substância e também dos nanomateriais, fornecendo elementos importantes para a análise da biocompatibilidade dos diferentes produtos analisados. Para ser aprovado no teste de citotoxicidade *in vitro*, um produto não deve ocasionar a morte das células nem afetar suas funções celulares. Os estudos *in vitro* representam uma alternativa potencialmente menos complicada e mais econômica para avaliar a resposta biológica aos nanomateriais, em comparação com estudos *in vivo*. Assim sendo, com o uso de

técnicas de cultura de células, os testes podem detectar a ocorrência de lise das células, de inibição do crescimento celular e de outros efeitos que possam ser desencadeados nas mesmas (AHMED *et al.*, 2017; ARAÚJO *et al.*, 2008).

Portanto, ainda existem muitas vantagens no uso de cultura de células como modelo experimental. O controle do ambiente, a homogeneidade da amostra, quando comparada ao uso de animais em experimentos, e a economia são as principais vantagens dessa técnica. Atualmente, com a implementação das Comissões de Ética de Uso de Animais em Pesquisa (CEUA), a cultura de células é o principal modelo alternativo para a substituição dos animais em experimentos de pesquisa (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

As células aderentes são oriundas de tecidos duros por isso dependentes de ancoragem e geralmente se propagam como uma monocamada ligadas a uma superfície de contato que é essencial para proliferação. A maioria das células derivadas de tecidos são dependentes de ancoragem (ALVES; GUIMARÃES, 2010), como é o caso das linhagens utilizadas nessa pesquisa, onde optou-se pelas células 3T3 e A549 por possuírem facilidade de obtenção, manutenção e manipulação, além do fato de terem a capacidade de se manter estáveis mesmo após muitas passagens, o que facilita o trabalho, fornecendo resultados mais confiáveis.

Para desenvolver ensaios que permitam testar a toxicidade das NPs é imperativo uniformizar metodologias, caracterizar devidamente as NPs do ponto de vista físico-químico e avaliar quais destas características são mais determinantes para a sua toxicidade. É também imprescindível desenhar testes novos ou adaptar os testes já existentes, no sentido de minimizar os erros cometidos na avaliação da toxicidade dos nanomateriais (FARIA, 2010).

Como descrito anteriormente, o ensaio de redução do MTT é um método de triagem, colorimétrico, comumente usado para medir a viabilidade celular através da leitura de sua absorvância. Por muito tempo foi atribuída a redução do sal de tetrazólio (MTT) pelas desidrogenases succínicas mitocondriais que produziam cristais de formazan púrpura que não são solúveis em água (MOSMANN, 1983). Mais tarde, foi comprovado que a redução do MTT em células ativas ocorre principalmente fora da mitocôndria, por desidrogenases não mitocondriais (LIU *et al.*, 1997; BERRIDGE; TAN, 1993). Desta forma, o MTT é internalizado nas células por meio de um processo de endocitose e que o formazan, originado a partir da redução do MTT, acumula-se em endossomas/lisossomas, para ser em seguida secretado por exocitose (LIU *et al.*,

1997). Portanto, esse ensaio é apropriado para avaliar a viabilidade celular, tendo em vista que a endocitose é um processo que somente ocorre em células viáveis (LIU et al., 1997).

Essa pesquisa foi baseada na produção de AgNPs e AuNPs a partir da síntese verde do extrato aquoso de *P. emarginatus* sendo após a biossíntese associadas ao sulfato de gentamicina e ao ácido hialurônico (AH2), sabendo que de acordo com o solvente utilizado, para uma mesma planta medicinal, é possível obter diferentes extratos em termos de polaridade, seletividade e, conseqüentemente, presença de diferentes classes químicas (CARVALHO et al., 2019). Sendo a água um extrator polar obtivemos, como observado na triagem fitoquímica, isoflavonoides e proantocianidinas que não apresentaram atividade citotóxica nas linhagens aqui testadas, o que está de acordo com o sugerido por Oliveira et al. (2017) que demonstraram atividade citotóxica para os compostos diterpenoides vouacapanos presentes na fração apolar deste gênero.

O EAPE em todas as concentrações testadas não apresentou efeitos citotóxicos nas duas linhagens celulares testadas e, em algumas concentrações promoveu aumentos significativos das proliferações celulares em comparação ao controle negativo, mesmo que esse aumento não tenha acontecido de forma dose dependente. Uma hipótese para tal acontecimento ter ocorrido se encontra no fato de que nos extratos é possível encontrar diversas fontes de energia que favorecem não só a sobrevivência como a proliferação celular em microambientes como é o caso dos poços das placas, tendo o papel de suprimento energético (OLIVEIRA, 2018).

No artigo de Barabadi et al. (2017) sobre bionanomateriais verdes anticâncer, os autores citam que o mecanismo exato da atividade anticâncer das NPs metálicas não é totalmente compreendido ainda e, que alguns estudos não relataram citotoxicidade em células cancerosas e normais tratadas com NPs metálicas. Como é o caso das AuNPs e AgNPs produzidas por síntese verde onde foi verificada sua falta de efeito citotóxico na faixa de 0,3-2,5 μM em diferentes tipos de linhagens celulares de câncer e normais; em outro estudo, citado pelos mesmos autores, a citotoxicidade *in vitro* de AuNPs biossintetizadas por microrganismos na faixa de concentração de 0,01-1000 $\mu\text{g/mL}$ em linhas de células normais 3T3-L1, H9c2 e cancerosas HepG2 mostraram a natureza não tóxica e biocompatível de AuNPs biossintetizadas.

No estudo realizado por Lee et al. (2018) com AuNPs e AgNPs produzidas por síntese verde com extrato de *Anemarrhena asphodeloides* Bunge os resultados

mostraram que até a concentração de 50 µg/mL as AuNPs não exibiram qualquer toxicidade nas linhagens celulares 3T3-L1, HT29 e MCF7. Contudo, as células A549 foram consideradas sensíveis ao tratamento com AuNPs na concentração de 50 µg/mL. Pelo contrário, AgNPs exibiram uma toxicidade significativamente maior em comparação com AuNPs nas linhagens celulares A549, HT29 a partir da concentração de 5 µg/mL e na linhagem celular MCF7 a partir da concentração de 1 µg/mL.

Em outra pesquisa realizada por Lee *et al.* (2020) com AuNPs e AgNPs sintetizadas através do extrato de *Allium cepa* foi observado que após o tratamento das linhagens celulares HT-29 e PANC-1 nas concentrações 2,5 - 20 µM não houve citotoxicidade significativa.

Na avaliação da citotoxicidade conduzida por Markus *et al.* (2017) com AuNPs e AgNPs biossintetizadas com extrato de *Angelica pubescens* Maximovich, onde ambas as NPs foram avaliadas em concentrações de 1 µg/mL a 100 µg/mL; as AgNPs mostraram citotoxicidade para células RAW264.7 a uma concentração ≥ 10 µg/mL com mais de 30 % de morte celular. Por outro lado, as AuNPs nas concentrações de 1 µg/mL a 50 µg/mL não exibiram morte celular para as RAW264.7, neste caso a inibição celular começou a se tornar mais significativa em 100 µg/mL.

No estudo da citotoxicidade *in vitro* realizado por Park; Ahn e Park (2017) com AuNPs e AgNPs sintetizadas com extrato de *Garcinia mangostana* L. e utilizadas nas concentrações de 18,75 µg/mL; 37,5 µg/mL e 75,0 µg/mL os resultados de citotoxicidade demonstrados para as células A549 após 24 h de incubação foi para as AgNPs a partir de 18,75 µg/mL e as AuNPs mostraram citotoxicidade na concentração mais alta 75,0 µg/mL (23,5 % de citotoxicidade). E, a viabilidade celular de AuNPs e AgNPs para as células NIH3T3 após 24 h de incubação foi de 98,0 % para as AuNPs, enquanto que as AgNPs apresentaram 63,0 % de citotoxicidade na concentração de 37,5 µg/mL. Mais interessante, as AuNPs mostraram viabilidade celular de 93,8 % na concentração de 75 µg/mL.

O ensaio *in vitro* de citotoxicidade pelo MTT realizado por Soshnikova *et al.* (2018) em linhagens celulares RAW 264.7 e MCF-7 tratadas com AuNPs e AgNPs sintetizadas com extrato da fruta de *Amomum villosum* nas concentrações de 0 µg/mL; 1 µg/mL; 25 µg/mL; 50 µg/mL e 100 µg/mL as AuNPs não mostraram citotoxicidade significativa em concentração menor que 50 µg/mL onde a viabilidade celular foi registrada em 80 % para a linhagem celular RAW 264.7, entretanto foram tóxicas para as células MCF-7 na dosagem de 25 µg/mL. Além disso, as AgNPs demonstraram

citotoxicidade significativa contra células RAW 264.7 e MCF-7 a 100 µg/mL e em uma dosagem inferior de 50 µg/mL, respectivamente.

Para avaliar a citotoxicidade de AuNPs e AgNPs, ambas nas concentrações de 1 µg/mL; 10 µg/mL e 100 µg/mL, sintetizadas a partir do extrato das folhas de *Dendropanax morbifera* Leveille, Wang *et al.* (2016) utilizaram as linhagens celulares HaCaT e A549. No teste com as células HaCaT as AgNPs somente na concentração de 100 µg/mL é que mostraram redução no crescimento das células e as AuNPs não apresentaram nenhum efeito citotóxico nas concentrações variando de 1 µg/mL a 100 µg/mL. No teste com as células A549 as AgNPs inibiram significativamente o crescimento destas células em mais de 70 % na concentração de 100 µg/mL após 48 horas de tratamento. Em contraste, as AuNPs a 100 µg/mL não induziram toxicidade nas células após 48 horas de tratamento.

No ensaio de viabilidade celular por MTT realizado por Oliveira (2018) as AgNPs obtidas por síntese verde do extrato das folhas de *Pterodon emarginatus* colhidas no verão (NpSB-Verão) e no inverno (NpSB-Inverno) testadas nas concentrações de 16 µg/mL; 32 µg/mL e 48 µg/mL foi observado que para a linhagem celular B16F10 com incubação de 24 horas na diluição de 16 µg/mL o efeito citotóxico entre os dois tipos de NPs foi praticamente igual, já nas concentrações de 32 µg/mL e 48 µg/mL as NpSB-Verão apresentaram maior efeito citotóxico que as NpSB-Inverno. Com as células NIH-3T3, foi constatado que as NpSB-Verão na concentração de 16 µg/mL não apresentaram comprometimento da viabilidade celular de forma significativa em comparação ao controle negativo, situação distinta das NpSB-Inverno que acarretaram em diminuição significativa da viabilidade dos fibroblastos na mesma concentração. No caso das células HaCaT as concentrações de 16 µg/mL de ambas as AgNPs promoveram diminuições estatisticamente significativas das viabilidades das células. Os aumentos das concentrações (32 µg/mL e 48 µg/mL) não promoveram alterações estatisticamente significativas.

A citotoxicidade das NPs pode depender de parâmetros como tamanho de partícula, área de superfície, reatividade de superfície, forma, propriedades físico-químicas da superfície, concentração, agentes redutores utilizados na síntese, tempo de exposição, tipo de célula, tempo de incubação, presença de proteínas que influenciam a captação celular, liberação de íons e biodistribuição (BARABADI *et al.*, 2017, ZHANG; SHEN; GURUNATHAN, 2016). Além de que o aumento do tamanho das NPs em solução aquosa acontece porque estas são facilmente agregadas em

uma cultura de células devido à alta natureza iônica da solução e a interação eletrostática / Van der Waals entre proteínas e NPs. No entanto, as AgNPs mostraram tamanhos de aglomerados maiores do que AuNPs, e isso provavelmente acontece porque AuNPs, consistindo de um metal mais inerte do que AgNPs, não são muito sensíveis para elevar as forças iônicas (ÁVALOS *et al.*, 2015).

Diante dos resultados obtidos, em que as AgNPs-PEG-AH2 apresentaram citotoxicidade nas concentrações de 10,8 µg/mL e 21,6 µg/mL e as AgNPs-PE e AgNPsPEG e AgNPs-PEG-AH2 na concentração de 21,6 µg/mL para as células 3T3 e para as células A549 a toxicidade foi somente na concentração de 21,6 µg/mL para as AgNPs-PE, AgNPsPEG e o aqui exposto este estudo apresenta evidências de que as respostas de cada tipo de célula são diferentes umas das outras, cada tipo de célula tem sua própria resposta específica ao insulto externo causado pelos nanomateriais.

E, ainda de acordo com o proposto por Lee *et al.* (2020), Lee *et al.* (2018), Markus *et al.*, MUKHA (2013) e Park; Ahn e Park (2017) no caso das AgNPs-PE e suas associações bem como das AuNPs-PE e associações podem ser usadas como veículos de entrega de fármacos, de compostos biologicamente ativos, como é o caso do sulfato de gentamicina e do ácido hialurônico (AH2).

Especificamente as AuNPs que são muito populares como veículos de entrega devido à sua baixa citotoxicidade, síntese fácil, boa biocompatibilidade, alta permeabilidade do tecido, forma esférica com tamanho uniforme e relativamente de simples modificações de superfície (PARK; AHN; PARK, 2017).

Na presente pesquisa, tanto as AgNPs-PE e suas associações bem como as AuNPs-PE e suas associações não exerceram citotoxicidade significativa em ambas as células testadas, como também foi verificado na avaliação da atividade hemolítica, nas concentrações sugeridas para atividade antimicrobiana e antioxidante.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que:

A triagem fitoquímica do extrato aquoso das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel (EAPE) revelou a presença de taninos, flavonoides e heterosídeos cardiotônicos.

Análise qualitativa do EAPE por espectrometria de massas com ionização por electrospray (EM-IE) apresentou compostos como procianidina, quercetina-ramnosídeo, kaempferol, digalato de procianidina, galoil pirogalol, mangiferina, luteolina, ácido moróctico = ácido estaridônico, ginsenoside Rf, o-galoil norbergenina, o-metil ésteres de davidigenina, geranilgeraniol, apigenina-6-C-glicosídeo-8-C-arabnosídeo (schaftoside), crisoeroil-8-C-glucosil-2-O-glucoronídeo-6-C-arabnosídeo.

O EAPE foi eficiente na síntese verde das AgNPs-PE e das AuNPs-PE.

A utilização de agitação e aquecimento (A+BM) e aquecimento sem agitação (BM) apresentou impacto positivo na síntese das AgNPs-PE e em suas associações, acelerando o processo.

As AgNPs-PE BM e as AgNPs-PEG BM em comparação com as AgNPs-PE A+BM e as AgNPs-PEG A+BM, foram as que apresentaram melhores características quanto ao espectro de absorção no UV-Vis, IP, PZ e foram escolhidas para as análises biológicas e passaram a ser chamadas de AgNPs-PE e de AgNPs-PEG.

Das AgNPs-PE associadas com o AH (AgNPs-PE-AH1, AgNPs-PE-AH2) as nanopartículas escolhidas foram as AgNPs-PE-AH2 devido apresentarem os melhores resultados quanto a viscosidade e ao UV-Vis.

A associação das AgNPs-PEG foi feita com o AH2 devido aos melhores resultados.

A análise de FEG-SEM apresentou AgNPs-PE com diâmetro médio de 59,04 nm para as AgNPs-PEG o diâmetro médio foi de 62,72 nm e para as AgNPs-PEG-AH2 foi de 65,56 nm todas com formato esférico e superfície lisa. Para as AuNPs-PE o diâmetro médio foi de 50,35 nm, para as AuNPs-PEG o diâmetro médio foi de 56,01 nm e para as AuNPs-PEG-AH2 foi de 64,52 nm também apresentaram superfície lisa e formato esférico.

As AgNPs-PE suas associações e as AuNPs-PE apresentaram PZ e IP adequados.

A formação das AgNPs-PE e das AuNPs-PE foi comprovada pelo EDE.

A análise comparativa entre os espectros na região do infravermelho indicou presença de vários grupos funcionais no EAPE e nas NPs biossintetizados, sendo que todas as amostras apresentaram bandas de absorção semelhantes, indicando que as NPs metálicas podem ter sido estabilizadas pelos fitoconstituintes presentes no EAPE.

As AgNPs-PE e suas associações bem como as AuNPs-PE e associações mantiveram sua estabilidade durante 30 dias ao abrigo da luz e sob refrigeração de 4 °C a 8 °C.

A atividade antioxidante das AgNPsPE e suas associações como também das AuNPs-PE e associações, em comparação com o padrão de Ácido Ascórbico, exibiu resultados próximos e parecidos com o padrão e a capacidade antioxidante das amostras foram dose-dependentes.

Os resultados da atividade hemolítica demonstraram que as AgNPsPE e suas associações, bem como as AuNPsPE e associações obtidas não apresentaram propriedades hemolíticas em eritrócitos de carneiro.

O ensaio de toxicidade das AgNPs-PE e suas associações frente aos náuplios de *Artemia salina* apresentou toxicidade em concentrações bem acima das sugeridas para utilização em sistemas biológicos. As AuNPs-PE e suas associações não apresentaram toxicidade em nenhuma concentração.

As AgNPs-PE, as AgNPs-PEG a as AgNPs-PE-AH2 apresentaram atividade bactericida contra todas as bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e levedura testadas, sendo mais eficientes que a gentamicina por atuarem em concentrações mais baixas. Além disso, não foi observada atividade bactericida no EAPE, que não apresentava as NPs, mostrando que a atividade bactericida está diretamente relacionada com as AgNPs-PE, as AgNPs-PEG e as AgNPs-PEG-AH2.

As AuNPs-PE e suas associações não apresentaram atividade bactericida contra as cepas testadas.

Na avaliação da viabilidade celular, tanto as AgNPs-PE e suas associações, as AuNPs-PE e suas associações bem como o EAPE não exerceram citotoxicidade significativa sobre as linhagens de fibroblastos 3T3 e células A549, nas concentrações sugeridas para atividade antimicrobiana e antioxidante.

Diante da atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e levedura, atividade antioxidante, biocompatibilidade sem efeitos citotóxicos frente aos náuplios de *A. salina* e sem comprometimento da viabilidade celular nas duas linhagens testadas; podemos sugerir que as NPMs sintetizadas através do extrato aquoso das sementes de *Pterodon emarginatus* e suas associações com gentamicina e ácido hialurônico possuem potencial para aplicações farmacêuticas e biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

- ABOUBAKAR, M. *et al.* Insulin-loaded nanocapsules for oral administration: In vitro and in vivo investigation. **Drug Development Research**, v. 49, p. 109-117, fev-2000.
- ABREU, C. L. C. **Avaliação da citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de quantificação de proteínas totais em células 3T3**. 2008, 106 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.
- ABRANKÓ, L.; GARCÍA-REYES, J. F.; MOLINA-DÍAZ, A. In-source fragmentation and accurate mass analysis of multiclass flavonoid conjugates by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal Mass Spectrometry**, v. 46, p. 478–488, 2011.
- ABU-REIDAH, I. M. *et al.* HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chemistry**, v. 166, p. 179–191, 2015.
- ADEBAYO-TAYOA, B.; SALAAMB, A.; AJIBADE, A. Green synthesis of silver nanoparticle using *Oscillatoria* sp. extract, its antibacterial, antibiofilm potential and cytotoxicity activity, **Heliyon**, v. 5, 2019.
- AGARWAL, R.; AGRAWAL, N. K.; SINGH, R. *Cicer arietinum* Leaf Extract Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and Screening of Its Antimicrobial Activity. **Advanced Science, Engineering and Medicine**, v. 6, p. 1–5, 2014.
- AHANGARI, A. *et al.* Development of gentamicin-gold nanospheres for antimicrobial drug delivery to Staphylococcal infected foci. **Drug Delivery**, v. 20, n.1, p. 34–39, 2013.
- AHMED, K. B. A. *et al.* Preparation of gold nanoparticles using *Salicornia brachiata* plant extract and evaluation of catalytic and antibacterial activity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 130, p. 54–58, 2014.
- AHMED, K. B. R. *et al.* Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. **Toxicology in Vitro**. v. 38, p. 179-192, 2017.
- ALAQAD, K.; SALEH, T. A. Gold and silver nanoparticles: synthesis methods, characterization routes and applications towards drugs. **Journal of Environmental and Analytical Toxicology**, v. 6, n. 4, p. 384-393, 2016.
- ALJABALI, A. A. A. *et al.* Synthesis of gold nanoparticles using leaf extract of *Ziziphus zizyphus* and their antimicrobial activity. **Nanomaterials**, v. 8, p. 174-188, 2018.

ALBERNAZ, V. L. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico.** 2014. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanotecnologia) - Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de Brasília. Brasília, 2014.

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. In: MOLINARO, E. M., CAPUO, L. F. G., AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde.** V. 2. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, 2010. cap. 5, p. 215-254. Disponível em: [http://www.fiocruz.br/ioc/media/vol_2\[1\].pdf](http://www.fiocruz.br/ioc/media/vol_2[1].pdf). Acesso em: 25 set. 2019.

ALI, I.; GATASHEH, M. K.; NASEEM, I. Hemolysis of human red blood cells by riboflavin-Cu(II) system. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1523, n. 2-3, p. 225-229, 2000.

ANDRADES, J. R.M. **Avaliação da resposta óptica decorrente da interação entre gentamicina e nanopartículas de ouro esféricas e em forma de bastão visando aplicação analítica.** 2015, 132 f. Dissertação (Mestrado em Química). Departamento de Química – PUC. Rio de Janeiro, 2015.

ANANDALAKSHMI, K.; VENUGOBAL, J.; RAMASAMY, V. Characterization of silver nanoparticles by green synthesis method using *Pedaliium murex* leaf extract and their antibacterial activity. **Applied Nanoscience**, v. 6, p. 399–408, 2016.

ANTONYSAM, J. M. A.; THANGIAH, S.; IRULAPPAN, R. Green synthesis of silver nanoparticles using *Dictyota bartayresiana* J.V. Lamouroux and their cytotoxic potentials. **International Biological and Biomedical Journal**, v. 1, n. 3, 2015.

ARAÚJO, R. A. *et al.* Enhanced proteolytic and cellulolytic activity in insecticide-resistant strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Journal of Stored Products Research**, v. 44, n. 4, p. 354-359, 2008.

ARUNACHALAM, K. *et al.* One step green synthesis of phytochemicals mediated gold nanoparticles from aegle marmales for the prevention of urinary catheter infection. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 6, n. 1, p. 700-706, 2014.

ASHARANI, P. V. *et al.* Investigations on the Structural Damage in Human Erythrocytes Exposed to Silver, Gold, and Platinum Nanoparticles. **Advanced Functional Materials**, v. 20, n. 8, p. 1232-1242, 2010.

ASHRAF, J. M. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles and characterization of their inhibitory effects on AGEs formation using biophysical techniques. **Scientific Reports**. v. 6, p. 201-214, 2016.

ATCC – AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **Products, services, standards, resources.** 2020. Disponível em: <http://www.atcc.org>. Acesso em: 04 dez. 2020.

ÁVALOS, A. *et al.* Effects of silver and gold nanoparticles of different sizes in human pulmonary fibroblasts. **Toxicology Mechanisms Methods**, v. 25, n. 4, p. 287–295, 2015.

BAGWELL, J. *et al.* "Morphological evaluation of adenocarcinoma human alveolar basal epithelial like cell line upon the exposure to omega fatty acids on in culture." **Journal of the Mississippi Academy of Sciences**, v. 59, 2014.

BALALAKSHMI, C. *et al.* Green synthesis of gold nanoparticles using a cheap *Sphaeranthus indicus* extract: Impact on plant cells and the aquatic crustacean *Artemia nauplii*. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 173, p. 598–605, 2017.

BALLOTTIN, D. P. M. **Caracterização de nanopartículas de prata e sua aplicação em tecidos antimicrobianos.** 2014. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

BANALA, R. R.; NAGATI, V. B.; KARNATI, P. R. Green synthesis and characterization of Carica papaya leaf extract coated silver nanoparticles through X-ray diffraction, electron microscopy and evaluation of bactericidal properties. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 2, p. 637–644, 2015.

BANERJEE, A. *et al.* Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, p. 134–139, 2008.

BARABADI, H. *et al.* Anti-cancer green bionanomaterials: present status and future prospects. **Green Chemistry Letters And Reviews**, v. 10, n. 4, p. 285–314, 2017.

BARBOSA, L. R. W. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. **Revista Científica da UFPA**. v. 4, 2004. Disponível em: <http://www.ufpa.br/rcientifica>. Acesso em: 08 ago. 2019.

BASAVEGOWDA, N. *et al.* Bioreduction of chloroaurate ions using fruit extract *Punica granatum* (Pomegranate) for synthesis of highly stable gold nanoparticles and assessment of its antibacterial activity. **Micro & Nano Letters**, v. 8, n. 8, p. 400–404, 2013.

BAVARESCO, O. S. A. *et al.* Utilização popular da Pterodon spp no tratamento de doenças reumáticas. **Revista de Investigação Biomédica**, v. 8, n. 1, p. 75-85, 2016.

BEGUM, N. A. *et al.* Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 71, v.1, p. 113–118, 2009.

BEHLING, B. E. *et al.* Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, n. 2, p. 474-482, 1993.

BESSA, N. G. F. de *et al.* Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v.15, n.4, p. 692-707, 2013.

BHATTACHARYA, D. *et al.* Gold nanoparticles conjugated antibiotics: stability and functional evaluation. **Nanoscience and Nanotechnology**, v.2, n. 2, p. 14-21, 2012.

BICUDO, R. C. S. **Nanopartículas de ácido hialurônico produzidas por nanoprecipitação e reticulação química: processos e caracterização**. 2011.172 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2011.

BINDHU, M. R. *et al.* Antibacterial activities of *Hibiscus cannabinus* stem-assisted silver and gold nanoparticles. **Materials Letters**, v. 131, p. 194–197, 2014.

BONTA, R. K. Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, p. 349-364, 2017.

BOSCARDIN, P. M. D. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de *Eucalyptus benthamii* maiden et cange – Myrtaceae**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Anvisa, 2010. 904p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 05 nov. 2020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6: **Deteção e identificação de bactérias de importância médica**. Brasília: Anvisa, 2013. 150p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 08 fev. 2019.

BUENO, C.A.; PIOVEZAN, M. Bioensaio toxicológico utilizando *Artemia salina*: fatores envolvidos em sua eficácia. **Instituto Federal de Tecnologia**, 2019.

BUSTAMANTE, K. G. L. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel) – Fabaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.12, n.3, p.341-345, 2010.

CAFFARO, K. M. T. **Avaliação biológica in vitro de espécies vegetais da Caatinga: *Bauhinia cheilantha* e *Lippia gracilis***. 2014. Dissertação (Mestrado em Enfermagem). Universidade Federal de Alagoas. Maceió, 2014. Disponível em: <http://www.repositorio.ufal.br>. Acesso em: 16 set. 2020.

CANCINO, J.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTTI, V. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 521-526, 2014.

CARDOSO, V. S. *et al.* Collagen-based silver nanoparticles for biological applications: synthesis and characterization. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 12, n. 1, p. 36, 2014.

CARVALHO, W. R. de. *et al.* *Pterodon emarginatus* hydroalcoholic extract: Antioxidant and photoprotective activities, noncytotoxic effect, and perspective of obtaining formulations with photochemoprotective activity. **Pharmacognosy Magazine**, v. 15, n. 64, p. 176, jul./set. 2019.

CASANOVA, M. C. R. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis**. 2010, 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Química de São Carlos – USP. São Carlos, 2010. Disponível em: <http://www.teses.usp.br>. Acesso em: 04 fev. 2017.

CHAMBERS, H. F. Aminoglicosídeos. In: GOODMAN, L.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2010. p. 1039-1049.

CHANDRAN, S.P. *et al.* Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 2, p. 577–583, 2006.

CHEN, Z.; BERTIN, R.; FROLDI, G. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH• assay using several statistical programs. **Food Chemistry**, v. 138, p. 414–420, 2013.

CHEN, L. Q. *et al.* Nanotoxicity of silver nanoparticles to red blood cells: size dependent adsorption, uptake, and hemolytic activity. **Chemical Research Toxicology**, v. 28, p. 501-509, 2015.

CHOI, J. *et al.* Physicochemical characterization and *in vitro* hemolysis evaluation of silver nanoparticles. **Toxicological Sciences**, v. 123, n. 1, 2011.

CHONG, B.F. *et al.* Microbial hyaluronic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n.4, p. 341-351, 2005.

COSTA, P. R. **Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro como ferramenta terapêutica e diagnóstica**. 2012. Dissertação. (Mestrado em Ciências e tecnologia das radiações, minerais e materiais). Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear. Belo Horizonte, 2012. Disponível em: <http://www.bdttd.cdtb.br>. Acesso em: 04 fev. 2017.

CÓTICA, L. F. *et al.* Simple and facile approach to synthesize magnetite nanoparticles and assessment of their effects on blood cells. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 324, n. 4, p. 559-563, 2012.

COURA, M. F. *et al.* Como obter nanopartículas de ouro usando suco de limão? **Química Nova**, v. 41, n. 5, p. 533-539, 2018.

COWMAN, M.K.; MATSUOKA, S. Experimental approaches to hyaluronan structure. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 791-809, 2005.

DANG, H.; FAWCETT, D.; POINERN, G. E. E. J. Green synthesis of gold nanoparticles from waste macadamia nut shells and their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermis*. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 7, n. 4, p.1171-1177, 2019.

DINIZ, M. E. R. **Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiiminas aromáticas**. 2011, 93 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

DJAHANIANI, H. *et al.* Facile synthesis of silver nanoparticles using Tribulus longipetalus extract and their antioxidant and antibacterial activities. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 4, p. 922–930, 2017.

DUTRA, R.C. **Avaliações fitoquímica e farmacológica dos frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel**. 2008, 244 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas na Área de Genética / Biotecnologia) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2008.

DUTRA, R.C. *et al.* Antiulcerogenic and antiinflammatory activities of the essential oil from *Pterodon emarginatus* seeds. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, p. 243-250, 2009.

ELIA, P. et al. Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as reducing agents. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 4007-4021, 2014.

ELELLA, M. H. A.; MOHAMED, R. R.; SABA, M. W. Synthesis of novel grafted hyaluronic acid with antitumor activity. **Carbohydrate Polymers**, n. 189, p. 107–114, 2018.

EL-RAFIE, H. M.; HAMED, M. A. A. Antioxidant and anti-inflammatory activities of silver nanoparticles biosynthesized from aqueous leaves extracts of four *Terminalia* species. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**. v. 5, 11pp, 2014.

ERDOĞAN, T. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Arbutus andrachne* leaf extract and its antimicrobial activity. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 6, p. 1129-1136, jun.2016.

FARIA, E. C. I.T de. **Estudo comparativo de citotoxicidade e internalização de nanopartículas de ouro com diferentes revestimentos**. 2010, 173 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia Analítica, Clínica e Forense) - Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, 2010.

FERREIRA, D. M. **Biossíntese otimizada de nanopartículas de ouro com extrato de *Viola oleífera***. 2016. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, Espírito Santo, 2016.

FERREIRA, S. B.; DANTAS, I. C.; CATÃO, R. M. R. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vogel). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.16, n.2, p.225-230, 2014.

FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. Antibiotics for emerging pathogens. **Science**, v. 325, n. 5944, Aug- 28, p. 1089–1093, 2009.

FOLDBJERG, R.; DANG, D. A.; AUTRUP, H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. **Archives of Toxicology**, v.85, p.743–750, 2011.

FONTES, R. V., CAMILLO, J., CORADIN, L. (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Centro-Oeste**. Brasília, DF: MMA, 2018. (Série Biodiversidade; 44).

FRASER, J.; LAURENT, T.; LAURENT, U. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. **Journal of Internal Medicine**, v. 242, p. 27-33, 1997.

FRANCIS, S.; KOSHY, E. P.; MATHEW, B. Green synthesis of *Stereospermum suaveolens* capped silver and gold nanoparticles and assessment of their innate

antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 7, p. 939-951, 2018.

FURLAN, C. M. *et al.* Flavonoids and antioxidant potential of nine Argentinian species of *Croton* (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 38, p. 693-702, 2015.

GARCIA, M. V. D. **Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

GARDEA-TORRESDEY, J. L. *et al.* Formation and growth of Au nanoparticles inside live alfalfa plants. **Nano Letters**, v. 2, n. 4, p. 397–401, 2002.

GAVADE, J.M. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles by using carambola fruit extract and their antibacterial activity. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, p. 1-6, 2015.

GRANDO, R. *et al.* Comparison of standardized dichloromethane with aqueous *Pterodon pubescens* Benth. Fruit extracts on antinociceptive and anti-inflammatory activity. **Journal of the Brazilian chemical Society**, v. 28, n. 3, p. 455-464, 2017.

GHRAMH, H. A., KHAN, K. A., IBRAHIM, E. S. Biological Activities of *Euphorbia peplus* Leaves Ethanolic Extract and the Extract Fabricated Gold Nanoparticles (AuNPs). **Molecules**, v. 24, p. 1431-1445, 2019.

HAINFELD, J. F. *et al.* Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. **The British Journal of Radiology**, v. 79, p. 248-53, mar. 2006.

HAISS, W. *et al.* Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 11, p. 4215-4221, 2007.

HAMELIAN, M. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using *Thymus kotschyanus* extract and evaluation of their antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 32, n.9, p. 1-8, Sept. 2018.

HAMOUDEH, M. *et al.* Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1329-1346, set-2008.

HANSEN, D.; HARAGUCHI, M.; ALONSO, A. Pharmaceutical properties of ‘sucupira’ (*Pterodon* spp.). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 607-616, 2010.

HARADA, T.N. **Correlação entre os ensaios de citotoxicidade em *Artemia salina* Leach e atividade antineoplásica sobre linhagens de células tumorais para**

algumas classes de produtos naturais. 92 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento da região centro-oeste) - Faculdade de Medicina, Universidade do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

HARDINGHAM, T. Solution properties of hyaluronan. In: Garg, H. G.; HALES, C. A. (Ed.) **Chemistry and biology of hyaluronan**. 1. ed. Oxford: Elsevier, 2004. p.1-19.

HEITZMANN, L. G. *et al.* Osteomielite crônica pós-operatória nos ossos longos – O que sabemos e como conduzir esse problema? **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.54. n.6, p.627-635, 2019.

HIROTA, B. C. K. *et al.* Toxicity evaluation *in vitro*: applicability of brine shirimp *Artemia salina* lethality assay. **Visão Acadêmica**, v.13, n.2, abr./jun 2012.

HOSCHEID, J.; CARDOSO, M. L. C. Sucupira as a potential plant for arthritis treatment and other diseases. **Hindawi Publishing Corporation Arthritis**, v. 2015, ID 379459. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/379459>

HUANG, H., YANG, X. Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: a green method. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 15, p. 2627–2631, 2004.

HUANG, H. *et al.* An Evaluation of Blood Compatibility of Silver Nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 6, ID 25518, 2016. DOI: 10.1038/srep25518.

ISAAC, R. S. R.; SAKTHIVEL, G.; MURTHY, C. Green Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles Using *Averrhoa bilimbi* Fruit Extract. **Journal of Nanotechnology**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

JAFARIZAD, A. *et al.* Biosynthesis and In-Vitro Study of Gold Nanoparticles Using *Mentha* and *Pelargonium* Extracts. **Procedia Materials Science**, v. 11, p. 224–230, 2015.

JAIN, D. *et al.* Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using papaya fruit extract and evaluation of their anti microbial activities. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 4, n. 3, p. 557 – 563, set. 2009.

JAMARAN, S.; ZARIF, B. R. Synergistic Effect of Silver Nanoparticles with Neomycin or Gentamicin Antibiotics on Mastitis-Causing *Staphylococcus aureus*. **Open Journal of Ecology**, v. 6, p. 452-459, 2016.

JUSTUS, B. **Morfoanatomia foliar e caulinar, análise química e atividades biológicas do óleo volátil de *Lavandula dentata* L., Lamiaceae.** 2016. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2016.

KALPANA, V. B. *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles using *Carica papaya* L. Leaf extract and screening its antimicrobial activity. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 7, p.149-156, 2018.

KASKA, A., MAMMADOV, R. Antioxidant properties, proximate content and cytotoxic activity of *Echinophora tournefortii* Jaub. & Spach. **Food Science Technology**, v. 39, n. 4, p. 875-880, oct./dec 2019.

KATAS, H. *et al.* Antibacterial activity of biosynthesized gold nanoparticles using biomolecules from *Lignosus rhinocerotis* and chitosan. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, p. 283–292, 2019.

KATVA, S. *et al.* Antibacterial Synergy of Silver Nanoparticles with Gentamicin and Chloramphenicol against *Enterococcus faecalis*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 13, n. 52, p. S828-S833, Oct./Dec. 2017.

KE, C. *et al.* Antioxidant acitivity of low molecular weight hyaluronic acid. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2670–2675, 2011.

KEIJOK, W. J. **Otimização e controle da síntese verde de nanopartícula de ouro utilizando o extrato de *Coffea arabica***. 1991, 99 f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, Vitória, 1991.

KEMP, M.M. *et al.* Gold and silver nanoparticles conjugated with heparin derivative possess antiangiogenesis properties. **Nanotechnology**, v. 20, n. 45, 2009.

KESARLA, M. K.; MANDAL, B. K.; BANDAPALLI, P. R. Gold nanoparticles by *Terminalia bellirica* aqueous extract – a rapid green method. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 9, n. 8, p. 825-830, 2014.

KHAN, F. *et al.* Controlled assembly of silver nano-fluid in *Heliotropium crispum* extract: A potent anti-biofilm and bactericidal formulation. **Applied Surface Science**, n. 387, p. 317–331, 2016.

KHARAT, S. N.; MENDHULKAR, V. D. Synthesis, characterization and studies on antioxidant activity of silver nanoparticles using *Elephantopus scaber* leaf extract. **Materials Science and Engineering**, v. 62, p. 719–724, 2016.

KIATKOSKI, E. C. **Estudo fitoquímico dos frutos e frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel e *Pterodon polygalaeflorus* Benth.** 2011, 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

KIM, B. Y. S.; RUTKA, J. T.; CHAN, C. W. Nanomedicine. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, p. 2434-43, 2010.

KOGAN, G. *et al.* Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial application. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 17-25, 2007.

KOGAN, G. *et al.* Hyaluronic acid: its function and degradation in *in vivo* systems. **Studies in natural products chemistry**, v. 34, p. 789-882, 2008.

KOLLEF, M. H.; FRASER, V. J. Antibiotic resistance in the intensive care unit. **Annals of Internal Medicine**, v. 134, p. 298-314, 2001.

KUMAR, P. *et al.* Antibacterial activity and in-vitro cytotoxicity assay against brine shrimp using silver nanoparticles synthesized from *Sargassum ilicifolium*. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 7, n. 4, p. 1447-1455, Oct-Dec 2012.

KUMAR, C. S. *et al.* Hyaluronic acid co-functionalized gold nanoparticle complex for the targeted delivery of metformin in the treatment of liver cancer (HepG2 cells). **Carbohydrate Polymers**, v. 128, p. 63–74, 2015.

KUPPUSAMY, P. *et al.* Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications – An updated report. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 4, p. 473-484, jul 2016.

KWOLEK-MIREK, M.; ZADRAG-TECZA, R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 14, p. 1068–1079, 2014.

LACY, C. F. *et al.* **Medicamentos lexi-comp manole: uma fonte abrangente para medicos e profissionais da saúde**. Barueri, SP: Manole, 2009. 1707 p.

LEE, H. A. *et al.* Rhizome of *Anemarrhena asphodeloides* as mediators of the eco-friendly synthesis of silver and gold spherical, face-centred cubic nanocrystals and its anti-migratory and cytotoxic potential in normal and cancer cell lines. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 46, n. S2, p. S285–S294, 2018.

LEE, K. X. *et al.* Bio-mediated synthesis and characterisation of silver nanocarrier, and its potent anticancer action. **Nanomaterials**, v. 9, p. 1423-1441, 2019.

LEE, S. H.; JUN, B-H. Silver nanoparticles: synthesis and application for nanomedicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 865-888, 2019.

LEE, Y. J. *et al.* Diallyl disulphide-loaded spherical gold nanoparticles and acorn-like silver nanoparticles synthesised using onion extract: catalytic activity and cytotoxicity. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 48, n. 1, p. 948–960, 2020.

LI, P. *et al.* Synergistic antibacterial effects of β -lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, p. 1912–1917, 2005.

LI, X. *et al.* Functional gold nanoparticles as potent antimicrobial agents against multi-drug-resistant bacteria. **American Chemical Society**, v. 8, n. 10, p. 10682–10686, 2014.

LIMA, C. P. de. *et al.* Efeito alelopático e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach dos extratos do fruto de *Euterpe edulis* Martius. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 2, p. 331-336, 2011.

LISH, R. A. D. *et al.* On how environmental and experimental conditions affect the results of aquatic nanotoxicology on brine shrimp (*Artemia salina*): A case of silver nanoparticles toxicity. **Environmental Pollution**, v. 255, 2019.

LIU, Y.; PETERSON, D. A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, p. 581 –593, 1997.

LOPES, J. R. **Síntese de nanopartículas de prata (NPsAg) em soluções aquosas de fibroína de seda e gelatina**. 2017, 115 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. de A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2 ed. 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras – manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 6 ed. v. 01, 2014.

LLORET F. C. *et al.* 6 α -Acetoxy-7 α -Hydroxy-Vouacapan Isolated from *Pterodon pubescens* Benth. Fruit's with Selective Activity against Prostate Cancer Cell Line: Artifact or Natural Product? **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 5, n. 2, 2016.

MARCELLIN, E.; CHEN, W.; NIELSEN, L. K. Microbial hyaluronic acid biosynthesis. In: Microbial Production of Biopolymers Edited by: **Rehm BHA**. Caister Academic Press; p. 163-180; 2009.

MARKUS, J. *et al.* Biosynthesis, Characterization, and Bioactivities Evaluation of Silver and Gold Nanoparticles Mediated by the Roots of Chinese Herbal *Angelica pubescens* Maxim. **Nanoscale Research Letters**, v. 12, n. 46, p. 1-12, 2017.

MASCARO, U.C.P.; TEIXEIRA, D.F.; GILBERT, B. Avaliação da sustentabilidade da coleta de frutos de sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vog.) após queda espontânea. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 7, p. 131-138, 2004.

MATA, Y.N. *et al.* Gold (III) biosorption and bioreduction with the brown alga *Fucus*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 166, n. 2–3, p. 612–618, 2009.

MATHUR, P. *et al.* Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles. **Artificial cells, nanomedicine and biotechnology**, v. 46, n. S1, p. S115–S126, 2018.

MATOS, F. J. **Introdução à fitoquímica experimental**. Editora UFC, Fortaleza, 1997.

MELO JÚNIOR, M. A. *et al.* Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872-1878, 2012.

MELO, T. R. K. *et al.* Caracterização e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marrom. **Holos**, ano 28, v.1, 2012.

MENDES, J. B. E. Desenvolvimento tecnológico, caracterização e avaliação *in vitro* de sistemas poliméricos contendo ácido ferúlico. 2016, 247f. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

MENDES, J. B. E. *et al.* PHBV/PCL Microparticles for Controlled Release of Resveratrol: Physicochemical Characterization, Antioxidant Potential, and Effect on Hemolysis of Human Erythrocytes. **The Scientific World Journal**, May 2012. DOI: 10.1100/2012/542937

MENDES, M. S. S. **Métodos “verdes” de produção de nanomateriais que promovem nanotecnologias sustentáveis**. 2015, 178 f. Dissertação (Mestrado em engenharia química e biológica) – Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Lisboa, 2015.

MENDES, V. S. *et al.* Inhibitory effects of *Pterodon emarginatus* bean oil and extract on *Staphylococcus aureus*. **Pharmacognosy Research**, v. 9, n. 4, p. 348-353, 2017.

MENSOR, L. L. *et al.* Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**. v. 15, p.127–130, 2001.

MEYER, B. N. *et al.* Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v.45, p.31-34, 1982.

MILANEZE, B. A. **Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro com resina de *Virola oleífera* e avaliação do seu efeito antibacteriano**. 2015. 94 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) – Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2015.

MIMS, C. A. *et al.* **Microbiologia médica**. São Paulo: Manole, 1995.

MIRANDA, M. L. D.; *et al.* Sesquiterpenos e outros constituintes das folhas de *Pterodon pubescens* Benth (Leguminosae). **Quimica Nova**, v. 37, n. 3, 473-476, 2014.

MOLDOVAN, B. *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles using *ligustrum ovalifolium* fruits and their cytotoxic effects. **Nanomaterials**, v. 8, p. 627-638, 2018.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**, V.47, n.1, p.1-19, 1979.

MOREIRA, K. R. A. **Síntese de nanopartículas de ouro em solução aquosa, transferência para outros solventes orgânicos e avaliação de sua estabilidade em diferentes meios orgânicos**. 2018, 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUHAMMAD, W. *et al.* Why Brine shrimp (*Artemia salina*) larvae is used as a screening system for nanomaterials? The science of procedure and nanotoxicology: A review. **International Journal of Biosciences**, v. 14, n. 5, p. 156-176, 2019.

MUKHA, I. P. *et al.* Antimicrobial activity of stable silver nanoparticles of a certain size. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 215-223, 2013.

NADKARNI, V.D.; PERVIN, A.; LINHARDT, R.J. Directional immobilization of heparin onto beaded supports. **Analytical Biochemistry**, v. 222, n. 1, p. 59-67, 1994.

NAGALINGAMA, M. *et al.* Biosynthesis, characterization, and evaluation of bioactivities of leaf extract-mediated biocompatible gold nanoparticles from *Alternanthera bettzickiana*. **Biotechnology Reports**, v. 19, 2018.

NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 6 ed, **NCCLS document M7-A6**, Wayne, p. 1-47, 2003.

NEGRI, G.; MATTEI, R.; MENDES, F. R. Antinociceptive activity of the HPLC- and MS-standardized hydroethanolic extract of *Pterodon emarginatus* Vogel leaves. **Phytomedicine**, v. 21, p. 1062-1069, 2014.

NGUYEN, T. Thanh-Ngan *et al.* Silver and gold nanoparticles biosynthesized by aqueous extract of burdock root, *Arctium lappa* as antimicrobial agent and catalyst for degradation of pollutants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 34247-34261, 2018.

NORUZI, M. Biosynthesis of gold nanoparticles using plant extracts. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 1, p. 1-14, 2015.

NUNES, S.K. *et al.* Green nanotechnology from tea: phytochemicals in tea as building blocks for production of biocompatible gold nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry**, v.19, n. 9, p. 2912–2920, 2009.

NUNES, M.R. **Desenvolvimento de materiais híbridos a base de sílica contendo o grupo orgânico iônico 1,4-diazoniabicyclo [2.2.2] octano e nanopartículas de ouro e paládio**. 2012, 135 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

O'CONNELL, Kieron M. G., *et al.* Combating Multidrug-Resistant Bacteria: Current Strategies for the Discovery of Novel Antibacterials. **Angewandte Chemie International**, v. 52, p. 2–30, 2013.

OH, K. H. *et al.* Biosynthesized gold and silver nanoparticles by aqueous fruit extract of *Chaenomeles sinensis* and screening of their biomedical activities. **Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology**. v. 46, n. 3, p. 599–606, 2018.

OLENNIKOV, D. N. *et al.* Bioactive phenolics of the genus *Artemisia* (Asteraceae): HPLC-DAD-ESI-TQ-MS/MS profile of the siberian species and their inhibitory potential against α -amylase and α -glucosidase. **Frontiers Pharmacology**, 2018.

OLIVEIRA, D. M. T.; PAIVA, E. A. S. Anatomy and ontogeny of *Pterodon emarginatus* (Fabaceae: Faboideae) seed. **Brazilian Journal of Biology**, v. 65, p. 483-494, 2005.

OLIVEIRA, A. E. M. de F. M. **Obtenção de produtos nanoestruturados bioativos a partir dos frutos de sucupira-branca (*Pterodon emarginatus* Vogel)**. 2016, 241 f. Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Amapá, 2016.

OLIVEIRA L.A. *et al.* Vouacapane diterpenoids isolated from *Pterodon* and their biological activities. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, p. 663-72, 2017.

OLIVEIRA, G. Z. S. **Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extrato aquoso e metabólito secundário (quercetina) das folhas de *Pterodon emarginatus* (sucupira branca) direcionadas para aplicações biomédicas e agrícolas**. 2018. 220 f. Tese (Doutorado em Nanociência e Nanobiotecnologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

OLIVEIRA, G. Z. da S. *et al.* Synthesis of silver nanoparticles using aqueous extracts of *Pterodon emarginatus* leaves collected in the summer and winter seasons. **International Nano Letters**, v. 9, p. 109-117, 2019.

PAN, N.C. et al. Hyaluronic acid: characteristics, microbial production and industrial applications. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.2, n.4, p. 42-58, jul-dez-2013.

PARK, Y. et al. Polysaccharides and phytochemicals: a natural reservoir for the green synthesis of gold and silver nanoparticles. **IET Nanobiotechnology**, v. 5, n. 3, p. 69–78, 2011.

PARK, J. S.; AHN, E-Y.; PARK, Y. Asymmetric dumbbell-shaped silver nanoparticles and spherical gold nanoparticles greensynthesized by mangosteen (*Garcinia mangostana*) pericarp waste extracts. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 6895-6908, 2017.

PATIL, S. P., KUMBHAR S. T. Antioxidant, antibacterial and cytotoxic potential of silver nanoparticles synthesized using terpenes rich extract of *Lantana camara* L. leaves. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 76–81, 2017.

PINTO, M. V. P. **Diversidade e estrutura genética em populações naturais de *Pterodon emarginatus* Vogel (Leguminosae)**. 2017, 50 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramentos de Plantas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

PIRES, J. et al. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. **Instituto de Biociências**, Universidade de São Paulo, 2017.

PROJAN, S. J.; SHLAES, D. M. Antibacterial drug discovery: is it all downhill from here? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 4, p. 18–22, 2004.

QUEIROZ, G. M. de et al. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v.10, n.2, p.132-8, mar-abr-2012.

RAI, A.; PRABHUNEB, A.; PERRY, C. C. Antibiotic mediated synthesis of gold nanoparticles with potent antimicrobial activity and their application in antimicrobial coatings. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, p. 6789–6798, 2010.

RAJAKUMAR, G. et al. Evaluation of anti-cholinesterase, antibacterial and cytotoxic activities of green synthesized silver nanoparticles using from *Millettia pinnata* flower extract. **Microbial Pathogenesis**, v. 103, p. 123-128, 2017.

RASTOGI, L., KORA, A. J., ARUNACHALAM, J. Highly stable, protein capped gold nanoparticles as effective drug delivery vehicles for amino-glycosidic antibiotics. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, p. 1571–1577, 2012.

RAVEENDRAN, P.; FU, J.; WALLEN, S.L. Completely “green” synthesis and stabilization of metal nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v.125, n. 46, p. 13940–13941, 2003.

REZENDE, M. U. de, CAMPOS, G. C. de. Viscosuplementação. **Revista Brasileira de Ortopedia**. v. 47, n. 2, p. 160-164, 2012.

ROCHA, D. M. S. da. **Aspectos taxonômicos, genéticos e reprodutivos de *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth. e *Pterodon emarginatus* Vog. (Leguminosae/Dipteryxaceae)**. 2006, 134f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

ROCHA, F. D., KAPLAN, M. A. C. Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos de sucupira branca (*Pterodon emarginatus*). **Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC**. Florianópolis, 2006.

ROCKENBACH, I. I. *et al.* Characterization of flavan-3-ols seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MSn and LC-ESI-FTICR-MS. **Food Research International**, v. 48, p. 848-855, 2012.

RODRÍGUEZ-LEÓN, E. *et al.* Synthesis of Gold Nanoparticles Using *Mimosa tenuiflora* Extract, Assessments of Cytotoxicity, Cellular Uptake, and Catalysis. **Nanoscale Research Letters**, v. 14, p. 334-349, 2019.

ROSA, T. da S. *et al.* Influência de extratos de açaí (*Euterpe oleracea* mart.) e pitanga (*Eugenia uniflora* L.) na atividade de catalase citosólica cerebral de ratos. **Inter-American Journal of Development and Research**, v. 2, n. 1, p. 2-10, jan-jun-2019.

ROSHMI, T. *et al.* Effect of biofabricated gold nanoparticle-based antibiotic conjugates on minimum inhibitory concentration of bacterial isolates of clinical origin. **Gold Bull**, v. 48, p. 63–71, 2015.

ROUTABOUL, Jean-Marc. *et al.* Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v. 224, n. 1, p. 96-107, 2006.

SACCARO JÚNIOR, Nilo L. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do brasil. **Ambiente & Sociedade**, Campinas, v. XIV, n. 1, p. 229-244, jan./jun. 2011.

SAEB, A. T. M. *et al.* Production of Silver Nanoparticles with Strong and Stable Antimicrobial Activity against Highly Pathogenic and Multidrug Resistant Bacteria. **The Scientific World Journal**, ID 704708, p.1-9, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/704708>.

SAHA, B. *et al.* In vitro structural and functional evaluation of gold nanoparticles conjugated antibiotics. **Nanoscale Research Letters**, v. 2, p. 614–622, 2007.

SALARI, S. *et al.* In-vitro evaluation of antioxidant and antibacterial potential of green synthesized silver nanoparticles using *Prosopis farcta* fruit extract. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 18 (1), p. 430-445, 2019.

SALOUTI, M. *et al.* Enhanced delivery of gentamicin to infection foci due to *Staphylococcus aureus* using gold nanorods. **Drug Delivery**, v.23, n. 1, p. 49–54, 2016.

SANFILIPPO, V. *et al.* Hyaluronan-metal gold nanoparticle hybrids for targeted tumor cell therapy. **International Journal Molecular Sciences**, v. 21, 2020.

SANTOS, N. C., CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Química Nova**, v. 25, n.6B, p.1181-1185, 2002.

SANTOS, A. P. *et al.* Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 891-896, 2010.

SANTOS, C. C. S. *et al.* Evaluation of the toxicity and molluscicidal and larvicidal activities of *Schinopsis brasiliensis* stem bark extract and its fractions. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 298-303, 2014.

SANTOS, C. B. R. dos *et al.* Oil from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog.: A traditional antiinflammatory. Study combining *in vivo* and *in silico*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 222, p. 107–120, 2018.

SASIREKHA, R. *et al.* Biosynthesis, characterization antibacterial effects of silver nanoparticle by using *Carica papaya* fruit extract and it's interaction with an anticancer drug (5- fluorouracil). **Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences**, v. 5, n. 1, 2018.

SATYAVANI, K. *et al.* Biomedical potential of silver nanoparticles synthesized from calli cells of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, n. 43, 2011.

SELVAKUMAR, P. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Acalypha hispida* and its application in blood compatibility. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 182, p. 52-61, 2018.

SENA, A. E. C. *et al.* Avaliação da síntese de nanopartículas de prata sob diferentes concentrações do extrato de *Copaíba multijuga* (Heine). **Scientia Naturalis**, v. 1, n. 1, p. 10-16, 2019.

SENS, L. **Síntese, caracterização, análise conformacional e atividade antioxidante de análogos de chalconas bromadas e hidroxiladas**. 2014. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2014.

SHANKAR, S.S.; AHMAD, A.; SASTRY, M. Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 6, p. 1627–1631, 2003.

SHIMMIN, R. G.; SCHOCH, A. B., BRAUN, P. V. Polymer size and concentration effects on the size of gold nanoparticles capped by polymeric thiols. **Langmuir**, v. 20, n. 13, p. 5613–5620, 2004.

SILVA, L. D. da. **Síntese verde, caracterização e atividade biológica de nanopartículas de prata obtidas utilizando extratos de *Hancornia speciosa* Gomes - Apocynaceae (mangabeira)**. 2014. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

SILVA, A. A. da. **Síntese e estabilização de nanopartículas de ouro para fins biotecnológicos e cosméticos**. 2016. DISSERTAÇÃO (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

SILVA, V. L. da. **Morfologia e citologia da célula bacteriana**. Disponível em: <http://www.ufjf.br/microbiologia.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2016.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis:Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. 1102 p.

SIMÕES, R. S.; ALMEIDA, S. S. M. S. Estudo fitoquímico de *Bauhinia forficata* (Fabaceae). **Biota Amazônia**, v. 5, n. 1, p. 27-31, 2015. Disponível em: <http://periodicos.unifap.br/index.php/biota>. Acesso em: 29 jul. 2019.

SINHA, S. N. PAUL, D. Eco-friendly green synthesis and spectrophotometric characterization of silver nanoparticles synthesized using some common Indian spices. **International Journal of Green and Herbal Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 401-408, 2014.

SINGH, P. *et al.* Green synthesis of gold and silver nanoparticles from *Cannabis sativa* (industrial hemp) and their capacity for biofilm inhibition. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 3571–3591, 2018.

SOLOMON, S. *et al.* Synthesis and study of silver nanoparticles. **EUA: Journal of Chemical Education**, v. 84, n. 2, p. 322, 2007.

SONG, J.Y.; KIM, B.S. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, n. 1, p. 79–84, 2009.

SOSHNIKOVA, V. *et al.* Cardamom fruits as a green resource for facile synthesis of gold and silver nanoparticles and their biological applications. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 108–117, 2018.

SPELLBERG B. *et al.* Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 1279-86, 2004.

SULIANI, C. R. **Síntese verde de nanopartículas de prata a partir do bagaço *Vitis labrusca* (Cultivar Ives), caracterização e aplicação na desinfecção de efluentes industriais**. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências dos Materiais) – Universidade de Caxias, Caxias, 2018.

SUTAN, N. A. Phytosynthesis of gold and silver nanoparticles enhance in vitro antioxidant and mitostimulatory activity of *Aconitum toxicum* Reichenb. Rhizomes alcoholic extracts. **Materials Science & Engineering**, v. 93, p. 746–758, 2018.

TEIMURI-MOFRAD, R. *et al.* Green synthesis of gold nanoparticles using plant extract: Mini-review. **Nanochemistry Research**, v. 2, n. 1, p. 8-19, 2017.

TEMPLETON, D. M. *et al.* Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. **Pure and Applied Chemistry**, v.72, n. 8, p. 1453–1470, 2000.

THAKKAR, K. N.; MHATRE, S. S.; PARIKH, R. Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine**, v.6, n. 2, p. 257–262, 2010.

THAKUR, A.; WANCHOO, R. K.; SINGH, P. Hydrogels of Poly(acrylamide-co-acrylic acid): In-vitro study on release of Gentamicin Sulfate. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v.25, n. 4, p.471-482, 2011.

TODARO, G. J.; GREEN, H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. **The Journal of Cell Biology**, v. 17, 1963.

TRABULSI, L. R.; SOARES, L. A. Antibióticos aminoglicosídios. In: SILVA, Penildon. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 1040-1044.

TSUGAWA, H. *et al.* A cheminformatics approach to characterize metabolomes in stable-isotope-labeled organisms. **Nature Methods**, v. 16, n. 4, p. 295-298, 2019.

VASEEHARAN, B.; RAMASAMY, P.; CHEN, J.C. Antibacterial activity of silver nanoparticles (AgNps) synthesized by tea leaf extracts against pathogenic *Vibrio harveyi* and its protective efficacy on juvenile *Fenneropenaeus indicus*. **Letters in Applied Microbiology**, v.50, n. 4, p. 352–356, 2010.

VERDE, G. M. V. *et al.* A Green Protocol for Microwave-Assisted Extraction of Volatile Oil Terpenes from *Pterodon emarginatus* Vogel. (Fabaceae). **Molecules**. v. 23, n. 651, 2018.

VO, Thanh-Truc, *et al.* Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using aqueous extract from *Crinum latifolium* leaf and their applications forward antibacterial effect and wastewater treatment. **Hindawi Journal of Nanomaterials**, ID 8385935, p.1-14, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/8385935>

WANG, Y.; HO, C.T. Polyphenolic chemistry of tea and coffee: a century of progress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.18, p. 8109–8114, 2009.

WANG, C. *et al.* Rapid green synthesis of silver and gold nanoparticles using *Dendropanax morbifera* leaf extract and their anticancer activities. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 3691–3701, 2016.

WEIGEL, P. H.; HASCALL, V. C.; TAMMY, M. Hialuronan Synthases. **American Society for Biochemistry and Molecular Biology**. Minireview, v. 272, n. 22, p. 13997- 14000, 1997.

WEISSMAN B.; MEYER K. The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord. **Journal of the American Chemical Society**, v. 76, p. 1753-1757, 1954.

YE, M. *et al.* Characterization of flavonoids in *Millettia nitida* var. *hirsutissima* by HPLC/DAD/ESI-MSn. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 1, p. 35-42, 2012.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos Editora Universitária, 2001. 500 p.

ZHANG, X-F.; SHEN, W.; GURUNATHAN, S. Silver Nanoparticle-Mediated Cellular Responses in Various Cell Lines: An in Vitro Model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, 2016.