

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

DANIELE PRISCILA DA SILVA FARDIN DE ASSUNÇÃO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DE OURO, OBTIDAS POR SÍNTESE
VERDE, A PARTIR DO EXTRATO DE *Annona muricata* Linnaeus
(Annonaceae)**

**PONTA GROSSA
2020**

DANIELE PRISCILA DA SILVA FARDIN DE ASSUNÇÃO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE
NANOPARTÍCULAS DE OURO E DE PRATA, OBTIDAS POR SÍNTESE
VERDE, A PARTIR DO EXTRATO DE *Annona muricata* Linnaeus
(Annonaceae)**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de doutora no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste.

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

**PONTA GROSSA
2020**

A851 Assunção, Daniele Priscila da Silva Fardin de
Desenvolvimento, caracterização e avaliação biológica de nanopartículas de prata e de ouro, obtidas por síntese verde, a partir do extrato de *Annona muricata* Linnaeus (Annonaceae) / Daniele Priscila da Silva Fardin de Assunção. Ponta Grossa, 2020.
99 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. Nanopartículas de prata. 2. Nanopartículas de ouro. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Ácido fólico. 5. *Annona muricata*. 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



Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Programa de
Pós-Graduação em

Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre a

Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa



Ponta Grossa, 18 de novembro de 2020.

ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCIÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 06/2020 DA DOUTORANDA DANIELE PRISCILA DA SILVA FARDIN DE ASSUNÇÃO REALIZADA NO DIA 18 DE NOVEMBRO DE 2020, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos dezoito dias de novembro de dois mil e vinte, às 14:00h, 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 Daniele Priscila da Silva Fardin de Assunção, 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 Folquatto (CESCAGE), Patricia Mathias Doll Boscardin (UEPG/PR), Patricia Mazurecki Campos (UEPG/PR) e Vanessa Cristina Godoy Jasinski (CESCAGE). 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 BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DE OURO, OBTIDAS POR SÍNTESE VERDE, A PARTIR DO EXTRATO DE *Annona muricata*"**

Encerrada a defesa, a banca pronunciou-se APROVADA 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.

Pró - Reitora de Pesquisa e Pós-Graduação

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

Av. Carlos Cavalcanti, 4746 - Ponta Grossa - Paraná - Brasil - CEP: 84030-900



Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Programa de
Pós-Graduação em

Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre as

Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa

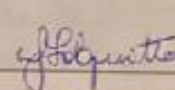


Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim ☒ não ☐

Novo título: Desenvolvimento, Caracterização e Avaliação Biológica de nanopar-
ticulas de prata e de ouro, obtidas por síntese verde, a partir do extrato
de Annona muricata Lamour. (Annonaceae)


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


Daniela Gaspar do Folquinto 2 - (CESCAGE) - Titular

Pró - Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

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

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



Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Programa de
Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas



Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa

Patricia Mathias Doll Boscardin 3 - (UEPG) – Titular

Patricia Mazurecki Campos 4 - (UEPG) – Titular

Vanessa Cristina Godoy Jasinski 5 - (CESCAGE) – 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

*“Que os vossos esforços desafiem
as impossibilidades, cultivando
sempre o amor e a generosidade.
Lembra-vos de que as grandes coisas
do homem foram conquistadas do que
parecia impossível”
Charles Chaplin*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me iluminou e me deu forças para enfrentar todos os obstáculos e nas horas mais difíceis me fortaleceu, fazendo com que eu me mantivesse bem para a conclusão do trabalho.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Josiane Padilha de Paula, que pela segunda vez me orientou, sempre com esse jeito especial de ser. Essa parceria foi essencial para o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço a amizade, a paciência e o apoio nessa trajetória. Obrigada por todo o conhecimento e dedicação.

À Prof.^a Dr.^a Daniela Gaspardo Folquito e a Prof.^a Dr.^a Patrícia Mathias Doll Boscardin por todas as considerações realizadas durante a qualificação.

Aos funcionários e aos técnicos do LABMU e LABMU-SEBISA, Vanessa, Sílvia, Virgínia, Ana, Traudi e Janaína, pelas análises realizadas e por todo o atendimento especial.

Aos alunos Bianca e Luiz, pelas análises e à Prof.^a Dr.^a Vanessa Lima Gonçalves Torres.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Aos meus pais Alceu e Dorceli, pelo incentivo, pela confiança, pelo apoio, sempre preocupados em ajudar e deixando tudo mais fácil.

Ao meu marido Ivan pela paciência, compreensão, companheirismo e toda a ajuda necessária em todos os momentos.

À minha querida filha Nathalia por me dar forças e ser o meu incentivo para a realização desse trabalho.

Aos meus amigos de laboratório e pra vida, Ana Cristina e Bárbara, que benção contar com vocês. A minha amiga Thais Latansio, sempre pronta a ajudar.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho, parentes, amigos, professores e colegas de trabalho, com certeza todos que me acompanharam nesse período foram fundamentais para que eu vencesse mais uma etapa.

RESUMO

A síntese verde é um método eficiente e frequentemente estudado na área da nanobiotecnologia, por não utilizarem reagentes e solventes que apresentem toxicidade, ampliando a sua aplicação no desenvolvimento de nanopartículas metálicas. Devido à citotoxicidade dos fármacos, atualmente o grande desafio é entregar o agente terapêutico diretamente em seu sítio de ação, promovendo uma melhor efetividade com mínimos efeitos colaterais. Muitas terapias direcionadas estão em desenvolvimento para abordar a resistência à múltiplos fármacos. O objetivo do presente trabalho foi sintetizar, caracterizar e avaliar a atividade biológica das AgNPs e AuNPs, vetorizadas, a partir do extrato da *Annona muricata* L. As AgNPs foram obtidas por fotorredução, a partir do extrato da polpa, semente e folhas de *A. muricata*, com exposição a luz artificial e também na sua ausência. As AuNPs foram obtidas a partir do extrato da polpa de *A. muricata*. As AgNPs e AuNPs obtidas com o extrato aquoso da polpa de *A. muricata* foram vetorizadas com o ácido fólico. No processo de caracterização, foram avaliados o tamanho das partículas, o índice de polidispersão, potencial zeta, assim como aspectos morfológicos. Além disso, foi analisada a estabilidade e a atividade antimicrobiana das AgNPs e AuNPs, vetorizadas e não-vetorizadas. A atividade larvicida foi realizada com as AgNPs preparadas com o extrato aquoso da polpa da *A. muricata*. Foi determinada a toxicidade das AgNPs e AuNPs, vetorizadas e não vetorizadas frente à *Artemia salina* e aos eritrócitos. Os extratos aquosos da polpa, das sementes e das folhas de *A. muricata* foram eficientes para a síntese de AgNPs. As AgNPs apresentaram atividade antimicrobiana, contra cepas de bactérias gram positivas e gram negativas e contra leveduras. A preparação de AgNPs, obtidas sem a exposição à luz artificial, apresentou características mais adequadas, quanto ao tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e estabilidade. Na avaliação cromatográfica qualitativa, foi determinada a presença de acetogeninas anonáceas, como a annonacina. O extrato aquoso da polpa de *A. muricata* também demonstrou eficácia na síntese das AuNPs. As AuNPs obtidas apresentaram tamanho, potencial zeta e PDI adequados, além de boa estabilidade no período avaliado. AuNPs apresentaram atividade antimicrobiana contra cepas de *E.coli*, *S.aureus* e *E. faecalis*. As AgNPs preparadas com o extrato da polpa da *A. muricata* demonstraram baixa toxicidade frente as larvas de *Plutella xylostella*. A vetorização das AgNPs e AuNPs com ácido fólico foi obtida com sucesso, mantendo a estabilidade e apresentando pequena alteração quanto às características físico-químicas e morfológicas, comparadas às AgNPs e AuNPs sem a vetorização. A atividade antimicrobiana de ambas as nanopartículas vetorizadas foi maior comparadas às nanopartículas sem a vetorização. A avaliação da toxicidade das AgNPs e AuNPs, com e sem a vetorização do ácido fólico, frente a *Artemia salina*, apresentou ótimos resultados, sendo favorável a sua utilização em sistemas biológicos. A avaliação hemolítica, demonstrou biocompatibilidade das AgNPs e AuNPs, vetorizadas e não-vetorizadas com ácido fólico. Sendo assim as AgNPs e AuNPs, vetorizadas ou não, poderão ser utilizados nos sistemas biológicos, desenvolvidas com potencial atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Nanopartículas de prata, Nanopartículas de ouro, Atividade antimicrobiana, Biocompatibilidade, ácido fólico, *Annona muricata*

ABSTRACT

Green synthesis is an efficient method and is frequently studied in the area of nanobiotechnology, as it does not use reagents and solvents that present toxicity, expanding its application in the development of metallic nanoparticles. Due to the cytotoxicity of drugs, currently the major challenge is to deliver the therapeutic agent directly to its site of action, promoting better effectiveness with minimal side effects. Many targeted therapies are under development to address resistance to multiple drugs. The objective of the present work was to synthesize and characterize the vectorized AgNPs and AuNPs, from the extract of *Annona muricata* L. and with potential antitumor activity. AgNPs were obtained by photoreduction, from the extract of the pulp, seed and leaves of *A. muricata*, with exposure to artificial light and also in its absence. AuNPs were obtained from *A. muricata* pulp extract. The AgNPs and AuNPs obtained with the aqueous extract of the *A. muricata* pulp were vectorized with folic acid. In the characterization process, particle size, polydispersity index, zeta potential, as well as morphological aspects were evaluated. In addition, vectorized and non-vectorized AgNPs and AuNPs stability and antimicrobial activity were analyzed. Larvicidal activity was performed with AgNPs prepared with the aqueous extract of the *A. muricata* pulp. The toxicity of AgNPs and AuNPs, both vectorized and non-vectorized, against *Artemia salina* and erythrocytes was determined. The aqueous extracts of the pulp, seeds and leaves of *A. muricata* were efficient for the synthesis of AgNPs. AgNPs showed antimicrobial activity, against strains of gram positive and gram negative bacteria and against yeasts. The preparation of AgNPs, obtained without exposure to artificial light, presented more adequate characteristics, in terms of size, polydispersity index, zeta potential and stability. Gas Chromatography and Mass Analyzer determined the presence of anonymous acetogenins, such as annonacin, with potential antitumor activity. The aqueous extract of *A. muricata* pulp also demonstrated efficacy in the synthesis of AuNPs. The AuNPs obtained showed adequate size, zeta potential and PDI, in addition to good stability in the evaluated period. AuNPs showed antimicrobial activity against strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *E. faecalis*. AgNPs prepared with *A. muricata* pulp extract showed low mortality compared to *Plutella xylostella* larvae, proving to be of low toxicity. The vectorization of AgNPs and AuNPs with folic acid was successfully achieved, maintaining stability and showing little change in terms of physicochemical and morphological characteristics, compared to AgNPs and AuNPs without vectorization. The antimicrobial activity of both vectorized nanoparticles was greater compared to nanoparticles without vectoring. The evaluation of the toxicity of AgNPs and AuNPs, with and without folic acid vectoring, against *Artemia salina*, showed excellent results, favoring its use in biological systems. The hemolytic evaluation showed biocompatibility of AgNPs and AuNPs, vectorized and non-vectorized. Thus, AgNPs and AuNPs, vectored or not, can be used in biological systems, developed with potential antimicrobial.

Keywords: Silver nanoparticles, Gold nanoparticles, Antimicrobial activity, Biocompatibility, Folic acid, *Annona muricata*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Folhas e fruto da <i>A. muricata</i>	25
Figura 2 - Estrutura geral das acetogeninas	26
Figura 3 - Mecanismo de citotoxicidade das acetogeninas no bloqueio do complexo mitocondrial.....	29
Figura 4 - Resistência adquirida à múltiplas drogas	30
Figura 5 - Estrutura molecular ácido fólico	31
Figura 6 - Vetorização das nanopartículas metálicas com o ácido fólico	31
Figura 7 - (a) AgNPs preparadas com extrato das polpa de <i>A. muricata</i> ; (b) AgNPs preparadas com extrato das sementes de <i>A. muricata</i> ; (c) AgNPs preparadas com extrato das folhas de <i>A. muricata</i>	43
Figura 8 - (a) AgNPs preparadas com extrato das polpa de <i>A. muricata</i> com exposição à luz artificial; (b) AgNPs preparadas com extrato das sementes de <i>A. muricata</i> com exposição à luz artificial; (c) AgNPs preparadas com extrato das folhas de <i>A. muricata</i> com exposição à luz artificial.....	44
Figura 9 - Espectros de UV-Vis das AgNPs preparadas com extrato da polpa, extrato das folhas e com o extrato das sementes de <i>A. muricata</i> , sem a exposição a luz artificial.....	45
Figura 10 - Espectros de UV-Vis das AgNPs preparadas com extrato da polpa de <i>A. muricata</i> com exposição à luz artificial nos tempos de 5 a 70 minutos.....	46
Figura 11 - Espectro de UV-Vis das AgNPs preparadas com extrato da semente de <i>A. muricata</i> com exposição à luz artificial nos tempos de 5 a 70 minutos.....	46
Figura 12 - Espectro de UV-Vis das AgNPs preparadas com extrato das folhas de <i>A. muricata</i> com exposição à luz artificial nos tempos de 5 a 70 minutos.....	47
Figura 13 - Fotomicrografias das (a) AgNPs sintetizadas a partir do extrato da polpa de <i>A. muricata</i> com exposição à luz artificial e de (b) AgNPs obtidas com extrato da polpa de <i>A. muricata</i> sem a exposição à luz artificial	51

Figura 14 - Fotomicrografias das (a) AgNPs sintetizadas a partir do extrato das sementes de <i>A. muricata</i> com exposição à luz artificial e de (b) AgNPs obtidas com extrato das sementes de <i>A. muricata</i> sem a exposição à luz artificial.....	52
Figura 15 - Fotomicrografias das (a) AgNPs sintetizadas a partir do extrato das folhas de <i>A. muricata</i> com exposição à luz artificial e de (b) AgNPs obtidas com extrato das folhas de <i>A. muricata</i> sem a exposição à luz artificial.	52
Figura 16 - Espectros de FTIR: a) Extrato polpa, AgNPsPsl, AgNPsPcl; b) Extrato folhas, AgNPsFsl, AgNPsFcl c) Extrato sementes, AgNPsSsl, SgNPScI	54
Figura 17 - Espectros EDS das AgNPs: (a) AgNPs obtida com o extrato da polpa de <i>A. muricata</i> com exposição à luz artificial , (b) AgNPs obtida com o extrato da polpa de <i>A. muricata</i> sem exposição à luz artificial; (c) AgNPs obtida com o extrato das folhas de <i>A. muricata</i> com exposição à luz artificial; (d) AgNPs obtida com o extrato das folhas de <i>A. muricata</i> sem exposição à luz artificial; (e) AgNPs obtida com o extrato das sementes de <i>A. muricata</i> com exposição à luz artificial; (f) AgNPs obtida com o extrato das sementes de <i>A. muricata</i> sem exposição à luz artificial.....	55
Figura 18 - (a) Espectros UV-Vis das AgNPs obtidas a partir do extrato da polpa da <i>A. muricata</i> , com a exposição à luz artificial e (b) espectros das AgNPs obtidas com o extrato da polpa da <i>A. muricata</i> sem a exposição da luz artificial.....	56
Figura 19 - (a) Espectros UV-Vis das AgNPs obtidas a partir do extrato das folhas da <i>A. muricata</i> , com a exposição à luz artificial e (b) espectros das AgNPs obtidas com o extrato das folhas da <i>A. muricata</i> sem a exposição da luz artificial.....	57
Figura 20 - (a) Espectros UV-Vis das AgNPs obtidas a partir do extrato das sementes da <i>A. muricata</i> com a exposição à luz artificial e (b) espectros das AgNPs obtidas com o extrato das sementes da <i>A. muricata</i> sem a exposição da luz artificial.	58
Figura 21 - Extrato da polpa <i>A. muricata</i> (a); Início da formação de AuNPs (b); AuNPs após 5 minutos de aquecimento.....	63

Figura 22 - Solução de citrato de sódio a 1% (a); AuNPs após 3 minutos de aquecimento (b);.....	63
Figura 23 - Espectro UV-Vis das AuNPs, obtidas com o extrato da polpa da <i>A. muricata</i>	64
Figura 24 - Espectro UV-Vis das AuNPs obtidas com o citrato 1%.....	65
Figura 25 - Fotomicrografias das AuNPs obtidas com o extrato da polpa de <i>A. muricata</i>	67
Figura 26 - Fotomicrografias das AuNPs obtidas com o citrato 1%.	67
Figura 27 - Espectros de EDS AuNPs obtidas a partir extrato polpa <i>A. muricata</i>	68
Figura 28 - Espectros de EDS AuNPs obtidas a partir de citrato 1%	68
Figura 29 - Espectro UV-Vis AuNPs do extrato da polpa de <i>A. muricata</i> no dia da preparação, 30, 90 dias e 1 ano após armazenamento sob refrigeração	69
Figura 30 - Espectro UV-Vis AuNPs obtidas a partir de citrato 1%, no dia da preparação e 30 dias após armazenamento sob refrigeração	70
Figura 31 - Espectro de massas extrato aquoso <i>A. muricata</i>	72
Figura 32 - AgNPsAF (a) e AuNPsAF (b) preparadas com a polpa de <i>A. muricata</i> e ácido fólico	72
Figura 33 - Espectro de UV-Vis das AgNPs AF (a) e AuNPS AF (b), preparadas com extrato da polpa de <i>A. muricata</i> e ácido fólico.	73
Figura 34 - Fotomicrografias das AgNPsAF (a) e AuNPsAF (b) obtidas com o extrato da polpa de <i>A. muricata</i> e vetorizadas com o ácido fólico	75
Figura 35 - Espectros de FTIR: a) Extrato polpa <i>A. muricata</i> , AgNPs polpa <i>A. muricata</i> obtidas pela luz artificial, AgNPsAF vetorizadas com ácido fólico e ácido fólico. b) Extrato polpa <i>A. muricata</i> ; AuNPs polpa <i>A. muricata</i> obtidas pela luz artificial, AuNPs vetorizadas com ácido fólico e ácido fólico.	76
Figura 36 - Espectros EDS AgNPsAF (a) e AuNPsAF (b).....	77
Figura 37 - Espectros UV-Vis das AgNPsAF no dia da preparação, 30 e 120 dias de armazenamento sob refrigeração.....	78
Figura 38 - Espectros UV-Vis das AuNPsAF no dia da preparação, 30 e 120 dias de armazenamento sob refrigeração.....	79
Figura 39 - Criação de náuplios de <i>A. salina</i> e tubo com <i>A. salina</i>	81
Figura 40 - Teste de toxicidade <i>A. salina</i>	81

Figura 41 - Avaliação da % de hemólise das AgNps, AgNPs AF, AuNPs, AuNps AF e extrato aquoso da polpa <i>A. muricata</i>	84
Figura 42 - Avaliação da % de hemólise das AgNPs, AgNPsAF e extrato aquoso da polpa da <i>A. muricata</i>	84
Figura 43 - Avaliação da % de hemólise das AuNps, AuNPsAF e extrato aquoso da polpa da <i>A.muricata</i>	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diâmetro hidrodinâmico (Z-average), Potencial Zeta (PZ), índice de polidispersão (PDI) e Diâmetro FEG e UV da AgNPs preparadas com extrato da polpa, das folhas e das sementes da <i>A. muricata</i> com e sem exposição à luz artificial	49
Tabela 2 - Atividade dos extratos de <i>A. muricata</i> na inibição do crescimento contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras	59
Tabela 3 - Atividade das AgNPs na inibição do crescimento contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras.....	60
Tabela 4 - Atividade bactericida e fungicida das AgNPs contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras.....	61
Tabela 5 - Percentual de mortalidade da <i>P. xylostella</i> frente aos extratos e AgNPs da <i>A. muricata</i>	62
Tabela 6 - Diâmetro hidrodinâmico, Potencial Zeta, índice de polidispersão (PDI) e Diâmetro FEG das AuNPs preparadas com o extrato da polpa e com citrato 1%	66
Tabela 7 - Atividade das AuNPs preparadas com o extrato aquoso da polpa da <i>A. muricata</i> e das AuNPs cit na inibição do crescimento e na atividade bactericida contra bactérias gram-positivas e negativas.....	71
Tabela 8 - Diâmetro hidrodinâmico (Z-average), Potencial Zeta, índice de polidispersão (PDI) e Diâmetro FEG das AgNPs e AuNPs preparadas com extrato da polpa e ácido fólico.....	74
Tabela 9 - Avaliação bacteriostática das AgNPsAF e AuNPsAF.....	80
Tabela 10 - Atividade bactericida das AgNPsAF e AuNPsAF	80
Tabela 11 - Toxicidade do extrato aquoso da polpa <i>A. muricata</i> , AgNPs, AgNPsAF, AuNPs e AgNO ₃ frente à <i>A. salina</i>	82
Tabela 12 - Toxicidade das AuNPs, AuNPsAF e AuCl ₄ frente à <i>A. salina</i>	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACGs	Acetogeninas
AgNO₃	Nitrato de Prata
AgNPs	Nanopartículas de Prata
AgNPsAF	Nanopartículas de Prata com ácido fólico
AgNpsFcl	Nanopartículas de prata obtidas com o extrato da folha e exposição à luz artificial
AgNPsFsl	Nanopartículas de prata obtidas com o extrato da folha, sem exposição à luz artificial
AgNPsPcl	Nanopartículas de prata obtidas com o extrato da polpa e exposição à luz artificial
AgNPsPsi	Nanopartículas de prata obtidas com o extrato da polpa, sem exposição à luz artificial
AgNPsScl	Nanopartículas de prata obtidas com o extrato da semente, com exposição à luz artificial
AgNPsSsl	Nanopartículas de prata obtidas com o extrato da semente, sem exposição à luz artificial
AuNPs	Nanopartículas de Ouro
AuNPsAF	Nanopartículas de ouro com ácido fólico
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
DLS	Dynamic light <i>scattering</i> – espalhamento de luz dinâmica
DP	Desvio Padrão
EDS	Espectroscopia de raios X por dispersão de energia
FEG	Microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo
HAuCl₄	Ácido cloroáurico
IVTF	Infravermelho com transformada de Fourier
MM	Massa molar
MDR	Resistência a múltiplas drogas
Mv	Milivolt
PDI	Índice de polidispersão
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
pZ	Potencial zeta
EROS	Espécies reativas de oxigênio
Rpm	Rotações por minuto
SPR	Superfície de ressonância de <i>plasmon</i>
UV-vis	Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1	SISTEMAS NANOCARREADORES.....	22
3.2	NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	23
3.3	<i>Annona muricata</i> L.....	25
3.3.1	Acetogeninas.....	26
3.3.2	Alcaloides.....	26
3.3.3	Compostos Fenólicos.....	27
3.3.4	Outros Compostos.....	27
3.3.5	Atividade Antimicrobiana.....	28
3.3.6	Atividade Antitumoral.....	28
3.4	ÁCIDO FÓLICO.....	30
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1	MATERIAL.....	32
4.2	EQUIPAMENTOS.....	32
4.3	REAGENTES E SOLVENTES.....	33
4.4	DESENHO EXPERIMENTAL.....	34
4.5	MÉTODOS.....	34
4.5.1	Preparação Do Extrato Aquoso Da Polpa <i>A. muricata</i>	34
4.5.2	Preparação Do Extrato Aquoso Das Sementes <i>A. muricata</i>	35
4.5.3	Preparação Do Extrato Aquoso Das Folhas <i>A. muricata</i>	35
4.5.4	Síntese Das AgNPs A Partir Da <i>A. muricata</i> Sem Exposição À Luz Artificial.....	35
4.5.5	Síntese Das AgNPs A Partir Da <i>A. muricata</i> E Fotorredução.....	35
4.5.6	Síntese Das AuNPs A Partir Do Extrato Aquoso Da Polpa <i>A. muricata</i>	36
4.5.7	Síntese Das AuNPs A Partir Do Citrato de Sódio.....	36
4.5.8	Vetorização Das AgNPs E AuNPs Com Ácido Fólico.....	36

4.5.9	Caracterização Morfológicas Das AgNPs, AuNPs, AgNPsAF e AuNPsAF.....	37
4.5.9.1	Espectroscopia UV-Vis das AgNPs, AgNPsAF, AuNPs e AuNPsAF.	37
4.5.9.2	Espectrometria de difração a laser e potencial zeta.....	37
4.5.9.3	Avaliação morfológica e de superfície.....	37
4.5.9.4	Espectroscopia de Infravermelho Transformada em Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy - FTIR).....	37
4.5.9.5	Espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDS).....	38
4.5.9.6	Avaliação cromatográfica qualitativa do extrato aquoso da polpa da <i>A. muricata</i>	38
4.6	ESTUDOS DE ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS.....	38
4.7	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS E DAS AgNPsPcl, AgNPsPsl, AgNPsFcl, AgNPsFsl, AgNPsScl, AgNPsSsl, AgNPsAF, AuNPs e AuNPsAF.....	39
4.8	ATIVIDADE LARVICIDA DAS AgNPs PREPARADAS COM O EXTRATO AQUOSO DA POLPA DA <i>A. muricata</i>	40
4.8.1	Criação Dos Insetos.....	40
4.8.2	Preparação Dos Discos Pelo Método De Imersão E Contato Direto	40
4.8.3	Avaliação Das AgNPs De <i>A. muricata</i> Na Biologia de <i>P. xylostella</i> Pelo Método De Contato Direto.....	41
4.9	TESTES DE TOXICIDADE COM NÁUPLIOS DE <i>A. salina</i>	41
4.10	ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1	SÍNTESE DAS AgNPs A PARTIR DA <i>A. muricata</i>	43
5.2	SÍNTESE DAS AgNPs A PARTIR DA <i>A. muricata</i> E FOTORREDUÇÃO.....	44
5.3	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICAS DAS AgNPs.....	45
5.3.1	Espectroscopia UV-Vis das AgNPs.....	45
5.3.2	Determinação De Diâmetro Médio, Índice De Polidispersão, Potencial Zeta.....	48
5.3.3	Avaliação Morfológica E De Superfície Por Microscópio Eletrônico De Varredura Por Emissão De Campo FEG.....	50
5.3.4	Espectroscopia de Infravermelho Transformada em Fourier.....	53

5.3.5	Espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDS).....	54
5.4	ESTUDOS DE ESTABILIDADE DAS AgNPs.....	56
5.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS E DAS AgNPsPcl, AgNPsPsl, AgNPsFcl, AgNPsFsl, AgNPsScl, AgNPsSsl.	59
5.6	ATIVIDADE LARVICIDA DO EXTRATO AQUOSO DA POLPA DE <i>A. muricata</i> E DAS AgNPsPcl.....	62
5.7	SÍNTESE DAS AuNPs A PARTIR DO EXTRATO AQUOSO DA POLPA DA <i>A. muricata</i>	62
5.8	SÍNTESE DAS AuNPs A PARTIR DO CITRATO DE SÓDIO.....	63
5.9	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICAS DAS AuNPs.....	64
5.9.1	Espectroscopia De UV-Vis Das AuNPs.....	64
5.9.2	Determinação De Diâmetro Médio, Índice De Polidispersão, Potencial Zeta.....	65
5.9.3	Avaliação Morfológica E De Superfície.....	66
5.9.4	Espectroscopia De Raios X Por Dispersão De Energia (EDS).....	68
5.10	ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS AuNPs.....	69
5.11	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS AuNPs.....	70
5.12	AVALIAÇÃO CROMATOGRÁFICA QUALITATIVA DO EXTRATO AQUOSO DA POLPA DA <i>A. muricata</i>	71
5.13	VETORIZAÇÃO DAS AgNPs E AuNPs COM ÁCIDO FÓLICO	72
5.14	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	72
5.14.1	Espectroscopia UV-Vis.....	72
5.14.2	Determinação De Diâmetro Médio, Índice De Polidispersão, Potencial Zeta.....	73
5.14.3	Avaliação Morfológica E De Superfície Das AgNPsAF E AuNPsAF..	74
5.14.4	Espectroscopia De Infravermelho Por Transformada Em Fourier.....	75
5.14.5	Espectroscopia De Raios X Por Dispersão De Energia (EDS).....	77
5.15	ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS AgNPsAF E AuNPsAF.....	78
5.16	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS AgNPsAF E AuNPsAF.....	79
5.17	TOXICIDADE FRENTE AOS NÁUPLIOS DE <i>A. salina</i>	81
5.18	ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	83
6	CONCLUSÃO	87
	REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia trouxe grandes possibilidades de controle e de manipulação de estruturas a nível molecular impactando de forma decisiva nas ciências farmacêuticas e conseqüentemente na medicina, trazendo a cada dia avanços na tecnologia diagnóstica e produção de medicamentos (NADAROGLU; GUNGOR; INCE, 2017).

A nanomedicina busca o desenvolvimento de fármacos encapsulados em sistemas nanométricos que permitem uma melhor eficácia. Isto inclui fármacos conhecidos, proteínas, enzimas e anticorpos que têm sua eficiência clínica prejudicada devido a baixa meia-vida ou alta toxicidade (SINGH *et al.*, 2016).

A formação de ligações estáveis, a variabilidade de tamanho e forma, alta capacidade de encapsulação e a conveniência de se ligar a substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas fazem das nanopartículas uma plataforma favorável para a liberação controlada de fármacos (YETISGIN *et al.*, 2020).

As propriedades físicas de nanopartículas menores de 100 nm garantem a estas aplicações biomédicas com potenciais singulares. Desta forma, estes sistemas são muito atrativos para o desenvolvimento de medicamentos empregados no tratamento do câncer, de problemas do coração, dos pulmões, do sangue, bem como de doenças inflamatórias e infecciosas (McMILLAN, 2011).

Apesar dos grandes avanços alcançados na tecnologia de desenvolvimento de medicamentos, ainda deparam-se com as limitações no tratamento de diversas doenças como o câncer, devido aos efeitos colaterais decorrentes do uso da terapêutica convencional, paralelamente a isso, enfrentam-se os problemas de multirresistência aos fármacos, que se observa tanto para os quimioterápicos, quanto para os antibióticos (GOTTESMAN *et al.*, 2009).

Este panorama constitui um verdadeiro desafio científico-tecnológico e de inovação com intensa busca por tratamentos mais eficazes e com menores efeitos adversos (JABIR *et al.*, 2012).

Inúmeros estudos buscando novas estratégias para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos têm sido realizados. No que se refere a nanopartículas, dois fatores são primordiais: o controle do tamanho das partículas e as propriedades de superfície, que garantem a liberação controlada do agente

farmacologicamente ativo no sítio específico de ação. Contendo essas características, as nanopartículas podem penetrar facilmente nas células e apresentar alta reatividade com outros sistemas biológicos, tais quais os microrganismos (RANGHAR *et al.*, 2014).

Desta forma, além dos vários benefícios terapêuticos, estes sistemas de liberação nanoparticulados podem também ser úteis para superar casos de resistência a múltiplos fármacos pelas células cancerosas (JABIR *et al.*, 2012) e pelos microrganismos.

Outra melhoria surgiu com o desenvolvimento de sistemas de liberação de agentes terapêuticos com vetorização, os quais são aplicados em diversos campos, desde a quimioterapia à terapia genética. Esses nanossistemas são dirigidos a um alvo e permitem um tratamento específico no local, possibilitando transportar, simultaneamente, dosagens mais elevadas dos agentes biologicamente ativos, com redução significativa dos efeitos secundários comparando-se ao tratamento convencional (CECÍLIO, 2014).

A produção de nanopartículas metálicas, com o intuito de atender essas demandas terapêuticas, foi otimizada com a proposta de síntese verde, que com certeza tornou-se uma tecnologia valiosa para a produção de nanopartículas de tamanho e formas controladas, utilizando fontes biológicas, como plantas e microrganismos e sem a utilização de materiais tóxicos ao ser humano e ao meio ambiente (PILENI, 2000).

Dessa forma, a planta escolhida para a produção das nanopartículas metálicas é a *Annona muricata* L.. Conhecida como graviola e empregada na medicina popular para o tratamento de várias infecções, apresentando atividade antiinflamatória, antiparasitária, antibacteriana, além de demonstrar ser potencialmente eficaz no tratamento do câncer (ALFAIA; ALMEIDA, 2016).

É importante salientar o desenvolvimento das nanopartículas metálicas, de ouro e de prata, a partir da síntese verde, utilizando-se extratos aquosos de *A. muricata*, sem a utilização de solventes e outras substâncias químicas redutoras, sendo obtidas de duas maneiras, sem a utilização da luz artificial e também em sua presença, de forma a controlar sua obtenção. Além disso, as nanopartículas metálicas obtidas pelo método de síntese verde foram vetorizadas, surgindo assim um sistema que apresentará maior biodisponibilidade em aplicações biológicas e futuramente poderá ser utilizado em terapia antimicrobiana.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar AgNPs e AuNPs, a partir da síntese verde, promovida pelo extrato de *A. muricata* Linnaeus (Annonaceae), vetorizadas e avaliar atividade antimicrobiana e de toxicidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar AgNPs por meio da redução da prata pelo extrato da folha, da semente e/ou da polpa de *A. muricata*, com e sem a exposição à luz artificial;
- Sintetizar AuNPs por meio da redução do ouro pelo extrato da polpa de *A. muricata*;
- Sintetizar AuNPs com citrato de sódio;
- Caracterizar as AgNPs e as AuNPs obtidas quanto às características físico-químicas e morfológicas;
- Realizar a vetorização com ácido fólico das AgNPs e AuNPs, obtidas com o extrato aquoso da polpa de *A. muricata*;
- Caracterizar as AgNPsAF e AuNPsAF vetorizadas com ácido fólico, quanto às características físico-químicas e morfológicas;
- Determinar a estabilidade das AgNPs, obtidas com o extrato aquoso da polpa, folhas e sementes da *A. muricata*, com e sem a utilização da luz artificial e das AuNPs, obtidas pelo extrato aquoso da polpa da *A. muricata*;
- Determinar a estabilidade das AgNPsAF e AuNPsAF obtidas com o extrato aquoso da polpa da *A. muricata*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato aquoso da polpa, folhas e sementes de *A. muricata*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana das AgNPs obtidas com o extrato aquoso da polpa, folhas e sementes de *A. muricata*, com e sem a utilização da luz artificial e das AuNPs obtidas com o extrato aquoso da polpa da *A. muricata*;
- Determinar a atividade larvicida das AgNPs obtidas com o extrato aquoso da polpa de *A. muricata* frente as larvas de *Plutella xylostella* Linnaeus;

- Avaliar a atividade antimicrobiana das AgNPs e AuNPs, obtidas com o extrato aquoso da polpa de *A. muricata* e vetorizadas;
- Determinar a toxicidade sobre os eritrócitos das AgNPs e AuNPs, obtidas a partir do extrato aquoso da polpa de *A. muricata*, na presença e ausência da vetorização;
- Avaliar a toxicidade das AgNPs e AuNPs, obtidas a partir do extrato aquoso da polpa de *A. muricata*, na presença e ausência da vetorização, frente aos náuplios de *Artemia salina*;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SISTEMAS NANOCARREADORES

A nanotecnologia farmacêutica é a área das ciências farmacêuticas envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica ou micrométrica. Estudos de tais sistemas têm sido realizados ativamente no mundo com o propósito de direcionar e controlar a liberação de fármacos (SAKATA *et al.*, 2007).

Os nanossistemas oferecem diversas vantagens, como a proteção do fármaco no sistema terapêutico contra possíveis instabilidades no organismo, promovendo manutenção de níveis plasmáticos em concentração constante. Além disso, há um aumento da eficácia terapêutica e liberação progressiva e controlada do fármaco pelo condicionamento a estímulos do meio em que se encontram (PIMENTEL *et al.*, 2007).

A diminuição expressiva da toxicidade pela redução de picos plasmáticos de concentração máxima e a diminuição da instabilidade e decomposição de fármacos sensíveis também deve ser considerada. A possibilidade de direcionamento a alvos específicos (sítio-especificidade), a incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas nos dispositivos e a diminuição da dose terapêutica e do número de administrações complementam as principais vantagens desses sistemas (ALVES; MARTINS; SANTANA, 2008).

Embora essas vantagens sejam significativas, alguns inconvenientes plausíveis não podem ser ignorados, como por exemplo, uma possível toxicidade, ausência de biocompatibilidade dos materiais utilizados e o elevado custo de obtenção dos nanossistemas comparados com as formulações farmacêuticas convencionais (DUNNE *et al.*, 2003; TAO; DESAI, 2003).

Nos últimos anos, numerosos estudos demonstraram que a distribuição de um fármaco no organismo pode ser modificada pelo uso de nanossistemas tais como lipossomas, nanopartículas ou micropartículas. Estes carreadores podem proteger o princípio ativo da degradação e/ou inativação; melhoram a biodisponibilidade por aumento da penetração celular e proporcionam a liberação do fármaco no sítio de ação desejado, eliminando ou minimizando os efeitos colaterais da terapêutica convencional (PEZZINI; FERRAZ; SILVA, 2007).

O desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação controlada por micro e nanossistemas poderá permitir um melhor controle na cinética de liberação do fármaco, resultando em níveis plasmáticos terapêuticos, com menores efeitos tóxicos, o que pode repercutir na melhoria da qualidade de vida de milhões de pacientes, além do impulso técnico, científico e financeiro, potencialmente adquiridos (PIMENTEL *et al.*, 2007).

A vetorização das nanopartículas pode ser ativa e passiva, além de direcionar o sistema a um tipo celular específico, podem se ligar aos receptores das superfícies das células. Essa ligação interfere na transdução de sinais, regulando a expressão de proto-oncogenes e alterando os mecanismos de proliferação celular. A combinação da vetorização passiva com a ativa potencializará a ação desses nanocarreadores, direcionando as partículas ao sítio de ação. Essa é a nova tendência das pesquisas que envolvem o tratamento de tumores e nanopartículas (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

A preocupação com o sucesso dos tratamentos efetuados com fármacos de características particulares, como toxicidade elevada, faixa terapêutica estreita, metabolização rápida, ou que necessitam ser empregados em esquemas terapêuticos de longa duração, levou os pesquisadores da área farmacêutica a buscarem novas alternativas de administração, além daquelas consideradas convencionais. O controle da liberação de substâncias ativas em sítios de ação específicos, por meio da utilização de formas farmacêuticas capazes de permitir a otimização da velocidade de liberação e do regime posológico, é uma área de pesquisa intensiva nos últimos anos (MAINARDES, 2007).

As nanopartículas recobertas com polietilenoglicol (PEG) são uma alternativa de vetorização às células tumorais. Essa camada protetora limita assim o reconhecimento e a liberação dos macrófagos e outras proteínas opsonizantes, permanecendo na circulação durante um tempo maior (HUANG, 2014).

3.2 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

O desenvolvimento da nanobiotecnologia dispõe de técnicas ambientalmente benignas na biossíntese de nanomateriais. Microrganismos, plantas e fungos podem ser usados como agentes biodegradáveis. A síntese verde é um método simples e rápido no desenvolvimento das nanopartículas metálicas, sendo uma abordagem

ecologicamente correta, econômica e reproduzível (NADAROGLU; GUNGOR; INCE, 2017; PRASANNARAJ; VENKATACHALAM, 2017).

A engenharia verde de nanopartículas metálicas é uma tecnologia valiosa para a produção de nanopartículas de tamanho e formas controladas, utilizando fontes biológicas (PILENI, 2000).

As biomoléculas de plantas são responsáveis pela redução, síntese e estabilização dos íons metálicos, sendo, portanto, muito utilizados na síntese de AgNPs (SANTHOSH; RAGAVENDRAN; NATARAJAN, 2015).

Atualmente, materiais em nanoescala são utilizados em aplicações farmacêuticas e no campo da biomedicina (KUPPUSAMY *et al.*, 2016).

Como a maioria dos métodos não biológicos utilizam para a síntese de nanopartículas metálicas substâncias químicas potencialmente perigosas, a síntese verde de nanopartículas metálicas usando extrato de plantas, tem recebido grande atenção, por ser um protocolo de etapa única com disponibilidade de grande quantidade, ecologicamente correto e de baixo custo que não envolve produtos químicos tóxicos (ARUNACHALA; ANNAMALAI; HARI, 2013).

Nanopartículas metálicas estão sendo utilizadas no campo biomédico para fins como proteção de microrganismos prejudiciais, bioimagem, transporte de fármacos, tratamento de câncer, diagnóstico médico, atividade antimicrobiana, antioxidante, antimetástase, biocompatibilidade e estabilidade (SINGH *et al.*, 2016).

O desenvolvimento de AuNPs utilizando extratos naturais é relevante, principalmente relacionado a questões ambientais (SILVA; LACERDA; JUNIOR, 2005). Diversos estudos apresentam a utilização da atividade redutora de matérias vegetais na síntese de nanopartículas metálicas (ISAAC; SAKTHIVEL; MURTHY, 2013).

Portanto, devido ao potencial das nanopartículas de metais nobres, como as AgNPs e AuNPs têm grande interesse devido à sua confiabilidade em relação à síntese econômica e propriedades terapêuticas amplas, como antimicrobiana, antioxidante e atividade anticancerígena (YU, 2000).

AgNPs têm um grande potencial particularmente na terapia do câncer devido ao seu papel seletivo na ruptura da cadeia respiratória mitocondrial por AgNPs levando à produção de mais espécies reativas de oxigênio e interrupção da síntese de ATP, que por sua vez causam danos ao DNA (KEKI *et al.*, 2000).

As AgNPs podem exercer atividade antibacteriana por três mecanismos diferentes. A liberação de íons Ag^+ , os quais podem se ligar a grupos tióis (-SH), desestabilizando a estrutura de proteínas e enzimas da membrana celular. A adsorção das AgNPs na membrana celular bacteriana podem formar poros, extravasamento do conteúdo citoplasmático e consequentemente morte celular. A produção de espécies reativas de oxigênio pode desestabilizar a estrutura do DNA e desnaturação de proteínas (MARAMBIO-JONES; HOEK, 2010).

3.3 *Annona muricata* L.

Annona muricata é conhecida como Soursop (Inglês), Graviola (Português), Guanabana (espanhol latino-americano), Omusitafeli /Ekitafeli (Uganda), além de outras denominações indígenas locais. Esta planta é uma espécie do gênero *Annona*, que compreende mais de 70 espécies, sendo a *A. muricata* (Figura 1), a mais amplamente cultivada (PINTO *et al.*, 2005).

A *A. muricata* é uma espécie cultivada em regiões tropicais das Américas, apresenta uma nova classe de fitoquímicos, as acetogeninas anonáceas, que entre outras atividades tem demonstrado ser antitumoral, pesticida, inseticida, antibacteriana, antiparasitária e imunossupressora. Além das acetogeninas, foram encontrados duzentos e doze compostos, como alcaloides, fenóis e outros compostos na espécie de *A. muricata* (AGU *et al.*, 2018; CORIA-TELEZ *et al.*, 2016).

Figura 1- Folhas e fruto da *A. muricata*



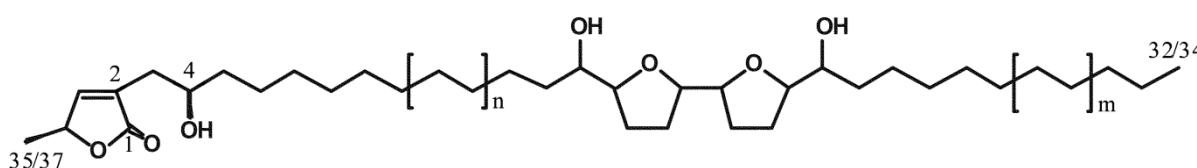
Fonte: SIAGRO EXPORT, 2017.

3.3.1 Acetogeninas

As acetogeninas são caracterizadas por uma longa cadeia alifática de 35-38 carbonos ligados a um anel gama-lactona, com um ou dois tetrahydrofuranos (THF) localizados ao longo da cadeia de hidrocarbonetos e um determinado número de grupos de oxigênio (hidroxila, acetoxilas, cetonas, epóxi). As acetogeninas são lineares e podem ter um ou dois grupos epóxi. Podem ainda apresentar dupla e tripla ligações, e anéis THP (tetrahidropirano) (AGU *et al.*, 2018; MELOT *et al.*, 2009) LANDOLT *et al.*, 1995; BERMEJO *et al.*, 2005).

As acetogeninas são consideradas os principais compostos bioativos da família Annonaceae. Sua estrutura geral está na Figura 2. Alguns estudos mostraram que as acetogeninas apresentam maior citotoxicidade, comparada aos alcaloides e a rotenona, um agente citotóxico (GAVAMUKULYA; WAMUNYOKOLI; EL-SHEMY, 2017).

Figura 2 – Estrutura geral das acetogeninas



Fonte: BERMEJO *et al.*, 2005

3.3.2 Alcaloides

Os alcaloides são compostos que ocorrem naturalmente e apresentam átomos de nitrogênio. Os mais abundantes em folhas de *A. muricata* são anonaine, xylopine, isolaureline, coclaurine, também são encontrados em raízes, caules e frutos (FOFANA *et al.*, 2012).

Estudos anteriores mostraram que os alcaloides isolados das espécies *Annona* possuem afinidade para os receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} *in vitro* e participam da biossíntese de dopamina. Assim, foi proposto que alcaloides derivados da *Annona* poderiam induzir efeitos antidepressivos e atividade citotóxica (HASRAT *et al.*, 1997).

Efeitos neurotóxicos também foram relatados para alguns alcaloides, e sugerem que a morte neuronal ocorre por apoptose (MATSUSHIGE *et al.*, 2012).

Sete alcaloides isoquinolinas, incluindo reticulina, coclaurina, coreximina, aterosperminina, stepharine, anomurina e anomuricina foram isoladas das folhas, raízes e cascas do caule da *A. muricata*. O óleo essencial da polpa da fruta fresca da *A. muricata* contém 2-hexenoicoéster metílico ácido (23,9%), éster etílico do ácido 2-hexenóico (8,6%), éster metílico do ácido 2-octenóico (5,4%), 2-butenóicoéster metílico ácido (2,4%), β -cariofileno (12,7%), 1,8 cineol (9,9%), linalol (7,8%), α -terpineol (2,8%), lialilpropionato (2,2%) e calarene (2,2%) (PIEME *et al.*, 2014).

3.3.3 Compostos Fenólicos

Trinta e sete compostos fenólicos aproximadamente foram relatados fazer parte da composição da *A. muricata*. Os importantes compostos fenólicos encontrado em folhas incluem quercetina, catequina, ácido gálico, argentinina e ácido clorogênico (NAWWAR, 2012).

A presença de flavonoides e antioxidantes lipofílicos compostos como tocoferóis e tocotrienóis podem estar presentes na polpa. A maioria dos fenóis é solúvel em água, sendo o uso medicinal mais comum, a infusão aquosa. Os compostos fenólicos são considerados os principais fitoquímicos responsáveis pela atividade antioxidante (CORREA-GORDILLO *et al.*, 2012).

3.3.4 Outros Compostos

Vitaminas, carotenoides, amidas e ciclopeptídeos também foram identificados em *A. muricata*. Vitaminas e carotenoides foram encontrados em folhas, sementes e polpa da fruta. A presença da amida *N-p*-coumaroil tiramina e ciclopeptídeos foram relatados nas sementes e mostrou ter efeitos anti-inflamatórios e anti-tumorais (ROGER *et al.*, 2015).

Por outro lado, aproximadamente 37 compostos voláteis foram identificados na polpa da fruta de *A. muricata*, e a maioria desses compostos são ésteres aromáticos e alifáticos. Além disso, 80 compostos presentes em óleos essenciais,

principalmente derivados de sesquiterpenos, foram identificados na folha (GAVAMUKULYA; WAMUNYOKOLI; EL-SHEMY, 2017).

3.3.5 Atividade Antimicrobiana

A bioatividade antimicrobiana de extratos de *A. muricata* é atribuída aos flavonóides, esteróides e alcaloides presentes nos extratos vegetais (RADJI; KURNIATI; KIRANASARI, 2015; SANTHOSH; YUVARAJAN; NATARAJAN, 2015).

O mecanismo de ação é provavelmente devido a um sinergismo entre estes compostos. Alguns alcaloides têm a capacidade de se ligar ao DNA de microrganismos e inibir a síntese de RNA (RADJI; KURNIATI; KIRANASARI, 2015), e demonstraram atividade antimicrobiana por inibição da glicosidase (MOHANTY *et al.*, 2008).

Também foi relatado que flavonóides atuam inibindo a membrana citoplasmática e síntese de DNA, como exemplo, a quercetina que se liga a subunidade GyrB da DNA girase de *Escherichia coli* e inibe a atividade enzimática ATPásica. O fenilfenol liga-se a proteínas de membrana ou o hidrogênio com proteínas vitais, como enzimas microbianas, alterando suas funções (RADJI; KURNIATI; KIRANASARI, 2015).

3.3.6 Atividade Antitumoral

A atividade antitumoral está relacionada com a presença de acetogeninas (LIU *et al.*, 2007), compostos característicos das Annonaceae, que exercem citotoxicidade seletiva sobre células tumorais, sem afetar as células normais (COLMAN-SAIZARBITORIA *et al.*, 2009).

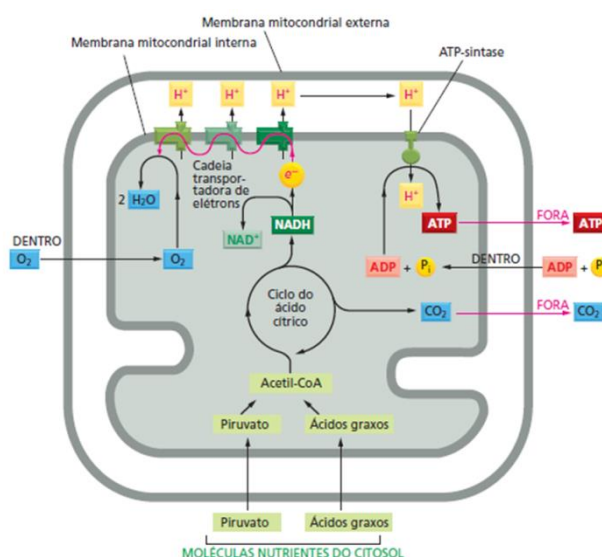
O mecanismo de citotoxicidade está relacionado com a inibição potente do complexo mitocondrial (complexo I), bloqueando a fosforilação oxidativa, limitando o nível de ATP a nível celular (Figura 3). As acetogeninas ainda inibem a NADH oxidase, que está presente nas membranas plasmáticas das células cancerosas (YUAN *et al.*, 2003; AGU *et al.*, 2018).

A seletividade das acetogeninas para células tumorais pode ser explicada tanto pelas atividades superiores da NADH oxidase que é peculiar às células

tumorais, bem como o aumento da demanda de ATP devido ao seu crescimento descontrolado (GUPTA *et al.*, 2012).

A ação das acetogeninas também está relacionada com o crescimento endotelial vascular, diminuindo assim o crescimento dos vasos próximo às células, assim há diminuição do fornecimento de glicose e consequentemente a diminuição da formação de ATP, necessário ao crescimento das células cancerosas. (MOGHADAMTOUSI; ROUHOLLAHI; KARIMIAN, 2015).

Figura 3 - Mecanismo de citotoxicidade das acetogeninas no bloqueio do complexo mitocondrial



Fonte: (COLMAN-SAZARBITORIA *et al.*, 2009).

Em torno de 2% das células cancerosas, pode desenvolver uma bomba de glicoproteína-P, causando assim a resistência das células cancerosas aos agentes quimioterápicos, os chamados tumores resistentes a múltiplos medicamentos (Figura 4) (OBERLIES; CHANG; MCLAUGHLIN, 1997).

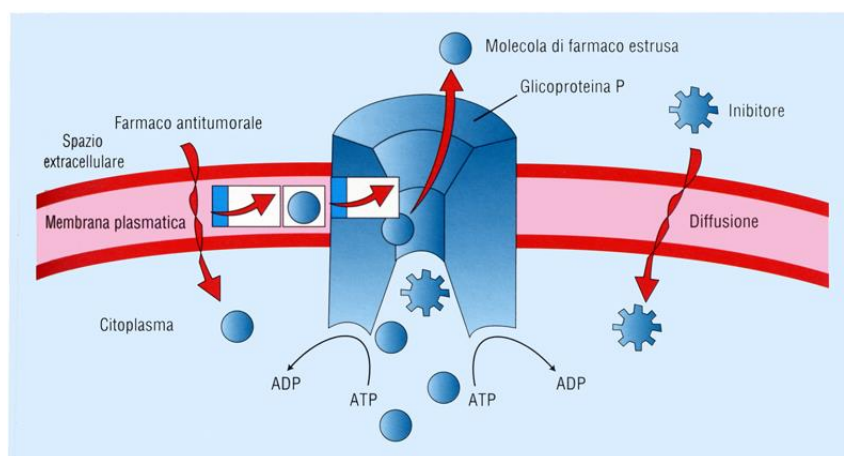
A resistência a múltiplas drogas (MDR) é um caso de resistência adquirida, observada em células tumorais, *in vivo* e *in vitro*, que consiste na ausência de resposta aos quimioterápicos, tanto àquele que foi utilizado inicialmente, quanto a outros empregados como alternativa. Este fato está relacionado à amplificação gênica e/ou ao aumento da expressão de algumas proteínas pertencentes à superfamília ABC (ATP-binding cassette). O resultado da expressão do gene *mdr1* em mamíferos é a glicoproteína-P, que utilizando a energia proveniente da hidrólise

do ATP, promove o efluxo do quimioterápico (HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010).

Alguns autores, como Collnot *et al.* (2007), propuseram que as acetogeninas realizam inibição competitiva com o substrato, alteração na fluidez da membrana e inibição da bomba de glicoproteína-P, diminuindo assim essa resistência aos antitumorais. Outra atividade é a reversão das fases do ciclo celular, diminuindo o processo de mitose.

O estudo de Liu e colaboradores (2007) relatou a atividade antitumoral das acetogeninas contra a linhagem celular do tumor pancreático humano (PACA-2), adenocarcinoma da próstata humana (PC-3), carcinoma pulmonar humano (A-549), além de exibir citotoxicidade contra o carcinoma hepatocelular (Hep G2) (LIU *et al.*, 2007).

Figura 4 - Resistência adquirida à múltiplas drogas



Fonte: (HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA; 2010).

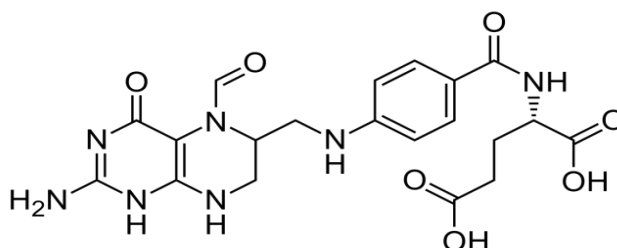
3.4 ÁCIDO FÓLICO

O ácido fólico é uma importante vitamina do complexo B que atua na biossíntese de aminoácidos, nucleotídeos, DNA, RNA e outras vitaminas. A sua estrutura está demonstrada na Figura 5. A importância do ácido fólico na preparação de sistemas de liberação de fármacos é como agente seletivo no tratamento do câncer, já que as células cancerígenas possuem sítios de interação com grupos folato (PAL *et al.*, 2019).

É uma pequena molécula capaz de ligar-se a receptores de folatos expressos mais vezes em células de tumores epiteliais do que em tecidos normais (TIAN *et al.*,

2011). O ácido fólico é um forte candidato no direcionamento de fármacos, pois interage em receptores que estão superexpressos nas células cancerosas humanas e são importantes para a internalização e o desenvolvimento das células (NGUYEN *et al.*, 2019).

Figura 5 - Estrutura molecular ácido fólico

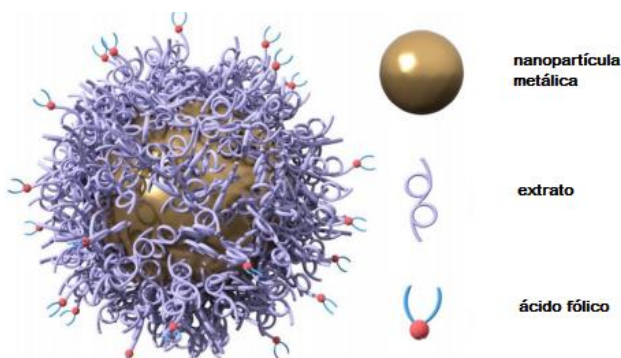


Fonte: PUBCHEM, 2020.

As nanopartículas com sistemas de direcionamento a um alvo mostram acúmulo mais rápido e maior concentração em tumores, quando comparadas com sistemas não direcionados. A utilização de folatos como ligante alvo, apresentou esse acúmulo sobre os tumores (WANGA; THANOU, 2010).

Uma forma esquemática da estrutura da nanopartícula metálica obtida através da redução do extrato de plantas e com vetorização do ácido fólico está demonstrada na Figura 6.

Figura 6 - Vetorização das nanopartículas metálicas com o ácido fólico



Fonte: adaptado de BRANDT (2019).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

- Frutos e folhas *A. muricata* obtidas do Mercado Municipal Curitiba- Paraná.
- Cepas bacterianas (ATCC) *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* e cepas fúngicas de *Candida albicans*.
- Náuplios de *Artemia salina*.
- Larvas de *Plutella xylostella* L.
- Sangue de carneiro.

4.2 EQUIPAMENTOS

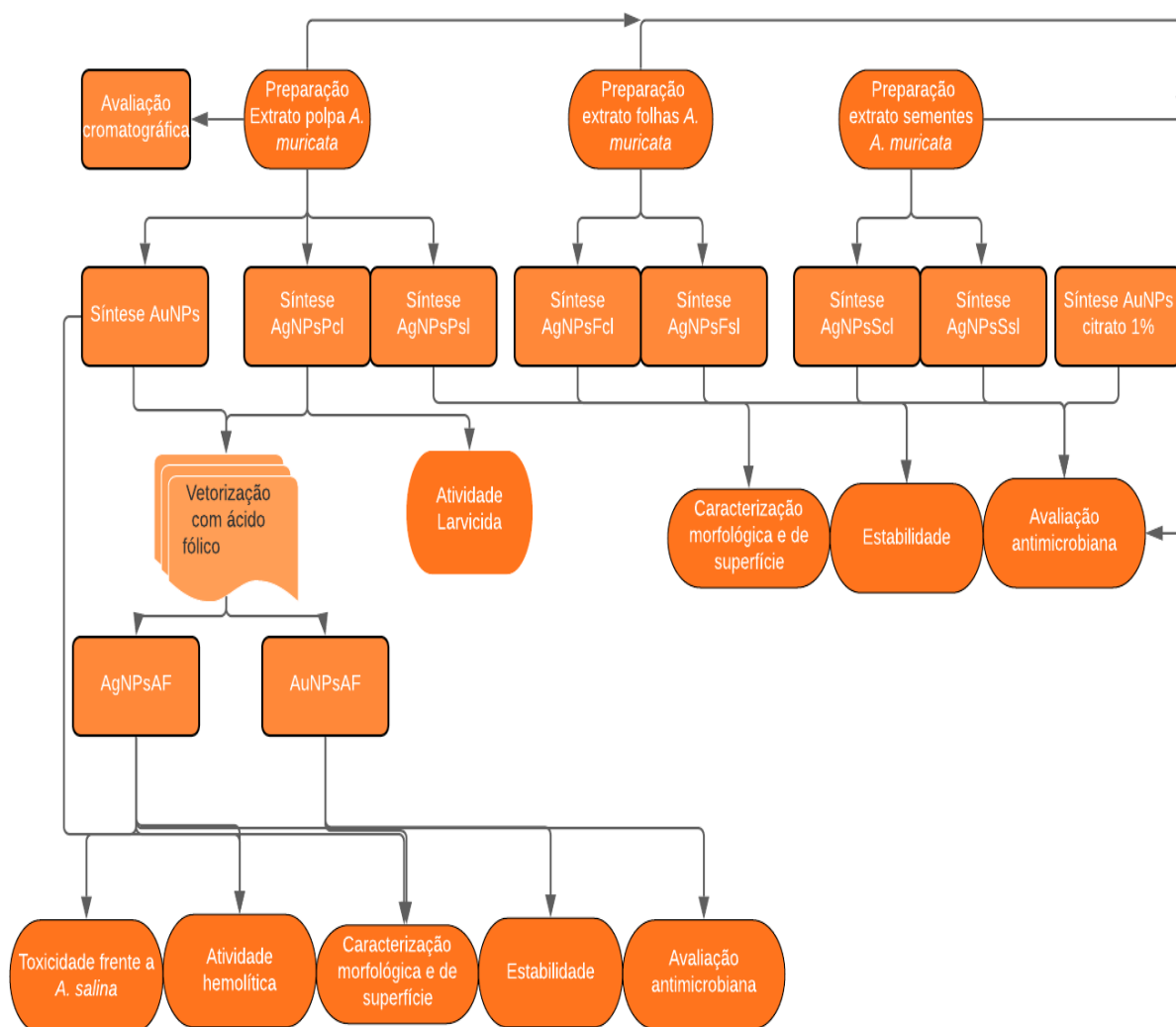
- Balança semi-analítica de prato único (SHIMADZU. Modelo UX420H, Quioto, Japão);
- Lavadora Ultrassônica (MAXICLEAN, modelo USC-1600^a, SP - Brasil);
- Ultraturrax (IKA. Modelo T18 Basic, Campinas (Cambuí) – SP - Brasil);
- Estufa (QUIMIS, modelo Q316M4, Diadema - SP - Brasil);
- pH metro (HANNA, modelo HI 221, São Paulo, Brasil);
- Espectrofotômetro de Absorção Atômica (VARIAN AA240FS, Mulgrave, Victoria 3170, Austrália);
- Difrátômetro de raios X (RIGAKU, modelo Ultima IV, Quioto, Japão);
- Espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR PRESTIGE 21, Quioto, Japão);
- Espectrofotômetro UV-Vis (NIR VARIAN CARY 50, Estados Unidos);
- Ultrafreezer (NUAIRE, modelo GLACIER -86°C, Plymouth, USA)
- Liofilizador (TERRONI, modelo LD1500A, São Paulo, Brasil);
- Sistema ultrapurificador de água (MILLIPORE, Bedford, MA, Estados Unidos);
- Sistema de Osmose reversa (QUIMIS, Diadema - SP - Brasil);
- Analisador de potencial zeta, peso molecular e tamanho de partícula ZETASIZER NANO SERIES (MALVERN, modelo NANO ZS90, Reino Unido);

- Metalizador (QUORUM TECHNOLOGIES, modelo SC7620 Mini Sputter Coater, Londres, Reino Unido);
- Microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo FEG-SEM (TESCAN, modelo MYRA3, República Tcheca).

4.3 REAGENTES E SOLVENTES

- Nitrato de Prata 99,8% (BIOTEC[®], São Paulo, Brasil);
- Água purificada Milli-Q (MILLIPORE[®], Bedford, MA, Estados Unidos);
- Brometo de potássio grau FTIR, $\geq 99\%$ (SIGMA-ALDRICH[®], St. Louis, MO, Estados Unidos).
- Ácido tetracloreáurico.
- Citrato de sódio dihidratado (Sigma–Aldrich[®], Missouri, EUA).
- Ácido fólico Florian[®].

4.4 DESENHO EXPERIMENTAL



Fonte: a autora, 2020.

4.5 MÉTODOS

4.5.1 Preparação Do Extrato Aquoso Da Polpa De *A. muricata*

O extrato aquoso da polpa de *A. muricata* foi preparado na concentração de 10%, 10g em 100 mL de água ultrapurificada, a partir do método de turboextração. Foi utilizado o ultraturrax® IKA a 10.000 RPM para sua homogeneização. O extrato foi filtrado em papel de filtro Whatmann® número 1.

4.5.2 Preparação Do Extrato Aquoso Das Sementes De *A. muricata*

As sementes de *A. muricata* obtidas do fruto fresco foram secas em estufa a 37°C durante 48 horas. Após a secagem as sementes foram maceradas em gral. Foi, então, realizada a decocção utilizando-se o extrato a 10%, 10g em 100 mL de água ultrapurificada, a 100°C durante 10min. O extrato foi filtrado em papel de filtro Whatmann® número 1.

4.5.3 Preparação Do Extrato Aquoso Das Folhas De *A. muricata*

O extrato das folhas secas foi preparado por meio de infusão durante 30 min, 10 g de folhas secas com 100 mL de água destilada. O extrato foi filtrado em papel de filtro Whatmann® número 1.

4.5.4 Síntese Das AgNPs A Partir Da *A. muricata* Sem Exposição À Luz Artificial

As AgNPs foram sintetizadas utilizando-se 1 mL de extrato aquoso da polpa ou 1 mL extrato aquoso das folhas ou 1 mL extrato de sementes, para 9 mL de solução aquosa de AgNO₃ a 1mM. Foi realizada inspeção visual para a detecção da mudança de coloração e consequente formação das AgNPs. A formação foi posteriormente confirmada por leitura em espectroscopia de UV-Vis.

4.5.5 Síntese Das AgNPs A Partir Da *A. muricata* E Fotorredução

As AgNPs obtidas pelos extratos aquosos de *A. muricata*, conforme citado anteriormente, foram expostas à luz artificial, promovida pela lâmpada SOLAR ULTRA TROPIC® 4000K- LT 24WT5HQ 549NM (made in Germany for JBL), em um intervalo de tempo de 5 a 60 minutos, com avaliação visual e por espectroscopia de UV-Vis a cada 5 minutos.

4.5.6 Síntese Das AuNPs A Partir Do Extrato Aquoso Da Polpa Da *A. muricata*

As AuNPs foram sintetizadas como descrito por Turkevich *et al.* (1951), a partir de redução química do precursor metálico ácido tetracloroáurico (HAuCl_4), com algumas modificações.

Inicialmente, 2,5 mL do extrato aquoso da polpa de *A. muricata* foram transferidos para um béquer e a solução aquecida até 80°C, sob agitação a 700 rpm. Adicionou-se rapidamente 50 μL de solução 5 mM de HAuCl_4 . A solução foi mantida sob agitação e aquecimento por 5 minutos.

Decorrido esse tempo, o aquecimento do sistema foi suspenso e feita a avaliação visual e por espectroscopia de UV-Vis para verificar a formação das AuNPs.

4.5.7 Síntese Das AuNPs A Partir Do Citrato De Sódio

Uma solução padrão de citrato de sódio (10mg.mL⁻¹) foi preparada dissolvendo-se 1 g de citrato de sódio em balão volumétrico de 100 mL. Baseando-se no método desenvolvido por Turkevich *et al.* (1951), 2,5 mL da solução de citrato de sódio foram transferidos para um béquer, a solução foi aquecida até 80°C e sob agitação a 700 rpm. Adicionou-se rapidamente 50 μL de solução 5 mM de HAuCl_4 . A solução foi mantida sob agitação e aquecimento por aproximadamente 3 min. Decorrido esse tempo, o aquecimento do sistema foi suspenso e a formação das AuNPs avaliada.

4.5.8 Vetorização Das AgNPs E AuNPs Com Ácido Fólico

As AgNPs e AuNPs foram vetorizadas com ácido fólico. Foi preparada uma solução de ácido fólico a 1%. A quantia de ácido fólico a ser adicionada foi calculada na proporção de 1:1 de massa molar para a prata e ouro. O ácido fólico foi adicionado à suspensão de AgNPs e à suspensão de AuNPs. A vetorização somente foi realizada com as AgNPs e AuNPs obtidas do extrato aquoso da polpa da *A. muricata*.

4.5.9 Caracterização Morfológica Das AgNPs, AuNPs, AgNPsAF E AuNPsAF

4.5.9.1 Espectroscopia UV-Vis das AgNPs, AgNPsAF, AuNPs e AuNPsAF

A formação das AgNPs, AgNPsAF, AuNPs e AuNPsAF foi monitorada utilizando o Espectrofotômetro de UV-Vis (Shimadzu® UV Spectrophotometer, model UV-1800), na faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm.

As medidas foram realizadas nos diferentes intervalos de tempo em que as nanopartículas foram sintetizadas.

4.5.9.2 Espectrometria de difração a laser e potencial zeta

O tamanho das partículas e o potencial zeta foram determinados por espalhamento de luz dinâmico, após o preparo de uma suspensão das nanopartículas (1:10, v/v) em água ultrapura. As medidas, em triplicata, foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer Nano series ZS90 (MALVERN INSTRUMENTS®, Worcestershire, Reino Unido).

4.5.9.3 Avaliação morfológica e de superfície

A análise morfológica das nanopartículas produzidas foi realizada em microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo FEG (TESCAN®, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca). As amostras foram submetidas à metalização com ouro em metalizador IC-50 Ion Coater (SHIMADZU®, Quioto, Japão). Para a obtenção das eletromicrografias, foi empregada voltagem de aceleração de 15 kV e utilizado *software* específico (*Electron Optical Design*).

4.5.9.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada em Fourier (FTIR)

As nanopartículas foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2%, m/m), no equipamento

IR Prestige 21 (SHIMADZU®, Quito, Japão), na faixa de 4000-400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 scan.min^{-1} .

4.5.9.5 Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS)

A técnica de EDS foi realizada no microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo FEG (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.

4.5.9.6 Avaliação cromatográfica qualitativa do extrato aquoso da polpa da *A. muricata*

CG-EM Perkin possui uma alta eficiência, permitindo a definição e a quantificação claras de picos cromatográficos estreitos, oferecendo dados extremamente precisos, independentemente da quantidade de amostras que estejam sendo executadas. Modelo: Cromatógrafo a Gás: Clarus® SQ8C. Analisador de massa: Clarus® SQ8C / Perkin Elme.

Parâmetros de operação: Obtenção dos espectros em modo scan ES+, temperatura do gás de 350°C, vazão do gás: (L/h) 650, tensão capilar 3,5 kV e fragmentador 40 V. O intervalo de razão massa e carga (m/z) 150 a 1000.

Foi realizada a pesquisa de acetogeninas anonáceas no extrato aquoso da polpa da *A. muricata*.

4.6 ESTUDOS DE ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS

As amostras foram armazenadas sob refrigeração a 4°C e avaliadas por espectroscopia UV-Vis, a cada 30 dias. A avaliação da estabilidade para as AgNPs, AuNPs, AgNPsAF e AuNPsAF foi realizada até o período de 12 meses.

4.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS E DAS AgNPsPcl, AgNPsPsl, AgNPsFcl, AgNPsFsl, AgNPsScl, AgNPsSsl, AgNPsAF, AuNPs e AuNPsAF

A atividade antimicrobiana foi realizada com as AgNPs preparadas com o extrato aquoso da polpa, sementes e folhas de *A. muricata*, todas obtidas com a presença da luz artificial e também em sua ausência. As AgNPsAF, AuNPs e AuNPsAF testadas, foram obtidas com o extrato aquoso da polpa da *A. muricata*.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata utilizando bactérias relevantes na área da saúde, com potencial para causar patologias, usando cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* e as leveduras *Candida albicans*.

O teste de microdiluição em caldo foi realizado em placas de 96 poços de acordo com o protocolo M7-A6 do NCCLS (2004) adaptado, utilizando caldo BHI (brain heart infusion).

Foi utilizado inicialmente, 100 µL da suspensão de AgNPs e AgNPsAF e realizadas diluições seriadas, para obtenção de concentrações finais de 5.4 µg/mL; 2.7 µg/mL; 1.35 µg/mL; 0.675 µg/mL, levando em consideração a concentração de prata utilizada no preparo das nanopartículas. O mesmo procedimento foi utilizado para as AuNPs e AuNPsAF, e as concentrações finais foram: 9.8 µg/mL; 4.9 µg/mL; 2.45 µg/mL e 1.225 µg/mL, levando em consideração a concentração de ouro utilizada no preparo das nanopartículas.

Em seguida, foram adicionados a cada poço da microplaca, 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. Para confirmação de microrganismos viáveis em concentrações não inibitórias, foram utilizados 15 µL do corante TCC (2,3,5 cloreto de trifeniltetrazólio) a 1% e aguardado 30 minutos em estufa a 35°C. Dessa forma foi determinada a Concentração inibitória mínima (CIM).

A concentração bactericida mínima (CBM) foi obtida semeando alíquotas dos poços que não apresentaram coloração pelo corante em ágar Mueller-Hilton. Após a semeadura, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para visualização do crescimento ou não.

4.8 ATIVIDADE LARVICIDA DAS AgNPs PREPARADAS COM O EXTRATO AQUOSO DA POLPA DA *A. muricata*

4.8.1 Criação Dos Insetos

O experimento foi realizado no laboratório de Farmacognosia da Universidade Estadual de Ponta Grossa em Ponta Grossa–PR, em sala climatizada sob condições controladas de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e umidade ($74\% \pm 5\%$).

Os insetos conhecidos como traça-das-crucíferas, a *Plutella xylostella*, são provenientes do laboratório de farmacognosia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sendo as larvas colocadas em recipientes plásticos e alimentadas diariamente com couve até que atingissem a fase pupal.

Em seguida, as pupas foram transferidas para gaiolas de plástico transparente até que alcançassem a fase adulta. No interior de cada gaiola foram colocados discos de couves medindo aproximadamente 8 centímetros de diâmetro sob papel filtro umedecido com água destilada para que ocorra a oviposição das fêmeas, além de um algodão embebido com solução de mel diluído em água. Os discos foram trocados diariamente e colocados em recipientes plásticos até a eclosão das larvas.

4.8.2 Preparação Dos Discos Pelo Método De Imersão E Contato Direto

Os discos de *Brassica oleracea var. acephala* (L.) (couve), foram cortados medindo aproximadamente 8 centímetros e imersos em cada amostra de AgNPs contendo extrato puro e extrato diluído a 10% da polpa de *A. muricata*, extrato da polpa, AgNO_3 e água destilada, como controle negativo até o total preenchimento da folha. Na sequência, foram adicionadas 10 larvas de segundo ínstar em cada disco e colocados em placas de Petri sobre papel filtro umedecido com água destilada para então serem identificadas, vedadas e acondicionadas sob temperatura e umidade controladas.

No método do contato direto, 10 larvas de segundo ínstar foram colocadas em cada disco de couve e na sequência, cada larva recebeu, com o auxílio de uma pipeta semiautomática, 10 μL de cada amostra e dos controles. Os discos foram colocados em placas de Petri sobre papel filtro umedecido com água destilada, as

placas foram identificadas, vedadas e acondicionadas sob temperatura e umidade controladas.

4.8.3 Avaliação Das AgNPs De *A. muricata* Na Biologia de *P. xylostella* Pelo Método De Contato Direto

Para a avaliação das AgNPs contendo o extrato da polpa de *A. muricata*, as larvas foram avaliadas através de leituras, na qual a primeira leitura foi realizada 48 horas após a montagem do experimento e as demais leituras foram feitas diariamente até que as larvas atingissem a fase pupal ou morressem.

As larvas que atingiam a fase pupal eram então confinadas em tubos de ensaio vedados, para posterior avaliação da viabilidade da fase pupal até a fase adulta durante um período de 7 dias após a transformação da pupa.

Para o experimento foram utilizados as AgNPs contendo extrato puro e extrato diluído a 10% da polpa de *A. muricata*, extrato da polpa, AgNO_3 e água destilada, como controle negativo. O delineamento experimental utilizado para os tratamentos foi inteiramente casualizado, constituído de quatro repetições com 10 larvas em cada. O experimento foi realizado com o intuito de se analisar a possível atividade larvívora das AgNPs contendo o extrato do fruto de *A. muricata*, além de analisar a eficiência de um método diferente de aplicação, nesse caso, o de contato direto.

4.9 TESTES DE TOXICIDADE COM NÁUPLIOS DE *A. salina*

Para os testes de toxicidade frente a *A. salina* foi utilizada a metodologia de Meyer e colaboradores (1982) adaptada. Preparou-se uma solução salina, utilizando o sal marinho na concentração de 3,3%. Os ovos de *A. salina* foram colocados para eclodir na solução salina, por 48 horas, com aeração constante e temperatura controlada de 25 °C em um aquário para eclosão.

Após 48 horas da eclosão dos ovos, cinco larvas de *A. salina* foram transferidas com uma micropipeta para tubos de ensaio contendo a solução salina e amostras a serem testadas em diferentes concentrações 200 µl/mL, 100 µl/mL, 50 µl/mL e 25 µl/mL. O teste foi acompanhado do controle negativo e realizado em

triplicata. As amostras testadas foram: AgNPs com e sem ácido fólico, AuNPs com e sem ácido fólico, extrato da polpa da *A. muricata*, AgNO₃ e AuCl₄.

4.10 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

A atividade hemolítica foi realizada conforme Aslam *et al.* (2012). Para a obtenção da solução de hemácias foi preparada uma suspensão de sangue de carneiro desfibrinado Newprov[®] a 5% em tampão fosfato 7,4.

Posteriormente, foram preparadas as diluições das AgNPs, AgNPsAF, AuNPs, AuNPsAF e do extrato da polpa, em solução tampão 7,4. O controle positivo foi preparado com água destilada a 10% e o controle negativo somente a solução de eritrócitos a 5%.

As análises foram realizadas em triplicata, as amostras foram incubadas em banho-maria, durante 24 horas à 37°C. Após esse período, foram centrifugadas em centrífuga HERMLE[®] labortechnik GmbH, modelo Z 326 K, a 4000 rpm. A leitura do sobrenadante foi realizada no leitor de placas BIOTEK[®] Synergy H1hybrid reader, a 540 nm. As leituras das absorbâncias foram registradas e o percentual de hemólise (A%) calculado de acordo com Rasool *et al.* (2015):

$$A\% = \left(\frac{Abs_A - Abs_B}{Abs_C - Abs_B} \right) \times 100$$

Sendo: *Abs A* – absorbância da amostra; *Abs B* – absorbância do branco; *Abs C* – absorbância do controle.

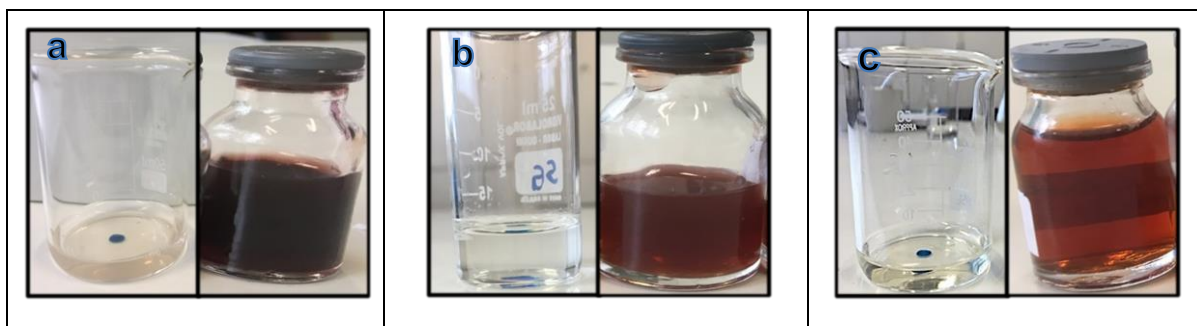
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE DAS AgNPs A PARTIR DA *A. muricata*

Foi possível observar a formação das AgNPs pelo método de síntese verde, com a redução da prata iônica pelos extratos das folhas, polpa e sementes de *A. muricata*, sem a utilização de nenhuma fonte de luz, conforme pode ser observado na Figura 7.

A formação das AgNPs, decorrente da reação de redução completa do AgNO_3 , foi confirmada pela mudança de coloração de amarelo claro para marrom. Pode-se observar uma diferença de tonalidade entre as amostras obtidas com o extrato da polpa (Figura 7a), das sementes (Figura 7b) e das folhas (Figura 7c). A mudança de coloração de amarelo claro para marrom ocorreu após 9 horas de reação.

Figura 7- (a) AgNPs preparadas com extrato das polpa de *A. muricata*; (b) AgNPs preparadas com extrato das sementes de *A. muricata*; (c) AgNPs preparadas com extrato das folhas de *A. muricata*



Fonte: a autora, 2018.

A mudança de cor observada na reação se deve à excitação da superfície de ressonância de *plasmon* (SPR) na redução do AgNO_3^+ . Essas Bandas SPR passam por mudança de coloração, de vermelha a azul, dependendo do tamanho e forma das nanopartículas (TANG *et al.*, 2013).

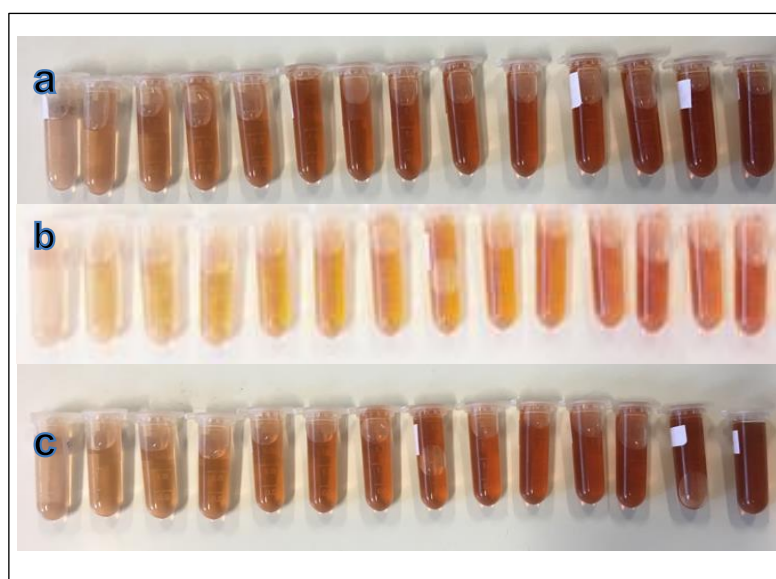
A nucleação das partículas e seu crescimento estão intimamente ligados ao agente redutor e as condições da reação. Agentes fortemente redutores como o borohidreto de sódio induzem a formação de centros de nucleação que crescem formando pequenos *clusters* cujo tamanho final depende do agente estabilizador. O efeito estabilizador é devido à carga elétrica conferida às nanopartículas pela

adsorção de íons dos sais utilizados. Podem ser observadas algumas desvantagens, como a existência de impurezas residuais derivadas da oxidação das espécies e dos íons dos sais empregados (SOLOMON *et al.*, 2007).

5.2 SÍNTESE DAS AgNPs A PARTIR DA *A. muricata* E FOTORREDUÇÃO

A aplicação da luz artificial na síntese das AgNPs se mostrou eficaz, reduzindo drasticamente o tempo para a formação das AgNPs. Pode-se observar na Figura 8 a mudança de coloração para marrom intenso após 60 minutos de exposição, tanto para as AgNPs sintetizadas com o extrato da polpa, quanto para os extratos da semente e da folha, o que demonstra uma grande otimização da síntese.

Figura 8 - (a) AgNPs preparadas com extrato das polpa de *A. muricata* com exposição à luz artificial; (b) AgNPs preparadas com extrato das sementes de *A. muricata* com exposição à luz artificial; (c) AgNPs preparadas com extrato das folhas de *A. muricata* com exposição à luz artificial



Fonte: a autora, 2018.

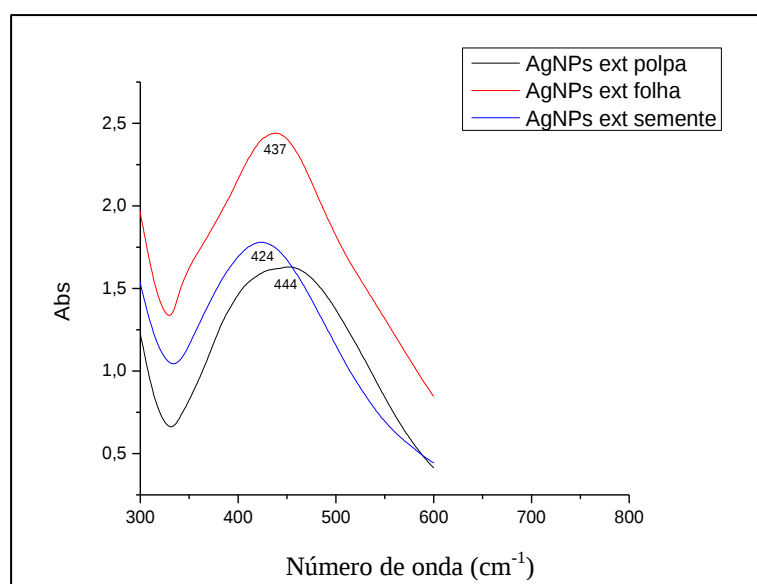
Os resultados da absorção UV-Visível mostraram diferenças na intensidade da cor, com intervalos de tempo aumentados e isso pode ser devido a produção das nanopartículas (SHRIVASTAVA, 2010).

5.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS AgNPs

5.3.1 Espectroscopia UV-Vis Das AgNPs

A Figura 9 apresenta os espectros de UV-Vis das AgNPs obtidas com o extrato da polpa, extrato das folhas e extrato das sementes, sem exposição à luz artificial, sendo os picos máximos de absorção observados em 444 nm, 437 nm e 424 nm, respectivamente.

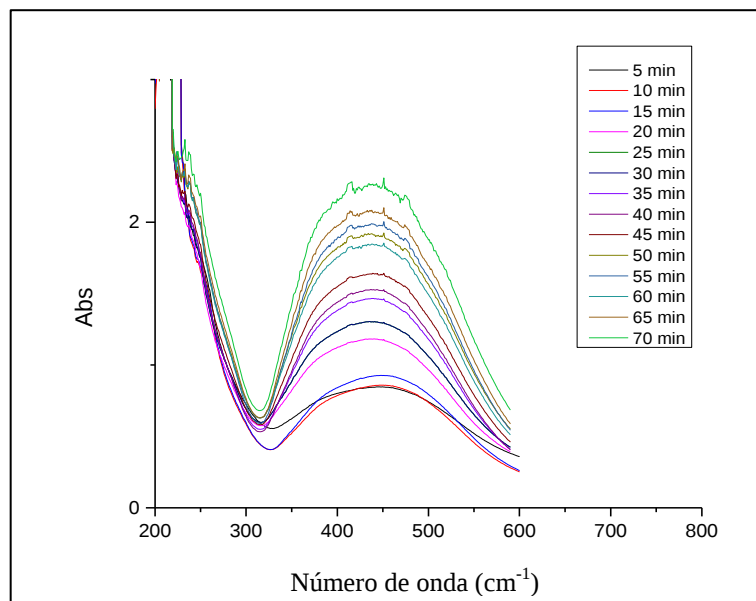
Figura 9– Espectros de UV-Vis das AgNPs preparadas com extrato da polpa, extrato das folhas e com o extrato das sementes de *A. muricata*, sem a exposição a luz artificial



Fonte: a autora, 2018.

Os espectros de UV-Vis obtidos após a exposição à luz artificial, nos tempos de 5 a 70 minutos estão apresentados nas Figuras 10, 11 e 12. As AgNPs preparadas com extrato da polpa de *A. muricata* expostas à luz artificial, apresentaram pico máximo em 428 nm, após 70 minutos exposição (Figura 10), sendo que o início da formação de AgNPs se inicia já aos 5 minutos de exposição.

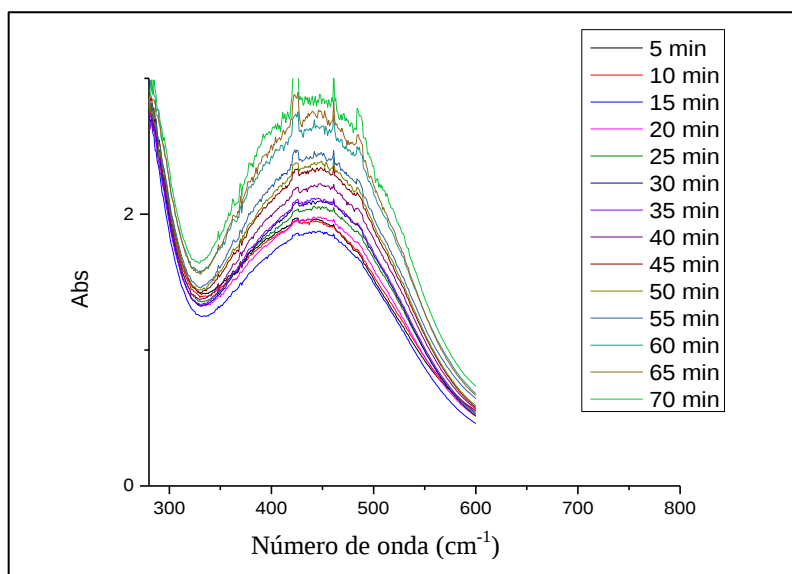
Figura 10 – Espectros de UV-Vis das AgNPs preparadas com extrato da polpa de *A. muricata* com exposição à luz artificial nos tempos de 5 a 70 minutos



Fonte: a autora, 2018.

As AgNPs preparadas com extrato das sementes de *A. muricata* expostas à luz artificial, apresentaram pico máximo em 442 nm, após 70 minutos de exposição (Figura 11), pode-se observar o início de formação de AgNPs em 5 minutos de exposição.

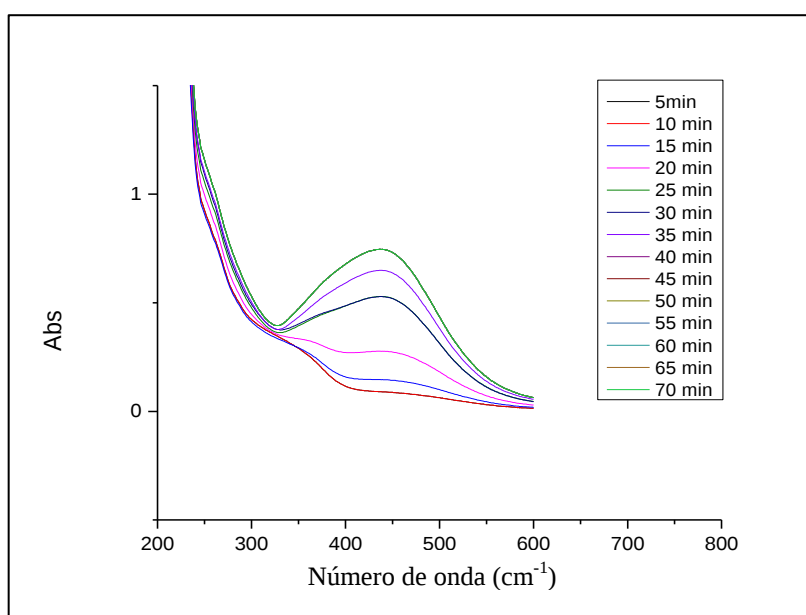
Figura 11 – Espectro de UV-Vis das AgNPs preparadas com extrato da semente de *A. muricata* com exposição à luz artificial nos tempos de 5 a 70 minutos



Fonte: a autora, 2018.

A Figura 12 mostra a formação das AgNPs obtidas pelo extrato das folhas de *A. muricata*. O pico máximo de absorção ocorreu em 435 nm em 70 minutos, entretanto, o início da reação deu a partir de 30 minutos, mais lenta que os demais extratos, o que pode ser indicativo de menor concentração de agentes redutores do que os demais extratos.

Figura 12 – Espectro de UV-Vis das AgNPs preparadas com extrato das folhas de *A. muricata* com exposição à luz artificial nos tempos de 5 a 70 minutos



Fonte: a autora, 2018.

A medida da espectroscopia no UV-Vis baseia-se no fenômeno de ressonância da banda plasmônica, observado em nanopartículas metálicas (NOGUEZ, 2007). É a excitação coletiva de elétrons na interface entre um condutor e um isolante (BERNI, 2010). A ressonância plasmônica de superfície para a prata ocorre em comprimento de onda entre 400 e 500 nm (ASHRAF, 2016), o que é condizente com os resultados obtidos neste trabalho, onde se observou a formação das AgNPs na faixa de 428 a 442 nm.

O tamanho e o formato das nanopartículas são os principais fatores que determinam a faixa espectral de absorção, isto é, onde ocorre a ressonância. Outros fatores que interferem são a densidade eletrônica, massa efetiva e a interação com seus estabilizadores e com o meio em que se encontram (SOLOMON *et al.*, 2007).

A presença da banda de plasmon, com comprimento de onda máximo de 440 nm, é indicativo da forma esférica das nanopartículas e de tamanho reduzido (CARDOSO *et al.*, 2014).

A correlação do tamanho das nanopartículas e o comprimento de onda é apresentada por Solomon *et al.* (2007). O comprimento de onda das nanopartículas de prata obtidas varia de 428 a 442 nm. A espectroscopia de 420 a 435 nm está relacionada com nanopartículas de 35 a 50 nm e de 438 a 450 nm, o tamanho deve estar entre 60 a 80 nm.

De acordo com Brause *et al.* (2002), o espectro de absorção óptica das nanopartículas metálicas desloca para picos de absorção maiores quando as partículas aumentam de tamanho.

Outro fator a ser analisado é o tamanho da banda de plasmon formado pelas AgNPs produzidas. Quanto maior o tamanho da partícula, a banda de plasmon torna-se mais larga e atinge picos de absorção maiores (MELO, 2012).

Os resultados obtidos neste trabalho indicam a formação de AgNPs com tamanhos homogêneos.

5.3.2 Determinação De Diâmetro Médio, Índice De Polidispersão, Potencial Zeta

A Tabela 1 mostra os resultados do diâmetro médio, potencial zeta, índice de polidispersão, bem como o tamanho das partículas obtido pelas imagens de FEG e o pico máximo de absorção das AgNPs na espectrometria de UV-Vis.

As nanopartículas que apresentaram o menor diâmetro médio e menor tamanho observado no FEG, foram as AgNPs obtidas com extrato de polpa de *A. muricata* sem exposição à luz artificial. Estas mesmas partículas apresentaram o melhor PDI, além de um potencial zeta de -29.6 mV, o que indica uma boa estabilidade.

Comparando com o tamanho médio das nanopartículas obtido pelas medidas realizadas nas fotomicrografias por FEG, pode-se observar diferença no diâmetro médio obtido por dispersão da luz, em especial nas AgNPs obtidas com o extrato de folha de *A. muricata* com exposição à luz artificial e nas AgNPs obtidas com o extrato da semente da *A. muricata* sem exposição à luz, o que se deve, provavelmente, à presença de aglomerados de AgNPs que determinam uma

distorção nos valores na análise por dispersão da luz (Zetasizer), já que esta não expressa o tamanho da nanopartícula isolada.

Tabela 1 - Diâmetro hidrodinâmico (Z-average), Potencial Zeta (PZ), índice de polidispersão (PDI) e Diâmetro FEG e UV da AgNPs preparadas com extrato da polpa, das folhas e das sementes da *A. muricata* com e sem exposição à luz artificial

	DM (nm±DP)	PZ (mV±DP)	PDI	FEG(nm±DP)
AgNPsPcl	87 ± 10.74	-30.3 ± 8.5	0.49 ±0.17	48 ±8.7
AgNPsPsl	51.5 ± 14.56	-29.6 ± 5.3	0.25 ±0.18	31 ±0.54
AgNPsFcl	194 ± 17.32	-33.5 ± 5.7	0.7 ±0.15	46 ±4.1
AgNPsFsl	62 ± 19.25	-27.2 ± 0.8	0.6 ±0.05	60 ±2.0
AgNPsScl	60 ± 18.34	-38.2 ± 2.5	0.29 ±0.24	54 ±1.52
AgNPsSsl	205 ± 28.31	-28 ± 4.9	0.56 ±0.10	47 ±1.53

Pcl- extrato de polpa de *A. muricata* e exposição à luz; Psl- extrato de polpa de *A. muricata* sem exposição à luz; Fcl - extrato de folha de *A. muricata* e exposição à luz; Fsl - extrato de folha de *A. muricata* sem exposição à luz; Scl - extrato de semente de *A. muricata* com exposição à luz; Ssl - extrato de semente de *A. muricata* sem exposição à luz. AgNPs - nanopartículas de prata.

Fonte: a autora, 2018.

No presente estudo, o PZ da AgNPs produzidas foi negativo e variou entre 27 e 38 mV, o que indica que as partículas tendem a ser estáveis. De acordo com Neves *et al.* (2013), valores de potencial zeta próximo a 30 mV apresentam maior estabilidade, enquanto quando os valores se encontram mais próximo de 5 mV, ocorre a diminuição da repulsão eletrostática entre as partículas e maior agregação, consequentemente, as partículas tendem a ser menos estáveis.

O estudo realizado por Paosen *et al.* (2017), utilizando extratos de plantas na preparação de AgNPs, apresentou valores de PZ negativo em torno de 27 mV, demonstrando estabilidade das AgNPs.

Avaliando a carga de superfície das AgNPs, pode-se sugerir que a nucleação da prata reduzida (Ag^0) ocorreu por biorredução. Assim, é possível que a Ag^0 esteja no interior das partículas, enquanto que componentes dos extratos estejam na periferia das AgNPs. Isso porque o potencial Zeta das AgNPs apresentou carga negativa em todas as concentrações de extrato (AKHTAR; PANWAR; YUN, 2013; MITTAL; CHRISTI; BANERJEE, 2013).

As AgNPs preparadas com extrato da polpa de *A. muricata* sem exposição à luz artificial apresentou o melhor PDI, mostrando que essas AgNPs se apresentam

monodispersas, da mesma forma que as AgNPs preparadas com extrato das sementes de *A. muricata* com exposição à luz artificial. Em contrapartida, as AgNPs preparadas com extrato das folhas de *A. muricata* com ou sem exposição à luz artificial, apresentaram um PDI acima de 0,5, o que sugere a heterogeneidade das partículas formadas.

O pH da suspensão de AgNPs obtidas com o extrato da polpa e das AgNPs obtidas com o extrato da semente de *A. muricata*, foi de 5, enquanto o pH das AgNPs preparadas com o extrato das folhas foi 6. Não houve diferença de pH das suspensões de AgNPs obtidas por fotorredução.

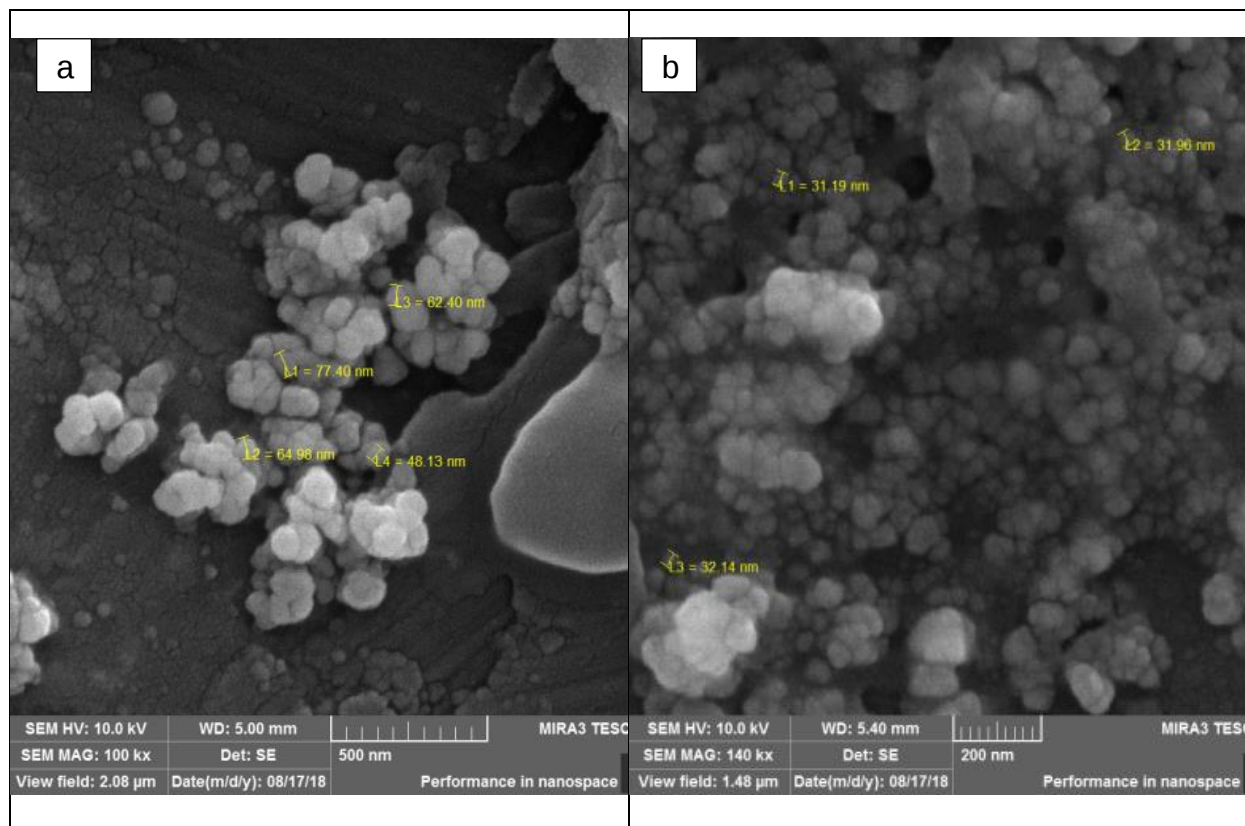
O pH da solução é levemente ácido, efeito da hidrólise do AgNO_3 , em baixa concentração e grande volume. Estudos mostram a partir de imagens de microscopia de transmissão que as nanopartículas obtidas em meio mais ácido são menores do que as obtidas em meio alcalino (CHAUDHURI; PARIA, 2019).

5.3.3 Avaliação Morfológica E De Superfície Por Microscópio Eletrônico De Varredura Por Emissão De Campo FEG

Todas as AgNPs produzidas apresentaram formato esférico, o que está de acordo com os resultados da espectroscopia de UV-Vis das AgNPs, onde os picos de absorção foram entre 424 e 444 nm, indicando a formação de AgNPs esféricas.

As AgNPs obtidas com o extrato da polpa de *A. muricata* e com a exposição à luz artificial, apresentaram tamanho maior, 60 nm, comparadas às AgNPs obtidas com extrato da polpa de *A. muricata* sem a exposição à luz artificial, onde o tamanho médio foi de 31 nm. Na imagem é possível observar, ainda, AgNPs aglomeradas (Figura 13).

Figura 13 - Fotomicrografias das (a) AgNPs sintetizadas a partir do extrato da polpa de *A. muricata* com exposição à luz artificial e de (b) AgNPs obtidas com extrato da polpa de *A. muricata* sem a exposição à luz artificial

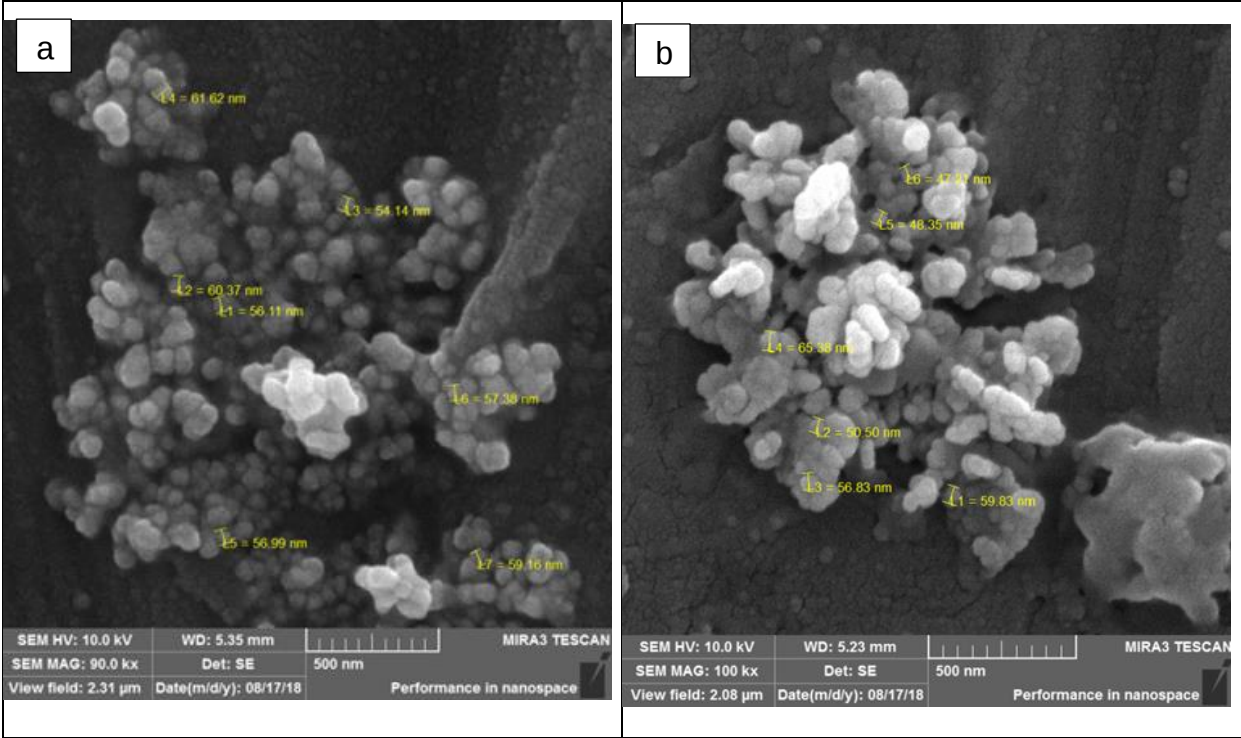


Fonte: a autora, 2018.

As AgNPs obtidas com extrato das sementes de *A. muricata*, com e sem exposição à luz artificial, apresentaram tamanho semelhante. A média de tamanho para as preparações que foram expostas a luz artificial foi de 54 nm e para as AgNPs que não foram expostas a luz artificial foi de 47 nm. Também podem ser observadas AgNPs aglomeradas (Figura 14).

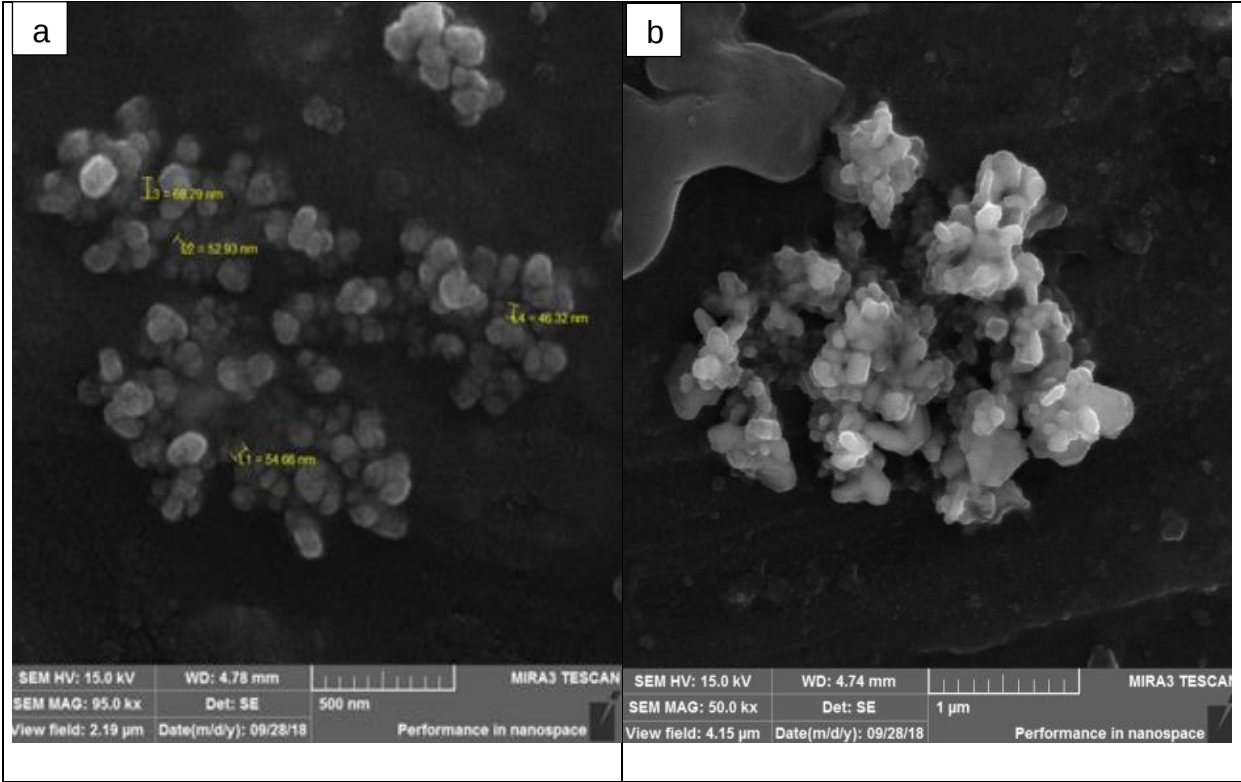
De forma similar, as AgNPs obtidas com extrato das folhas de *A. muricata*, com e sem exposição à luz artificial, apresentaram média de 54 nm e aglomerados de nanopartículas (Figura 15).

Figura 14 - Fotomicrografias das (a) AgNPs sintetizadas a partir do extrato das sementes de *A. muricata* com exposição à luz artificial e de (b) AgNPs obtidas com extrato das sementes de *A. muricata* sem a exposição à luz artificial.



Fonte: a autora, 2018.

Figura 15 - Fotomicrografias das (a) AgNPs sintetizadas a partir do extrato das folhas de *A. muricata* com exposição à luz artificial e de (b) AgNPs obtidas com extrato das folhas de *A. muricata* sem a exposição à luz artificial.



Fonte: a autora, 2018.

Haldar *et al.* (2013), utilizando extrato da polpa de *Pinus roxburghii* Sarg., obteve AgNPs com características morfológicas e tamanho médio de 20 a 53 nm semelhantes às obtidas no presente trabalho.

5.3.4 Espectroscopia De Infravermelho Por Transformada em Fourier (FTIR)

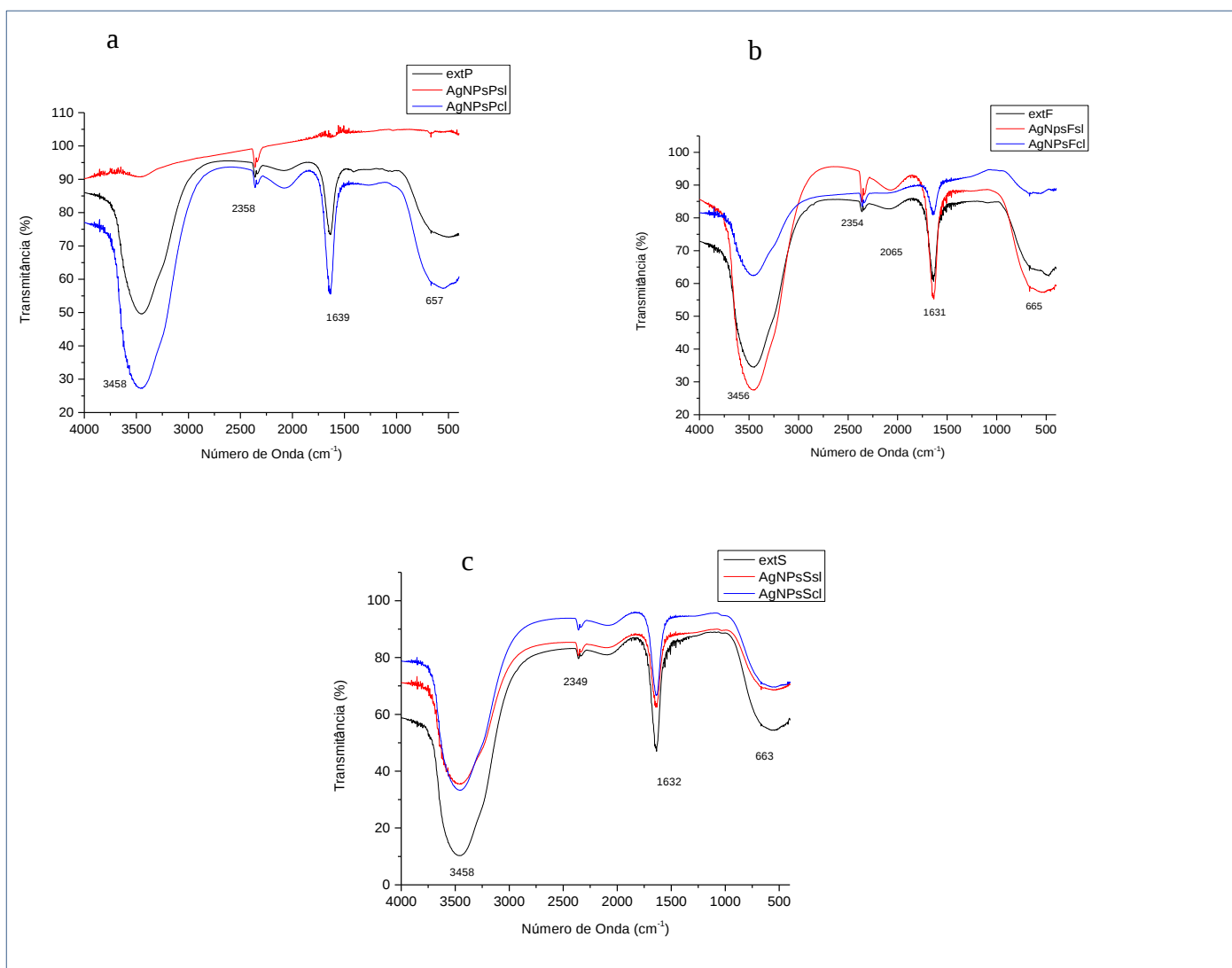
A análise do FTIR permite caracterizar os grupos funcionais envolvidos na síntese de AgNPs.

Na Figura 16 pode-se observar bandas em 3457cm^{-1} , correspondentes aos grupos (O-H) provenientes dos fenóis e alcoóis, presentes nos flavonóides, os quais aparecem na faixa de 3500 cm^{-1} e 3200 cm^{-1} . Uma banda na região de 1646 cm^{-1} , referente ao estiramento do grupo funcional (C=O) ligado aos anéis aromáticos das acetogeninas, observados na faixa de $1680\text{ a }1620\text{ cm}^{-1}$ (PRETSCH; BÜHLMANN; AFFOLTER, 2009).

Os resultados do presente estudo foram semelhantes aos encontrados por Dubey; Lahtinenb e Sillanpa (2010), que realizou a preparação de nanopartículas de prata e ouro utilizando o extrato de planta *Tanacetum vulgare* L.

Esses resultados indicam que o grupo carbonila das acetogeninas está adsorvido fortemente aos metais, indicando a interação com a Ag, formando uma camada protetora ao seu redor. Isto comprova a presença de polifenóis, que confere energia livre para reduzir os íons de prata para AgNPs (SUKIRTHA, 2012).

Figura 16 - Espectros de FTIR: a) Extrato polpa, AgNPsPsl, AgNPsPcl; b) Extrato folhas, AgNPsFsl, AgNPsFcl c) Extrato sementes, AgNPsSsl, SgNPsScl



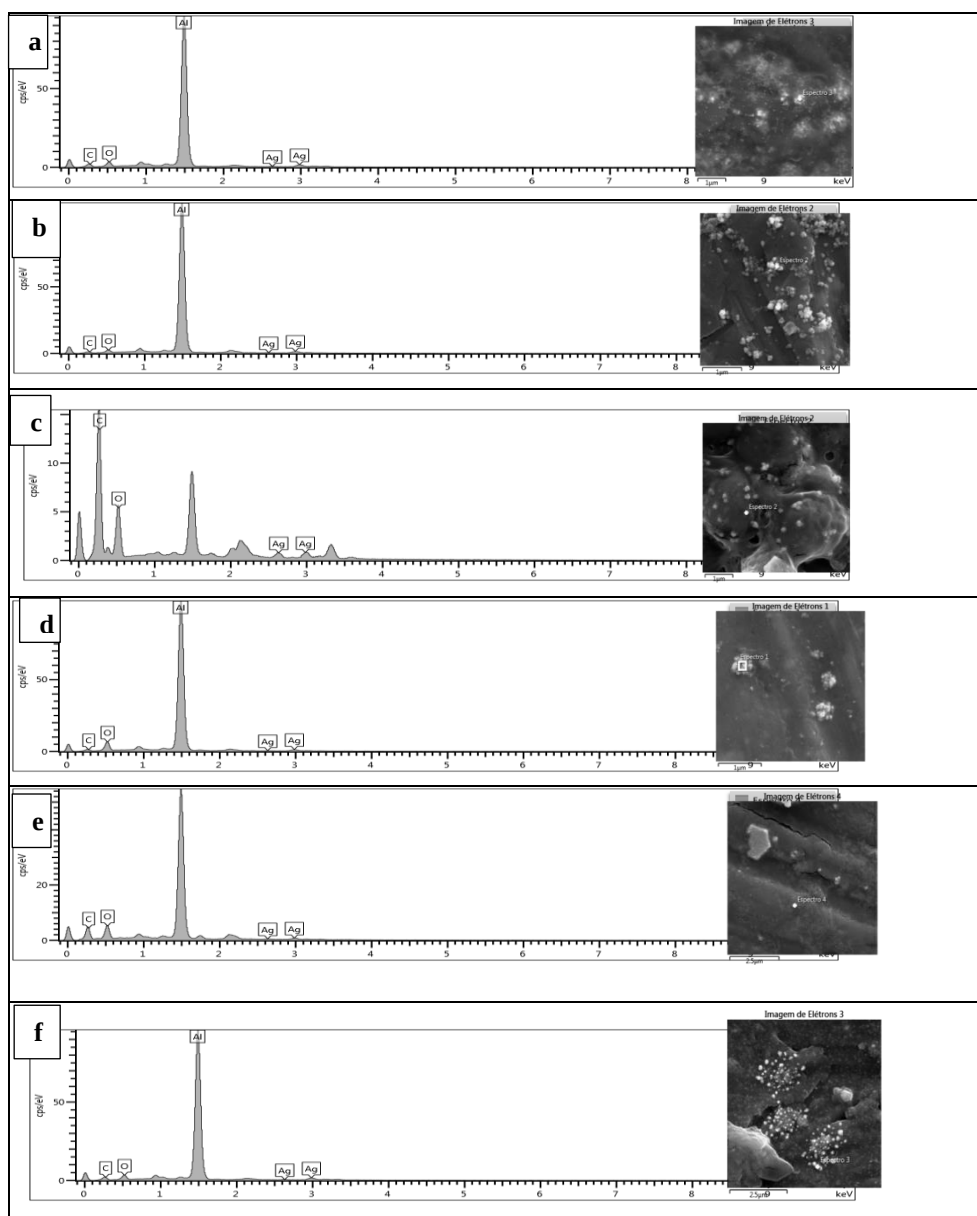
Fonte: a autora, 2018.

5.3.5 Espectroscopia De Raios X Por Dispersão De Energia (EDS)

O espectro dispersivo de energia revelou a presença de prata como elemento da preparação. Todas as amostras de AgNPs analisadas mostram um pico de absorção óptica a 3 keV devido à ressonância plasmônica da superfície, comprovando a presença do elemento Ag.

Na Figura 17, no entanto, outros elementos aparecem, devido a composição do extrato, como carbono e oxigênio. O Alumínio (Al) é o elemento que apresenta forte pico em 1,5 keV, indicativo da composição do *stub*.

Figura 17 - Espectros EDS das AgNPs: (a) AgNPs obtida com o extrato da polpa de *A. muricata* com exposição à luz artificial, (b) AgNPs obtida com o extrato da polpa de *A. muricata* sem exposição à luz artificial; (c) AgNPs obtida com o extrato das folhas de *A. muricata* com exposição à luz artificial; (d) AgNPs obtida com o extrato das folhas de *A. muricata* sem exposição à luz artificial; (e) AgNPs obtida com o extrato das sementes de *A. muricata* com exposição à luz artificial; (f) AgNPs obtida com o extrato das sementes de *A. muricata* sem exposição à luz artificial.



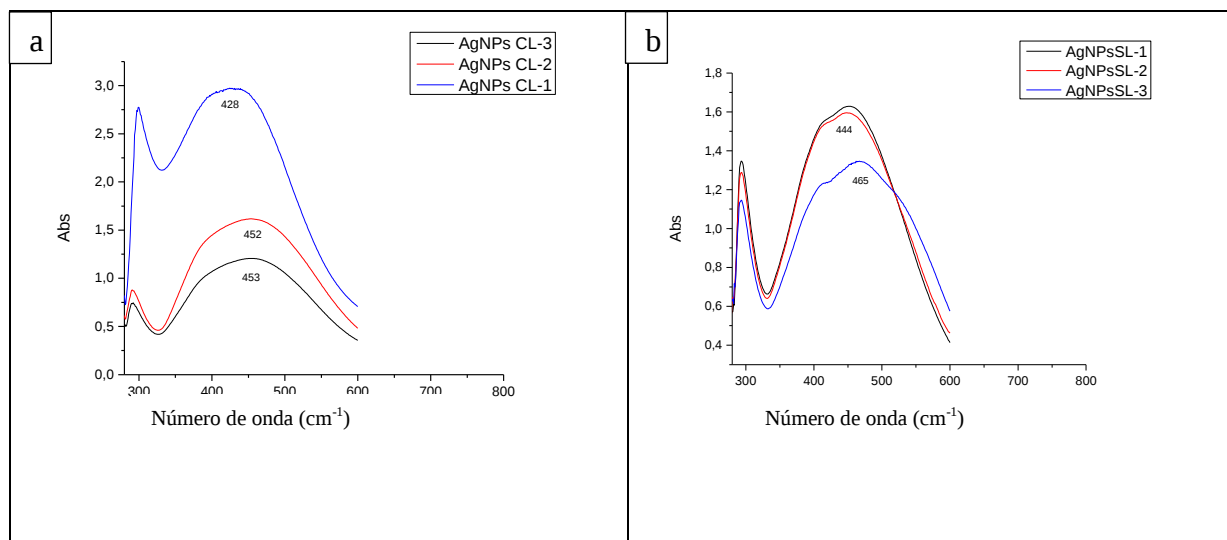
Fonte: a autora, 2018.

5.4 ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS AgNPs

A avaliação da estabilidade (Figura 18) mostrou que as AgNPs obtidas com extrato de polpa de *A. muricata* sem exposição à luz artificial (Figura 18b) e as AgNPs obtidas com extrato de polpa de *A. muricata* com exposição à luz artificial (Figura 18a), permaneceram estáveis, o que pode ser observado pela manutenção do pico de absorção na mesma faixa de comprimento de onda no espectro de UV-Vis, durante o período analisado. Este resultado é indicativo de que as AgNPs produzidas com extrato de polpa de *A. muricata* sem exposição à luz artificial e com exposição à luz artificial, mantiveram o tamanho e a homogeneidade das partículas.

Entretanto, observa-se que as AgNPs produzidas com extrato de polpa de *A. muricata* com exposição à luz artificial tiveram uma redução no pico de absorção nos dois intervalos de tempo avaliados, o que pode ser devido à uma redução na concentração de nanopartículas presentes na amostra.

Figura 18 – (a) Espectros UV-Vis das AgNPs obtidas a partir do extrato da polpa da *A. muricata*, com a exposição à luz artificial e (b) espectros das AgNPs obtidas com o extrato da polpa da *A. muricata* sem a exposição da luz artificial.



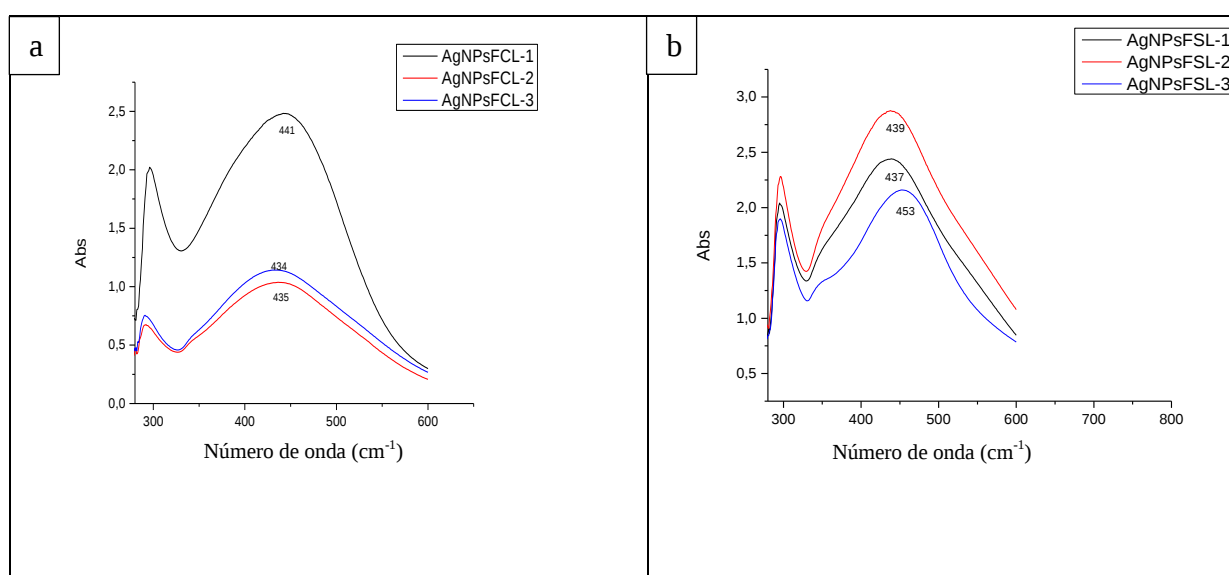
1 - dia da preparação; 2 - 90 dias de refrigeração; 3 - 1 ano de refrigeração.
Fonte: a autora, 2019.

De forma similar, podemos observar na Figura 19, que as AgNPs produzidas com extrato de folhas de *A. muricata* sem exposição à luz artificial (Figura 19b), mantiveram o pico de absorção na mesma faixa, nos períodos avaliados, entretanto, observa-se uma grande redução no pico de absorção das AgNPs produzidas com

extrato de folhas de *A. muricata* com exposição à luz artificial (Figura 19a), após 90 dias e após 1 ano. Isso indica uma redução no número de partículas na amostra.

Paralelamente, também é possível visualizar um alargamento dos picos nesses espectros, o que sugere que a distribuição das AgNPs produzidas com extrato de folhas de *A. muricata* com exposição à luz artificial, sofreram aglomeração, tornando a amostra heterogênea.

Figura 19 – (a) Espectros UV-Vis das AgNPs obtidas a partir do extrato das folhas da *A. muricata*, com a exposição à luz artificial e (b) espectros das AgNPs obtidas com o extrato das folhas da *A. muricata* sem a exposição da luz artificial



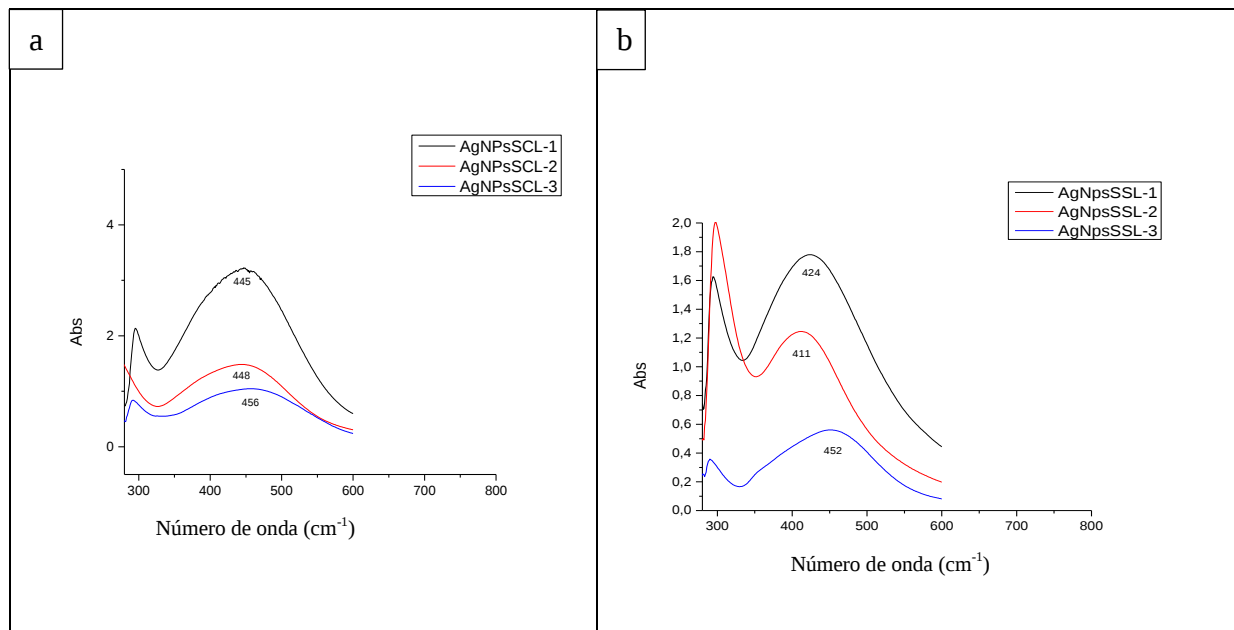
1 - dia da preparação; 2 - 90 dias de refrigeração; 3 - 1 ano de refrigeração.
Fonte: a autora, 2019.

As AgNPs produzidas com extrato de sementes de *A. muricata* sem exposição à luz artificial (Figura 20b) manteve o pico de absorção no UV-Vis na mesma faixa de absorção, mas apresentou uma redução na intensidade do pico, indicando redução das nanopartículas na preparação após 90 dias de avaliação. Após o período de 1 ano pode se observar que houve um deslocamento do pico de absorção de 424 para 452 nm, este fenômeno ocorre quando há um aumento no tamanho das nanopartículas.

Também 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. As AgNPs produzidas com extrato de sementes de *A. muricata* com exposição à luz artificial não apresentaram

grande variação na faixa de absorção do UV-Vis, entretanto fica evidente a redução da intensidade do pico de absorção nos dois períodos analisados (Figura 20a).

Figura 20– (a) Espectros UV-Vis das AgNPs obtidas a partir do extrato das sementes da *A. muricata* com a exposição à luz artificial e (b) espectros das AgNPs obtidas com o extrato das sementes da *A. muricata* sem a exposição da luz artificial.



1 - dia da preparação; 2 - 90 dias de refrigeração; 3 - 1 ano de refrigeração.
Fonte: a autora, 2019.

A presença da banda de *plasmon*, com comprimento de onda máximo de 440 nm, é indicativo do formato esférico das nanopartículas e de tamanho reduzido (CARDOSO *et al.*, 2014). Quanto maior o tamanho da partícula, a banda de plasmon torna-se mais larga e atinge comprimentos de onda maiores (MELO, 2012).

Simultaneamente, os picos de absorbância podem ser usados para prever o tamanho e a estabilidade das AgNPs sintetizadas.

Achados semelhantes também foram observados usando extrato das folhas de *Bambusa arundinacea* como agente redutor na síntese de AgNPs. A utilização de extratos confere estabilidade em algumas preparações (KALAIARASI, 2015).

A diminuição da intensidade de absorção refere-se a uma diminuição na concentração de nanopartículas, que podem ter sofrido degradação no período de avaliação da estabilidade. A análise de espectroscopia UV-Vis mostrou que a exposição à luz artificial foi determinante para desencadear este fenômeno, como pode ser observado nas Figuras 18a, 19a e 20a.

Dentre todas as amostras, as AgNPsPsl apresentaram melhor estabilidade no período estudado.

5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS E DAS AgNPsPcl, AgNPsPsl, AgNPsFcl, AgNPsFsl, AgNPsScl, AgNPsSsl

A Tabela 2 mostra os resultados da atividade bacteriostática e fungistática dos extratos da polpa, sementes e folhas da *A. muricata*. O extrato das folhas da *A. muricata* não apresentou atividade bacteriostática contra nenhuma das cepas bacterianas testadas. Apenas apresentou ação fungistática contra a *C. albicans*.

Já o extrato da polpa e da semente de *A. muricata* apresentou atividade bacteriostática contra as cepas de *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, entretanto não apresentou atividade bacteriostática contra a *P. aeruginosa*.

Os extratos de semente, polpa e folhas de *A. muricata* não apresentaram atividade bactericida.

Tabela 2 - Atividade dos extratos de *A. muricata* na inibição do crescimento contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras

Microrganismos	Extrato polpa (µg/mL)	Extrato folha (µg/mL)	Extrato semente (µg/mL)
<i>S. aureus</i>	100	NA	100
<i>E. faecalis</i>	100	NA	100
<i>E. coli</i>	100	NA	100
<i>P. aeruginosa</i>	NA	NA	NA
<i>P. mirabilis</i>	100	NA	100
<i>K. pneumoniae</i>	100	NA	100
<i>C. Albicans</i>	100	100	100

NA – não apresenta
Fonte: a autora, 2018.

Todas as AgNPs produzidas, com extrato da polpa, das folhas e das sementes, com e sem exposição à luz artificial, apresentaram atividade bacteriostática na concentração de 5.4 µg/mL, contra as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus*

mirabilis e *Pseudomonas aeruginosa* e ação fungistática contra *Candida albicans* (Tabela 3)

Tabela 3 - Atividade das AgNPs na inibição do crescimento contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras.

Microrganismos	AgNPs Pcl (µg/mL)	AgNPs Psl (µg/mL)	AgNPs Fcl (µg/mL)	AgNPs Fsl (µg/mL)	AgNPs Scl (µg/mL)	AgNPs Ssl (µg/mL)
<i>S. aureus</i>	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4
<i>E. faecalis</i>	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4
<i>E. coli</i>	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4
<i>P. aeruginosa</i>	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4
<i>P. mirabilis</i>	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4
<i>K. pneumoniae</i>	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4
<i>C. albicans</i>	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4

Pcl- extrato de polpa de *A. muricata* e exposição à luz ; Psl- extrato de polpa de *A. muricata* sem exposição à luz; Fcl - extrato de folha de *A. muricata* e exposição à luz; Fsl - extrato de folha de *A. muricata* sem exposição à luz; Scl - extrato de semente de *A. muricata* com exposição à luz; Ssl - extrato de semente de *A. muricata* sem exposição à luz. AgNPs - nanopartículas de prata.
Fonte: a autora, 2018.

Na avaliação da atividade bactericida (Tabela 4), as AgNPs obtidas com o extrato da polpa da *A. muricata* com exposição à luz artificial, foram efetivas contra *K.pneumoniae*, *E.coli* e *P. mirabilis*, já as obtidas sem a presença da luz artificial, apresentaram atividade bactericida somente contra *K. pneumoniae*, todas na concentração de 5.4 µg/mL,

As AgNPs obtidas com extrato das folhas da *A. muricata* com exposição à luz artificial apresentaram apenas atividade fungicida contra a *C. albicans* e as AgNPs obtidas com o extrato das folhas de *A. muricata* sem exposição à luz artificial, apresentaram atividade bactericida contra *K. pneumoniae* e *E. coli*, todas na concentração de 5.4 µg/mL

As AgNPs obtidas com o extrato das sementes de *A. muricata* com exposição à luz artificial não apresentaram atividade bactericida, já as obtidas sem a exposição à luz artificial, apresentaram atividade bactericida contra *S. aureus*, na concentração de 5.4 µg/mL,.

Estes resultados demonstraram maior eficácia das AgNPs obtidas com os extratos de *A. muricata* contra bactérias e fungos, comparadas ao extrato puro.

Tabela 4 - Atividade bactericida e fungicida das AgNPs contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras.

Microrganismos	AgNPs Pcl (µg/mL)	AgNPs Psl (µg/mL)	AgNPs Fcl (µg/mL)	AgNPs Fsl (µg/mL)	AgNPs Scl (µg/mL)	AgNPs Ssl (µg/mL)
<i>S. aureus</i>	NA	NA	NA	NA	NA	5.4
<i>E. faecalis</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>E. coli</i>	5.4	NA	NA	5.4	NA	NA
<i>P. aeruginosa</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>P. mirabilis</i>	5.4	NA	NA	NA	NA	NA
<i>K. pneumoniae</i>	5.4	5.4	NA	5.4	NA	NA
<i>C. albicans</i>	NA	NA	5.4	NA	NA	NA

Pcl- extrato de polpa de *A. muricata* e exposição à luz; Psl- extrato de polpa de *A. muricata* sem exposição à luz; Fcl - extrato de folha de *A. muricata* e exposição à luz; Fsl - extrato de folha de *A. muricata* sem exposição à luz; Scl - extrato de semente de *A. muricata* com exposição à luz; Ssl - extrato de semente de *A. muricata* sem exposição à luz; AgNPs - nanopartículas de prata; NA - não apresenta; A - apresenta.

Fonte: a autora, 2018.

O estudo de Vieira *et al.* (2010) demonstrou atividade antibacteriana do extrato de folhas de *A. muricata* preparado com etanol e metanol contra *S. aureus*, já o extrato aquoso não apresentou atividade. O mesmo estudo apresentou potenciação da estreptomicina mais o extrato etanólico de *A. muricata* contra cepas multirresistentes de *Escherichia coli* e *S. aureus*.

O estudo de Lima *et al.* (2006), utilizando extrato aquoso de graviola apresentou efeito bactericida frente a *S. aureus* e *V. cholerae*, entretanto, os extratos etanólicos dessa planta não mostraram atividade antibacteriana. A bioatividade de extratos de graviola à base de água pode estar relacionada à estrutura química das substâncias ativas.

Em uma investigação das propriedades bactericidas de oito espécies de anonáceas, Takahashi *et al.* (2006), isolaram e confirmaram a capacidade do ácido traquilobanóico em inibir *B. subtilis* e *S. aureus*.

Após o desenvolvimento das AgNPs com os extratos da polpa, folhas e sementes da *A. muricata*, as AgNPs escolhida, para o desenvolvimento das AuNPs e posterior vetorização foram as AgNPs preparadas com o extrato aquoso da polpa da *A. muricata*, sob as condições de controle da luz artificial, pois apresentaram ótima estabilidade e atividade antimicrobiana.

5.6 ATIVIDADE LARVICIDA DO EXTRATO AQUOSO DA POLPA DE *A. muricata* E DAS AgNPsPcl

O extrato aquoso da polpa da *A. muricata* apresentou mortalidade de 42.5% das larvas *P. xylostella*. Já as AgNPs obtidas com o extrato puro da polpa da *A. muricata* e exposição a luz artificial, 20% de mortalidade e as AgNPs obtidas com o extrato da polpa de *A. muricata* diluído a 10% e com exposição a luz artificial obteve uma mortalidade de 37.5% no método de imersão, em que as larvas se alimentaram dos discos de couve com as nanopartículas de prata, AgNO₃ e controle negativo.

No método de contato direto, na aplicação tópica diretamente na larva, o extrato da polpa apresentou 15% de mortalidade, AgNPs do extrato da polpa, 10% e AgNPs extrato diluído 25% (Tabela 5).

Tabela 5 - Percentual de mortalidade da *P. xylostella* frente aos extratos e AgNPs da *A. muricata*

	Ação por Imersão %	Ação por Contato direto %
Extrato polpa <i>A. muricata</i>	42.5	15
AgNPs extrato polpa <i>A. muricata</i>	20	10
AgNPs extrato polpa <i>A. muricata</i> 10%	37.5	25
Controle -	15	30
AgNO ₃	32	25

Fonte: SOUZA; NEVES, 2019.

As AgNPs preparadas com o extrato da polpa da *A. muricata* apresentou mortalidade semelhante ao controle negativo, a água destilada.

Na avaliação da ação por contato direto, as AgNPs obtidas pelo extrato puro e diluído apresentaram ação igual ou menor a do controle negativo.

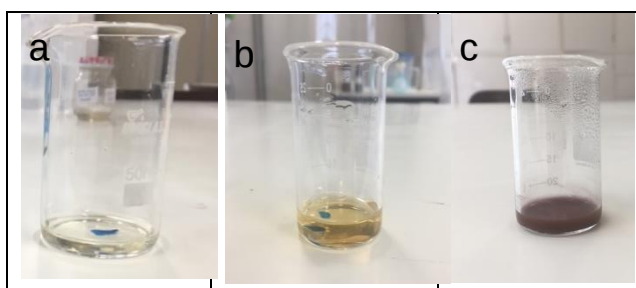
Isso comprova que a preparação das AgNPs obtidas pelo método de síntese verde, não apresentaram atividade larvicida nos dois métodos testados.

5.7 SÍNTESE DAS AuNPs A PARTIR DO EXTRATO AQUOSO DA POLPA DA *A. muricata*

O extrato da polpa de *A. muricata* se mostrou eficiente na redução do cloreto áurico à AuNPs.

Na Figura 21 pode-se observar a mudança de cor do extrato da polpa de *A. muricata*, da coloração amarelo clara (a), para coloração amarelo mais intenso (b), logo após o início da reação do extrato da polpa com o cloreto áurico, até atingir a coloração violácea (c), após 5 minutos de reação com aquecimento, demonstrando a formação das AuNPs e a influência da temperatura na reação. O escurecimento da solução, com aumento da temperatura, indica aumento de tamanho das partículas, em decorrência da agregação (GAN *et al.*, 2012).

Figura 21– Extrato da polpa *A. muricata* (a); Início da formação de AuNPs (b); AuNPs após 5 minutos de aquecimento.



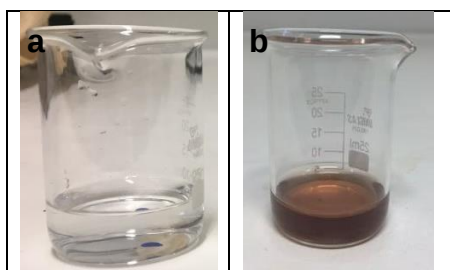
Fonte: a autora, 2019.

5.8 SÍNTESE DAS AuNPs A PARTIR DO CITRATO DE SÓDIO

A Figura 22 apresenta a formação das AuNPs a partir da solução de citrato a 1%, com a sua síntese realizada em 3 minutos. Pode-se observar a alteração da cor transparente da solução de citrato de sódio a 1% para a coloração violácea, característica das AuNPs.

A mudança da cor para tons que variam de vermelho a roxo é uma propriedade característica das nanopartículas de ouro e confirma a sua formação. Isto ocorre devido à vibração dos plasmons de superfície (SHAMELI *et al.*, 2012).

Figura 22– Solução de citrato de sódio a 1% (a); AuNPs após 3 minutos de aquecimento (b);



Fonte: a autora, 2019.

A síntese das AuNPs a partir do citrato de sódio a 1% foi realizada, para comparar sua estabilidade e atividade antimicrobiana com as AuNPs preparadas somente com o extrato aquoso da polpa da *A. muricata*, através do método de síntese verde.

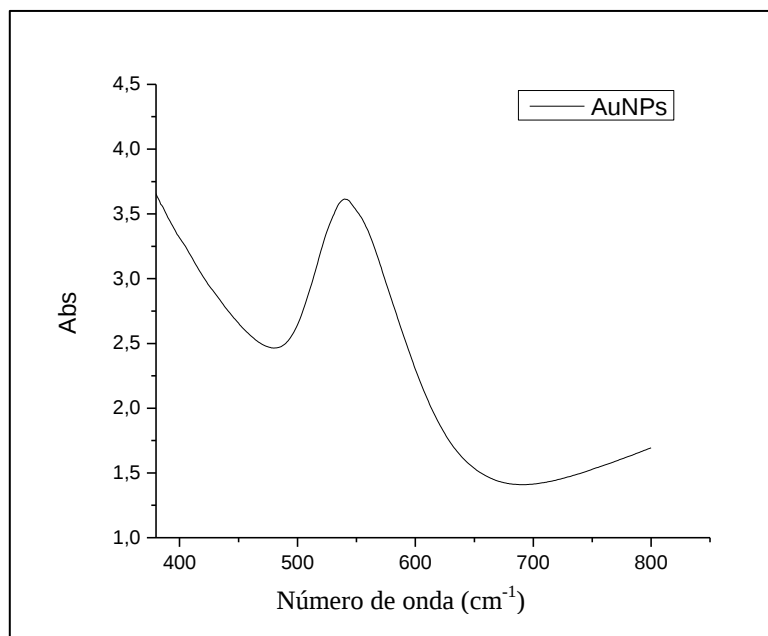
5.9 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS AuNPs

5.9.1 Espectroscopia De UV-Vis Das AuNPs

O espectro de UV-Vis, representado na Figura 23, mostra o pico máximo de absorção das AuNPs em 540 nm, o que é um resultado condizente com as medidas esperadas para AuNPs, que se encontram nas faixas de comprimentos de onda de 500-550 nm (SHANKAR *et al.*, 2004).

A presença de um único pico de absorção centrado nesta faixa de absorção revela a presença de partículas com tamanho superior a 20 nm e indica que ocorre a formação de partículas com tamanho homogêneo (YANG *et al.*, 2007).

Figura 23 - Espectro UV-Vis das AuNPs, obtidas com o extrato da polpa da *A. muricata*.

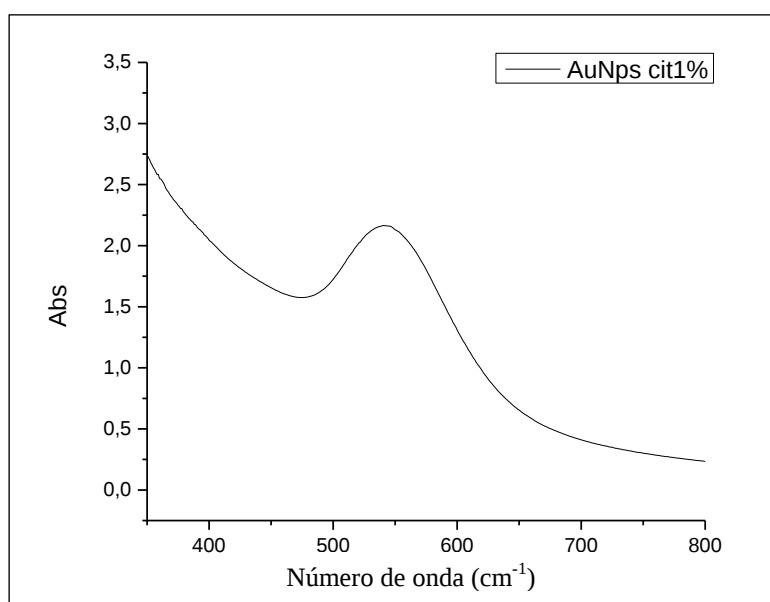


Fonte: a autora, 2019.

O espectro de UV-Vis, na Figura 24, apresenta um pico máximo em 540 nm das AuNPs preparadas com citrato a 1% e um alargamento da banda de plasmon, indicativo da formação de nanopartículas com tamanhos maiores (MELO, 2012).

O máximo de absorção no espectro UV-Vis de soluções coloidais está relacionado ao tamanho médio das partículas, enquanto que a largura da banda de absorção relaciona-se com a dispersão das partículas, assim a técnica de espectroscopia de UV-Vis fornece importantes informações para caracterizar as soluções (LEOPOLD; LENDL, 2003), a máxima absorção é dependente da concentração (CHAUDHURI; PARIA, 2012).

Figura 24 - Espectro UV-Vis das AuNPs obtidas com o citrato 1%.



Fonte: a autora, 2020.

5.9.2 Determinação De Diâmetro Médio, Índice De Polidispersão, Potencial Zeta

Na Tabela 6 estão os resultados obtidos para as AuNPs, incluindo o tamanho obtidos por meio das imagens de FEG. Pode-se observar que há uma grande diferença no diâmetro médio, obtido por dispersão de luz (zetasisizer) e o tamanho das partículas determinados pelas medidas das imagens. Isso provavelmente se deve à formação de aglomerados que são medidos como partículas únicas nos métodos de dispersão de luz. Entretanto, as AuNPs apresentaram um baixo PDI, indicando homogeneidade das partículas.

O potencial zeta das AuNPs apresentou valores negativos e abaixo do considerado adequado para garantir a estabilidade das partículas (NEVES, 2013). Estes resultados justificam a formação de aglomerados observados nas imagens do FEG.

Tabela 6 - Diâmetro hidrodinâmico, Potencial Zeta, índice de polidispersão (PDI) e Diâmetro FEG das AuNPs preparadas com o extrato da polpa e com citrato 1%

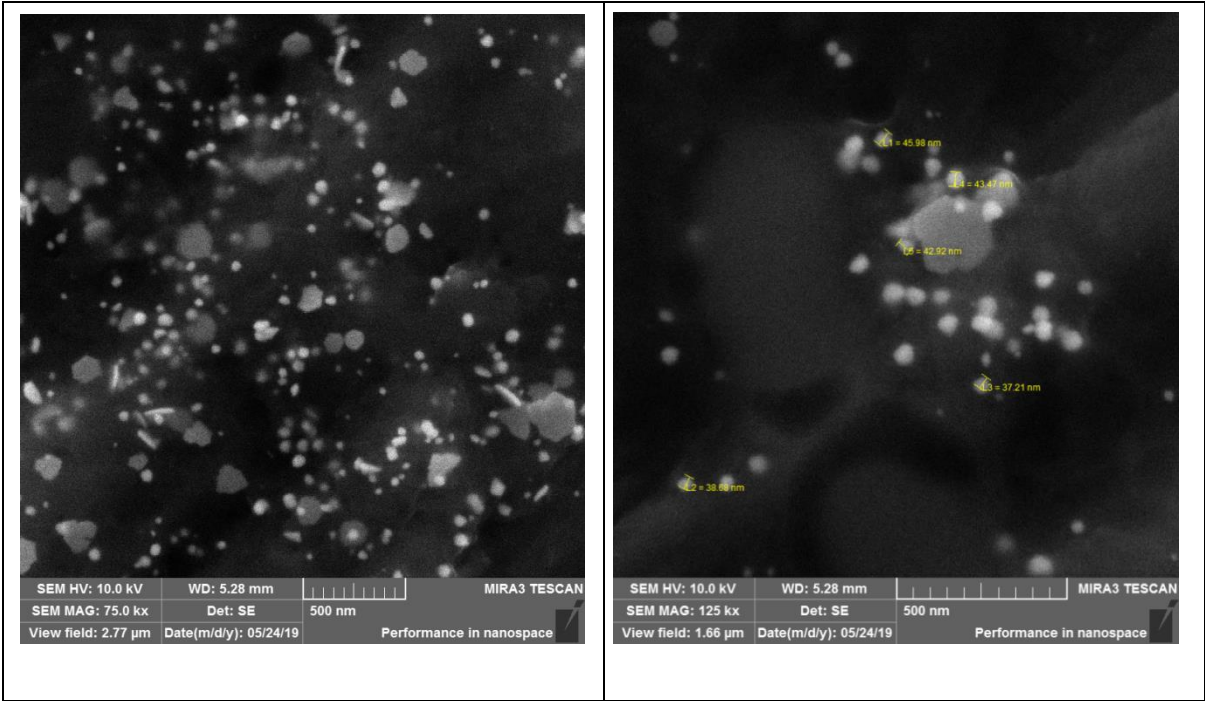
	Tamanho nm	Zeta	PDI	FEG (nm)
AuNPs p	138±34.26	-7.06±5.6	0.38±0.13	41.6±2.94
AuNPs cit	160.7±41.2	-13.4±6.1	0.42±0.21	43.6±5.8

p-polpa; cit-citrato 1%
 Fonte: o autor, 2019.

5.9.3 Avaliação Morfológica E De Superfície

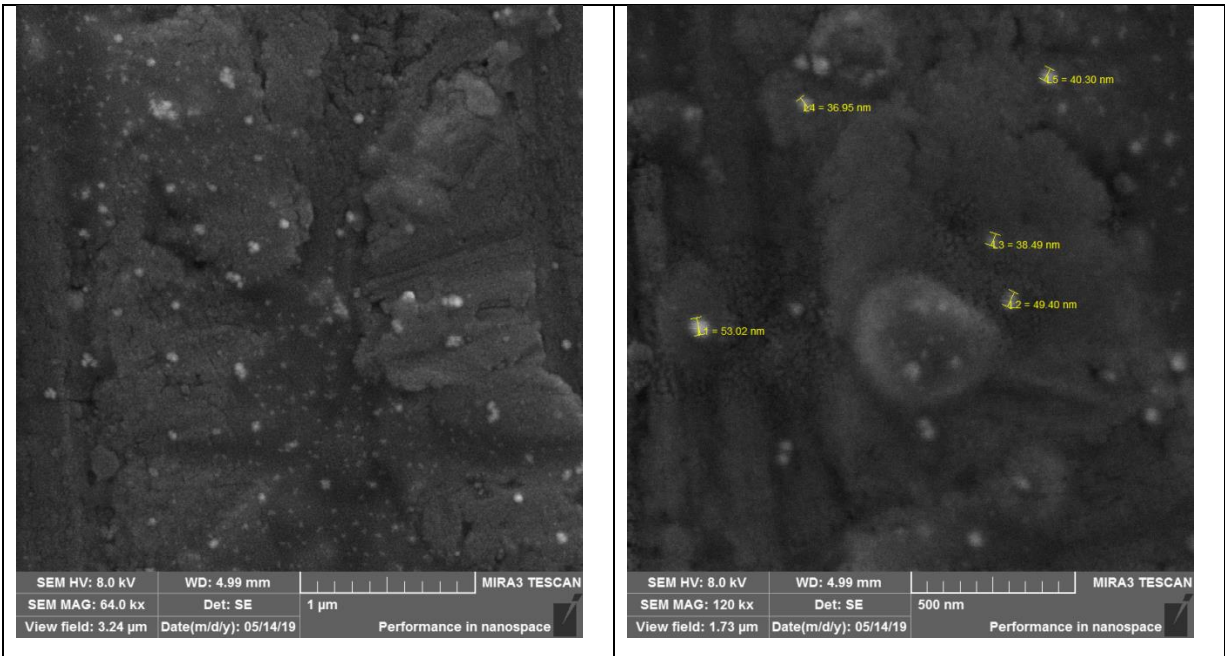
A Figura 25 revela a presença de AuNPs obtidas a partir do extrato da polpa da *A. muricata*, com formato esférico e diâmetro médio de 41.6 nm. Hernandez *et al.* (2007) apresentaram resultados semelhantes em seu estudo utilizando extratos de plantas. A Figura 26 apresenta AuNPs obtidas a partir de citrato a 1%, com formato esférico e com diâmetro médio de 43.6 nm. Resultados semelhantes foram obtidos por Pillai e Kamat (2004), na preparação de AuNPs com citrato a 1%

Figura 25 – Fotomicrografias das AuNPs obtidas com o extrato da polpa de *A. muricata*



Fonte: a autora, 2019.

Figura 26 – Fotomicrografias das AuNPs obtidas com o citrato 1%.



Fonte: a autora, 2019.

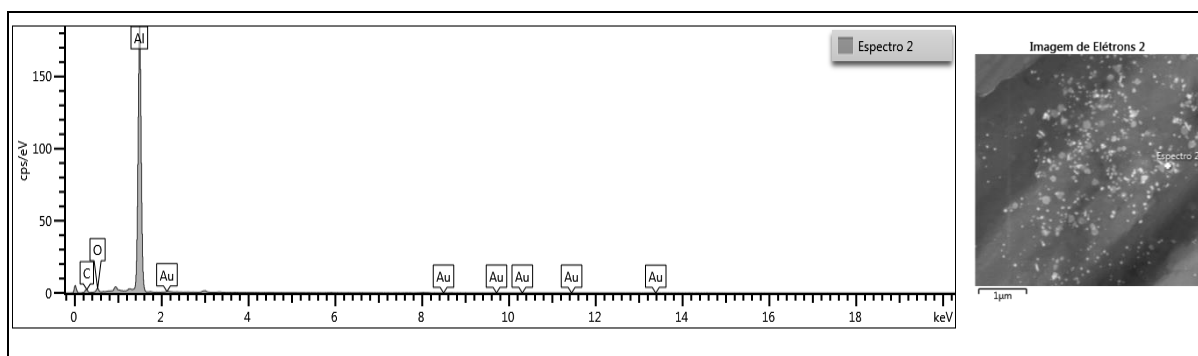
5.9.4 Espectroscopia De Raios X Por Dispersão De Energia (EDS)

O espectro dispersivo de energia revelou a identificação da composição elementar no sintetizado de AuNPs, o que sugere a presença do ouro como elemento da preparação.

As AuNPs apresentaram um pico de absorção óptica característica da ressonância plasmônica da superfície do ouro, comprovando a presença deste elemento na amostra. Outros elementos aparecem devido à composição do extrato, como carbono e oxigênio, além do Al que é o elemento que apresenta forte pico em 1,5 keV, indicativo da composição do *stub* (Figura 27).

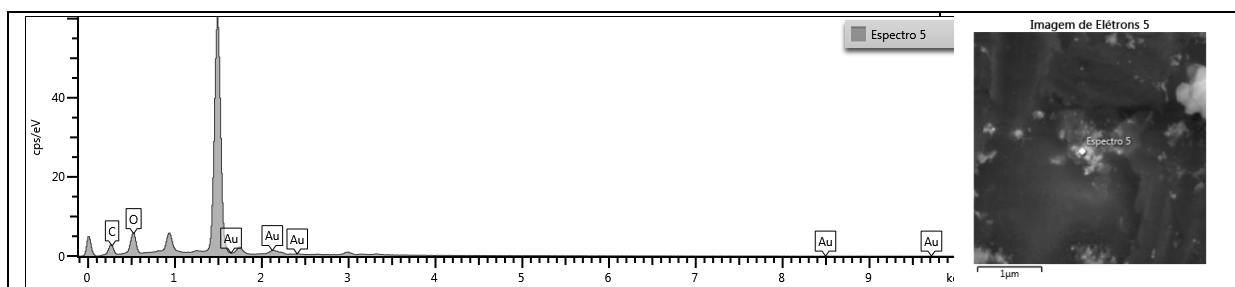
A Figura 28 apresenta o espectro das AuNPs preparadas somente com o citrato a 1%, demonstrando a presença do elemento Au.

Figura 27- Espectros de EDS AuNPs obtidas a partir extrato polpa *A. muricata*



Fonte: a autora, 2019.

Figura 28- Espectros de EDS AuNPs obtidas a partir de citrato 1%

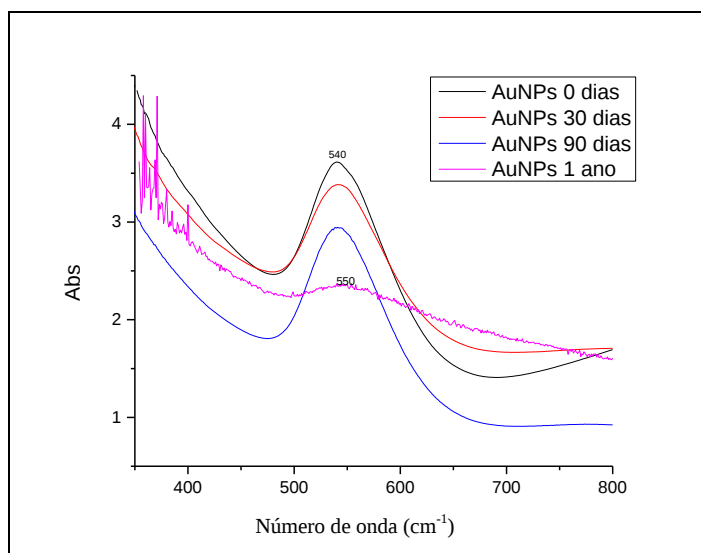


Fonte: a autora, 2019.

5.10 ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS AuNPs

Conforme pode ser observado no espectro de UV-Vis, Figura 29, o pico máximo de absorção se manteve em 540 nm nos períodos de 30 dias e 90 dias, não havendo deslocamento do comprimento de onda, o que é indicativo da estabilidade das AuNPs obtidas com o extrato da polpa da *A. muricata*. Já com um ano de armazenamento, o pico se deslocou para 550 nm e apresentou um achatamento, com consequente diminuição da quantidade e alteração no tamanho das nanopartículas.

Figura 29 - Espectro UV-Vis AuNPs do extrato da polpa de *A. muricata* no dia da preparação, 30, 90 dias e 1 ano após armazenamento sob refrigeração

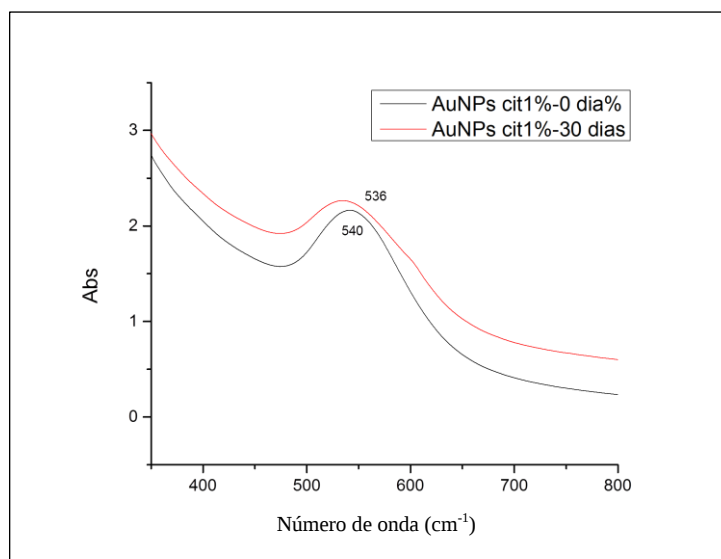


Fonte: a autora, 2019.

Já as AuNPs obtidas com o citrato apresentaram um alargamento na banda de plasmon após 30 dias de armazenamento, sugerindo um aumento no tamanho das nanopartículas (Figura 30). As nanopartículas avaliadas no período de 90 dias e um ano não apresentaram estabilidade.

A presença de uma espécie que se adsorve na superfície das AuNPs, que pode ser o próprio redutor, tensoativos, tióis, polímeros em solução, permite estabilizar e funcionalizar as AuNPs formadas. A sua ação exerce um papel importante no controle da agregação, do tamanho, da forma e da orientação cristalográfica superficial das nanopartículas (MURPHY *et al.*, 2005).

Figura 30- Espectro UV-Vis AuNPs obtidas a partir de citrato 1%, no dia da preparação e 30 dias após armazenamento sob refrigeração



Fonte: a autora, 2019.

5.11 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS AuNPs

A Tabela 7 mostra a atividade bacteriostática e bactericida das AuNPs preparadas com o extrato da polpa da *A. muricata* contra as bactérias gram-positivas e gram-negativas. Essas AuNPs apresentaram atividade bacteriostática na concentração de 9.8 µg/mL, contra *E. coli*, *S. aureus* e 4.9 µg/mL contra as cepas de *E. faecalis*. Entretanto, não apresentaram atividade bactericida.

O estudo de Rao; Inwati e Singh (2017), demonstrou potencial atividade antimicrobiana de AuNPs obtidas pelo método de síntese verde contra as cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*.

A preparação das AuNPs somente utilizando o citrato, não apresentou atividade bacteriostática nem bactericida, resultado semelhante foi obtido por Timoszyk (2018), que testou AuNPs preparadas somente com o citrato contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, não apresentando a capacidade de inibir o crescimento microbiano nas concentrações testadas.

Já as AuNPs preparadas com o extrato aquoso da polpa de *A. muricata* apresentaram atividade bacteriostática contra *E.coli*, *S. aureus* e *E. faecalis*.

Tabela 7 - Atividade das AuNPs preparadas com o extrato aquoso da polpa da *A. muricata* e das AuNPs cit na inibição do crescimento e na atividade bactericida contra bactérias gram-positivas e negativas

Microrganismos	Atividade bacteriostática AuNPs extrato aquoso polpa (µg/mL)	Atividade bacteriostática AuNPs extrato aquoso polpa (µg/mL)	Atividade bactericida AuNPs cit (µg/mL)	Atividade bactericida AuNPs cit (µg/mL)
<i>S. aureus</i>	9.8	NA	NA	NA
<i>E. faecalis</i>	4.9	NA	NA	NA
<i>E. coli</i>	9.8	NA	NA	NA
<i>P. aeruginosa</i>	NA	NA	NA	NA
<i>P. mirabilis</i>	NA	NA	NA	NA
<i>E. cloacae.</i>	NA	NA	NA	NA

NA: não apresenta. cit – citrato a 1%

Fonte: o autor, 2019.

Importante destacar que as AuNPs apresentaram atividade contra *Enterococcus faecalis* em menor concentração (4.9 ug/mL), comparadas com as AgNPs, ambas obtidas com o extrato aquoso da polpa da *A. muricata*.

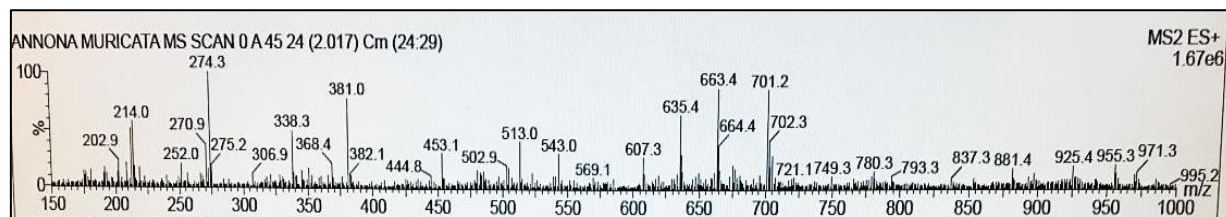
5.12 AVALIAÇÃO CROMATOGRÁFICA QUALITATIVA DO EXTRATO AQUOSO DA POLPA DA *A. muricata*

O espectro de massas é um dos métodos mais importantes para a caracterização dos compostos naturais, mesmo se tratando de misturas, é possível obter e diferenciar diversas massas e suas fragmentações em íons com a identificação de compostos (ABU-REIDAH *et al.*, 2015).

O extrato aquoso da polpa de *A. muricata* apresentou massas específicas das acetogeninas anonáceas, como a annonacina, com forma molecular $C_{35}H_{64}O_7$, [M+K]⁺ de 635,4289 m/z e a 15- acetyl guanacone $C_{37}H_{66}O_8$, [M+K]⁺ de 663,4 m/z. (CHAMPY; GUÉRINEAU; LAPRÉVOTE, 2009).

A Figura 31 apresenta o espectro de massas do extrato aquoso da *A. muricata*, comprovando a presença das acetogeninas em sua composição, dessa forma estando presente nas nanopartículas obtidas.

Figura 31 - Espectro de massas extrato aquoso *A. muricata*

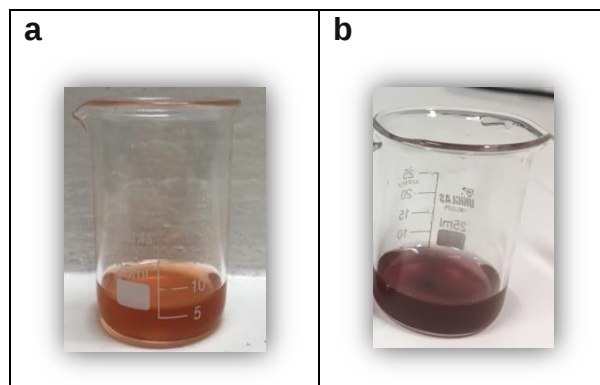


Fonte: a autora, 2019.

5.13 VETORIZAÇÃO DAS AgNPs E AuNPs COM ÁCIDO FÓLICO

As AgNPs obtidas com o extrato aquoso da polpa da *A. muricata* apresentaram uma leve turbidez após a vetorização com o ácido fólico, apresentando uma tonalidade com menor intensidade (Figura 32), comparada com as AgNPs sem a vetorização, utilizando a luz artificial para sua obtenção.

Figura 32 - AgNPsAF (a) e AuNPsAF (b) preparadas com a polpa de *A. muricata* e ácido fólico



Fonte: a autora, 2020.

5.14 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

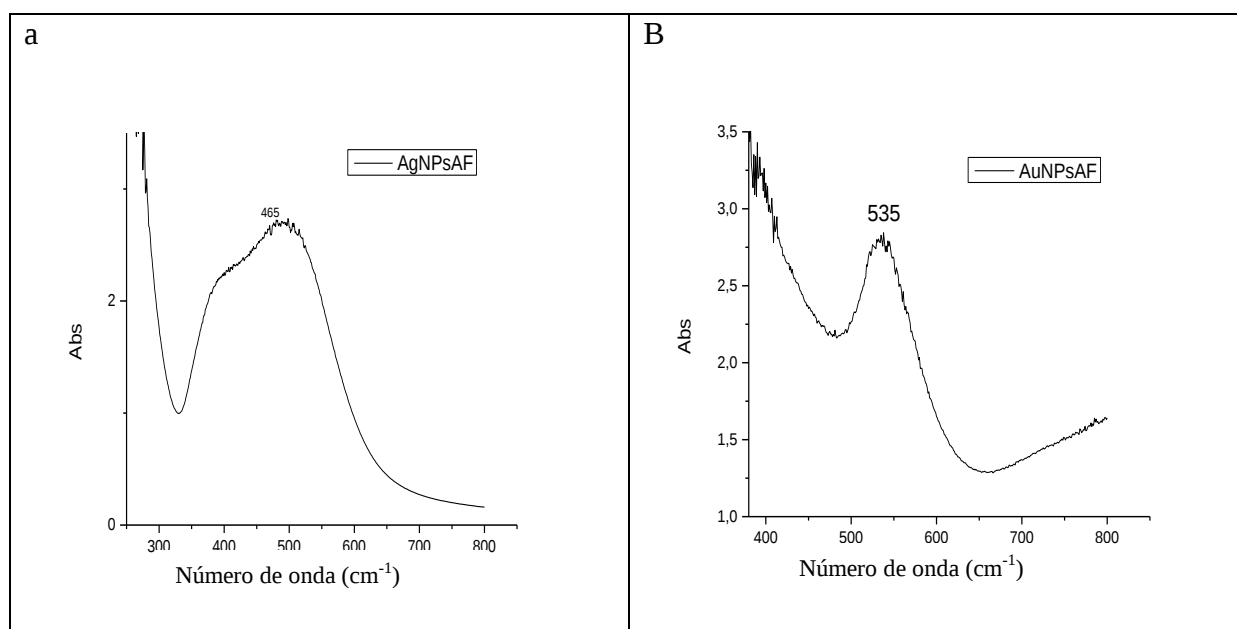
5.14.1 Espectroscopia UV-Vis

As amostras das nanopartículas de ouro e prata vetorizadas com o ácido fólico apresentaram uma diferença no pico de absorção, enquanto as AgNPs apresentaram pico de absorção em 428 nm, com a presença do ácido fólico, o pico de absorção ocorreu em 456 nm (Figura 33a). Essa alteração está relacionada com a alteração no tamanho das partículas.

O deslocamento da banda depende do tamanho da partícula, do ambiente químico, das espécies adsorvidas na superfície e da constante dielétrica, qualquer alteração na absorbância ou comprimento de onda define o tamanho, a forma e as propriedades da partícula (ZHANG *et al.*, 2016; SHARMA; YNGARD; LIN, 2009).

Já as nanopartículas de ouro obtidas pelo método de síntese verde e vetorizadas com ácido fólico não apresentaram alterações no pico de absorção, comparadas às nanopartículas sem a vetorização, 535nm (Figura 33b) e 540 nm, respectivamente.

Figura 33- Espectro de UV-Vis das AgNPs AF (a) e AuNPS AF (b), preparadas com extrato da polpa de *A. muricata* e ácido fólico.



Fonte: a autora, 2019.

5.14.2 Determinação De Diâmetro Médio, Índice De Polidispersão, Potencial Zeta

A Tabela 8 resume os dados de diâmetro médio (DM) determinado por distribuição de intensidade, Índice de polidispersão (PDI), potencial Zeta (PZ) das AgNPs AF e AuNPs AF.

Em comparação aos resultados do valor de diâmetro médio, as AgNPs AF (115.2 nm) e AuNPs AF (191.4 nm) apresentaram maior valor de diâmetro médio, comparadas com as nanopartículas sem a vetorização, AgNPs (87 nm) e AuNPs (138nm). Esse tamanho maior, provavelmente é devido à presença do ácido fólico, proporcionando alguns pontos de aglomeração das nanopartículas.

O potencial zeta das AgNPsAF de -28.5 mV apresentou valor próximo às AgNPs, de -30.3mV. Já as AuNPsAF apresentaram potencial zeta de -10.2 mV, pouco maior que as AuNPs, -7.06, indicando maior estabilidade das nanopartículas de ouro com ácido fólico. As nanopartículas de prata permaneceram estáveis na presença de ácido fólico. As nanopartículas com potencial zeta acima de (+/-) 30 mV mostram-se estáveis em suspensão, uma vez que a carga superficial impede a agregação das nanopartículas (MOHANRAJ; CHEN, 2006).

O índice de polidispersão das AgNPsAF apresentou valor de 0.57, comparados com 0.49 das AgNPs. Essa alteração do valor de PDI está relacionada com a distribuição das nanopartículas, caracterizando uma polidispersão. Para as AuNPs AF, o valor foi semelhante às AuNPs sem a vetorização. O PDI é uma medida da amplitude da distribuição de tamanho resultante da análise cumulativa de dados de dispersão dinâmica de luz (DLS), cujos valores se encontram entre 0 e 1 (CAZO *et al.*, 2012).

Tabela 8 - Diâmetro hidrodinâmico (Z-average), Potencial Zeta, índice de polidispersão (PDI) e Diâmetro FEG das AgNPs e AuNPs preparadas com extrato da polpa e ácido fólico.

	DM (nm) $\pm$ DP	PZ(mV) $\pm$ DP	PDI	FEG(nm) $\pm$ DP
AgNPsAF	115.2 $\pm$ 19.1	-28.5 $\pm$ 5.63	0.57 $\pm$ 0.13	46.2 $\pm$ 6.9
AuNPsAF	191.4 $\pm$ 24.75	-10.2 $\pm$ 4.61	0.43 $\pm$ 0.09	53.5 $\pm$ 7.95

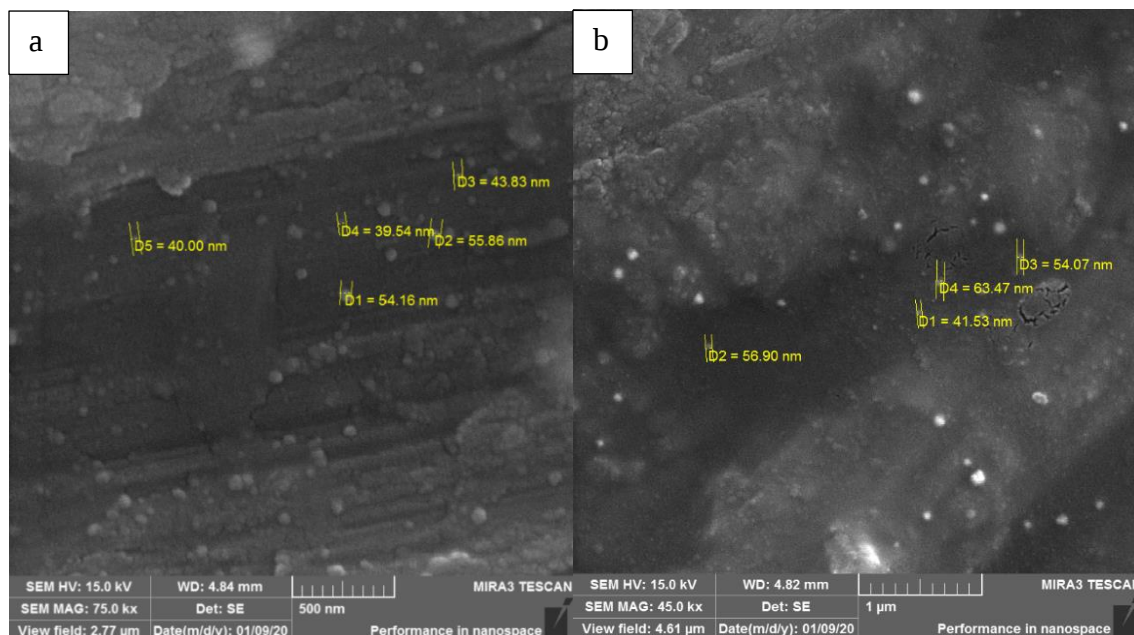
Fonte: a autora, 2020.

5.14.3 Avaliação Morfológica E De Superfície Das AgNPsAF E AuNPsAF

A avaliação morfológica e de superfície das AgNPsAF e AuNPsAF sintetizadas com ácido fólico estão demonstradas na Figura 34.

As AgNPsAF (46.2nm) estão praticamente com o mesmo tamanho das AgNPs sem a presença do ácido fólico (48 nm). Já as AuNPsAF (53.5 nm) apresentaram pouca diferença, comparadas às AuNPs (41.6 nm).

Figura 34 – Fotomicrografias das AgNPsAF (a) e AuNPsAF (b) obtidas com o extrato da polpa de *A. muricata* e vetorizadas com o ácido fólico



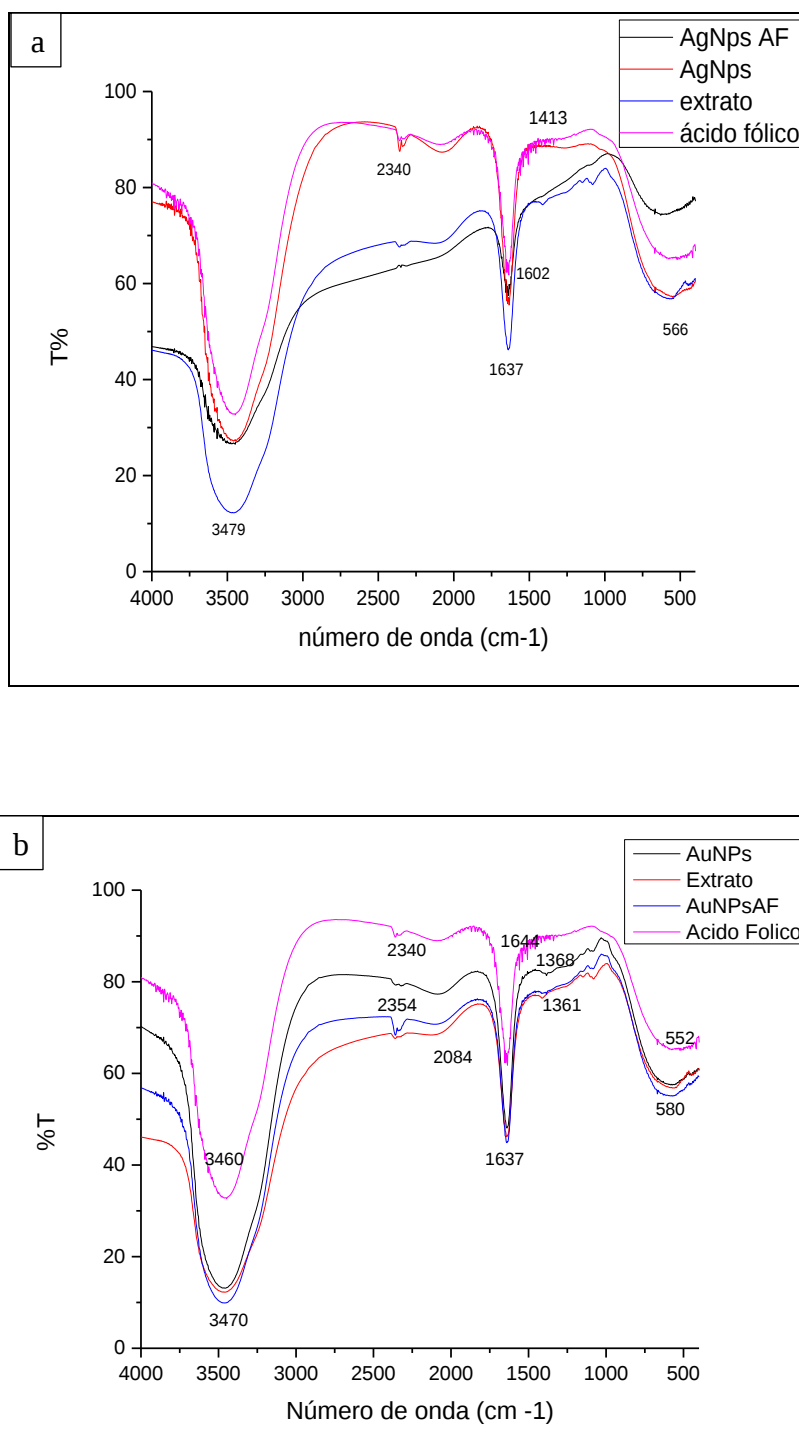
Fonte: a autora, 2020.

5.14.4 Espectroscopia De Infravermelho Por Transformada Em Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy – FTIR)

Os espectro de FTIR do ácido fólico, extrato aquoso da polpa da *A. muricata*, AgNPs, AgNPsAF, AuNPs e AuNPsAF estão representados na Figura 35. O ácido fólico apresenta três porções, um anel pteridina, ácido p-aminobenzoico e glutamato (BROWN, 1961; VOSTRIKOVA *et al.*, 2019).

O pico em 1637 cm^{-1} corresponde aos grupos carbonila do anel aromático das acetogeninas. As bandas em 3479 cm^{-1} correspondem ao alongamento e vibrações de grupos O–H dos flavonoides e compostos fenólicos. Em 1413 cm^{-1} no espectro do ácido fólico, a banda é característica da carboxila do glutamato. Essa banda não aparece nos espectros das AgNPsAF e AuNPsAF, devido a ligação do ácido fólico às nanopartículas metálicas nessa região. O ácido fólico interage com a superfície das nanopartículas através do grupo carboxila da porção de ácido glutâmico (ROCHA *et al.*, 2019; PAMUNUWA *et al.*, 2020; SAMBOU *et al.*, 2016).

Figura 35 – Espectros de FTIR: a) Extrato polpa *A. muricata*, AgNPs polpa *A. muricata* obtidas pela luz artificial, AgNPsAF vetorizadas com ácido fólico e ácido fólico. b) Extrato polpa *A. muricata*; AuNPs polpa *A. muricata* obtidas pela luz artificial, AuNPs vetorizadas com ácido fólico e ácido fólico.



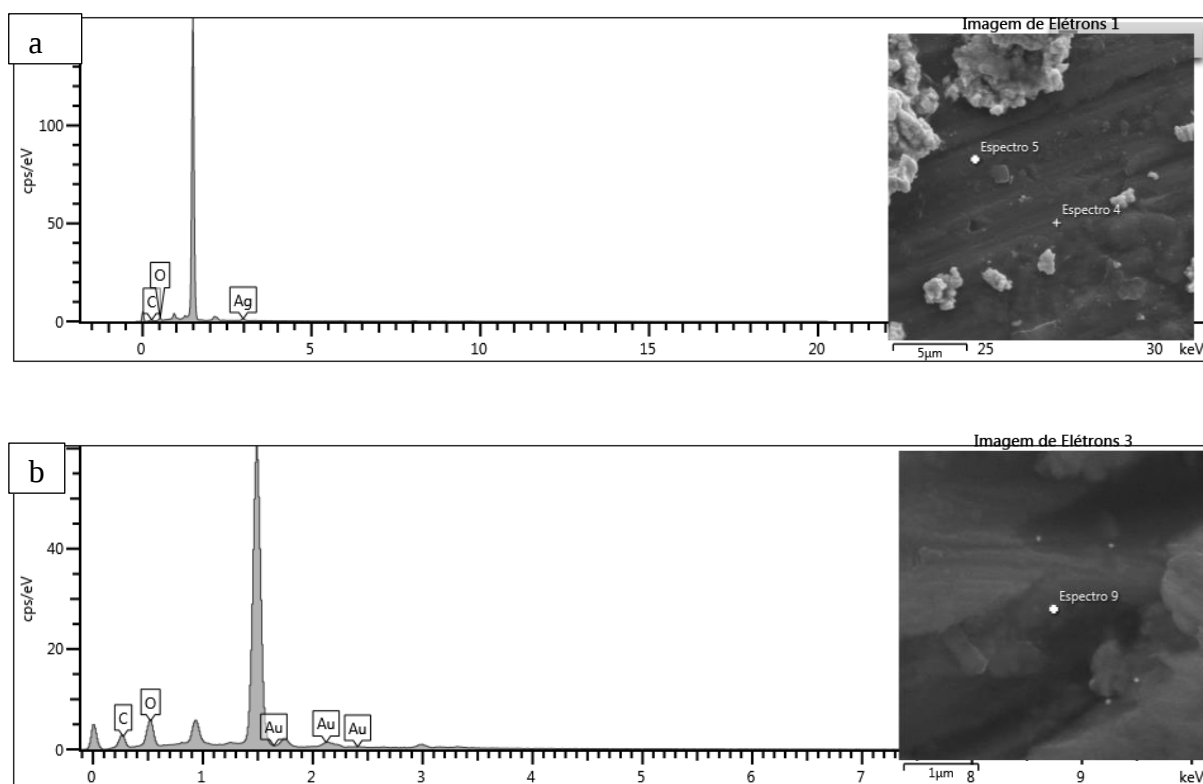
Fonte: a autora, 2020

5.14.5 Espectroscopia De Raios X Por Dispersão De Energia (EDS)

O espectro dispersivo de energia revelou a presença de Ag e Au como elementos da preparação em cada amostra analisada. Todas as amostras de AgNPsAF e AuNPsAF demonstram um pico de absorção óptica a 3 keV e 2 keV, devido à ressonância plasmônica da superfície, comprovando a presença do elemento Ag e Au, respectivamente, semelhante ao encontrado nas AgNPS e AuNPs sem a vetorização.

Na Figura 36, no entanto, outros elementos aparecem, devido a composição do extrato e do ácido fólico, como carbono e oxigênio. O Al é o elemento que apresenta forte pico em 1,5 keV, indicativo da composição do *stub*.

Figura 36- Espectros EDS AgNPsAF (a) e AuNPsAF (b)



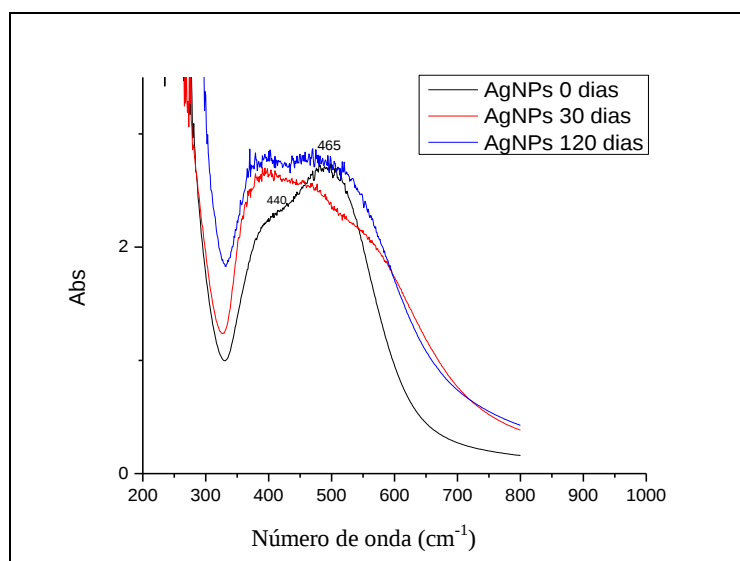
Fonte: a autora, 2020.

5.15 ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS AgNPsAF E AuNPsAF

O estudo da estabilidade das AgNPsAF no período de 30 e 120 dias de armazenamento em refrigeração, está demonstrado na Figura 37. A intensidade no pico da Absorbância não foi alterada, o que indica que a quantidade de nanopartículas produzidas não apresentou alteração.

Aos 120 dias de armazenamento, pode-se observar um aumento na largura do pico de absorção, indicativo de uma maior heterogeneidade no tamanho das nanopartículas.

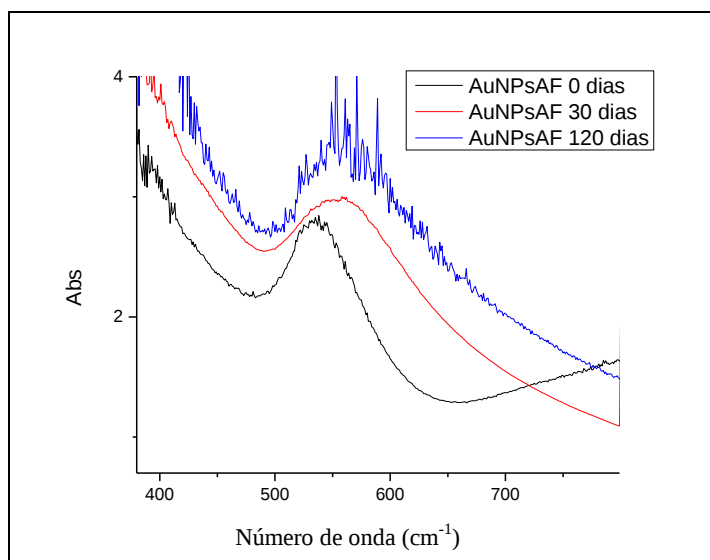
Figura 37 – Espectros UV-Vis das AgNPsAF no dia da preparação, 30 e 120 dias de armazenamento sob refrigeração



Fonte: a autora, 2020.

Na avaliação das AuNPsAF, vetorizadas com o ácido fólico na Figura 38, pode-se observar uma aumento na intensidade dos picos de absorção e também um achatamento na curva, indicando uma diferença no tamanho das nanopartículas, mas mantendo a quantidade produzida.

Figura 38 – Espectros UV-Vis das AuNPsAF no dia da preparação, 30 e 120 dias de armazenamento sob refrigeração



Fonte: a autora, 2020

5.16 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS AgNPsAF E AuNPsAF

A tabela 9 apresenta a inibição do crescimento da *Escherichia coli* e *Proteus Mirabilis* frente à concentração de 2.7 µg/mL das AgNPsAF.

Na concentração de 0.675 µg/mL das AgNPsAF, houve inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*.

As AuNPsAF apresentaram atividade sobre a inibição do crescimento da *Proteus mirabilis*, na concentração de 9.8 µg/mL e da *Escherichia coli* na concentração de 4.9 µg/mL. Contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*, a concentração de inibição da AuNPsAF foi de 1.22 µg/mL (Tabela 9).

As AgNPsAF e AuNPsAF não apresentaram atividade sobre o crescimento da *Staphylococcus aureus*.

AuNPsAF não apresentou atividade bactericida sobre as cepas testadas, enquanto as AgNPs apresentaram atividade contra *Escherichia coli* (Tabela 10).

Tabela 9 – Avaliação bacteriostática das AgNPsAF e AuNPsAF

Microrganismos	AgNPsAF ($\mu\text{g/mL}$)	AuNPsAF ($\mu\text{g/mL}$)
<i>S. aureus</i>	NA	NA
<i>E. faecalis</i>	0.675	1.22
<i>E. coli</i>	2.7	4.9
<i>P. aeruginosa</i>	0.675	1.22
<i>P. mirabilis</i>	2.7	9.8
<i>C. albicans</i>	0.675	1.22

NA – não apresenta
Fonte: a autora, 2020.

Tabela 10 – Atividade bactericida das AgNPsAF e AuNPsAF

Microrganismos	AgNPsAF ($\mu\text{g/mL}$)	AuNPsAF ($\mu\text{g/mL}$)
<i>S. aureus</i>	NA	NA
<i>E. faecalis</i>	NA	NA
<i>E. coli</i>	2.7	NA
<i>P. aeruginosa</i>	NA	NA
<i>P. mirabilis</i>	NA	NA
<i>C. albicans</i>	NA	NA

NA - não apresenta. A - apresenta Fonte: a autora, 2020.

As AgNPsAF apresentaram atividade bacteriostática em concentração quatro vezes menor comparadas às AgNPs sem a vetorização, sobre as cepas de *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* e duas vezes maior frente a *E. coli* e *P. mirabilis*.

As AuNPs sem a vetorização não apresentaram atividade contra *P. aeruginosa* e *P. mirabilis*, sendo que as AuNPsAF apresentaram atividade bacteriostática quatro vezes maior frente a *P. aeruginosa* e na concentração de 9.8 $\mu\text{g/mL}$ frente a *P. mirabilis*.

Importante destacar, que a vetorização apresentou maior efetividade na inibição do crescimento de bactérias gram positivas e negativas, como também melhor efeito fungistático.

5.17 TOXICIDADE FRENTE AOS NÁUPLIOS DE *A. salina*

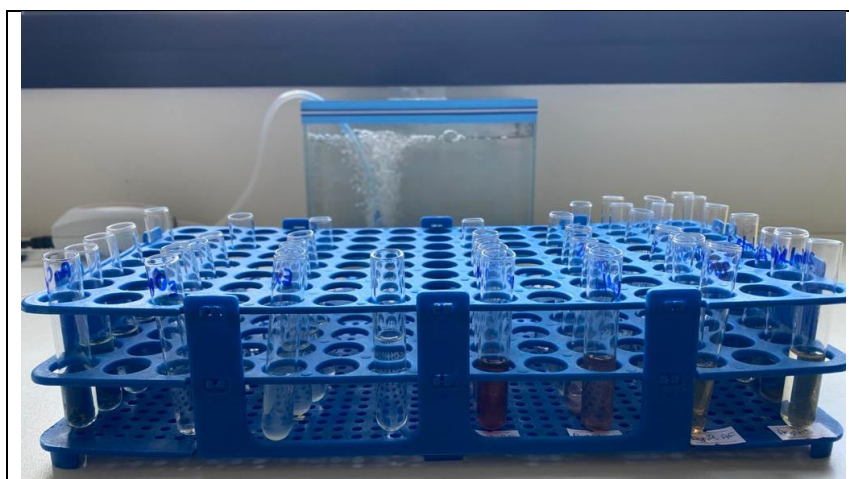
A contagem dos animais mortos e vivos foi realizada após 24h e 48 h. A morte do microcrustáceo é evidenciada pela sua sedimentação. Por se tratar de um crustáceo ativo em água salina, a falta de movimento e sedimentação são os indicadores de morte do mesmo (BUENO; PIOVEZAN, 2019). A realização do teste e a criação dos náuplios de *A. salina* estão demonstradas na Figura 39 e 40.

Figura 39 - Criação de náuplios de *A. salina* e tubo com *A. salina*



Fonte: a autora, 2020

Figura 40 - Teste de toxicidade *A. salina*



Fonte: a autora, 2020.

As concentrações testadas de AgNPs, AgNPsAF, AuNPs e AuNPsAF foram acima das concentrações que apresentaram atividade no teste antimicrobiano.

O controle, preparado apenas com salina, apresentou todas as *artemias* viáveis. O extrato aquoso da polpa de *A. muricata* apresentou toxicidade apenas na concentração de 108 µg/mL, sendo viável a sua utilização nas concentrações a partir de 54 µg/mL (Tabela 12).

Silva *et al.* (2015) demonstraram em seu estudo a toxicidade dos extratos etanólicos das folhas e casca do caule da *A. muricata* frente à *A. salina*, na maioria das concentrações testadas.

Os extratos metanólicos de *Croton heliotropiifolius* Kunth apresentaram alta toxicidade frente a *A. Salina* em todas as concentrações testadas, comprovado por SILVA *et al.* (2017). A toxicidade em algumas espécies de *Croton* foi relatada devido à presença de diterpenoides (RAMOS *et al.*, 2009).

As nanopartículas de prata obtidas com o extrato aquoso da polpa da *A. muricata* com e sem a vetorização do ácido fólico e o nitrato de prata, apresentaram os mesmos resultados, não apresentaram morte das *artemias* em nenhuma das concentrações testadas (Tabela 11).

Lima *et al.* (2011) obtiveram resultados semelhantes em suas nanopartículas de prata e ZnO, com 100% das *artemias* viáveis, ao contrário do nitrato de prata, que apresentou mortalidade de todas as *artemias*.

Já as nanopartículas de ouro, com e sem a vetorização, causaram 100 % de mortalidade das *artemias* até a concentração de 49 µg/mL. Na concentração de 24,5 µg/mL, as *artemias* estavam viáveis, ao contrário do AuCl₄, que apresentou mortalidade em todas as concentrações (Tabela 12).

Tabela 11 - Toxicidade do extrato aquoso da polpa *A. muricata*, AgNPs, AgNPsAF, AuNPs e AgNO₃ frente à *A. salina*

Concentrações	Extrato <i>A. muricata</i>	AgNps	AgNPsAF	AgNO ₃
108 µg/mL	0% vivas	100% vivas	100% vivas	100% vivas
54 µg/mL	100% vivas	100% vivas	100% vivas	100% vivas
27 µg/mL	100% vivas	100% vivas	100% vivas	100% vivas
13,5 µg/mL	100% vivas	100% vivas	100% vivas	100% vivas

Fonte: a autora, 2020.

Tabela 12 - Toxicidade das AuNPs, AuNPsAF e AuCl₄ frente à *A. salina*

Concentrações	AuNps	AuNPsAF	AuCl ₄
197 µg/mL	0% vivas	0% vivas	0% vivas
98 µg/mL	0% vivas	0% vivas	0% vivas
49 µg/mL	0% vivas	0% vivas	0% vivas
24.5 µg/mL	100% vivas	100% vivas	0% vivas

Fonte: a autora, 2020.

Isso comprova que a utilização das nanopartículas de ouro com e sem vetorização com o ácido fólico não apresentaram toxicidade para a *A. salina* na concentração de 24,5 µg/mL, apresentando viabilidade em sua utilização.

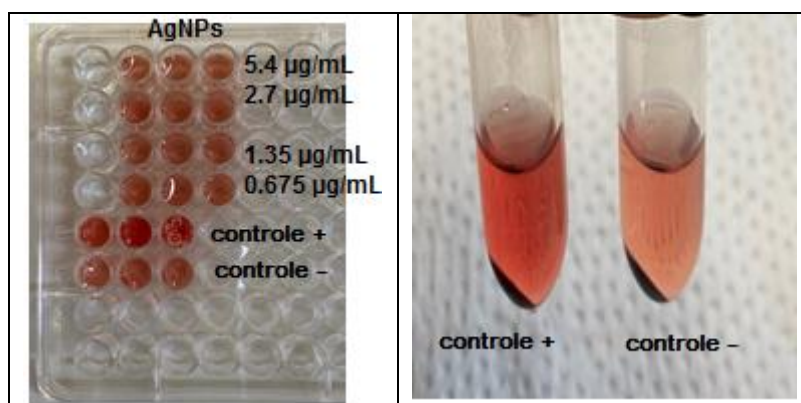
Foi relatado que a concentração letal avaliada por esta metodologia, em extratos de plantas, pode ser útil na determinação de toxicidade oral aguda em ratos, foi verificada uma correlação significativa entre os resultados *in vitro* e *in vivo* (PARRA *et al.* 2001).

O ensaio de letalidade frente a *A. salina* mostra-se útil na avaliação e fracionamento monitorado para bioatividades, podendo levar ao isolamento de produtos naturais, incluindo várias classes. Esse ensaio está sendo utilizado em várias atividades biológicas, confirmando sua sensibilidade e versatilidade em estudos de toxicidade (HARADA, 2009). A ausência de citotoxicidade dos extratos testados frente à *A. salina* é um indicador de que a planta ou seus órgãos podem ser bem tolerados frente ao sistema biológico (STEFANELLO *et al.*, 2006).

5.18 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

As leituras do controle positivo e negativo foram determinadas e a % de hemólise calculada (Figura 41).

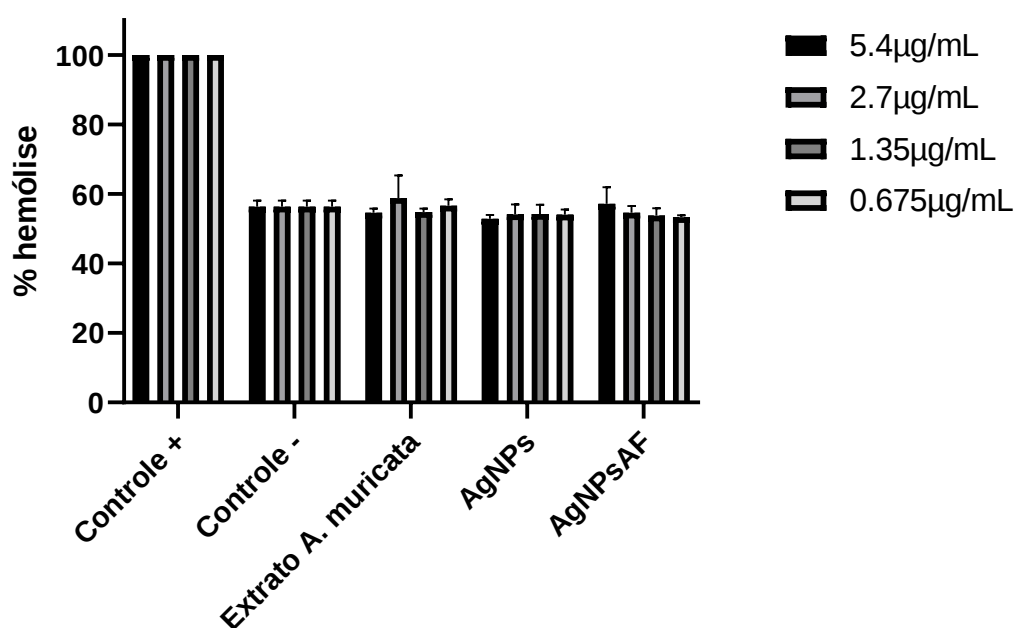
Figura 41 - Avaliação da % de hemólise das AgNPs, AgNPs AF, AuNPs, AuNps AF e extrato aquoso da polpa *A. muricata*.



Fonte: a autora, 2020.

Ao avaliar a % de hemólise do Extrato aquoso da polpa de *A. muricata*, AgNPs e AgNPsAF, nas concentrações de 5.4 µg/mL, 2.7 µg/mL, 1.35 µg/mL e 0.675 µg/mL, pode-se determinar que as amostras não apresentaram hemólise frente a solução de eritrócitos, conforme demonstrado na Figura 42.

Figura 42 - Avaliação da % de hemólise das AgNPs, AgNPsAF e extrato aquoso da polpa da *A. muricata*



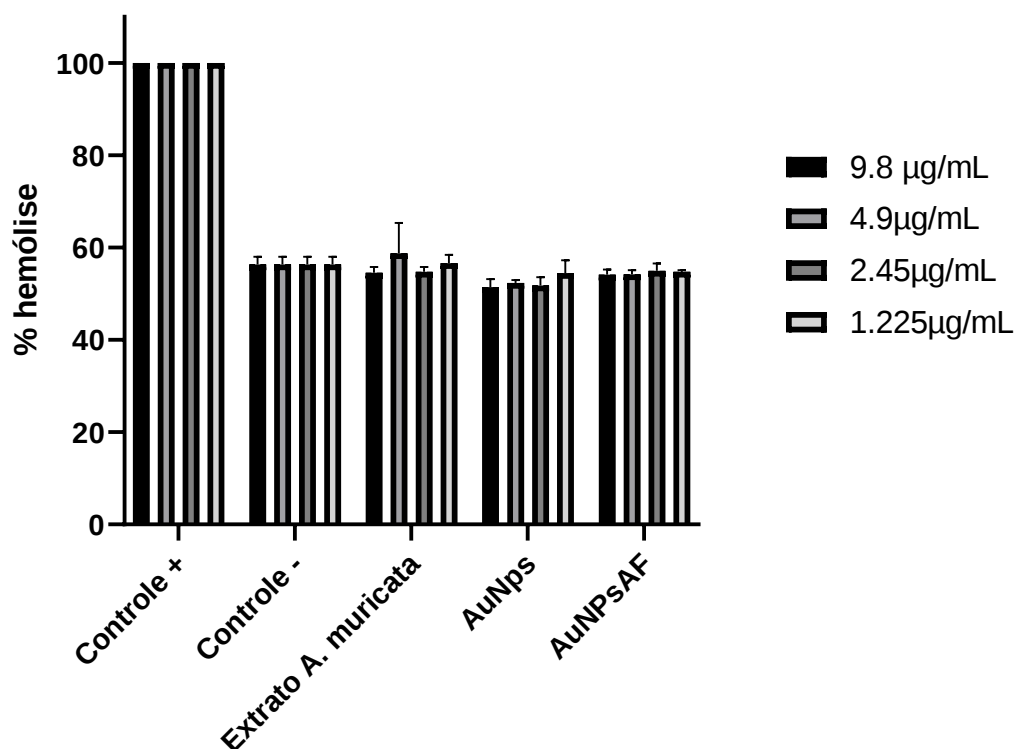
Fonte: a autora, 2020.

Esse resultado é muito importante, pois as concentrações testadas são as mesmas utilizadas no teste antimicrobiano, onde as AgNPs, e AgNPsAF apresentaram atividade antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e antifúngica contra *Candida albicans*.

Selvakumar *et al.* (2018), desenvolveram AgNPs revestidas com PEG, adicionadas aos eritrócitos, e não apresentaram nenhuma descarga de hemoglobina, da mesma forma como os resultados obtidos nesse trabalho. A hemólise é menor ou nula quando revestem as AgNPs com um biopolímero adequado, aumentando a biocompatibilidade das nanopartículas.

Na avaliação da hemólise frente às AuNPs e AuNPsAF, pode-se determinar que as células não apresentaram citotoxicidade sobre os eritrócitos, conforme demonstrado na Figura 43.

Figura 43 - Avaliação da % de hemólise das AuNps, AuNPsAF e extrato aquoso da polpa da *A. muricata*



Fonte: a autora, 2020.

As concentrações testadas também foram as mesmas do teste antimicrobiano, onde as AuNPs e AuNPsAF apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Candida albicans*.

Vários estudos exploram os eritrócitos como um modelo para avaliar a citotoxicidade de uma série de compostos que têm algum potencial de atividade biológica e que deve ser avaliada, devido à efeitos de toxicidade. O teste de hemólise é rápido, eficiente, um método simples e de baixo custo de análise para avaliar a possível citotoxicidade (CÓTICA *et al.*, 2012).

Dessa forma, todas as nanopartículas metálicas obtidas com o extrato aquoso da polpa da *A. muricata*, com e sem a vetorização utilizando o ácido fólico, apresentam biocompatibilidade e são de potencial utilização nos sistemas biológicos.

6 CONCLUSÃO

Os extratos aquosos da polpa, das sementes e das folhas de *A. muricata* foram eficientes para a síntese verde de AgNPs.

A utilização da luz artificial apresentou impacto positivo na síntese das AgNPs, acelerando o processo de formação, entretanto favoreceu a aglomeração das AgNPs.

As AgNPs com características mais adequadas, de tamanho, PDI, potencial zeta e estabilidade foram obtidas com extrato da polpa da *A. muricata* e sem exposição à luz artificial.

As AgNPs apresentaram atividade antimicrobiana, contra cepas de bactérias gram positivas e gram negativas e atividade antifúngica, contra leveduras.

O extrato aquoso da polpa de *A. muricata* apresentou eficácia na síntese verde das AuNPs.

O extrato aquoso da polpa e da semente da *A. muricata* apresentou maior espectro de ação sobre a inibição do crescimento microbiano, comparado ao extrato das folhas de *A. muricata*.

As AuNPs obtidas apresentaram tamanho, potencial zeta e PDI adequados, além da estabilidade das preparações no período avaliado, comparadas às AuNPs obtidas com o citrato de sódio.

As AuNPs preparadas a partir do extrato aquoso da polpa da *A. muricata* demonstraram atividade antimicrobiana contra cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *E. faecalis*, ao contrário das AuNPs preparadas somente com o citrato de sódio, que não apresentou atividade.

As AuNPs apresentaram atividade contra *Enterococcus faecalis* em menor concentração comparadas com as AgNPs, ambas obtidas com o extrato aquoso da polpa da *A. muricata*.

As larvas de *Plutella xylostella* apresentaram baixa mortalidade frente às AgNPs preparadas com o extrato da polpa da *A. muricata*, semelhante ao controle negativo, no método de imersão. No método de contato direto, apresentou mortalidade menor que o controle negativo, comprovando ser de baixa toxicidade.

O extrato aquoso da polpa da *A. muricata* comprovou apresentar acetogeninas anonáceas.

A vetorização das AgNPs e AuNPs com ácido fólico foi obtida com sucesso, utilizando o método de síntese verde, a partir do extrato aquoso de *A. muricata* e com a utilização da luz artificial.

As AgNPsAF e AuNPsAF permaneceram estáveis no período avaliado.

As AgNPsAF e AuNPsAF apresentaram maior atividade bacteriostática, comparadas às nanopartículas de prata e de ouro sem a vetorização.

A avaliação da toxicidade das AgNPs e AuNPs, com e sem a vetorização do ácido fólico, frente *A. salina*, apresentou ótimos resultados, sendo favorável a sua utilização em sistemas biológicos.

Sendo assim, as AgNPs e AuNPs, vetorizadas ou não com ácido fólico apresentaram biocompatibilidade com os eritrócitos e ausência de toxicidade, primordiais para o desenvolvimento de sistemas biológicos, com potencial atividade antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

- ABU-REIDAH, I.M.; ALI-SHTAYEH, M.S.; JAMOUS, R.M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chemistry**, v.166, p.179–191, 2015.
- AGU, C., K.; OKOLIE, P., N.; FALODUN, A.; ENGEL-LUTZ, N. In vitro anticancer assessments of *Annona muricata* fractions and in vitro antioxidant profile of fractions and isolated acetogenin (15-acetyl guanacone). **Journal of Cancer Research and Practice**, v.5, p.53-66, 2018.
- AKHTAR, S. M.; PANWAR, J.; YUN, S.Y. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. **ACS sustainable Chemistry and Engineering**. v. 1, p. 591-602, 2013.
- ALFAIA, S.P.D.; ALMEIDA, S.M.S.S. Avaliação fitoquímica, análise citotóxica e antimicrobiana do extrato bruto etanólico das folhas de *Annona muricata* L. (Annonaceae). **Biota Amazonia Journal System**, v.6 n.1, p.26-30, 2016.
- ALVES, G. P.; MARTINS, F.; SANTANA, M. H. A. Nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos. **Fármacos & Medicamentos**. São Paulo, p. 44-50, 2008.
- ARUNACHALA ,M. D. K.; ANNAMALAI, S.; HARI, S. One-step green synthesis and characterization of leaf extract-mediated biocompatible silver and gold nanoparticles from *Memecylon umbellatum*. **International Journal of Nanomedicine**, n. 8, p.1307–1315, 2013.
- 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, n. February, p. 204-214, 2016.
- ASLAM, F.; RIAZ, M.; ZUBAIR, M.; RIZWAN, K.; ABBAS, M.; BUKHARI, T.H.; BUKHARI, I.H. Antioxidant, haemolytic activities and GC-MS profiling of *Carissa carandas* roots. **Intern J Phytomed**, v.3, p.567-578, 2012.
- BERMEJO, A.; FIGAD`ERE, B.; ZAFRA-POLO, C. M.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action, **Natural Product Reports**, v.22, p.269 – 3032, 2005.
- BERNI, N. E.A. Desenvolvimento de nanobiocompósitos contendo nanopartículas de prata para aplicações bactericidas. **Dissertação (Mestrado em Física) Universidade de São Paulo**, p. 114, 2010.
- BRANDT, V.J.;MARQUES, C.F.R. Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com copolímero PCL–co– PEG–ácido fólico para liberação controlada de metotrexato. **Instituto de Química, UNESP**, 2019.

BRAUSE, R.H.; MOELTGEN, K.; KLEINERMANN, A. Characterization of laser ablated and chemically reduced silver colloids in aqueous solution by UV/VIS spectroscopy and STM/SEM microscopy. **Applied of Physical B**, v. 75, p. 711-716, 2002.

BROWN, G. W. The biosynthesis of acid folic. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 236(9), p.2534-2543, 1981.

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

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.

CAZO, N. A.; PEREIRA-FILHO, R.E.; SILVA, M.; FERNANDES, B.J. Nanopartículas de poli-ε-caprolactona carregadas com hidrocortisona: preparação usando planejamento fatorial e sua avaliação. **Orbital The Electronic Journal of Chemistry**, v. 4, n. 2, p. 54- 76, 2012.

CECÍLIO, C. C. S. **Caracterização físico-química e biológica de nanopartículas para o tratamento de leucemias**. 2014. 71f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica). Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Programa de Biotecnologia Farmacêutica. Universidade de Coimbra, Portugal. 2014.

CHAUDHURI, G. R.; PARIJA, S. Core/Shell Nanoparticles, Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications. **Chemical Reviews**, n.112, p. 2373-2433, 2012.

CHAMPY, P. GUÉRINEAU, V.; LAPREVOTE, O. Maldi-tof MS Profiling of Annonaceous Acetogenins in *Annona muricata* products for human consumption. **Molecules**, v.14, p.5235-5246, 2009.

COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; MONTILLA, L.; RODRIGUEZ, M.; CASTILLO, A. HASEGAWA, M. Xymarginatin: a new acetogenin inhibitor of mitochondrial electron transport from *Xylopiia emarginata* Mart., *Annonaceae*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 871-875, 2009.

COLLNOT, E.M.; BALDES, C.; WEMPE, M.F. et al. Mechanism of inhibition of P glycoprotein mediated efflux by vitamin E TPGS: influence on ATPase activity and membrane fluidity. **Molecular Pharmacology**, n. 4, p. 465-474, 2007.

CORIA-TÉLLEZ, A.; MONTALVO-GONZALEZ, E.; YAHIA, E.; OBLEDO- VAZQUEZ, E. *Annona muricata*: a comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. **Arabian Journal of Chemistry**, 2016.

CORREA-GORDILLO, J.; ORTIZ, J.; SANCHEZ-MEJIA, M.; PACHON, H. Actividad antioxidante en guanabana (*Annona muricata* L.) uma revision bibliografica. **Boletim Latinoamericano Caribe Plantas Medicinaiis Aromaticas**, v.11, p.111–126, 2012.

CÓTICA, F.L.; FREITAS, F.V; DIAS, V.G.; SANTOS, A. I.; VENDRAME, C.S.; KHALI, M.N.; MAINARDES, M. R.;STARUCH, M.; JAIN, M. Simple and facile approach to synthesize magnetite nanoparticles and assessment of their effects on blood cells. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.324, p. 559–563, 2012.

DUBEY, A. P. S.; LAHTINENB, M.; SILLANPA, A. M. Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles. **Process Biochemistry**, n. 45, p. 1065 1071, 2010.

DUNNE, M.; BIBBY, D.C.; JONES, J.C.; CUDMORE, S. Encapsulation of protamine sulphate compacted DNA in polylactide and polylactide-co-glycolide microparticles. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v.92, p.209-219, 2003.

FOFANA, S.; KEITA, A.; BALDE, S.; ZIYAEV, R.; ARIPOVA, S.F. Alkaloids from leaves of *Annona muricata*. **Chemical of Natural Compounds**, v. 48, n.4, p. 714, 2012.

GAN, P.; HAN N. G. S.; HUANG, Y.; FONG, S.; YAU, L. Green synthesis of gold nanoparticles using palm oil mill effluent (POME): A low-cost and eco-friendly viable approach. **Science Drive**, v. 3, 2012.

GAVAMUKULYA , Y.; WAMUNYOKOLI, F.; EL-SHEMY, H. A. *Annona muricata*: Is the natural therapy to most disease conditions including cancer growing in our backyard? A systematic review of its research history and future prospects. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 9, p. 835–848, 2017.

GOTTESMAN, M. M. Defeating Drug Resistance in Cancer. **Discovery Medicine**, v.6, p.18-23, 2009.

GUPTA, A.; PANDEY, S.; SHAH, D.R.; YADAV, J.S.; SETH, N.R. Annonaceous acetogenins: the unrevealed area for cytotoxic and pesticidal activities. **Systematic Reviews in Pharmacy**, n. 2, p. 104-109, 2012.

HALDAR, K.M.; HALDAR, B.; CHANDRA, G. Fabrication, characterization and mosquito larvicidal bioassay of silver nanoparticles synthesized Parasitol Res from aqueous fruit extract of putranjiva. *Drypetes roxburghii* (Wall.). **Parasitology Research**, n. 112, p. 1451–1459, 2013.

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.

HASRAT, J. A.; BRUYNE, T.; BACKER, J.P.; VAUQUELIN, G., VLIETINCK, A. J. Isoquinoline Derivatives Isolated from the Fruit of *Annona muricata* as 5-HTergic 5-HT_{1A} Receptor Agonists in Rats: Unexploited Antidepressive Products. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 49, n. 11, p. 1145–1149, 1997.

HERNANDEZ, J.; SOLLA-GULLÓN, J.; HERRERO, E.; ALDAZ, A.; J.M. FELIU, M.J. Electrochemistry of Shape-Controlled Catalysts: Oxygen Reduction Reaction on Cubic Gold Nanoparticles. **The Journal of Physics C**, n.111, p.14078-14083, 2007.

HUANG, C-Y.; YANG, C-Y.; YANG, C-K.; SHREH, R-H.; WANG, Y-T.; HWU, Y.; CHEN, J-Y. Pegylated gold nanoparticles induce apoptosis in human chronic myeloid Leukemia cells. **Biomed Research International**, p.1-10, 2014.

HUBER, C. P.; MARUIANA, H. C.; ALMEIDA, P. W. Glicoproteína-p, resistência a múltiplas drogas (mdr) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**, v. 33, N. 10, p. 2148-2154, 2010.

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

JABIR, N. R.; TABREZ, S.; ASHRAF, G. M. et al. Nanotechnology-based approaches in anticancer research. **International Journal of Nanomedicine**, v.7, p.4391-4408, 2012.

KALAIARASI, K.; PRASANNARAJ, G.; SAHI, V. S.; VENKATACHALAM, P. Phytofabrication of biomolecules coated metallic silver nanoparticles using leaf extracts of in vitro raised bamboo species and its anticancer activity against human PC3 cell lines. **Turkey Journal Biology**, v. 39, p. 223–232, 2015.

KEKI, A.; TOROK, J.; DEAK, G, et al. Silver nanoparticles by PAMAM-assisted photochemical reduction of Ag⁺. **Journal of Colloid Interface Science**, n. 229, p.550–553, 2000.

KUPPUSAMY, P.; YUSOFF, M. M.; MANIAM, P. G.; GOVINDAN, N. Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications - an updated report, **Saudi Pharmaceutical Journal**, n. 24, p. 473–484, 2016.

LANDOLT, L.J.; AHAMMADSAHIB, I.K.; HOLLINGWORTH, M.R.; BARR, R.; CRANE, L.F.; BUERCKVG, L.N.; P. MCCABE, P.; J.L. MCLAUGHLIN, L.J. Determination of structure-activity relationships of annonaceous acetogenins by inhibition of oxygen uptake in rat liver mitochondria. **Chemical Biology Interact**, v. 98, n. 1, p. 113, 1995.

LEOPOLD, O. N.; LENDL, I. B. A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 107, n. 24, p. 5723-5727, 2003.

LIMA, M.R.F.; XIMENES, E.C.P.A.; LUNA, J.S.; SANT'ANA, A.E.G. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira Farmacognosia**, n.16, p. 300-306, 2006.

LIMA, P.C.; CUNICO, M.M.; TREVISAN, R.R., PHILIPPSSEN, F. A.; MIGUEL, G.O.; MIGUEL, D.M. Efeito alelopático e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach dos extratos do fruto de *Euterpe edulis* Martius. **Acta Botanica Brasilica**, v.25(2), p.331-336. 2011.

LIU, H. X.; HUANG, G.R.; ZHANG, H. M.; WU, J. R.; YAO, Z. J. Annonaceous acetogenin mimics bearing a terminal lactam and their cytotoxicity against cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 12, p. 3426-3430, 2007.

MAINARDES, R. M. **Desenvolvimento de nanopartículas de PLA e PLA-PEG para administração intranasal de zidovudina**. 2007, 133f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara, 2007.

MARAMBIO-JONES, E.M.C.; HOEK, V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **Journal of Nanoparticle Research**, n. 12, p. 1531-1551, 2010.

MATSUSHIGE, A.; KOTAKE, Y.; MATSUNAMI, K.; OTSUKA, H.; OHTA, S.; TAKEDA, Y. Annonamine, a New Aporphine Alkaloid from the Leaves of *Annona muricata*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 60, n.2, p. 257—259, 2012.

McMILLAN, N. **Self assembly of hybrid nanostructures encompassing inorganic, organic and biological applications**. University of Glasgow. MSc(R) thesis, 2011.

MELO, T. R. K; ALMEIDA-LIMA, J.; GOMES, L. D.; DANTAS-SANTOS, N., CAMARA, R.G.B., ROCHA, O.H.A. Caracterização e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marrom. **Holos**, v.1, 2012.

MELOT, A.; FAL, D.; GLEYE, C.; CHAMPY, P. Apolar annonaceous acetogenins from the fruit pulp of *Annona muricata*. **Molecules**, v.14, p.4387–4395, 2009.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MC LAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v.45, p.31-34, 1982.

MITTAL, A. K.; CHRISTI, Y.; BANERJEE, C.U. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**. v. 31, n. 2, p. 346-356, 2013.

MOGHADAMTOUSI, S.; ROUHOLLAHI, E.; KARIMIAN, H. The chemopotential effect of *Annona muricata* leaves against azoxymethane induced colonic aberrant crypt foci in rats and the apoptotic effect of Acetogenin Annonamuricin E in HT-29 cells: a bioassay – guided approach. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. 1-28, 2015.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles - A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 561–573, 2006.

MOHANTY, S.; HOLLINSHEAD, J.; JONES, L.; JONES, P.W.; THOMAS, D.; WATSON, A.A. et al. *Annona muricata* (Graviola): toxic or therapeutic. **Natural Products Communications**, v. 3, n.1, p. 31-33, 2008.

MURPHY, C. J.; SAU, T.K.; GOLE, A.M.; ORENDORFF, C.J.; GAO, J.; GOU, L.; HUNYADI, S.E.; LI, T. Anisotropic metal nanoparticles: synthesis, assembly, and optical applications. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 29, p. 13857 - 13870, 2005.

NADAROGLU, H.; GUNGOR, A; INCE, S. A Synthesis of Nanoparticles by Green Synthesis Method. **International Journal of Innovative Research and Reviews**, v.1, n.1, p. 6-9, 2017

NAWWAR, M.; AYOUB N.; HUSSEIN S.; HASHIM A.; EL-SHARAWY, R.; WENDE, K.; HARMS, M.. Flavonol triglycoside and investigation of the antioxidant and cell stimulating activities of *Annona muricata* Linn. **Archival of Pharmacals Research**, v. 35, n. 5, p. 761-767, 2012.

NEVES, A. R. et al. Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. **International Journal of Nanomedicine**, v.8, p. 177-187, 2013.

NGUYEN, N.C.; TRAN, N.B.; THI, N.H.; HUU, P.P.; THI, N., H. Physical absorption of folic acid and chitosan on dihydroartemisinin-loaded poly-lactic-co-glycolic acid nanoparticles via electrostatic interaction for their enhanced uptake and anticancer effect. **Hindawi Journal of Nanomaterials**, 2019.

NOGUEZ, C. Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The Influence of Shape and Physical Environment. **Phys. Chem.** **v.111, p. 3806-3819, 2007.**

OBERLIES, N.; CHANG, C.J.; MCLAUGHLIN, J.L. Structure-activity relationships of diverse Annonaceous acetogenins against multidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF - 7/Adr) cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, n. 40, p. 2102-2106, 1997.

OLIVEIRA, L.C., TAVEIRA, E.J.F., SOUZA, L.G., MARRETO, R.N., LI MA, E.M., TAVEIRA, S.F. Aplicações das Nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n.4, p.695-70, 2012.

PAL, K.; ROY, S.; PARIDA, K.P.; DUTTA, A.; BARDHAN, S.; DAS, S.; JANA, K.; KARMAKA, P. Folic acid conjugated curcumin loaded biopolymeric gum acacia microsphere for triple negative breast cancer therapy in vitro and in vivo model. **Material Sciences & Engineering C**, v.95, p. 204-216, 2019.

PAMUNUWA, G.; NIPUNIKA ANJALEE, N.; KUKULEWA, D.; EDIRISINGHE, C.; SHAKOOR, F.; KARUNARATNE, N.D. Tailoring of release properties of folic acid encapsulated nanoparticles via changing alginate and pectin composition in the matrix. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v.1, 2020.

PAOSEN, S., SAISING, J., SEPTAMA, W.A., PIYAWAN, S., KUNCHAI, V. Green synthesis of silver nanoparticles using plants from Myrtaceae family and characterization of their antibacterial activity. **Material Letters**, v. 209, p.201-206, 2017.

PARRA, A.; YHEBRA, R.; SARDINAS, I.; BUELA, L. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v.8, n.5, p.395-400, 2001.

PEZZINI, R. B.; FERRAZ, G.H.; SILVA, S.A.M. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, 2007.

PIEME, C. A.; KUMAR, G.S.; DONGMO, S.M.; MOUKETTE, B.; BOYOUUM, F.F.; GOGANG, Y.J.; SAXENA, K.A. Antiproliferative activity and induction of apoptosis by *Annona muricata* (Annonaceae) extract on human cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 516, 2014.

PILENI, M. P. Fabrication and physical properties of self-organized silver nanocrystals. **Pure and Applied Chemistry**, n. 72, p. 53–65, 2000.

PILLAI, S.Z.; KAMAT, V. P. What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method? **The Journal of Physical Chemistry B**, n.108, p. 945-951, 2004.

PIMENTEL, F. L.; JÚNIOR, J.T.A.; MOSQUEIRA, C.V.; MAGALHAES-SANTOS S. N. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, 2007.

PINTO, Q.; CORDEIRO M.; ANDRADE, D.; FERREIRA, F., FILGUEIRAS, H. *Annona muricata*: *Annona* species, taxonomy and botany inter-national centre underutilised crops. **University of Southampton**, p. 3-16, 2005.

PRASANNARAJ, G.; VENKATACHALAM, P. Hepatoprotective effect of engineered silver nanoparticles coated bioactive compounds against diethylnitrosamine induced hepatocarcinogenesis in experimental mice. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 167, p. 309–320, 2017.

PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; AFFOLTER, C.; PRETSCH, E., BHUHLMANN, P.; AFFOLTER, C. **Structure Determination of Organic Compounds**. v. 13, Berlin, Springer, 2009.

PUBCHEM. National center for biotechnology information. **PubChem Compound Summary** for CID 135398658, Folic

acid. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Folic-acid>. Accessed Oct. 26, 2020.

RADJI, M.; KURNIATI, M.; KIRANASARI, A. Comparative antimycobacterial activity of some Indonesian medicinal plants against multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, n.1, p. 19-22, 2015.

RAMOS, C.S.S.; OLIVEIRA, S.C.J.; CAMARA, G.A.C.; CASTELAR, I.; CARVALHO, U.F.F.A., LIMA-FILHO, V.J. Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19(2A), p. 376-381, 2009.

RANGHAR, S.; SIROHI, P., VERMA, P.; AGARWAL, V. Nanoparticle-based Drug Delivery Systems: Promising Approaches Against Infections. **Brazilian archives of biology and technology**, v.57, n.2, p. 209-222, 2014.

RAO, Y.; INWATI, G. K.; SINGH, M. Green synthesis of capped gold nanoparticles and their effect on Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Future Science OA**, v. 3, n. 4, p.1–15, 2017.

RASOOL, S., KHAN, F.Z., UL HASSAN, S., AHMED, M., AHMED, M., TAREEN, R.B. Anticonvulsant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Berberis calliobotrys Aitch ex Koehne* (Berberidaceae). **Trop J Pharm Res**, v.14, n.11, p.2031-2039, 2015.

ROCHA, S.M.; ALVES, J.R.S.; NASCIMENTO, M.L.L.B.; MAGALHÃES, J.L. Avaliação de métodos de incorporação do ácido fólico em nanopartículas de sílica aminofuncionalizadas. **CB Química**, 2019.

ROGER, T.; PIERRE-MARIE, M.; IGOR, V.; PATRICK, V. Phytochemical screening and antibacterial activity of medicinal plants used to treat typhoid fever in Bamboutos division, West Cameroon. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, n. 6, p. 34-49, 2015.

SAKATA, S.; UCHIDA, K.; KAETSU, I.; KITA, Y. Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals sensor and electroresponsive hydrogel. **Radiation Physics and Chemistry**, v.76, p.733-737, 2007.

SAMBOU, A.; GOM, D.B.; GOMIS, L.; BEYE, C.A. Turnability of the Plasmonic Response of the Gold Nanoparticles in Infrared region. **American Journal of Nanomaterials**, v. 4, N. 3, 63-69, 2016.

SANTHOSH, B.S.; RAGAVENDRAN, C.; NATARAJAN, D. Spectral and HRTEM analyses of *Annona muricata* leaf extract mediated silver nanoparticles and its Larvicidal efficacy against three mosquito vectors *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus*, and *Aedes aegypti*. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v.153, p.184–190, 2015a.

SANTHOSH, B.S.; YUVARAJAN, R.; NATARAJAN, D. *Annona muricata* leaf extract-mediated silver nanoparticles synthesis and its larvicidal potential against dengue, malaria and filariasis vector. **Parasitology Research**, n. 114, p. 3087–3096, 2015b.

SELVAKUMAR, P.; SITHARA, R.; VIVEKA, K.; SIVASHANMUGAM, P. Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Acalypha hispida* and its application in blood compatibility. **Journal of Photochemistry & Photobiology**, 2018.

SHAMELI, K.; ABDOLLAHI, Y.; AHMAD, B. M.; ZAMANIAN, A.; SANGPOUR, P.; ZARGAR, M. S. P. Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Curcuma longa* tuber powder. **International Journal of Nanomedicine**, v.7, p. 5603–5610, 2012.

SHANKAR, S.S.; RAI, A.; AHMAD, A.; SASTRY, M. Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core–Ag shell nanoparticles using *Neem* (*Azadirachta indica*) leaf broth. **Journal of Colloid and Interface Science**, n. 275, p. 496–502, 2004.

SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, n. 1–2, p. 83–96, 2009.

SHRIVASTAVA, S.; DASH, D. Label-free colorimetric estimation of proteins using nanoparticles of silver, **Nano-Micro Letters**, n. 2, p.164–168, 2010.

SIAGRO EXPORT. Disponível em: <http://siagroexport.com/es/?s=Annona+muricata>. Acesso: 10.out.2017.

SILVA, F. M.; LACERDA, P.S.B.; JUNIOR, J.J. Desenvolvimento sustentável e química verde. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 103-110, 2005.

SILVA, F.M.E.; NASCIMENTO, C.B.R.; BARRETO, S.F.; FILHO, M.O.M; GRIZ, S.A.S.; SANTOS, F.A.; MOUSINHO, C. K. Estudo *in vitro* do potencial citotóxico da *Annona muricata* L. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 36 (2), p. 277-283, 2015.

SILVA, J.A.G.; LIMA, I.R.; SANTANA, M.A. N.; SILVA, T.M.S.; SILVA, M.I.A. G.; LEITE, S.P. *Screening* Fitoquímico e Avaliação da Toxicidade de *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae) frente à *Artemia salina* Leach **Rev. Virtual Quim**, v. 9 (3), p. 934-941, 2017.

SINGH, P., KIM, Y.J., ZHANG, D.B., YANG, D.C. Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. **Trends in Biotechnology**, v. 34, p. 588–599, 2016.

SOLOMON, S.; BAHADORY, M.; JEYARAJASINGAN, A.; RUTKOWSKY, S.; BORITZ, C. Synthesis and study of silver nanoparticles. **EUA: Journal of Chemical Education**, v. 84, n. 2, p. 322, 2007.

STEFANELLO, M.E.A.; SALVADOR, M.J.; ITO, M.Y., MACARI, P.A.T. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* ssp *floccosa*. **Rev Bras Farmacogn**, v.16(4), p.525-30, 2006.

SUKIRTHA, R.; PRIYANKAA,M.K.; ANTONYA, J.J.; KAMALAKKANNANA,S.; THANGAMB, R.; GUNASEKARANB, P.; KRISHNANA, M.; ACHIRAMANA, S.. Cytotoxic effect of Green synthesized silver nanoparticles using *Melia azedarach* against in vitro HeLa cell lines and lymphoma mice model. **Process Biochemistry**, n. 47,p. 273–279, 2012.

TAKAHASHI, J.A.; PEREIRA, C.R.; PIMENTA, L.P.; BOAVENTURA, M.A.; SILVA, L.G. Antibacterial activity of eight Brazilian annonaceae plants. **Natural Product Research**, n. 20, p. 21-26, 2006.

TANG, B.; LI, J.; HOU, X.; AFRIN, T; SUN, L.; WANG, X. Colorful and antibacterial silk fiber from anisotropic silver nanoparticles. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 12, p.4556–4563, 2013.

TAO, S. L.; DESAI, T. A. Microfabricated drug delivery systems: from particles to pores. **Adv. Drug Del. Rev.**, v.55, p.315-328, 2003.

TIAN, H.; TANG, Z.; ZHUANG, X.; CHEN, X.; JING, X.. “Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application”. **Polymer Science**. 2011.

TIMOSZYK, A. A review of the biological synthesis of gold nanoparticles using fruit extracts: scientific potential and application. **Bull. Mater. Sci.**, v. 41, 2018.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Inglaterra: Faraday Discussions London**, v. 11, p.55, 1951.

VIEIRA, G.H.F.; MOURÃO, J.A.; ÂNGELO, A.M.; COSTA, R.A.; VIEIRA, R.H.S.F. Antibacterial effect (in vitro) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against Gram positive and Gram negative bacteria. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.52, n. 3, p.129-32, 2010.

VOSTRIKOVA, A. M. A.; KOKORINAA, A. A.; MITROPHANOVAA, N. A.; SINDEEVAA, A. O.; ANDREI V. SAPELKINA, V A.; SUKHORUKOVA, B. G.; GORYACHEVAA, Y. I. One step hydrothermal functionalization of gold nanoparticles with folic acid. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, p. 533-538, 2019.

WANGA, M., THANOU, A. M. B. “Targeting nanoparticles to cancer: Review”. **Pharmacological Research**, 62. Pg. 90–99, 2010.

YANG, S.; ZHANG, T.; ZHANG, L.; YANG, Z.; DING, B. Continuous synthesis of gold nanoparticles and nanoplates with controlled size and shape under UV irradiation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 296, n. 1–3, p. 37-44, 2007.

YETISGIN, A.A.; CETINEL, S.; ZUVIN, M.; KOSAR, A.; KUTLU, O. Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications. **Molecules**, v.25, p.1-31, 2020.

YU, D. G. Formation of colloidal silver nanoparticles stabilized by Na⁺-poly(gamma glutamic acid)-silver nitrate complex via chemical reduction process. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, n. 59, p. 171–178, 2007.

YUAN, S.S.; CHANG, H.L.; YEH, Y.T.; KAO, Y.H.; UN, K.H.; WU, Y.C.; SU, J.H. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G 1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. **Life Sciences**, v. 72, p. 2853-2861, 2003.

ZHANG, F.X.; LIU, G.Z.; SHEN, W.; GURUNATHAN, S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. **Int. J. Mol. Sci**, v.17, n.1, 2016.