

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

CAMPUS UNIVERSITÁRIO DARCY RIBEIRO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

TESE DE DOUTORADO

Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extrato aquoso e metabólito secundário (quercetina) das folhas de *Pterodon emarginatus* (sucupira branca) direcionadas para aplicações biomédicas e agrícolas

GISELLE ZAYRA DA SILVA DE OLIVEIRA

Brasília-DF 2018 **GISELLE ZAYRA DA SILVA DE OLIVEIRA**

Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extrato aquoso e

metabólito secundário (quercetina) das folhas de Pterodon emarginatus

(sucupira branca) direcionadas para aplicações biomédicas e agrícolas

Tese de doutorado submetida ao Programa

de Pós-Graduação em Nanociência

Nanobiotecnologia da Universidade

Brasília, como parte integrante dos requisitos

para a obtenção do título de Doutora em

Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientador: Dr. Luciano Paulino da Silva

Brasília-DF

2018

GISELLE ZAYRA DA SILVA DE OLIVEIRA

Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extrato aquoso e metabólito secundário (quercetina) das folhas de *Pterodon emarginatus* (sucupira branca) direcionadas para aplicações biomédicas e agrícolas

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Nanociência e Nanobiotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Luciano Paulino da Silva (Presidente - Orientador) Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dr. Sacha Braun Chaves (Membro vinculado ao Programa) Universidade de Brasília - UnB

Dra. Kelly Grace Magalhães (Membro externo não vinculado ao programa)
Universidade de Brasília - UnB

Dra. Vanessa da Silva Mattos (Membro externo não vinculado ao programa e a UnB) Embrapa Cenargen (Brasília - DF)

Dr. Marcelo Henrique Sousa(Membro suplente)
Universidade de Brasília - UnB

Brasília-DF, 31 de julho de 2018.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

REITORA

Dra. Márcia Abrahão Moura

VICE-REITOR

Dr. Enrique Huelva

DECANA DE PÓS-GRADUAÇÃO

Dra. Helena Eri Shimizu

DECANA DE PESQUISA E INOVAÇÃO

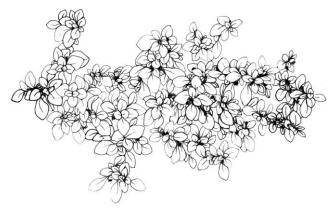
Dra. Maria Emília Machado Telles Walter

DIRETORA DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Dra. Andréa Queiroz Maranhão

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

Dr. João Paulo Fegueiró Longo



"Não é sobre ter todas as pessoas do mundo pra si É sobre saber que em algum lugar, alguém zela por ti É sobre cantar e poder escutar mais do que a própria voz É sobre dançar na chuva de vida que cai sobre nós

> É saber se sentir infinito Num universo tão vasto e bonito, é saber sonhar Então fazer valer a pena Cada verso daquele poema sobre acreditar

Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações E assim ter amigos contigo em todas as situações

> A gente não pode ter tudo Qual seria a graça do mundo se fosse assim? Por isso eu prefiro sorrisos E os presentes que a vida trouxe para perto de mim

Não é sobre tudo que o seu dinheiro é capaz de comprar E sim sobre cada momento, sorriso a se compartilhar Também não é sobre correr contra o tempo pra ter sempre mais Porque quando menos se espera, a vida já ficou pra trás

> Segura teu filho no colo Sorria e abraça os teus pais enquanto estão aqui Que a vida é trem bala, parceiro E a gente é só passageiro prestes a partir"

> > Trem bala - Ana Vilela

AGRADECIMENTOS

"Somos todos mestres uns dos outros"

A **Deus** pelo cuidado e por ser presença constante em minha vida.

Ao meu anjo da guarda pela proteção.

Aos meus pais, **Maria do Livramento** e **Álvaro Ramos** por terem me dando a graça de conviver em família e provar que nossa união transpõe os limites físicos. Vocês são minhas eternas inspirações. Obrigada por terem me dado asas para voar! A minha irmã **Ana Gabrielle** por ser uma parceira de vida tão leal e generosa. Como foi difícil ficar longe de vocês!

Aos meus **avós, tios** e **primos** por torcerem e acreditarem que eu podia ir além.

Ao meu orientador, **Prof.º Dr. Luciano Paulino da Silva** por ter aceitado me orientar e por tanto ter me ensinado durante esse período acadêmico.

À todos os **professores do Programa de Pós Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia** pelas trocas de conhecimentos, experiências e aprendizagens.

Aos profissionais que colaboraram para realização desse trabalho: Ma. Alicia Ombredane, Ma. Alyne Rodrigues, Carla Soll, Dr. Cláudio Lopes, Dr. Fábio Nakagomi, Dr. Gilbert Engler, Dra. Janice Engler, Dr. Marcelo Henrique, Dra. Sonia Freitas, Dr. Thales Rocha e Dr. Thiago Mattos.

À equipe do Institut National de la Recherche Agronomique, em especial, **Dra. Janice Engler**, **Dr. Gilbert Engler**, **Ma. Danila Cabral**, **Dra. Kércya Simões**, **Dra. Julie Cazareth** e **Dra. Vanessa Mattos**. Além desses, um agradecimento especial para uma grande amiga, **Ma. Mariana Paraízo**, que dividiu comigo momentos importantes dessa experiência acadêmica no exterior.

À todos os amigos do Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO) que convivi durante esses anos, em especial, a Alessandra, Alícia, Aryana, Ariane, Douglas, Eduardo, Jéssica, José, Lívia, Luciane, Nayara e Vanessa por tantas experiências vividas.

À todos os amigos do Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) da Embrapa Cenargen: Beatriz, Carlos Bloch, Daniel, Diego, Eder, Eduardo, Felipe, Marcelo, Mariana e Maura por me transmitirem tanta alegrias e conhecimentos.

Às infraestruturas das instituições de pesquisa e de ensino que convive: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília-DF), particularmente ao Laboratório de Nanobiotecnologia – LNANO, e Universidade de Brasília-UnB, Universidade Federal do Piauí-UFPI e Institut National de la Recherche Agronomique-INRA.

Às instituições financiadoras que viabilizaram o custeio da pesquisa durante os últimos anos de pesquisa: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À estrutura da **biblioteca da Embrapa Sede (Brasília-DF)** e as gentilíssimas pessoas que trabalham lá, em especial ao **Chiquinho e Dona Fátima**. Bem como aos colegas que ali estudavam, que mesmo sem saber, me ajudavam com suas presenças durante os meses de escrita.

Aos Dra. Kelly Magalhães, Dr. Marcelo Henrique Sousa, Dr. Sacha Braun Chaves e Dra. Vanessa da Silva Mattos por terem aceitado prontamente o convite para participar da minha banda de defesa de tese e também aos Dra. Kelly Magalhães, Dr. Luís Muehlmann, Dra. Marcella Carneiro e Dra. Vera Polez pelas suas importantes considerações e contribuições dadas na minha qualificação de doutorado.

À todos os **meus amados amigos de Teresina**, principalmente a Diego, **Fernanda**, **Gabriel**, **Jéssyca**, **Karlene**, **Rafaela** e **Ravenna** por fazerem parte da minha vida desde a infância, por tanto amor, carinho, companheirismo e por entenderem tão bem meus sentimentos.

Aos amigos que fiz em Brasília e que quero levar para a vida: **Amanda**, Cristiane, **Fabiana**, **Fernanda**, **Gabriela**, **Isabella**, **Ivo**, **Luyana**, **Mateus**, **Molina** e **Paula**.

Aos meus amigos do grupo de oração da Paróquia Verbo Divino.

Obrigada! Vocês me deram mais força para prosseguir...

Que a melodia da esperança nunca acabe no meu coração...

OLIVEIRA, G. Z. S. Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extrato aquoso e metabólito secundário (quercetina) das folhas de *Pterodon emarginatus* (sucupira branca) direcionadas para aplicações biomédicas e agrícolas. 2018. 220 f. Tese de doutorado - Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília - UnB, Brasília-DF, 2018.

RESUMO

A necessidade da utilização de métodos mais sustentáveis que visassem reduzir os potenciais efeitos deletérios sobre a saúde dos organismos vivos e meio ambiente fez com que a busca por rotas alternativas para produção de nanopartículas de prata (AqNPs) se tornasse uma crescente nos últimos anos. Além disso, os estudos envolvendo avaliações de suas atividades biológicas vêm representando uma forte linha de pesquisa em nanotecnologia, em virtude das suas aplicações representarem estratégias úteis na prevenção, no tratamento e no controle de diversas patologias de importância biomédica e agrícola. Assim sendo, o objetivo desta Tese é investigar o potencial de extratos aquosos das folhas de Pterodon emarginatus (sucupira branca) na formação de nanopartículas de prata (NpSB) e nos seus potenciais efeitos citotóxicos, antioxidantes, hemolíticos, antibacterianos e nematotóxicos; além de também verificar o potencial de um metabolito secundário presente nas folhas de P. emarginatus (quercetina) na síntese de AgNPs (NpQ) para fins nematotóxicos e analisar os efeitos desses nanossistemas no desenvolvimento de plantas modelo Arabidopsis thaliana. Para isso, os extratos aquosos das folhas de sucupira branca nas concentrações finais equivalentes de 10, 20 e 40 mg de folhas congeladas/mL foram adicionados às soluções aquosas de nitrato de prata para concentração final de 1 mM para produção de NpSB. As reações foram incubadas à 75°C por 150 min e monitoradas a cada 30 min por espectroscopia de absorção em 425 nm. Enquanto que para produção de NpQ, as soluções aquosas de quercetina nas concentrações finais de 5, 10 e 20 µM foram adicionadas às soluções aquosas de nitrato de prata na concentração final de 1 mM. As reações foram submetidas à 75°C por 15 min e monitoradas por espectroscopia de absorção em 425 nm. Assim, foi verificado que os extratos das folhas coletadas nas duas estações (verão e inverno) exibiram ações redutoras dos íons de prata satisfatórias, tendo a concentração de 20 mg/mL melhor capacidade de induzir o processo de formação de AqNPs com considerável estabilidade coloidal. As estações de coleta das folhas de P. emarginatus interferiram na síntese e no rendimento das NpSBs e também nos seus diâmetros hidrodinâmicos e potenciais Zeta. Entretanto, essas partículas apresentaram dimensões secas, perfis de massa molecular e padrões de cristalinidade dos átomos similares. Além disso, foi averiguado que as NpSBs apresentaram atividades citotóxicas expressivas sobre linhagens de melanoma murino (B16F10), atividade antioxidante marcante na remoção de radicais hidroxilas, efeito hemolítico insignificante, efeito antibacteriano frente às cepas Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis e Escherichia coli, e efeito nematotóxico em Meloidogyne incognita. No que se referem às NpQs foi verificado que as soluções aquosas de guercetina apresentaram potencial para rápida formação de AqNPs, sendo o rendimento mais alto utilizando a concentração de quercetina de 20 µM (NpQ 20). De acordo com DLS, as NpQ 20 apresentaram diâmetros hidrodinâmicos de 29,06 nm (Z-Average), índice de polidispersividade de 0,561 e potencial Zeta de -23,7 mV. Além disso, as NpQ 20 demonstraram ainda atividades nematotóxicas in vitro e em solo contendo A. thaliana infestadas por M. incognita, não comprometendo as etapas do ciclo celular, a germinação de sementes e o desenvolvimento desse modelo vegetal. Em suma, a partir desses resultados é possível inferir que os extratos aquosos das folhas de P. emarginatus e as soluções aquosas de quercetina apresentaram capacidades formadoras de AgNPs satisfatórias, que por sua vez demostraram potenciais biomédicos e agrícolas. Além disso, foi possível revelar que alguns parâmetros das NpSBs são moduláveis por aspectos sazonais da P. emarginatus e apresentando assim novos potencias biológicos para esta espécie de planta da biodiversidade brasileira.

Palavras-chaves: Antibacteriano; Antioxidante; *Arabidopsis thaliana;* Citotoxicidade; Divisão celular; Fabaceae; Flavonoide; Germinação; Hemolítico; *Meloidogyne incognita;* Nanobiotecnologia; Nanopartículas metálicas; Nematoide de nó de raiz; Plântulas; Química verde; Sazonalidade.

OLIVEIRA, G. Z. S. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract and secondary metabolite (quercetin) from leaves of *Pterodon emarginatus* (White sucupira) directed to biomedical and agricultural applications. 2018. 220 f. Doctoral thesis - Post-Graduate Program in Nanoscience and Nanobiotechnology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília - UnB, Brasilia-DF, 2018.

ABSTRACT

The need to use more sustainable methods to reduce the potential deleterious effects on the health of living organisms and the environment has made the search for alternative routes for the production of silver nanoparticles (AqNPs) a growing trend in recent years. In addition, studies involving evaluations of its biological activities have represented a strong line of research in nanotechnology, since its applications represent useful strategies in prevention, treatment, and control of several pathologies of biomedical and agricultural importance. Therefore, the aim of this thesis is to investigate the potential of aqueous extracts of leaves from Pterodon emarginatus (sucupira branca) in formation of silver nanoparticles (NpSB) and its potential cytotoxic, antioxidant, hemolytic, antibacterial, and nematotoxic effects; as well as to verify the potential of a secondary metabolite present in leaves of *P. emarginatus* (quercetin) in the synthesis of AgNPs (NpQ) for nematotoxic purposes and to analyze the effects of these nanosystems on development of Arabidopsis thaliana plants. For this, aqueous extracts of sucupira branca leaves at equivalent final concentrations of 10, 20, and 40 mg of frozen leaves/mL were added to aqueous solutions of silver nitrate to a final concentration of 1 mM for NpSB production. Reactions were incubated at 75°C for 150 min and monitored every 30 min by absorption spectroscopy at 425 nm. While for NpQ production, aqueous solutions of quercetin at final concentrations of 5, 10, and 20 µM were added to the aqueous solutions of silver nitrate at the final concentration of 1 mM. The reactions were submitted to 75°C for 15 min and monitored by absorption spectroscopy at 425 nm. Thus, it was verified that extracts of leaves collected in the two seasons (summer and winter) exhibited satisfactory silver ion reducing actions, and the concentration of 20 mg/mL was better able to induce the formation process of AgNPs with considerable colloidal stability. P. emarginatus leaf collection stations interfered in synthesis and yield of NpSBs and also in their hydrodynamic and potential Zeta diameters. However, these particles had similar dry dimensions, molecular mass profiles, and crystallinity atom patterns. In addition, it was found that the NpSBs showed significant cytotoxic activities on murine melanoma (B16F10) lines, marked antioxidant activity in removal of hydroxyl radicals, insignificant hemolytic effect, antibacterial effect against strains Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis and Escherichia coli, and effect nematotoxic in Meloidogyne incognita. Regarding NpQs, it was verified that aqueous quercetin solutions showed potential for rapid formation of AgNPs, with the highest yield using quercetin concentration of 20 µM (NpQ 20). According to DLS, NpQ 20 presented hydrodynamic diameters of 29.06 nm (Z-Average), polydispersity index of 0.561 and Zeta potential of -23.7 mV. In addition, NpQ 20 also demonstrated nematotoxic activities in vitro and in soil containing A. thaliana infested by M. incognita, without compromising the stages of cell cycle, seed germination, and development of this plant model. In summary, from these results it is possible to infer that the aqueous extracts of leaves from P. emarginatus and aqueous solutions of quercetin showed satisfactory AgNPs forming capacities, which in turn demonstrated biomedical and agricultural potentials. In addition, it was possible to reveal that some parameters of NpSBs are tunable by seasonal aspects of P. emarginatus and thus presenting new biological capabilities for this species of Brazilian biodiversity plant.

Keywords: Antibacterial, Antioxidant; *Arabidopsis thaliana*; Cell division; Cytotoxicity; Fabacea; Flavonoid; Germination; Green chemistry; Hemolytic; *Meloidogyne incognita*; Metal nanoparticles; Nanobiotechnology; Nematotoxic; Root-knot nematodes; Seasonality; Seedlings.

LISTA DE FIGURAS

Referencial teórico

Figura 1: Abordagens top-down e bottom-up para formações de nanopartículas (Fonte: PAREEK et al., 2017 – adaptado).

Figura 2: Diagrama esquemático do mecanismo de síntese biogênica de nanopartículas metálicas (Fonte: AKHTAR; PANWAR; YUN, 2013 – Adaptado).

Figura 3: Fotos de uma árvore de *P. emarginatus* (a), flores de *P. emarginatus* (b), frutos de sucupira branca (c) e óleo de sucupira branca (d) (Fonte: CAMILLO et al., 2016).

Capítulo I

Figura I-1: Ramos de P. emarginatus (sucupira branca).

Figura I-2: Folhas de *P. emarginatus* utilizadas para preparação dos extratos aquosos.

Figura I-3: Monitoramento da mudança de coloração no meio reacional de síntese das AgNPs produzidas com extratos aquosos das folhas de *P. emarginatus* coletadas na estação do verão.

Figura I-4: Monitoramentos cinéticos das formações de NpSB-Verão por análises espectrofotométricas (425 nm) durante 150 min.

Figura I-5: Monitoramentos cinéticos das formações de NpSB-Inverno obtidas por análises espectrofotométricas (425 nm) durante 150 min.

Figura I-6: Curvas representativas das absorções espectrofotométricas das NpSBs e seus respectivos controles.

Figura I-7: Imagens obtidas por MET e histogramas da distribuição de classes de tamanhos dos diâmetros secos das NpSB-Verão e das NpSB-Inverno.

Figura I-8: Imagens de MFA e histogramas de distribuição de classes de tamanhos das alturas secas das NpSB-Verão e das NpSB-Inverno.

Figura I-9: Imagem de MFA referente à informação de viscoelasticidade das NpSB-Verão.

Figura I-10: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das NpSBs e seus respectivos controles.

Figura I-11: Perfis de massas moleculares obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF das NpSBs e de seus respectivos controles.

Figura I-12: Dendrograma obtido por espectrometria de massa MALDI-TOF referente aos perfis de similaridade molecular das NpSBs e de seus respectivos controles.

Figura I-13: Difratogramas de raios X das NpSBs, estrelas - prata cúbica Fm-3m, arquivo JCPDS N° 04-0783.

Capítulo II

Figura II-1: Viabilidades de linhagens celulares de melanoma murino (B16F10) após exposição *in vitro* com as NpSB-Verão, NpSB-Inverno e seus respectivos controles no intervalo de 24 h.

Figura II-2: Viabilidades de linhagens celulares de melanoma murino (B16F10) após exposição *in vitro* com as NpSB-Verão, NpSB-Inverno e seus respectivos controles no intervalo de 72 h.

Figura II-3: Viabilidades de linhagens celulares de fibroblastos (NIH 3T3) após exposição *in vitro* com as NpSB-Verão, NpSB-Inverno e seus respectivos controles no intervalo de 24 h.

- **Figura II-4**: Viabilidades de linhagens celulares de fibroblastos (NIH 3T3) após exposição *in vitro* com as NpSB-Verão, NpSB-Inverno e seus respectivos controles no intervalo de 72 h.
- **Figura II-5**: Viabilidades de linhagens celulares de queratinócitos (HaCAT) após exposição *in vitro* com as NpSB-Verão, NpSB-Inverno e seus respectivos controles no intervalo de 24 h.
- **Figura II-6**: Viabilidades de linhagens celulares de queratinócitos (HaCAT) após exposição *in vitro* com as NpSB-Verão, NpSB-Inverno e seus respectivos controles no intervalo de 72 h.
- **Figura II-7**: Atividade antioxidante das NpSB-Verão, NpSB-Inverno e seus controles por meio dos seus potenciais de degradação da 2 desoxirribose.
- **Figura II-8**: Avaliação do potencial hemolítico *in vitro* das NpSB-Verão, NpSB-inverno e de seus respectivos controles.
- Figura II-9: Avaliação dos efeitos nematotóxicos in vitro das NpSBs e seus respectivos controles.

Capítulo III

- Figura III-1: Solução aquosa de quercetina na concentração de 200 µM.
- **Figura III-2:** Citômetro de fluxo utilizado para as análises dos níveis de ploidia dos núcleos das raízes de *A. thaliana* crescidas *in vitro* e em solo.
- **Figura III-3**: Raízes de *A. thaliana* infectadas por *M. incognita* na forma de galhas sem e com massas de ovos.
- **Figura III-4**: Mudanças de coloração dos meios reacionais de síntese de AgNPs produzidas com soluções aquosas de quercetina (NpQ).
- **Figura III-5**: Esboço da reação de redução dos íons Ag^+ (a) e recobrimento das AgNPs (b) por quercetina.
- **Figura III-6:** Monitoramentos cinéticos de formações das NpQ por leituras espectrofotométricas (425 nm) durante 15 min.
- **Figura III-7**: Curvas de absorções espectrofotométricas das AgNPs sintetizadas com soluções aquosas de quercetina (NpQ).
- Figura III-8: Avaliação dos efeitos nematotóxicos in vitro das NpQ e seus respectivos controles.
- **Figura III-9**: Morfologias de *M. incognita* (J2) tratados por 48 h com H₂O controle, álcool 70%, AgNPs sintetizadas com solução aquosa de quercetina NpQ, solução aquosa de quercetina e solução de nitrato de prata.
- **Figura III-10:** Germinação de *Arabidopsis thaliana* sob diferentes exposições. Imagens das plântulas obtidas por registros fotográficos e por lupa binocular. O teste de germinação foi observado após sete dias das primeiras aplicações das amostras em sementes de *A. thaliana* tipo selvagem (Col-0) semeadas em meio MS (Dia 7).
- **Figura III-11:** Germinação de *Arabidopsis thaliana* sob diferentes exposições. Imagens das plântulas obtidas por registros fotográficos e por lupa binocular. O teste de germinação foi observado após sete dias das segundas aplicações dos das amostras em sementes de *A. thaliana* tipo selvagem (Col-0) semeadas em meio MS (Dia 14).
- **Figura III-12:** Plântulas de *A. thaliana* sob diferentes exposições. Imagens obtidas por registros fotográficos e por lupa binocular após sete dias das primeiras aplicações das amostras em plântulas de *A. thaliana* crescendo em meio Knop (Dia 24).

Figura III-13: Plântulas de *A. thaliana* sob diferentes exposições. Imagens obtidas por registros fotográficos e por lupa binocular após sete dias das segundas aplicações das amostras em plântulas de *A. thaliana* crescendo em meio Knop (Dia 31).

Figura III-14: Avaliação dos níveis de ploidia dos núcleos de células de raízes de *A. thaliana* crescidas *in vitro* após receberem exposições com NpQ e seus respectivos controles.

Figura III-15: Plantas infectadas com *M. incognita* antes e depois de cinco semanas de exposições.

Figura III-16: Avaliação dos níveis de ploidia dos núcleos contidos nas raízes de *A. thaliana* crescidas em solo após receberem exposições com NpQ e seus respectivos controles.

Figura III-17: Avaliação nematotóxica em solo das NpQ (20) 1/500 e seus respectivos controles em raízes de *A. thaliana* infectadas com *M. incognita*.

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela I-1: Análises por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta de superfície das NpSB-Verão e de seus respectivos controles (Lote 1).

Tabela I-2: Análises por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta de superfície das NpSB-Verão e de seus respectivos controles (Lote 2).

Tabela I-3: Monitoramento cinético da estabilidade coloidal das características físicas das NpSB-Verão (10) por meio de análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta de superfície – Lote 1.

Tabela I-4: Monitoramento cinético da estabilidade coloidal das características físicas das NpSB-Verão (20) por meio de análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta de superfície – Lote 1

Tabela I-5: Monitoramento cinético da estabilidade coloidal das características físicas das NpSB-Verão (40) por meio de análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta de superfície – Lote 1.

Tabela I-6: Monitoramento cinético da estabilidade coloidal das características físicas das NpSB-Verão (10) por meio de análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta de superfície – Lote 2.

Tabela I-7: Monitoramento cinético da estabilidade coloidal das características físicas das NpSB-Verão (20) por meio de análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta de superfície – Lote 2.

Tabela I-8: Monitoramento cinético da estabilidade coloidal das características físicas das NpSB-Verão (40) por meio de análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta de superfície – Lote 2.

Tabela I-9: Análises por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta de superfície das NpSB-Inverno e de seus respectivos controles (Lotes 1, 2 e 3).

Tabela I-10: Monitoramento cinético da estabilidade coloidal das características físicas das NpSB-Inverno (20) por meio de análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta de superfície – Lote 1.

Tabela I-11: Monitoramento cinético da estabilidade coloidal das características físicas das NpSB-Inverno (20) por meio de análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta de superfície – Lote 2.

Capítulo II

Tabela II-2: Concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações bactericidas mínimas (CBM) das NpSB-Verão e NpSB-Inverno frente aos crescimentos das bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*

❖ Capítulo III

Tabela III-1: Análises por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta de superfície das NpQs e de seus respectivos controles.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

A549: câncer de pulmão

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Ag⁰: Prata

Ag+: Prata iônica

AgNO₃: Solução aquosa de nitrato de prata

AgNPs: Nanopartículas de prata

ASTM: American society for testing and materials

ATP: Adenosina trifosfato

B16F10: Linhagem celular de melanoma murino

C: Conteúdo de um conjunto haploide de cromossomas

Ca+: Cálcio

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CCD: Charge-coupled device (Dispositivo de carga acoplada)

CGEN: Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

CIM: Concentração inibitória mínima **Cms**: Concentrações de matéria seca

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CNRS: Centre National de la Recherche Scientifique

Co²⁺: Cobaltoso

COL-0: Sementes de Arabidopsis thaliana tipo selvagem

Cu²⁺: Cúprico

DIC: Differential interference contrast optics (Óptica com contraste por interferência diferencial

DLS: *Dynamic light scattering* (Espalhamento de luz dinâmico)

DMEM: Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

DRX: Difração de raios-X

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

Embrapa: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EROs: Espécies reativas de oxigênio

FAPDF: Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal

Fe²⁺: Ferroso Fe³⁺: Íon férrico

FTIR: Fourier transform infrared spectroscopy (Espectrocopia de infravermelho com transformada de

Fourier) **G1**: Gap 1 **G2**: Gap 2

H9C2: células do cardiomioblasto de rato

HDF: Linhagem de fibroblastos dérmicos humanos

H₂O: Água

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HaCaT: Linhagem celular de queratinócito humano

HIV: Human immunodeficiency virus (Vírus da imunodeficiência humana)

HUVEC: células endoteliais da veia umbilical humana

IC50: Inhibitory concentration 50% (Concentração inibitória de 50%)

INRA: Institut national de la recherche agronomique

ISA: Institut Sophia Agrobiotech

J2: *M. incognita* juvenis de segundo estágio **J3:** *M. incognita* juvenis de terceiro estágio

J4: M. incognita juvenis de quarto estágio

KBr: Brometo de potássio

LDL: Low density lipoprotein (Lipoproteínas de baixa densidade)

LNANO: Laboratório de Nanobiotecnologia **LEM**: Laboratório de Espectrometria de Massa

MALDI-TOF: Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz: tempo de voo)

MCF 7: Linhagem celular de câncer de mama humano

Meio MS: Meio Murasige e Skoog

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

MFA: Microscopia de força atômica

MgCl₂: Cloreto de magnésio

MOPS: 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid (Ácido 3-morfolinopropano-1-sulfônico)

MTT: 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

m/z: Relação massa-carga Na₃C₆H₅O₇: Citrato de sódio

Ni²⁺: Níquel

NHDF: Linhagem de fibroblastos dérmicos humanos normais **NHEK**: Linhagem de queratinócito epidérmico humano normal

NIH 3T3: Linhagem celular de fibroblasto murino

NpQ: Nanopartículas de prata sintetizadas utilizando soluções aquosas de quercetina

NPs: Nanopartículas

NpSB: Nanopartículas de prata sintetizadas utilizando extrato aquoso das folhas de *P. emarginatus* (sucupira branca)

One-Way ANOVA: One-way analysis of variance (Análise de variância unidirecional)

PACA: Provence-Alpes-Côte d'Azur

PCR: Polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase)

Pdl: *Polydispersivity index* (Índice de polidispersividade)

P. ex.: Por exemplo

pH: Potencial hidrogeniônico

PLGA: Ácido lático-co-ácido glicólico Querc: Solução aquosa de quercetina RPS: Ressonância plasmônica de superfície

SERS: Espectroscopia raman intensificada pela superfície (Surface enhanced raman spectroscopy)

SiO₂NP: Nanopartículas de óxido de silício TiO₂NP: Nanopartículas de óxido de titânio UFPI: Universidade Federal do Piauí

UnB: Universidade de Brasília

UNS: University of Nice Sophia Antipolis

UV: Radiação ultravioleta

UV-Vis: Espectroscopia no ultravioleta visível

Zn²⁺: Zinco

2-DR: 2-desoxirribose

α: Alfaβ: BetaE: Epsiloneθ: Teta

λ: Lambda (Comprimento de onda)

APRESENTAÇÃO DA TESE

A presente tese intitulada "Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extrato aquoso e metabólito secundário (quercetina) das folhas de *Pterodon emarginatus* (sucupira branca) direcionadas para aplicações biomédicas e agrícolas" está distribuída em três capítulos, em que o 1º capítulo envolve investigações a respeito da "Síntese de nanopartículas de prata utilizando extratos aquosos das folhas de *Pterodon emarginatus* (sucupira branca)", enquanto que o 2º capítulo relata as "Atividades biológicas *in vitro* de nanopartículas de prata sintetizadas com extratos aquosos das folhas de *P. emarginatus* (sucupira branca)" e por fim o 3º capítulo discorreu sobre a "Avaliação do potencial nematotóxico de nanopartículas de prata sintetizadas com o metabólito secundário (quercetina) encontrado em folhas de *Pterodon emarginatus* (sucupira branca)".

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	09
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	14
APRESENTAÇÃO DA TESE	16
1. REFERENCIAL TEÓRICO	19
1.1 Nanobiotecnologia	1.9
1.2 Nanopartículas de prata	20
1.3 Síntese verde para produção de nanopartículas de prata	
1.4 Pterodon emarginatus (sucupira branca)	29
1.5 Quercetina	33
1.6 Aplicações das nanopartículas de prata em áreas biomédicas	37
1.6.1 Atividade citotóxica e melanoma	39
1.6.2 Atividades antioxidante e hemolítica	41
1.7 Aplicações da nanotecnologia em áreas agrícolas	44
1.7.1 Controle de fitonematoides por recursos nanotecnológicos	
1.7.2 Atividade nematotóxica e Meloidogyne incognita (nematoide de galha)	47
2. JUSTIFICATIVA	53
3. OBJETIVOS	57
3.1 Objetivo Geral	57
3.2 Objetivos Específicos	
CAPÍTULO I: Síntese de nanopartículas de prata utilizando extratos aquos	os
das folhas de Pterodon emarginatus (sucupira branca)	
Resumo	59
1. Introdução	60
2. Objetivos do Capítulo I	
3. Material e Métodos	
4. Resultados e discussão	69
5. Conclusão	97
CAPÍTULO II: Atividades biológicas <i>in vitro</i> de nanopartículas de prata	
sintetizadas com extratos aquosos das folhas de P. emarginatus (sucupira	ì
branca)	
Resumo	
1. Introdução	
2. Objetivos do Capítulo II	
3. Material e Métodos	
4. Resultados e discussão	
5. Conclusão	129
CAPÍTULO III: Avaliação do potencial nematotóxico de nanopartículas	
prata sintetizadas com o metabólito secundário (quercetina) encontrado	em
folhas de <i>Pterodon emarginatus</i> (sucupira branca)	121
Resumo	I
2. Objetivos do Capítulo III	
3. Material e Métodos	
3 Maienale Meionos	

Resultados e discussão	141
5. Conclusão	165
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	166
5. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	
6. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA	168
6. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICAREFERÊNCIAS	171

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Nanobiotecnologia

A nanobiotecnologia é um ramo da ciência e tecnologia que envolve diversas áreas do conhecimento, dentre elas a física, a química, a biologia, as ciências dos materiais e a biotecnologia, que por sua vez estão inseridas diretamente nas etapas de produção, caracterização e aplicação de nanoestruturas. Essas estruturas em nanoescala recebem tal nomenclatura quando apresentam tamanhos menores do que 100 nm em alguma de suas dimensões, além de apresentarem também propriedades físicas, químicas, elétricas, fotoeletroquímicas, magnéticas, mecânicas, ópticas e biológicas distintas dos materiais originais; o que as tornam promissoras para as mais diversas aplicações e oportunidades de pesquisas novas. As manifestações dessas propriedades encontram-se intimamente interligadas com os tamanhos, as formas e os graus de dispersões dos nanomateriais gerados (BHAT, 2003; MODY et al., 2010; FARAMARZI; SADIGHI, 2013).

Dentro desse cenário, diversos tipos de nanoestruturas estão se destacando pelas suas potenciais aplicações nas áreas biomédicas e agrícolas, em virtude de suas propriedades diferenciais em relação aos materiais originais que possibilitam diagnósticos, prevenções e tratamentos de doenças humanas, como também aprimoram a produção agrícola que envolve desde melhoramento da qualidade da água, sementes e grãos, armazenamento de vegetais, utilização de nanopesticidas, nanofertilizantes e testes de segurança alimentar. Exemplos disso são os dendrímeros, os fulerenos, os lipossomas, as micelas poliméricas, as nanoemulsões, as nanopartículas metálicas, as nanopartículas poliméricas e os nanotubos de carbono (RIZZO et al., 2013; HUANG et al., 2015; PETERS et al., 2016).

No caso das nanopartículas metálicas, elas se apresentam na forma de suspensões coloidais, aquosas ou não aquosas, que na maioria das vezes se formaram por meio de processos de redução química de sais metálicos, contendo precursores de metais como ouro, prata, paládio, platina e cobre, na presença de agentes redutores com citrato trissódico, borohidreto de sódio, ácido ascórbico ou álcoois (POLTE et al., 2015).

Muitas dessas nanopartículas metálicas, como as de alumínio, titânio, zinco, cobre, cobalto, índio, magnésio, silício, zircónio, cromo, níquel, ouro, prata, paládio, platina e manganês, apresentam, dentre outras diversas atividades, propriedades antibióticas de amplo espectro em concentração muito baixas, intensa toxicidade para bactérias, liberação de íons metálicos alta, ausência de resistência bacteriana e em sua maioria sem manifestar toxicidade para células humanas. Todos esses fatores favorecem a vislumbração de uma vasta gama de aplicações antibacterianas direcionadas para indústria, práticas medicinais e agricultura (PALZA, 2015; HOSEINZADEH et al., 2017; KÖLLER et al., 2017).

1.2 Nanopartículas de prata

De acordo com a etiologia da palavra nanopartícula, nano refere-se ao termo bilionésimo, ou seja, à unidade 10⁹ e partícula remete a um agrupamento de átomos (WILLIAMS, 2008). A proposta da produção ou síntese de nanopartículas é proporcionar novas ou melhoradas propriedades de acordo com os seus tamanhos, distribuição e morfologia (WILLEMS, 2005).

Entre as nanopartículas metálicas atualmente disponíveis, as nanopartículas de prata (AgNPs) destacam-se pela estabilidade química, condutividade elétrica, reatividade alta em virtude de sua grande razão área de superfície/volume que disponibiliza alta fração de átomos na superfície, toxicidade baixa para as células humanas (ANTUNES et al., 2013; SOUZA et al., 2013), atividade antibiótica de largo espectro frente a vários microrganismos como bactérias, fungos (ARAVINTHAN et al., 2015), vírus (SUJITHA et al., 2015) e protozoários (KALANGI et al., 2016). Além de apresentarem relevantes propriedades catalíticas (VIDHU; PHILIP, 2014) ópticas, eletrônicas, magnéticas (ABBASI et al., 2016), espectroscopia raman intensificada pela superfície (SERS) (MEHERETU; CIALLA; POPP, 2014) e fotossensibilizadoras (WEI et al., 2015).

As AgNPs também possuem a capacidade de absorver e espalhar luz com excelência já que elas apresentam os elétrons de condução contidos na superfície da prata metálica oscilados ao interagirem com determinados comprimentos de luz, e assim ocorrendo o conhecido fenômeno de ressonância plasmônica de superfície (RPS) (ABBASI et al., 2016). O comprimento de onda de luz absorvido é interligado

com os tamanhos das AgNPs, o que influencia diretamente nas colorações de suas suspensões (SHENASHEN; SAFTY; ELSHEHY, 2014).

Uma das primeiras aplicações das AgNPs na saúde aconteceu por sua ação antibacteriana efetiva que possibilitou seu uso em revestimentos de próteses ósseas, dispositivos cirúrgicos, catéteres, sistemas de infusão e compósitos dentários (AGNIHOTRI; MUKHERJI; MUKHERJI, 2013). Ademais, o aumento no número de pesquisas sobre as potencias aplicações das AgNPs levou à identificação de várias atividades biológicas além da antibacteriana, a exemplo da fungicida (AGHAMOOSA; SABOKBAR, 2014), larvicida (ELUMALAI et al., 2016), antiangiogênica (BAHARARA et al., 2014), anti-inflamatória (HEBEISH et al., 2014) e antiproliferativa (DZIEDZIC et al., 2016).

Nos Estados Unidos da América (EUA), os efeitos antimicrobianos das AgNPs já são reconhecidos desde 1954 para aplicações em produtos, embora esses nanossistemas estejam sendo utilizados há mais de 150 anos, tendo inclusive relatos que mencionam a utilização da prata coloidal por antigos romanos e egípcios (NOWACK et al., 2011). Em meados de 1800, a prata era utilizada para o tratamento de úlceras, mas com o advento da penicilina seu uso foi suprimido. No entanto, em 1960 esse composto voltou a ser empregado na forma de solução de AgNO₃ (nitrato de prata) e direcionado ao tratamento de feridas de queimaduras (KLASEN, 2000). Considerando que a prata ainda é utilizada para combater infecções (p. ex. bacterianas e fúngicas) e com danos mínimos aos organismos vivos, seu potencial terapêutico incrível instiga pesquisas de novas aplicações biológicas, principalmente na forma de nanopartículas (RAUWEL et al., 2015).

Os estados de oxidação da prata mais estáveis são Ag⁰ e Ag⁺, sendo que no caso das sínteses de AgNPs vários sais de prata solúveis em água podem ser utilizados para fornecimento de íons de prata para síntese de AgNPs, mas em métodos químicos do tipo *bottom-up*, o mais comumente empregado em publicações da área é o nitrato de prata (AgNO₃) em concentrações tipicamente variando de 0,1 a 10 mM, embora a concentração de 1 mM seja a mais comumente adotada (SRIKAR et al., 2016).

A escolha da via de síntese é um fator muito importante a ser considerado, uma vez que esta determina o tamanho e a forma das AgNPs, que podem ser esféricas, triangulares, hexagonais, octogonais, em hastes e em bastões (HAIDER; KANG, 2015; ZHANG et al., 2016). Os tamanhos e as formas das AgNPs também são influenciados pela natureza do meio reacional, pH (potencial hidrogeniônico) e temperatura da reação, bem como pelos seus agentes redutores e estabilizantes (SHENASHEN; SAFTY; ELSHEHY, 2014; RAUWEL et al., 2015).

A revolução científica da nanotecnologia fez com que surgissem várias estratégias para produção de AgNPs, e para alcançar tais finalidades podem ser empregados métodos físicos, químicos ou biológicos (SHENASHEN; SAFTY; ELSHEHY, 2014).

Os métodos físicos comumente estão associados com uma abordagem *top-down* (de cima para baixo) que têm como princípio diminuir a massa de um material até atingir proporções menores, em um processo de desconstrução de amostra macroestruturado para nanoestruturado (Figura 1) (POLTE et al., 2015). Dentre eles têm os que aplicam técnicas de evaporação-condensação, ablação a laser (ANBALAKAN; BANU, 2016), descarga por arco elétrico (TIEN et al., 2008), etc. Esses métodos empregam energias físicas (calor, energia elétrica, etc) e apresentam as vantagens de não utilizarem produtos químicos tóxicos, formarem AgNPs com distribuição de tamanho estreita, terem um tempo de processamento normalmente rápido e serem eficazes em produzir AgNPs em pó (NATSUKI; NATSUKI; HASHIMOTO, 2015). Por outro lado, suas principais desvantagens são a taxa de rendimento pequena, o consumo de energia alto, o custo elevado principalmente para investir em equipamentos e a contaminação ambiental por liberar grande quantidade de subprodutos perigosos (THAKKAR; MHATRE; PARIKH, 2010; TRAN; NGUYEN; LE, 2013; ABBASI et al., 2016).

Uma das principais técnicas físicas para produção de nanopartículas metálicas é a evaporação-condensação que traz como desvantagem a necessidade de espaço e quantidade de energia grandes e exigir bastante tempo para preparação por utilizar um forno de tubo à pressão atmosférica fazendo com que precursores metálicos sejam vaporizados em um gás transportador a temperatura e pressão definidas (GE et al., 2014).

Por outro lado, os métodos químicos representam uma abordagem *bottom-up* (de baixo para cima) a qual é executada como estratégia que visa à interação e agregação

controlada de átomos metálicos e/ou moléculas para formação de nanopartículas (Figura 1) (POLTE et al. 2015). As técnicas químicas são as mais comuns nas sínteses de AgNPs, a exemplo das que utilizam de eletroquímica, pirólise, irradiação e redução química por agentes redutores orgânicos e inorgânicos (ROLDÁN; PELLEGRI; SANCTIS, 2013; HUANG et al., 2017a; REMYA et al., 2017).

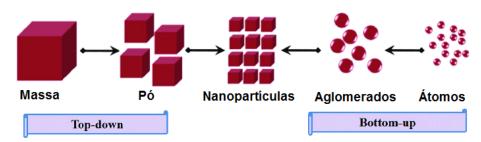


Figura 1: Abordagens top-down e bottom-up para formações de nanopartículas (Fonte: PAREEK et al., 2017 – adaptado).

Tais metodologias são as mais populares por produzirem estruturas menores, mais homogêneas e com formas e tamanhos desejados ao reduzirem os sais metálicos presentes em soluções. Entretanto, seus preparos comumente envolvem solventes e geram resíduos reacionais (precursores químicos e agentes redutores) de toxicidade alta, assim como seus potencias de contaminações, representam alguns fatores que as tornam inadequadas para algumas aplicações biomédicas por serem considerados danosos para os seres vivos e meio ambiente (THAKKAR; MHATRE; PARIKH, 2010; RAUWEL et al., 2015). Além disso, muitas dessas rotas químicas utilizam soluções orgânicas não polares para formação das partículas e assim necessitam de etapas de purificação do produto reacional final (SHENASHEN; SAFTY; ELSHEHY, 2014).

A redução química é o método químico mais adotado para síntese metálica de nanopartículas por ter um custo baixo, requerer equipamentos simples e ter rendimento alto (NATSUKI; NATSUKI; HASHIMOTO, 2015). Suas reduções acontecem por agentes redutores químicos orgânicos e inorgânicos (p. ex. citrato de sódio, ácido ascórbico, borohidreto de sódio, hidrogênio elementar, polióis, reagente de Tollens, N,N-dimetilformamida e copolímeros de blocos de poli) em soluções aquosas ou não aquosas (BAYAT; KHATIBZADEH, 2013). Nesses processos é fundamental o uso produtos para estabilizar o crescimento das AgNPs e evitar as

suas sedimentações, aglomerações ou perdas de suas propriedades superficiais, mas tais elementos em grande escala poluem o meio ambiente (p.ex. tiofenol, a tioureia, acetato de marcapto e PVP) (SINGH et al., 2016a).

Embora a produção de AgNPs seja uma realidade, com diversos métodos de preparo consagrados para sua produção, o emprego de AgNPs ainda é limitado em virtude da carência de métodos que possibilitem a obtenção de estruturas com tamanhos e formas homogêneos, e que ainda apresentem pouca ou nenhuma toxicidade para a saúde humana e impacto negativo ao meio ambiente (KULKARNI; MUDDAPUR, 2014).

Assim, os chamados métodos biológicos de síntese de AgNPs, também denominados síntese verde, oferecem muitas vantagens em relação aos demais métodos convencionais, uma vez que esses não necessitam de pressões, energias e temperaturas altas como condições primordiais para realização dos processos sintéticos, já conterem agentes estabilizantes em suas composições (BENELLI, 2016a), apresentarem a possibilidade de produção de volumes em grandes escalas (RAFIQUE et al., 2016) e ainda serem consideradas ecoamigáveis, sustentáveis, limpos, simples, rápidos e econômicos (BENELLI, 2016b).

De acordo com Anastas e Warner (2000), os princípios da química verde são prevenção, economia de átomos, uso de matéria prima renovável, sínteses mais seguras para os seres vivos e o meio ambiente, design visando eficiência energética e produtos químicos mais seguros (p. ex. solventes e substâncias auxiliares), minimização da utilização de derivados, opção por reagentes catalíticos ao invés de reagentes estequiométricos, geração de produtos químicos que após exercerem sua função, venham a se degradar em produtos não nocivos para o meio ambiente e seres vivos, desenvolvimento de tecnologia para análise em tempo real das substâncias para a prevenção da poluição e elaboração de substâncias mais seguras para prevenção de acidentes químicos. Com base na aplicação destes princípios que a síntese verde de AgNPs tem obtido muito destaque nos últimos anos.

1.3 Síntese verde para produção de nanopartículas de prata

A síntese verde de nanopartículas é uma vertente da química verde que alia a nanotecnologia com a biotecnologia (NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2010), ao visar a substituição de agentes redutores e estabilizadores tóxicos por agentes biorredutores e estabilizantes biológicos de íons de prata (p. ex. organismos inteiros ou extratos de tecidos de plantas, algas, cogumelos, leveduras, bactérias, fungos e vírus); devido ao fato desses materiais conterem proteínas, enzimas, aminoácidos, vitaminas, lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos e diversos metabólitos secundários (p. ex. terpenoides, polifenois, flavanoides e saponinas) em suas composições que poderão atuar nos processos biossintéticos das AgNPs (DURÁN et al., 2011; LOGESWARI; SILAMBARASAN; ABRAHAM, 2013; SILVA et al., 2017).

A opção por essa abordagem de nanotecnologia sustentável oferece vantagens como a simplicidade de execução, a rapidez e o custo baixo; o que a torna viável, eficiente e rentável para vários processos (DAS et al., 2013a). Além disso, normalmente envolve um processo de etapa única com produtos biocompatíveis e não tóxicos, concentrações de íons prata baixas, condições reativas brandas e o uso de compostos solúveis em água. Por conseguinte, todos estes fatores reduzem o risco de toxicidade para vários organismos vivos e para o meio ambiente (KRUMOV et al., 2009; TAVAKOLI et al., 2013).

Dessa forma, a síntese verde também traz à tona a questão ecológica de combate à poluição ambiental por diminuir os subprodutos tóxicos e poluentes das reações, bem como oportuniza a exploração da diversidade de fontes de matérias primas existentes na natureza (RAUWEL et al., 2015), podendo beneficiar-se de materiais renováveis e ainda possibilitar um novo direcionamento para produtos e subprodutos naturais detentores de eficiência energética alta que seriam descartados no lixo (JAGTAP; BAPAT, 2013).

Contudo, mesmo em face de todos os benefícios da opção por rotas verdes para sintetizar AgNPs, algumas dificuldades são encontradas nesses processos, como é o caso da típica alta polidispersividade de tamanhos das partículas produzidas, a dificuldade de obter taxas de rendimento das sínteses altas (dependendo dos agentes redutores empregados) e o potencial de nucleação ser dependente da concentração de macromoléculas dos organismos biológicos, que

por sua vez variam conforme fatores bióticos e abióticos envolvidos (TRAN; NGUYEN; LE, 2013; REMYA et al., 2017).

A condição essencial para que haja formação de AgNPs por uma rota de síntese verde é que a solução contendo íons prata esteja na presença de três elementos importantes: solvente (preferencialmente água), agente redutor biológico ecoamigável e agente estabilizante não tóxico (IRAVANI et al., 2014). E mesmo que os mecanismos moleculares envolvidos com a formação de AgNPs utilizando materiais biológicos não estejam completamente esclarecidos, vários relatos sugerem que as biossínteses ocorram da seguinte forma: Primeiramente acontecem interações eletrostáticas entre as cargas positivas dos íons prata (Ag⁺) e as cargas negativas dos grupos carboxílicos de biomoléculas. Depois, a redução desses íons é iniciada pelos componentes dos materiais biológicos, favorecendo a geração dos núcleos de prata metálica neutros (Ag⁰) que irão se aglomerar e desencadear um fenômeno chamado nucleação, a continuação desse processo proporciona o crescimento das AgNPs (Figura 2) (AKHTAR; PANWAR; YUN, 2013).

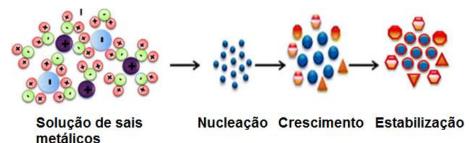


Figura 2: Diagrama esquemático do mecanismo de síntese biogênica de nanopartículas metálicas (Fonte: AKHTAR; PANWAR; YUN, 2013 – Adaptado).

Posteriormente, as próprias moléculas biológicas contidas nos meios reacionais recobrirão as AgNPs, formando uma camada de cobertura, o que irá conferir estabilização aos nanossistemas, fazendo com que, em geral, não haja a necessidade da adição de compostos químicos para manifestarem tais papéis (SRIKAR et al., 2016). Já nas sínteses químicas convencionais são adicionadas substâncias como aminoácidos, poliol, sacarose, dextrano e etc, para aumentar a estabilidade dos nanossistemas gerados (KULKARNI; MUDDAPUR, 2014). Em particular nas biossínteses de AgNPs utilizando extratos vegetais, os compostos naturais fitoquímicos, como alcaloides, flavonoides e polifenóis, presentes em

extratos vegetais são tipicamente responsáveis pelos revestimentos e estabilizações das AgNPs (MITTAL et al., 2015).

Os dois primeiros estágios do processo de síntese verde, nucleação e crescimento, são determinantes dos tamanhos e das formas das AgNPs, e eles que podem ser regulados por elementos reacionais como temperatura, pH, precursor metálico, agente de redução e de estabilização (CHEN; ZHANG, 2012; DANG et al., 2012).

Segundo Ge e colaboradores (2014), os possíveis mecanismos de formação de sínteses biológicas, em particular aquelas promovidas por microrganismos, estão relacionados com reduções enzimáticas e não enzimáticas. Os microrganismos que possuem paredes celulares carregadas negativamente interagem eletrostaticamente com os íons metálicos positivos, o que ocasiona bioredução dos íons metálicos e posterior formação das AgNPs. As interações dos microrganismos com os íons prata podem ser encaradas como um mecanismo de tentativa de defesa deles frente às toxicidades dos metais (MUKHERJEE et al., 2001; TRAN; NGUYEN; LE, 2013).

Outro aspecto relevante é o de que as sínteses de AgNPs utilizando bactérias e fungos, ou mesmo plantas, podem acontecer no interior ou exterior desses organismos, pois eles produzem matérias inorgânicas intra ou extracelularmente; contudo, elas esbarram na dificuldade de processamento e ajustes de seus tamanhos e formas, principalmente nas sínteses intracelulares (ABBASI et al., 2016), bem como necessitam de ambientes com condições assépticas e conhecimento sobre manuseios desses organismos (DEVI; JOSHI, 2015; SINGH et al., 2015).

No caso dos procariotos, as vantagens de utilizá-los para sintetizar AgNPs estão nas simplicidades de obtenção de suas biomassas e na facilidade de manipulação genética para produção de elementos específicos e mais almejados para síntese (PANTIDOS; HORSFALL, 2014). Porém apresentam como desvantagens a dificuldade de produção em grande escala, taxa de síntese baixa, bem como produzem nanopartículas com tamanho e formas restritos, além de apresentarem vias de produção lentas e dificuldades na manutenção dos parâmetros das culturas que podem comprometer a reprodutibilidade das síntese de AgNPs (RAFIQUE et al., 2016).

Quanto aos fungos, há alta secreção de enzimas responsáveis pela redução dos íons metálicos, apresenta capacidades de ligações e absorções intracelulares elevadas e facilidade de manuseio. No entanto, são identificados diversos inconvenientes na manipulação genética para expressão aumentada de enzimas associadas à síntese de AgNPs (RAUWEL et al., 2015).

Neste cenário, as plantas emergem como um recurso biológico de destaque em razão de geralmente oferecerem menores riscos patogênicos para saúde dos manipuladores e dos consumidores, serem produtos comumente mais estáveis, apresentarem menores desperdícios, propiciarem um ambiente de trabalho higiênico, terem custos baixos e taxas de sínteses altas (BANERJEE et al., 2014; MAKAROV et al., 2014). Outra vantagem para utilização das AgNPs obtidas por essas rotas de síntese é que dependendo do extrato vegetal utilizado e consequentemente de seus princípios ativos, estes podem agir de forma sinérgica com as AgNPs, o que potencializa alguns efeitos biológicos (ARUNACHALAM et al., 2015).

Entre as partes vegetais utilizadas, as folhas são a escolha mais realizada para síntese de nanopartículas, embora também se tenham registros de síntese com raízes, flores, cascas, sementes, frutos e tubérculos (SILVA et al., 2017). Centenas de exemplos disso podem ser encontrados em trabalhos que utilizaram de espécies de plantas para produzir AgNPs, incluindo aqueles desenvolvidos no Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia a partir de extratos das folhas de *llex paraguariensis* (erva mate) (SILVEIRA et al., 2018), das folhas de *Annona muricata* (graviola) (AVIDOS; BONATTO; SILVA, 2014), do fruto da *Anacardium othonianum* (castanha de caju) (BONATTO; SILVA, 2014), de frutos, sementes e folhas de *Hancornia speciosa* Gomes (magabeira) (SILVA, 2014), de folhas de *Brosimum gaudichaudii* (mama-cadela) (ALBERNAZ, 2014) e do tubérculo de *Curcuma longa* (açafrão) (OMBREDANE, 2016).

Têm-se também outros exemplos de nanossistemas produzidos de acordo com as diretrizes de química verde que empregaram peptídeos (MEDEIROS; SILVA, 2016), subprodutos de arroz (ALBERNAZ et al., 2015) e óleo de rã (BONATTO, JOANITTI; SILVA, 2018) para produção de nanopartículas de quitosana, nanocristais de celulose e nanoemulsão, respectivamente.

Todavia, de modo geral, os desafios envolvidos nas sínteses verdes de AgNPs são a necessidade do conhecimento de seus mecanismos de formação e de ação (celulares, bioquímicos e moleculares), desenvolvimento de estratégias para degradação e dissolução das AgNPs formadas (SILVA et al., 2017), obtenção de tamanhos definidos, distribuição uniforme e homogênea (SHENASHEN; SAFTY; ELSHEHY, 2014), reprodutibilidade, controle das condições de síntese, regulamentação e previsibilidade dos riscos associados (SILVA; BONATTO; POLEZ, 2016).

Além disso, também são relevantes o conhecimento de suas interações com os ambientes aquáticos, padronizações das composições químicas dos metabólitos botânicos presentes nas plantas utilizadas para síntese de AgNPs, otimização das rotas de síntese verde para produção em larga escala (BENELLI, 2016b), aprimoramento do controle de liberação de íons prata e a modulação da estabilidade das AgNPs empregadas para os mais diversos fins (HAIDER; KANG, 2015).

Por fim, tendo em vista a grande biodiversidade de plantas existentes no território brasileiro (BERLINCK et al., 2018), o Brasil se encontra em uma posição privilegiada, por fornecer oportunidades aos pesquisadores de explorarem os potenciais que seus diversos recursos biológicos apresentam de reduzirem íons prata e de estabilizarem AgNPs, bem como os mecanismo envolvidos nesses processos. Como é o caso da *Pterodon emarginatus*, planta utilizada no presente estudo.

1.4 Pterodon emarginatus (sucupira branca)

Pterodon emarginatus é uma árvore conhecida popularmente como sucupira branca, faveiro, fava de sucupira, fava de Santo Inácio, sucupira verdadeira ou sucupira lisa. Essa planta nativa não é considerada endêmica no Brasil, mas tem crescimento muito comum em regiões do Cerrado, especialmente nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Tocantins; além de ser encontrada em áreas de transição entre as florestas semidecíduas de São Paulo e de Minas Gerais. Além desses, também tem ocorrência confirmada em alguns outros estados do norte, nordeste, centro-oeste e sudeste (CRUZ et al., 2012; LIMA; LIMA, 2015).

O gênero *Pterodon* pertence à família Fabaceae (= Leguminosae) e subfamília Faboideae, estando representada por quatro espécies nativas no Brasil: *P. abruptus* Benth, *P. apparicioi* Pedersoli, *P. polygalaeflorus* Benth e *P. emarginatus* Vogel. Muitas vezes na literatura a *P. emarginatus* é chamada de *P. pubescens*, isso porque Bentham, em 1862, classificou essa espécie como *P. pubescens*, mas tempos depois Vogel demonstrou que *P. emarginatus* e *P. pubescens* correspondiam à mesma espécie, então tornou oficial e unificada a nomenclatura *P. emarginatus* Vogel (HANSEN; HARAGUCHI; ALONSO, 2010).

Já com relação aos aspectos morfológicos, a *P. emarginatus* se caracteriza por ter crescimento lento e atingir altura de 5 a 10 metros, tendo o tronco uma circunferência de até 70 cm e casca cinza-amarelada, áspera, irregular e com depressões (Figura 3a). Os solos secos, arenosos e com teores de cálcio elevados propiciam o desenvolvimento dessa espécie que é considerada decídua (em determinados períodos perde as folhas), não pioneira (não se desenvolve em ambientes inóspitos), heliófita (intolerante ao sombreamento) e xerófita (adaptada a climas semiáridos) (LORENZI, 2002; DUTRA et al., 2012a).

As árvores de *P. emarginatus* apresentam copa em formato piramidal com folhas compostas, paripinadas, com ápices emarginados-mucronados, margens inteiras, nervação broquidódroma, face adaxial glabra e face abaxial pubescente (FELFILI et al., 2002; SILVA JUNIOR, 2005). Suas flores rosadas ou arroxeadas (Figura 3b) têm até 1 cm de diâmetro, estão dispostas em cachos nos finais dos ramos e possuem inflorescências no período de julho a outubro. Já o processo de frutificação acontece tipicamente nos meses de junho a setembro, todavia os frutos permanecem nas plantas por um maior período de ano, sendo que eles ficam dispostos no ápice dos ramos até a outra floração e tem seu amadurecimento quando a planta fica quase sem nenhuma folha (LORENZI, 2008; SILVA JUNIOR, 2005; PIAUILINO, 2012).

Os frutos têm até 5 cm de comprimento, são secos, achatados, de formato elíptico circunferenciado com uma ala membranácea e colorações variando de bege a marrom, cada um deles contendo uma semente de até 0,8 cm no seu interior (Figura 3c). Essas estruturas favorecem suas dispersões aéreas, sendo essa a forma de propagação da espécie (FELFILI et al., 2002; LORENZI, 2002).

A madeira amarelada da sucupira representa em madeireiras uma importância comercial historicamente elevada, devido a sua dureza alta e resistência ao apodrecimento frente à umidade e contato de longa duração, características apropriadas para utilização na indústria de móveis e construção civil e naval (TAVARES et al., 2015). Para conservação da espécie, o corte de sucupira branca em regiões urbanas é proibido por lei, além de ser tida como Patrimônio Ecológico no Distrito Federal por meio do tombamento determinado no Decreto Nº. 14.738/93 (FELFILI et al., 2002).

Essa planta também pode ser adotada em projetos de paisagismo, arborização urbana e reflorestamento de áreas degradadas e de preservação. Suas partes mais utilizadas na medicina popular são as sementes e os frutos, embora também se tenham registros do uso das folhas e das cascas. Essas partes vegetais são coletadas em propriedades particulares e vendidas em feiras e mercados. Os frutos inteiros, os óleos dos frutos (Figura 3d) e as cascas são as principais porções comercializadas, no entanto, a maior quantidade é direcionada para farmácias de manipulação a fim de elaborar extratos e produtos à base de sucupira (CAMILLO et al. 2016).

Com relação aos efeitos farmacológicos, existem vários relatos na literatura a respeito das atividades biológicas dos extratos de diferentes partes vegetais de *P. emarginatus*. Este é o caso dos seus frutos que demonstraram benefícios em tratamentos de inflamações, dores, artrite, reumatismo e diabetes. Também apresentaram função profilática contra infecções por cercárias de *Schistosoma mansoni* (KATZ et al., 1993; HANSEN; HARAGUCHI; ALONSO, 2010), antibacteriana (SILVA et al., 2005), antimicobacteriana (MACHADO et al., 2015), antifúngica (ROQUE et al., 2015), antioxidante contra estresse oxidativo e nitrosativo, hipolipemiante (PAULA et al., 2005; FORNO et al., 2016) e angiogênica (ARAÚJO, 2015). Além de apresentar atividades citotóxicas em linhagens celulares neoplásicas de melanoma, mama, ovário, rim, pulmão, próstata, cólon, leucemia (EUZÉBIO et al., 2009) e glioblastoma (HANSEN et al., 2012).

Os potencias antitumorais também puderam ser evidenciados na utilização de suas sementes, que por sua vez proporcionaram funções antiproliferativas em linhagens celulares de leucemia mielóide crônica (PEREIRA et al., 2011), câncer de

próstata (SPINDOLA et al., 2009), glioma, melanoma, carcinoma do cólon, carcinoma do pulmão, câncer de mama e de ovário; também não demonstrou fortes efeitos citotóxicos em células mononucleares de sangue periférico (DUTRA et al., 2012b). As sementes apresentaram também propriedades antimicrobianas, leishmanicida (DUTRA et al., 2009a), cicatrizante dérmica (DUTRA et al., 2009b), antiulcerogênica, anti-inflamatória (DUTRA et al., 2009c), antinociceptiva e antioxidante (DUTRA, 2008). Além disso, também apresentaram toxicidade potente quando expostas aos crustáceos *Artemia salina*.

As investigações científicas também evidenciaram propriedades biológicas semelhantes em outras partes vegetais da sucupira branca, a exemplo de suas cascas que apontaram atividades anti-inflamatória, analgésica (MORAES et al., 2009; MORAES et al., 2012), antibactericida e antifungicida (BUSTAMANTE et al., 2010); assim como também de folhas que indicaram efeitos antileishmanicidas (SILVA et al., 2014a) e antibacterianos (SANTOS et al., 2010). Essas suas últimas partes citadas têm muito menos registros na literatura quando comparadas com os frutos e sementes.

Com relação à toxicidade, Sant'Ana e colaboradores (2012) registraram um surto de intoxicação bovina causada pela ingestão acidental de folhas e frutos de *P. emarginatus*, sendo que tal situação culminou na morte dos animais que manifestaram os sinais clínicos de eriçamento de pêlos, apatia, prostração, tremores musculares, ressecamentos, incoordenação e decúbito esternal prolongado.

Quanto ao perfil fitoquímico das folhas de P. emarginatus, os principais componentes já identificados no seu óleo essencial foram nove hidrocarbonetos sesquiterpênicos: γ -muuroleno, biciclogermacreno, acifileno, β -elemeno, E-cariofileno, α -humuleno, α -copaeno, allo-aromadendreno e δ -cadineno. Já no extrato etanólico bruto foi constatada uma mistura de esteróides estigmasterol e β -sitosterol (SANTOS et al., 2010). Enquanto que Miranda e colaboradores (2014), além de encontrarem os esteroides (β -sitosterol e estigmasterol) no extrato etanólico das folhas também evidenciaram a presença de compostos flavonoides (luteolina, kaempferol, quercetina, (+)-catequina, quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo e rutina), sesquiterpênicos (rel-2 β , 6β -epóxi- 5β -hidróxi-isodaucano, oplopanona, 1 β ,

 6α -diidróxi-4(15)-eudesmeno, óxido de cariofileno, α-cadinol e espatulenol), feofitina (feofitina A) e ácido p-hidroxibenzoico.

Estes resultados estão em concordância com Cruz (2016) que estudando as classes de metabólitos secundários do extrato etanólico das folhas de *P. emarginatus* evidenciaram esteroides, triterpenoides, fenóis, taninos, depsídios e depsidonas. Já no extrato hidroetanólico, os principais constituientes encontrados foram luteolina-7-O-rutinoside, C, O-glicosilflavonas e di-C-glicosilflavonas, além de saponinas em níveis mais baixos (NEGRI; MATTEI; MENDES, 2014). Contudo, até o momento não se tem relatos detalhando os componentes existentes no extrato aquoso das folhas de *P. emarginatus* e também não há trabalhos publicados na literatura científica de sua aplicação para síntese de AgNPs.

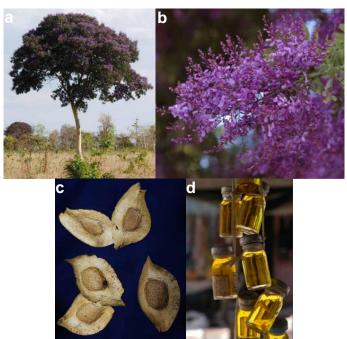


Figura 3: Fotos de uma árvore de *P. emarginatus* (a), flores de *P. emarginatus* (b), frutos de sucupira branca (c) e óleo de sucupira branca (d) (Fonte: CAMILLO et al., 2016).

1.5 Quercetina

Os flavonoides são compostos polifenólicos amplamente distribuídos na natureza e bastante conhecidos por suas propriedades antioxidantes. Eles são agrupados segundo suas estruturas químicas em: flavonas, isoflavonas, flavan-3-ol e antocianidinas, e até o momento já foram reconhecidos mais de 4000 flavonoides (VERMA; TREHAN, 2013).

Dentro desse contexto, tem-se a quercetina (3, 3', 4', 5, 7 pentahidroxiflavona) como representante do grupo dos flavonóis (MAALIK et al. 2014). Esse flavonoide pode ser facilmente inserido na dieta humana, uma vez que está presente em várias espécies de plantas as quais incluem frutas, hortaliças, ervas e sementes, como maça, limão, nozes, hortelã, coentro, cebola, salva e couve-flor. É importante conhecer onde a quercetina pode ser encontrada, pois seu valor nutricional é atingido essencialmente por meio da ingestão diária de alimentos, o que desperta interesse na indústria alimentícia, nutracêutica e farmacêutica (ISLAM et al., 2013; KAUR, 2013; VERMA; TREHAN, 2013; BASHA et al., 2014).

Assim se realça a importância dietética de quercetina para expressão de seus efeitos antioxidantes, como também de seus efeitos antivirais, anticancerígenos, antimicrobianos (bacteriostática), anti-inflamatórios, neuroprotetores, cardioprotetores, hepatoprotetores, protetores do sistema reprodutivo e antiobesidade (ALAM et al., 2014; MAALIK et al. 2014).

Muitas das propriedades terapêuticas da quercetina se devem à atividade antioxidante em células, tecidos e órgãos, sendo um poderoso agente de eliminação de radicais livres, evitando estados de estresse oxidativo (KARUPPAGOUNDER et al., 2013; SCHADICH et al., 2016). Como consequência, manifesta atividades neuroprotetoras em lesão por reperfusão de isquemia cerebral (ANNAPURNA; ANSARI; MANJUNATH, 2013), doenças neurodegenerativas de idade avançada (KARUPPAGOUNDER et al. 2013), doença de Alzheimer (TANGSAENGVIT et al., 2013) e agente antiestresse (TIWARI et al., 2015).

Essa molécula também tem o papel de agente antihipertensivo ao reduzir a pressão arterial por meio na inibição da enzima conversora de angiotensina, auxiliar na prevenção da aterosclerose (KAUR, 2013), melhorar desequilíbrios hemodinâmicos e metabólicos induzidos por alta ingestão de sal (OLALEYE et al., 2014) e regular fatores mediadores da pressão arterial, como adesão vascular, resistência vascular periférica e volume sanguíneo total (MARUNAKA et al., 2017).

Essa propriedade de inibição da atividade enzimática e da prevenção da acumulação de espécies reativas de oxigênio realizada pelos flavonoides, como a quercetina, os tornam candidatos favoráveis para serem explorados também como um novo gênero de drogas anticancerígenas, sendo que entre os tipos de

flavonoides a estrutura dos flavonois é mais conveniente do que as flavonas em relação à afinidade de ligação da catalase e demais enzimas. Alguns dos fatores que podem influenciar na ligação e na inibição é o numero de hidroxilas presentes na estrutura (MAJUMDAR; DAS; SAHA, 2017).

Nesse contexto, a quercetina é reconhecida por ser um polifenol que proporciona inibição do crescimento de muitos tipos de tumores com ação reconhecida em células neoplásicas de cabeça, de pescoço (CHANG et al., 2013) e de próstata. Além de não apresentar toxicidade frente às células não neoplásicas mesmo em grandes doses e manifestar relevantes efeitos quimioterapêuticos e quimiopreventivos (YANG et al., 2015).

Esse flavonoide proporciona também inibição de enzimas que ativam agentes cancerígenos e alteração dos caminhos de transdução de sinal, ao interagir com receptores de células regulatórias, apresentando potencial para tratamento do câncer via antiangiogênese (BASHA et al., 2014).

Esse flavonoide natural também tem efeitos benéficos em órgãos como pulmões e fígado, manifestando atividade pneumoprotetora contra fibrose pulmonar (VERMA et al., 2013) e esteatohepatite (SURAPANENI et al., 2014), respectivamente. Sua ação hipoglicêmica também tem consequência na estabilização da secreção prolongada de insulina (MUKHOPADHYAY; PRAJAPATI, 2015).

Outra característica da maioria dos flavonoides é a de serem agentes quelantes de metais. Um exemplo é o complexo quercetina-térbio, este por sua vez apresentou habilidade de doar átomos de hidrogênio que vieram a reagir com radicais livres; no entanto, tal ação quelante diminuiu o potencial redox do complexo quercetina-metal (DOLATABADI et al., 2014). Outro modelo é o complexo quercetina-magnésio, que apresentou atividade antioxidante aprimorada em relação à quercetina livre (GHOSH et al., 2017). Tais complexos são considerados uma classe de fármacos naturais que cada vez mais vêm despertando interesse farmacológico. Íons metálicos como Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ e Zn²⁺ podem formar complexos com a quercetina, no entanto, é importante mencionar que suas estabilidades são estritamente dependentes dos íons metálicos utilizados (LIU; GUO, 2015).

A quercetina apresenta características intrínsecas de uma molécula com propriedades adequadas para exercer papel de fármaco, como é o caso da baixa toxicidade e da boa absortividade e afinidade de ligação com o receptor (ISLAM et al., 2013). No entanto, alguns inconvenientes limitam as suas aplicações terapêuticas, como é o caso da sua biodisponibilidade oral, solubilidade aquosa e permeação baixas, digestão gastrointestinal e metabolismo dentro do corpo rápidos e taxa de metabolismo de primeira passagem alta (NAM et al., 2016).

Assim, diversos tipos de veículos nanotecnológicos vêm se mostrando promissores em contornar tais limitações, como é o caso da incorporação desse flavonoide em nanoformulações de polímeros, lipossomas, quitosana e sílica (NAM et al., 2016). Outros transportadores nanoestruturados que também veicularam quercetina apresentam origens lipídicas (HUANG et al., 2017b), poliméricas biodegradáveis (MUKHOPADHYAY; PRAJAPATI, 2015) e metálicas (DAS et al., 2013b).

Dessa maneira, a nanotecnologia surgiu como uma ferramenta para produção de sistemas visando melhorar as propriedades da quercetina e conforme mencionado por Hao e colaboradores (2017), o encapsulamento desse metabólito secundário em lipossomas revestidos de quitosana melhorou a proteção do flavonoide contra a degradação, aumentou sua biocompatibilidade, favoreceu sua estabilidade de armazenamento e atividade antioxidante, bem como aumentou sua dissolução. Outro caso é da quercetina encapsulada em nanoestruturas de beta-lactoglobulina e alginato de sódio que alcançou maior proteção, com liberação sustentada no fluido intestinal, mas não no fluido gástrico, servindo de uma boa oportunidade para incorporação no campo dos nutracêuticos (MIRPOOR et al., 2017).

Podem ser destacados também como efeitos produzidos por nanoestruturas contendo quercetina a manifestação de atividades antiproliferativas em diversos tipos de células cancerígenas (NAM et al., 2016), atividade antiedematosa (HÄDRICH et al., 2016), cicatrização de feridas elevada, biocompatibilidade ótima na presença de fibroblastos e excelente atividade bactericida, com possibilidade de direcionamento para engenharia de tecidos (VEDAKUMARI et al., 2017). Além de

também apresentar propriedades indicadoras de pH, serem altamente fluorescentes e antioxidantes (PATRA et al., 2017).

Além da quercetina também se têm demais exemplos da utilização de metabólicos isolados para produção de nanossistemas, como é o caso da produção de AgNPs a partir da redução de íons prata pelas moléculas de ácido ascórbico (vitamina C) (MATOS, 2016) e certamente o uso de quercetina como agente redutor e/ou estabilizante de AgNPs constitui uma abordagem bastante promissora em processos de síntese verde.

1.6 Aplicações das nanopartículas de prata em áreas biomédicas

Em relação aos campos de aplicação para as AgNPs é importante considerar que de acordo com suas características de tamanhos, formas, cargas e etc, são determinadas as aplicações mais apropriadas, e portanto essa diversidade de parâmetros é de grande interesse para indústria (ABBASI et al., 2016).

Produtos contendo AgNPs estão sendo bastante utilizados no setor comercial de desodorantes, sabões, detergentes, desinfecção de ambientes, sistemas sanitários, filtros de água, preservação e armazenamento de alimentos, revestimentos têxteis (MANJUMEENA et al., 2014; BALLARIN et al., 2015; ABBASI et al., 2016), cosméticos, tintas, mecânica, emissores de luz, indústria química (REMYA et al., 2017) e tratamentos de poluentes ambientais (propriedade catalítica) (MATA; NAKKALA; SADRAS, 2015b).

Além disso, o uso de AgNPs é bem explorado na área de eletrônica com filmes eletrônicos transparentes, condutores, fibras, eletrodos e películas finas flexíveis com células solares (HAIDER; KANG, 2015); assim como também as propriedades ópticas diferenciais das AgNPs permitem suas detecções em limites muito baixos, por meio de vários métodos como colorimétrico e SERS, o que oportuniza suas aplicações para detecções e imagens (SHENASHEN; SAFTY; ELSHEHY, 2014).

No tocante às aplicações biomédicas, a estabilidade coloidal e a biocompatibilidade nos ambientes biológicos são fatores importantes a serem considerados (ZARSCHLER et al., 2016). Já existem exemplos de aplicações das AgNPs na ciência molecular (HAIDER; KANG, 2015), em medicações locais

específicas (GOYAL et al., 2016), sensores para diagnósticos de doenças, detectores de metais pesados e produtos químicos e biológicos (KIRUBAHARAN et al., 2012; SHENASHEN; SAFTY; ELSHEHY, 2014; KAHN et al., 2015), entrega de drogas (AUSTIN et al., 2014), radioterapia (WU et al., 2015) e catalisadores para redução de corantes, como o azul de metileno (EDISON; SETHURAMAN, 2012). Também já foram comprovadas suas atividades antimicrobianas, antiparasitárias e antifúngicas contra uma vasta gama de microrganismos (SRIKAR et al., 2016).

Exemplos individuais são destacados nas atividades antiplasmodiais (tratamento da malária), antivirais com ação na inibição do vírus da dengue (BENELLI, 2016b), HIV (*human immunodeficiency virus*), hepatite B e influenza (WEI et al., 2015), assim como em revestimentos antibacterianos para aplicações clínicas em curativos de feridas e queimaduras, catéteres, implantes cardiovasculares, ortopédicos e compósitos dentários para prevenções (HE et al., 2016).

Também podem ser encontradas AgNPs sintetizadas por rotas verdes que apresentam atividades biológicas marcantes, como os efeitos larvicidas frente às larvas dos mosquitos vetores da malária, dengue e encefalite japonesa (GOVINDARAJAN et al., 2016), antiangiogênicos (BAHARARA et al., 2014) e citotóxicos (KATHIRAVAN; RAVI; ASHOKKUMAR, 2014).

Embora seus mecanismos de ações ainda não estejam complemente esclarecidos, já há uma evolução nessa direção, pois alguns relatos na literatura relacionam tais efeitos com a capacidade de liberação dos íons de prata, produção de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs), interações com lipídeos, proteínas e DNA que culminam em danos oxidativos nas membranas celulares, organelas e núcleo, tendo consequências tóxicas, inflamatórias e mortes celulares por necrose ou apoptose (DURÁN et al., 2016).

No entanto, mesmo frente aos benéficos já atestados pela utilização de AgNPs, alguns inconvenientes foram evidenciados pelas suas exposições excessivas, como descoloração da pele ou dos olhos (DRAKE; HAZELWOOD, 2005), danos às células epiteliais (STOEHR et al., 2011), danos ao DNA, perturbações genéticas e alterações metabólicas. A toxicidade das AgNPs está relacionada aos seus tamanhos, formas, frequências de exposições, concentrações,

métodos de sínteses, agentes de coberturas, tipos celulares e organismos teste (WEI et al., 2015; SILVA; LUQUEÑO; VALDEZ, 2016).

Assim, com o intuito de minimizar as chances de reações imunes ou efeitos colaterais adversos, diversos aspectos devem ser considerados em relação às suas aplicações em pesquisas clínicas, como as fontes materiais utilizadas, métodos de síntese selecionados, estabilidade, liberação controlada, biodistribuição, bioacumulação, efeitos a curto e em longo prazo, toxicidade para os seres vivos e meio ambiente (ZHANG et al., 2016).

1.6.1 Atividade citotóxica e melanoma

Uma das temáticas mais estudadas atualmente na chamada nanomedicina é a eventual citotoxicidade das AgNPs (HAIDER; KANG, 2015). Sabe-se que várias propriedades físicas e químicas desse nanomaterial influenciam nos seus potenciais efeitos citotóxicos e demais atividades biológicas, tais como: tamanho, forma, morfologia, composição, cobertura, estado de aglomeração, dissolução, reatividade, taxa de liberação dos íons prata e tipo celular. E ainda que quanto menores as partículas, maiores serão suas áreas superficiais relativas e também os seus potenciais efeitos tóxicos devido à reatividade aumentada (JOHNSTON et al., 2010; PARK et al., 2011; POWERS et al., 2011; LOZA et al., 2014). Tais toxicidades tornam as AgNPs promissoras no tratamento de canceres humanos (WEI et al., 2015) e as suas respostas celulares frente às exposições dependem, entre outros fatores, da dose e do tempo de exposição (GAILLET; ROUANET, 2015).

As ações anticancerígenas das AgNPs muitas vezes são atribuídas às suas capacidades de comprometerem as membranas celulares, gerarem EROs e pela ação dos íons Ag⁺ deteriorarem as proteínas e o DNA. Assim, têm despertado interesse em aplicações nos tratamentos de leucemia, carcinoma hepatocelular, câncer de pulmão e carcinoma oral (WEI et al., 2015). Além desses, AgNPs tiveram seus efeitos citotóxicos *in vitro* comprovados contra linhagens celulares de câncer de cólon humano COLO 205 (MATA; NAKKALA; SADRAS, 2015a), adenocarcinoma humano HT-29 (ARUNACHALAM et al., 2015), câncer de mama humano (MCF 7) (RAMAR et al., 2015) e melanoma (RIVERA et al., 2013).

Além das AgNPs, alguns outros nanossistemas também têm desempenhado atividades citotóxicas frente às linhagens celulares de melanoma, como nanopartículas de cobre (CHAKRABORTY; BASU, 2017) e de oxido de zinco (ALARIFI et al., 2013). As atuações em casos de melanoma metastático também podem ser obtidas com as nanoconchas de ouro (BEAR et al., 2013), nanopartículas de gadolínio (KOTB et al., 2016) e de policaprolactona revestidas com quitosana (NECKEL et al., 2015).

Os melanomas são tumores originados por proliferações e diferenciações malignas dos melanócitos que podem se manifestar em lesões pigmentadas ou em regiões de pele normal. Os principais fatores de risco associados a essa neoplasia são a exposição excessiva ao sol, pele branca, fatores genéticos, história familiar de câncer de pele, xeroderma pigmentoso e nevos congênitos e displásicos (CASTILHO; SOUSA; LEITE, 2010).

Ainda que esse tipo de câncer seja mais frequente em indivíduos adultos e brancos, e embora seja o de menor incidência entre os cânceres de pele, ele merece atenção clínica especial pelo seu potencial agressivo elevado e metastático, o que justifica sua letalidade alta. Além disso, é considerado o tumor de maior evolução no número de registros das ultimas décadas (TROTTER et al., 2013).

Com relação à localização, além da pele, o melanoma pode surgir nas outras mucosas, nos olhos e no sistema nervoso; podendo receber diferentes classificações, dentre elas a de melanoma superficial, nodular, lentigo maligno e acral lentiginoso (VOLKOVOVA et al., 2012).

A progressão desse tumor acontece primeiramente de forma horizontal, ou seja, espalhando-se superficialmente sobre a pele, tendo a possibilidade de atingir a derme papilar superior. No entanto, a multiplicação desordenada dessas células neoplásicas eleva o potencial invasivo da doença para tecidos adjacentes, propiciando a progressão vertical e aumentando as chances de metástases para os gânglios linfáticos e demais órgãos (ALONSO et al., 2004; FAURI et al., 2010).

O prognóstico dependerá do estágio de evolução da lesão quando esta é detectada, de modo que a probabilidade de sobrevivência dos pacientes na fase precoce é superior a 90%, 60% no estágio II e 10% no estágio III, sendo até mesmo fatal no estágio IV (MUELLER; BOSSERHOFF, 2009).

Assim, o estágio evolutivo do melanoma, juntamente com o seu grau de invasão e subtipo tumoral são elementos imprescindíveis para a escolha terapêutica, que por sua vez baseiam-se na remoção cirúrgica da área afetada e dos tecidos circundantes, quimioterapia, radioterapia ou terapia biológica (imunoterapia). Tais procedimentos podem ser adotados de forma isolada ou associados (GARBE et al., 2010) e a nanotecnologia tem surgido como uma área promissora no que tange a novas estratégias terapêuticas para melanomas.

1.6.2 Atividades antioxidante e hemolítica

O corpo humano produz defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas capazes de neutralizar as ameaças de radicais livres e demais oxidantes, evitando o estresse oxidativo (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013). Entende-se por estresse oxidativo a situação em que há um desequilíbrio entre a geração de oxigênio e nitrogênio reativos e o potencial de defesa antioxidante. A impossibilidade dos antioxidantes endógenos em neutralizarem as EROs faz com que estas danifiquem lipídeos, proteínas e DNA, sendo que tais danos oxidativos podem estar relacionados com inúmeras doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, neoplásicas e também com o envelhecimento (ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

A ingestão de alimentos com propriedades antioxidantes é muito importante para promoção da saúde, principalmente os de origens naturais, como frutas e vegetais. Exemplos de frutas conhecidas por serem fontes ricas em antioxidantes são romã, manga, maça, laranja, batata, jabuticaba e jamelão (PARASHAR; SHARMA; GARG, 2014). Algumas das classes de fitoquímicos encarregadas de exercerem atividades antioxidantes são: diterpenos fenólicos (carnosol, ácido carnósico e rosmanol), flavonoides (quercetina, catequina, naringenina e kaempferol), ácidos fenólicos (ácidos gálico, protocatecuico, caféico e rosmarínico), pigmentos (antocianina e antocianidina) e óleos voláteis (eugenol, carvacrol, timol e mentol) (BREWER, 2011).

Por outro lado, é possível atestar também atividades antioxidantes elicitadas por nanomateriais, como AgNPs (AZIZ et al., 2014), nanopartículas de quitosana recobertas com PLGA (ácido lático-co-ácido glicólico) (ALQAHTANI et al., 2015), nanopartículas de ouro (SATHISHKUMAR et al., 2016a) e nanopartículas de óxido

de zinco (NETHRAVATHI et al., 2015), além de nanoemulsões (HA et al., 2015) e de lipossomas (FENG et al., 2016).

Os antioxidantes desempenham papel de agentes quelantes ao doarem íons de hidrogênio para os radicais de oxigênio, proporcionando diminuição da oxidação (PISOSCHI; POP, 2015). Ademais, a atividade antioxidante de um composto se dá não somente por sua capacidade em eliminar radicais livres e efeitos redutores, como também por regular positivamente as defesas antioxidantes e as enzimas desintoxicantes, modular a sinalização das células redox e a expressão gênica, além de poder retardar, evitar ou suprimir a formação de radicais livres e o dano oxidativo. No entanto, alguns fatores podem interferir na expressão dessa atividade, como reatividade dos antioxidantes frente aos radicais livres, abundância de radicais livres e liposolubilidade dos antioxidantes (ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

Diversos métodos são adotados pra avaliar a atividade antioxidante, isso acontece por meio de métodos químicos, celulares e com organismos vivos (animais e humanos). Os métodos *in vitro* com substâncias químicas, em geral, envolvem a eliminação de radicais livres estáveis, redução de íons metálicos, métodos competitivos e oxidação de LDL (lipoproteínas de baixa densidade). Exemplos disso são os ensaios para medir o potencial de eliminação de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), H₂O₂ (peróxido de hidrogênio), óxido nítrico, peroxinitrito e radical hidroxila; potencial de redução da oxidação férrica e cúprica, fosfomolibdênio, ácido tiobarbitúrico, xantina oxidase; e atividade quelante de metais. Nos modelos com organismos vivos (vertebrados), a medida normalmente ocorre com testes de capacidade de redução férrica do plasma; estimativas de glutationa reduzida, redutase, peroxidase, S-transferase, além de ensaios de dosagens de superóxido dismutase, catalase e peroxidação lipídica e LDL (lipoproteína de baixa intensidade) (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013).

Ensaios que avaliam a redução química de íons metálicos e consequentes formações de nanopartículas como indicativo de atividade antioxidante também constituem uma opção analítica eficiente para amostras de extratos vegetais, ervas, chás, polifenóis e vitaminas; visto que há uma correlação entre a capacidade de um composto em doar hidrogênios ou elétrons, reduzindo de íons metálicos e a intensidade da manifestação de bandas de absorção de RPS, características de

nanopartículas formadas. Situações atestadas por Özyürek e colaboradores (2012) e Scampicchio e colaboradores (2006) ao observarem os maiores potenciais antioxidante de compostos de reduzirem íons prata e ouro, respectivamente, nos maiores rendimentos para formação de nanopartículas de prata e ouro.

Por outro lado, as avaliações das atividades antioxidantes celulares ocorrem por meio de análises das manifestações de enzimas antioxidantes e das inibições de enzimas pró-oxidantes, assim como a ativação ou a supressão de fatores da transcrição redox (ROY et al., 2009; SONG et al., 2010).

Sob outra perspectiva, a avalição da atividade hemolítica constitui outro teste muito importante de ser realizado, principalmente quando se almeja aplicações de substâncias e nanomateriais em práticas clínicas, pois a biocompatibilidade e a menor manifestação de efeitos colaterais adversos são considerados elementos relevantes para o sucesso da ação terapêutica, sendo a hemólise um dos inconvenientes mais prejudiciais nesse sentido. A hemólise é um fenômeno desencadeado pela interação de compostos com os eritrócitos, ocasionando danos às suas membranas e consequente lise celular e liberação de hemoglobina. Uma de suas implicações clínicas *in vivo* é a anemia, que uma vez estabelecida de forma intensa pode ser fator de predisposição para patologias cardíacas, cardiovasculares e pulmonares (JESWANI et al., 2015). Segundo Pavan e colaboradores (2014), também há uma forte ligação entre a atividade hemolítica e a inflamatória.

Os mecanismos de hemólise não estão completamente esclarecido, até porque pode ser desencadeado de diferentes maneiras, porém sabe-se que um dos caminhos que levam as hemácias a entrarem em hemólise é o inchaço osmótico, caracterizado pelo aumento da permeabilidade das membranas a íons pequenos, o que ocasiona aumento de volume por influxo de água em uma tentativa de equilibrar a pressão osmótica celular, sucedendo para o rompimento físico das hemácias (LIJAKOVIC, 2015).

Algumas estratégias farmacotecnológicas são adotadas para evitar e/ou reduzir que fármacos desencadeiem processos hemolíticos, como é o caso da conjugação de polímeros (p. ex. peguilação), utilização de transportadores coloidais (p. ex. micelas poliméricas) e hidrogeis, microencapsulação (p. ex. nanoemulsões), coadministração de agentes botânicos e modificação química-molecular dos

fármacos. Dentre esses, na coadministração de agentes botânicos, as amostras biológicas atuam de forma secundária com a finalidade de proteger e fortalecer as membranas eritrocíticas (JESWANI et al., 2015). Extratos de plantas como *Clinacanthus nutans* (PANNANGPETCH et al., 2007), *Maytenus royleanus* (SHABBIR; KHAN; SAEED, 2013) e *Psidium guajava* (THEPHINLAP et al., 2013) já tiveram seus efeitos protetores de hemácias averiguados e por isso têm pesquisas direcionadas para investigar os efeitos da coadministração de seus extratos com compostos farmacológicos com potencial hemolítico. Em contrapartida, extratos vegetais ricos em saponinas são desaconselhados, visto o potencial hemolítico desse fitocomposto (AMINI et al., 2014).

Algumas nanopartículas também apresentam expressivas atividades hemolíticas, como as de óxido de alumínio (VINARDELL et al., 2015) e à base de albumina para entrega de fisetina (GHOSH et al., 2016). Ao tempo que não foram evidenciadas as mesmas reações com nanopartículas de PLGA (FORNAGUERA et al., 2015) e dióxido de titânio (NATARAJ et al., 2014). Cho e colaboradores (2014) verificaram que a capacidade hemolítica de nanopartículas é associada aos seus potenciais Zeta e ao seu estado de funcionalização. Enquanto que Chen e colaboradores (2015) e Raja e colaboradores (2016) relacionam a tendência em lesionar células vermelhas aos tamanhos e às concentrações dos nanossistemas, respectivamente.

1.7 Aplicações da nanotecnologia em áreas agrícolas

As propriedades diferenciais dos nanossistemas também abrem um leque de perspectivas para inserção da nanotecnologia nas mais diversas áreas da agricultura, por proporcionar a melhora na produção e no rendimento agrícola (HUANG et al., 2015) ao oportunizar o aperfeiçoamento da qualidade e da segurança de alimentos e recursos naturais de modo sustentável, diminuindo os insumos agrícolas, inserindo uma menor concentração de produtos químicos no solo e aumentando a oferta de nutrientes térreos. Além de ter como base minimizar os danos aos solos, às águas e saúde dos manuseadores e futuros consumidores (PRASAD et al., 2017).

A inovação tecnológica da utilização de nanomateriais na agricultura traz a possibilidade de realizar o controle de pragas (p.ex. insetos e microrganismos) por meio de nanopesticidas, viabiliza uma maior capacidade de absorver nutrientes com os nanofertilizantes (CHHIPA, 2017), permite o diagnóstico rápido de fitopatologias e avalia o percentual de nutrientes, contaminantes e a qualidade do solo com nanosensores e nanobiosensores (KUMAR; GULERIA; MEHTA, 2017); além de utilizados em embalagens rotulagem de alimentos serem е (BUMBUDSANPHAROKE; KO, 2015). Exemplos dos tipos de nanomateriais já empregados na agricultura são as nanopartículas de ouro, ferro, prata, quitosana, argila, óxido de zinco, dióxido de titânio, sílica; os nanotubos de carbono; os nanocompósitos em geral; e diversas substâncias nanoencapsuladas (PETERS et al., 2016).

Há também a importância de se pesquisar a biodisponibilidade e a durabilidade dos nanopesticidas e nanomateriais aplicáveis à agricultura de uma maneira geral, suas toxicidades e seus efeitos sobre a saúde humana e o meio ambiente, para exploração desses recursos tecnológicos de forma mais segura e sustentável (KAH; HOFMANN, 2014).

1.7.1 Controle de fitonematoides por recursos nanotecnológicos

Nesse contexto surgiu a possibilidade de utilizar recursos nanotecnológicos para tentar minimizar os obstáculos advindos das escolhas terapêuticas empregadas para controle de nematoides, visto que os métodos existentes não são muito eficientes. A utilização de nanomateriais traria as vantagens de apresentarem tamanhos pequenos, relação superfície/volume grande e proporcionarem uma liberação lenta, controlada e direcionada de ativos por um período mais prolongado. Já se tem a comprovação que diversas nanopartículas exibiram efeitos expressivos contra fitopatologias provocadas por bactérias, fungos e nematoides (BHAU et al., 2016; SANTIAGO; SILVA, 2017).

A proposta da inserção da nanotecnologia no manejo de nematoides objetiva proteger os agentes nematicidas da degradação e melhorar suas solubilidades, permeabilidades e estabilidades, além de diminuir o uso indiscriminado de pesticidas convencionais, pelo propósito de reduzir as doses de aplicações, o que minimiza os

impactos sob o meio ambiente e a exposição humana, conferindo uma administração mais segura (NURUZZAMAN et al., 2016). A aplicação desses nanossistemas é considerada deveras promissora, uma vez que possibilita uma permeação superior através da cutícula do fitoparasita com liberação lenta e controlada de princípios ativos nos alvos. Além disso, nanomateriais constituem uma formidável opção para o carreamento de pesticidas hidrofóbicos e instáveis em condições experimentais normais, dependendo dos materiais utilizados para produzir as nanopartículas (XU et al., 2014).

Alguns exemplos de substâncias que tiveram sucesso para nanoencapsulação de substâncias e no controle de pragas na agricultura são os polímeros, sílica porosa e argila (NURUZZAMAN et al., 2016), como é o caso das nanopartículas poliméricas fungicidas (XU et al., 2014) e as nanocápsulas nematicidas contendo lansiumamida B contra *Bursaphelenehus xylophilus* e *Meloidogyne incognita* (YIN et al., 2012); além das nanopartículas de óxido de grafeno testadas contra *M. incognita* (GUROO et al., 2016).

A avaliação nematicida de nanossistemas contra *Meloidogyne* spp. também foi realizada com nanopartículas de óxido de silício (SiO₂NP), que por sua vez não apresentaram capacidade de promover a mortalidade de *M. incognita* juvenis de segundo estágio (J2); com nanopartículas de óxido de titânio (TiO₂NP) que se mostraram ineficientes para esta atividade, sendo capazes de promover uma mortalidade de J2 inferior a 5%; enquanto que AgNPs foram responsáveis pela mortalidade de 100% dos indivíduos J2. Nos testes em solo contendo plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) como modelo vegetal infectado, foi provado que tanto AgNPs como as TiO₂NP controlaram a infecção por *M. incognita*. Também foram certificados efeitos tóxicos dessas nanopartículas em tomateiros ao observarem diminuições de raízes, caules e pesos dessas plantas (ARDAKANI, 2013).

Esses resultados corroboram com aqueles obtidos por Cromwell e colaboradores (2014) que comprovaram os efeitos de AgNPs, sintetizadas por via química, de inativarem os J2 de *M. incognita* em 6h e apresentarem atividade nematicida em solo, contendo dois tipos de gramíneas (*Cynodon dactylon* e *C. transvaalensis*) infectadas com *M. graminis*, ao diminuírem significativamente a

quantidade de J2 e reduzirem a formação de galhas, além de elevarem a qualidade das gramíneas e não induzirem toxicidade para as plantas.

Nesse contexto, é importante destacar a importância da utilização de tecnologia verde para produção de sistemas nanométricos para controle de pragas agrícolas, uma vez que tal abordagem tem como proposta trazer uma contribuição importante para redução de riscos ambientais e exposição humana (NURUZZAMAN et al., 2016). De modo que as nanopartículas metálicas sintetizadas por vias biológicas surgem como uma estratégia promissora para aplicações nematicidas, como foi relatado por Nassar (2016) ao observar a atividade nematicida marcante de AgNPs produzidas por extratos de *Urtica urens* contra ovos e larvas (J2) de *M. incognita*.

As AgNPs produzidas a partir do extrato aquoso bruto da microalga verde *Parachlorella kessleri* também se destacaram ao matarem 100% dos *M. incognita* J2 (HAMED et al., 2016). Em tratamentos de solo, esses efeitos foram perpetuados com AgNPs sintetizadas com extratos de algas, *Ulva lactuca* e *Turbinaria turbinata*, ao ser constatada diminuição das populações de *M. javanica* (J2) presentes em berinjelas cultivadas em estufas. Além disso, os tratamentos propiciaram o melhor crescimento e sem causar toxicidade para as plantas (ABDELLATIF; HAMOUDA; ANSARY, 2016). Ademais, Sharaf e colaboradores (2016) relataram aumento das concentrações de clorofila em tomateiros infectados por *M. incognita* e tratados de maneira eficaz com AgNPs biossintetizadas por *Streptomyces cyanoalbus*.

1.7.2 Atividade nematotóxica e Meloidogyne incognita (nematoide de galha)

A infecção por nematoides ataca em algum nível praticamente todas as espécies de plantas cultivadas, sendo hoje considerada a maior causa biótica de estresse vegetal e de perdas de colheitas. Nematoides estão difundidos globalmente e têm nas raízes os seus principais alvos, locais em que muitos deles desencadeiam as formações de estruturas celulares complexas, denominadas de galhas, sendo assim conhecidos por nematoides das galhas. No entanto, podem estar presentes em diferentes partes das plantas (BIRD; KALOSHIAN, 2003; GAO et al., 2016).

São organismos pequenos, transparentes e as fêmeas adultas apresentam formato de pêra com a ponta um pouco retorcida, enquanto os machos adultos são

vermiformes (ONKENDI, 2012; SHAHAZAD; HUSSNAIN, 2013). Dentre os nematoides de plantas (fitonematoides), o gênero *Meloidogyne* é o mais bem sucedido fitoparasita de todo mundo. De acordo com a classificação taxonômica, os nematoides de galhas pertencem ao Domínio Eukaryota, Reino Metazoa, Filo Nematoda, Classe Chromadorea, Ordem Tylenchida, Superfamília Tylenchoidea, Família Heteroderidae e Gênero Meloidogyne (ABAD et al., 2003).

Nematoides pertencentes ao gênero Meloidogyne têm como plantas hospedeiras monocotiledôneas, dicotiledôneas-lignosae, dicotiledôneas-herbáceas e gimnospermas, contudo, os seus alvos são variáveis entre as diversas espécies do gênero Meloidogyne (RATHORE; TIWARI, 2017). A espécie *Meloidogyne incognita* parasita plantas cultivadas e até silvestres incluindo árvores frutíferas, cereais, vegetais e flores ornamentais. Esse parasitismo interfere significativamente na produção de quiabo (MUKHTAR; HUSSAIN; KAYANI, 2017), cenoura (BONTEMPO et al., 2017), tomate (SAAD et al., 2017), berinjela (HUSSAIN et al., 2015), algodão (SILVA et al., 2014b), soja (ROCHA et al., 2015), beterraba (NAGDI; YOUSSEF, 2015), batata (HAMIDA et al., 2016), entre outras. Representa, assim, um dos patógenos mais danosos para a agricultura e a horticultura. Em relação aos aspectos econômicos, as perdas anuais a nível global em decorrência dos nematoides fitoparasitas são em torno de bilhões de dólares anuais (MENDY et al., 2017).

Ademais foi documentado por Ntidi e colaboradores (2016) que ervas daninhas presentes em estufas, campos e jardins também estão servindo de hospedeiras para *M. incognita*, e que uma vez constatada essa infecção é necessário realizar sua pronta retirada.

No ciclo celular de *M. incognita*, após a eclosão dos ovos, estes se transformam no estádio de juvenis J2 (vermiforme) que tem predileção por adentrar as suas zonas de alongamento das raízes ou as suas regiões de emergências laterais. Posteriormente, eles se movimentam entre as células em direção ao cilindro vascular, desencadeando processos de hiperplasia e hipertrofia dessas células vegetais, fenômenos fundamentais para as organizações dos sítios de alimentação e as formações de galhas. Os nematoides são dependentes dessas estruturas formadas durante todas as etapas do seu desenvolvimento. Se por ventura o sítio de

alimentação se tornar não funcional, o nematoide morrerá (BIRD, 2004; ESCOBAR et al., 2015).

Nesse contexto, as células secretoras das glândulas de *M. incognita* exercem a função importante de liberar proteínas efetoras nas plantas hospedeiras deixando-as mais susceptíveis, sendo que tais proteínas facilitam o parasitismo e manipulam diversos fatores vegetais (RUTTER et al., 2014), além da ação enzimática degradante facilitar o acesso parasitário às paredes celulares das raízes dos hospedeiros juntamente com a perfuração mecânica. A liberação dessas secreções ocorre por meio do estilete (aparato bucal) e também está correlacionada com a indução da diferenciação das células de alimentação, também chamadas de células gigantes (FAVERY et al., 2016).

As etapas seguintes são crucias na relação parasita-hospedeiro e estão relacionadas com transformações drásticas. É quando após três mudas eles se transformam em adultos, e os machos saem das raízes, ao mesmo tempo que as fêmeas permanecem e produzem grandes massas de ovos que serão depositados fora do tecido radicular (NGUYĒN et al., 2014). Esses parasitas se reproduzem por partenogênese meiótica facultativa ou partenogênese mitótica obrigatória, o que garante seu rápido aumento dos níveis populacionais (SERENO; DANCHIN, 2014), além do seu tempo de geração ser inferior a 2 meses (GOVERSE et al., 2000).

Outro fato interessante sobre os estádios de vida do *M. incognita* é que em cada fase eles produzem certos tipos metabólitos. Os ovos realizam mais abundantemente a glicólise e expressam grande quantidade de metabólitos associados ao metabolismo energético; nos J2 há uma maior taxa metabólica que está relacionada com a formação de tecido, mobilidade e neurotransmissão; enquanto que os estádios J3 e J4 apresentam perfis semelhantes com expressões de metabólitos mais direcionados para o metabolismo de aminoácidos e do ciclo de ureia. Já nas fêmeas os metabólitos são referentes à homeostase celular e síntese de ácidos nucléicos (SUBRAMANIAN et al., 2017).

O principal sintoma da patologia causada por *M. incognita* é a formação de galhas nas raízes de hospedeiros susceptíveis proporcionando danos a essas estruturas vegetais. O resultado direto disso é o prejuízo na absorção de nutrientes, que faz com que as plantas fiquem desnutridas, fracas, com rendimento baixo,

reduções das biomassas e componentes bioativos de raízes e folhas, diminuição do perfilhamento, amarelecimento, murchamento e crescimento retardado. As plantas mais jovens são em geral mais vulneráveis que as mais velhas (SAIKIA; TIWARI; PANDEY, 2013; KYNDT; FERNANDEZ; GHEYSEN, 2014; HUSSAIN et al., 2015; SHARMA; SHARMA, 2015).

Além disso, as raízes das plantas danificadas pelos fitonematoides ficam mais propensas ao acometimento por outras infecções secundárias como fusariose, que é causada pelo fungo *Fusarium oxysporum*. Esse fato tem por consequência o agravamento na saúde das plantas e redução das suas tolerâncias ao estresse ambiental (MEENA et al., 2015).

Uma postura fundamental para o êxito no manejo desses fitoparasitas é a sua correta identificação. Exemplos de métodos direcionados para essa finalidade analisam aspectos morfológicos, bioquímicos (p. ex. fenótipo de esterase) e moleculares (p. ex. PCR - reação em cadeia da polimerase, com iniciadores específicos de espécies) (AYDINLI; MENNAN, 2016); assim como investigar a diversidade genética, os mecanismo de parasitismo, as agressividades e as virulências das espécies de *Meloidogyne* presentes nas plantações também são de suma importância para o planejamento das abordagens de controle (ONKENDI et al., 2014; MATTOS et al., 2016).

No Brasil, os esquemas geralmente adotados para manejo dessa parasitose são: rotações de culturas, nematicidas químicos, agentes biológicos, antagonistas naturais e pousios. Nesse cenário visualiza-se gradativamente a substituição de nematicidas químicos por produtos biológicos, solarização, cultivares resistentes (geneticamente modificadas) e alterações orgânicas do solo (BARBARY et al., 2015; NAGARAJU, 2016; BONTEMPO et al., 2017; MUKHTAR et al., 2017).

Todavia, existem teorias recentemente difundidas que acreditam que a não utilização de nematicidas no campo resultará em mais perdas agrícolas e um exemplo de nematicida químico é o brometo de metilo (ONKENDI et al., 2014). O uso de nematicidas químicos é o procedimento mais utilizado por oferecer solução rápida para o controle de nematoides, mas estes têm custos altos, não são ambientalmente amigáveis e têm ações sobre microrganismos não alvo, fauna e flora existente ao redor, podendo também contaminar as águas subterrâneas e

diminuir o ozônio atmosférico. Assim, há necessidade de novas medidas de controle dessa parasitose e de investigações dos seus riscos ambientais e sanitários (PEREIRA et al., 2015). Para mais, os resíduos dos pesticidas estão relacionados com neoplasias, patologias hepáticas, hipertensão, etc, implicando em riscos para saúde dos agricultores e de consumidores dos produtos agrícolas (MUKHTAR; KAYANI; HUSSAIN, 2013).

Uma abordagem que vem sendo estudada é a utilização de fitonematicidas, já que eles têm seus mecanismos de ações nematicidas e/ou nematostáticos voltados para suprimir as densidades populacionais dos nematoides baseado na quimiotaxia, comprometimento da motilidade juvenil, inibição da eclosão dos ovos e mortalidade dos juvenis por paralisia (CABONI et al., 2015). Exemplos disso são extratos de *Armoracia rusticana* (AISSANI et al., 2013), de *Cannabis sativa* (MUKHTAR; KAYANI; HUSSAIN, 2013), de *Canavalia ensiformis* (ROCHA et al., 2017) e dos extratos das raízes e caules de *Fumaria parviflora*, sendo que as ações nematicidas desses últimos podem está atribuídas às presenças de alcaloides, flavonoides, glicosídeos, taninos, saponinas, esteroides e fenóis (NAZ et al., 2013).

Têm-se na literatura relatos de fitoquímicos naturais que atuam de forma antagonista aos nematoides fitoparasitas. Isso porque são compostos encontrados em plantas contendo politienilos, isotiocianatos, glucosinolatos, glicosídeos cianogênicos, poliacetilenos, alcalóides, lipídeos, terpenoides, sesquiterpenos, diterpenos, quassinoides, esteroides, triterpenoides, fenólicos simples e complexos. Podem ser identificados compostos antagonistas de nematoides também em algas e fungos. Esses estudos revelam que o emprego de fitoquímicos na agricultura, embora não seja muito rentável, sinaliza um potencial promissor. Outra diferença entre os pesticidas fitoquímicos e os nematicidas químicos tradicionais é que os primeiros podem apresentar, em sua maioria, maior segurança para o meio ambiente e os seres humanos. A agência de proteção ambiental dos EUA exige uma quantidade menor de dados para registrar um pesticida fitoquímico tradicional e com menores custos (JANG et al., 2016; CHITWOOD, 2002).

Por outro lado, agentes microbianos também são escolhas mais seguras e baratas para o controle biológico de nematoides, é o caso da adoção dos micróbios rizosférico Bacillus megaterium, Glomus intraradices e Trichoderma harzianum

(GUPTA et al., 2015); além do fungo *Pochonia chlamydosporia* (VIGGIANO; FREITAS; LOPES, 2014) e biofertilizantes à base de bactérias fixadoras de nitrogênio, fosfato e potássio (YOUSSEF; EISSA, 2014).

O emprego do manejo orgânico também é uma técnica de custo baixo que acentua a proliferação de microrganismos que por sua vez agem como antagonistas para os fitoparasitas, além da decomposição da matéria orgânica lenta propiciar o depósito de compostos específicos que têm efeitos nematicidas, o que leva à proteção dos cultivos e minimização dos riscos ambientais (AKRAM et al., 2016; ODEYEMI et al., 2016).

O cultivo de plantas geneticamente modificadas e resistentes também constitui uma outra opção na tentativa de diminuir a reprodução de nematoides e suas densidades populacionais, sem ameaçar o meio ambiente e os agroecossistemas, oferecendo custos inferiores às demais medidas de controle (HUSSAIN; MUKHTAR; KAYANI, 2014).

Entretanto, o aparecimento de variedades resistentes torna as diversas medidas de controle ineficazes, o que coloca em risco a segurança alimentar. Outro problema é que muitos países enfrentam a falta de recursos financeiros para tratar e pesquisar novas formas de controle da parasitose (ONKENDI et al., 2014). Além disso, o manejo desse gênero é extremamente difícil, sobretudo em virtude do grande número de hospedeiros possíveis, da taxa de reprodução alta em curtos períodos e da capacidade alta de se adaptarem a pressão de seleção e de desenvolverem cultivares resistente (JIA et al., 2013).

2. JUSTIFICATIVA

A valorização de pesquisas envolvendo recursos naturais da rica biodiversidade brasileira, representada nesse trabalho pelas folhas da árvore P. emarginatus, amplia as informações contidas na literatura sobre os diversos de nanomateriais, proporcionando potenciais para síntese ainda conhecimentos acerca das possíveis aplicações tecnológicas de modo sustentável, como é o caso da utilização de plantas brasileiras em processos nanotecnológicos de química verde. Ainda nessa vertente, a escolha de recursos biológicos, sejam eles cultivados ou disponíveis na natureza, traz à tona também a questão do reaproveitamento de subprodutos na agroindústria, o que é algo muito positivo e viável ambientalmente.

Sendo esse também um elemento norteador de uma das linhas de pesquisa desenvolvidas no Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, que entre outras finalidades visa ao desenvolvimento e realizações de testes biológicos de nanomateriais produzidos por vias ecoamigáveis, almejando produzir pesquisa, desenvolvimento e inovação com sustentabilidade nas áreas biomédicas e agrícolas. O que muito se alinha com os objetivos da Embrapa, ao utilizar de materiais e subprodutos disponíveis na agricultura e na biodiversidade brasileira para pesquisa para geração de conhecimento e tecnologia que possa resultar em inovações tecnológicas especialmente direcionadas para agropecuária brasileira.

Nesse contexto, essa pesquisa prioriza a utilização de matéria prima regional como agente redutor de íons de prata e estabilizadores de AgNPs. Isto estabelece um aspecto favorável, já que Morzelle e colaboradores (2015) visualizam o bioma Cerrado em uma colocação privilegiada por ter em seu território uma imensa quantidade de fontes biológicas renováveis com composições metabólicas diversas e abundantes atribuídas às características climáticas regionais peculiares.

Dito isso, o primeiro capítulo desta Tese teve como intuito avaliar os potenciais que extratos aquosos das folhas de *P. emarginatus* apresentam em produzir AgNPs (NpSB), bem como analisar a influência que variações sazonais eventualmente provocariam no rendimento e nas características desses nanomateriais. Preocupação essa justificada considerando todas as variações

climáticas e ambientais próprias da vegetação do Cerrado (KLINK; MACHADO, 2005), e ainda sabendo que tais fatores abióticos podem influenciar na presença e nas concentrações de biomoléculas e fitoquímicos ativos, acarretando em consequências sobre as biossínteses de AgNPs (MUKHERJEE; PATRA, 2017). Ademais, o conhecimento da relação existente entre essas variáveis auxiliaria na melhor compreensão sobre as condições ótimas de uso nanobiotecnológico para o extrato aquoso de *P. emarginatus*, permitindo que esse possa ser explorado da melhor maneira possível e de acordo com as características das AgNPs que se deseja obter.

A escolha dessa planta se explica pelo fato dela ser uma representante da biodiversidade brasileira com forte incidência no Cerrado, sendo protagonista histórica de relatos na literatura a respeito dos seus inúmeros efeitos terapêuticos em complicações clínicas como inflamações, dores e neoplasias (HANSEN; HARAGUCHI; ALONSO, 2010; DUTRA et al., 2012), além de demonstrarem ações antioxidantes (FORNO et al., 2016) e antimicrobianas contra bactérias (SILVA et al., 2005) e fungos (ROQUE et al., 2015). Tais efeitos farmacológicos somados aos conhecimentos dos principais componentes de suas folhas já identificados: hidrocarbonetos sesquiterpênicos (SANTOS et al., 2010), di-C-glicosilflavonas, C, Oglicosilflavonas, luteolina-7-O-rutinoside, saponinas (NEGRI; MATTEI; MENDES, 2014), esteroides, feofitina e flavonoides (luteolina, kaempferol, quercetina, (+)catequina, quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo, rutina e ácido p-hidroxibenzoico) (MIRANDA et al., 2014); fizeram com que P. emarginatus fosse escolhida e utilizada como organismo vegetal candidato para avaliação do seu potencial como agente redutor de íons de prata e estabilizador de AgNPs recém formadas. Propósito pertinente, dado que até o momento não há relatos sobre a síntese verde de AgNPs a partir de extratos de *P. emarginatus*.

Assim, entre os metais nobres existentes, a prata recebe destaque por suas propriedades diferenciadas, como estabilidade química, atividades catalíticas e antibacterianas (ANDRADE et al., 2015), pouca ou nenhuma reação alérgica em intervenções terapêuticas (RAI et al., 2016) e ter custo baixo considerando as concentrações empregadas (CHENG et al., 2013). Esses benefícios podem ser observados de forma intensificada nas AgNPs, nanomaterial escolhido para

investigação dessa Tese, posto que os seus tamanhos diminutos evidenciam suas reatividades altas pela razão área de superfície/volume grande que disponibilizam alta fração de átomos na superfície, elevando a sensibilidade das interações. Além do delas propiciarem uma maior transferência de elétrons entre as biomoléculas (BONDARENKO et al., 2013), minimizando as chances de toxicidade sistêmica e promoverem uma liberação lenta e controlada de íons e ativos farmacológicos (CHERUKURI et al., 2010).

As AgNPs manifestam também toxicidade baixa para as células humanas (ANTUNES et al., 2013; SOUZA et al., 2013), bem como biocompatibilidade e propriedades eletroquímicas e catalíticas únicas que favorecem suas aplicações clínicas (LIU et al., 2014). Além disso, relatos mencionam as melhorias dos efeitos antimicrobianos (p. ex. bactérias, fungos e nematoides) (AHN et al., 2014; AGHAMOOSA; SABOKBAR, 2014; GURUNATHAN et al., 2014) e citotoxicidade em células neoplásicas (ZHANG; SHEN; GURUNATHAN, 2016) das AgNPs em relação aos íons prata.

Assim, os dados do segundo capítulo abrangem as investigações das possíveis atividades citotóxicas (melanomas cutâneos e células não neoplásicas), antioxidantes, hemolíticas, antibacterianas e nematotóxicas (*M. incognita*) das NpSBs, mirando possíveis aplicações terapêuticas para patologias que comprometem a saúde de seres humanos e também, em outra vertente, que acometem as plantas.

No que se refere às doenças humanas, há necessidade real de novas alternativas terapêuticas para o câncer de pele tipo melanoma, tendo em vista sua gravidade e as opções de tratamento serem ineficientes, além de apresentarem efeitos colaterais indesejáveis e comprometedores da adesão do paciente (NIKOLAOU et al., 2012). E ainda sabendo que em células neoplásicas há um desequilíbrio oxidativo (ZHU et al., 2014), ensaios de atividades antioxidantes das NpSBs se tornam bastante oportunos, assim como realizações de testes hemolíticos para avaliação da possível toxicidade em células vermelhas do sangue. Por outro lado, posto que as AgNPs têm ações bactericidas consagradas (FRANCI et al., 2015), então também cabe uma verificação se as AgNPs sintetizadas a partir do extrato de *P. emarginatus* seguem a mesma tendência.

No caso das patologias que acometem as plantas, a fitopatologia denominada Meloiginose é uma boa representante daquelas causadas por agentes da classe dos fitoparasitas, por ser a maior causa biótica de estresse vegetal e por ocasionar perdas de colheitas, sendo o nematoide *M. incognita* o maior protagonista da penetração de raízes de plantas, tendo como consequências a desnutrição, murchamento, redução da biomassa, crescimento retardado e rendimento baixo de vegetais, implicando em perdas econômicas de bilhões de dólares no setor agrícola, por atacar em algum nível praticamente todas as espécies de plantas cultivadas (HUSSAIN et al., 2015; GAO et al., 2016).

Por fim, o terceiro capítulo traz em voga uma questão atual em química verde: a possibilidade de realizar a síntese de AgNPs utilizando de um único agente redutor e estabilizante, ao invés do uso de extratos complexos contendo múltiplos compostos. Essa abordagem tem o propósito de melhorar o rendimento da síntese, aumentar sua reprodutibilidade, ter um maior controle sobre as condições reacionais, entre outros. Nessa direção, esse capítulo teve a intenção de avaliar a capacidade de formação de AgNPs a partir da utilização de quercetina. A escolha da quercetina se deu em virtude de ser um dos metabólitos secundários previamente identificados nas folhas de *P. emarginatus* (MIRANDA et al., 2014) e por ter sua ação antioxidante conhecida (WANG et al., 2016), o que permitiria o eventual conhecimento do papel de pelo menos um dos metabólitos secundários da planta na formação de AgNPs.

Além disso, conhecer as propriedades físicas e químicas das AgNPs formadas por soluções de extratos e por soluções formadas por apenas um metabólito, será muito importante para definição das melhores composições dos agentes redutores, considerando suas potencialidades na formação de AgNPs, bem como seus efeitos possíveis biológicos. E ainda, esse estudo abre também uma perspectiva para a exploração futura de outros componentes dos extratos, os quais podem estar associados no processo de síntese verde de AgNPs.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o potencial de extratos aquosos das folhas de *P. emarginatus* (sucupira branca) na formação de AgNPs e nas expressões dos potenciais efeitos citotóxicos, antioxidantes, hemolíticos e nematotóxicos desses nanossistemas; bem como verificar o potencial de um metabólito secundário presente nas folhas de *P. emarginatus* na síntese de AgNPs para fins fitonematotóxicos.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar AgNPs (NpSBs) utilizando extratos aquosos das folhas de P.
 emarginatus (sucupira branca) coletadas nas estações de verão chuvoso e de inverno seca no Cerrado (Goiás) (Capítulo I);
- Caracterizar as NpSBs por meio de técnicas físicas e químicas baseadas em análises de mudanças das colorações dos meios reacionais, espectrofotometria na região do visível (Vis), espalhamento de luz dinâmico (DLS), potencial Zeta, microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia de força atômica (MFA), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectrometria de massa MALDI-TOF e difração de raios-X (DRX) (Capítulo I);
- Avaliar a viabilidade de linhagens celulares de melanoma murino (B16F10),
 fibroblasto murino (NIH 3T3) e queratinócito humano (HaCaT) frente às exposições
 in vitro com as NpSBs (Capítulo II);
- Investigar a capacidade antioxidante in vitro das NpSBs (Capítulo II);
- Averiguar o potencial hemolítico in vitro das NpSBs (Capítulo II);
- Analisar a atividade microbiológica das NpSBs frente às bactérias Staphylococcus aureus ATCC 29213, Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 e Escherichia coli ATCC 25922 (Capítulo II);

- Avaliar os efeitos nematotóxicos in vitro das NpSBs sobre a viabilidade de M.
 incognita juvenis de segundo estádio (J2) (Capítulo II);
- Sintetizar AgNPs utilizando um metabólito secundário (quercetina) encontrado nas folhas de *P. emarginatus* NpQ e realizar suas caracterizações por meio de técnicas físicas e químicas baseadas em análises de mudanças das colorações dos meios reacionais, espectroscopia UV-Vis, DLS e potencial Zeta (Capítulo III);
- Avaliar os efeitos nematotóxicos in vitro e em solo das NpQ sobre a viabilidade de M. incognita juvenis de segundo estágio (J2) e utilizando A. thaliana como planta modelo in vivo para verificação da eficácia de controle (Capítulo III);
- Analisar as morfologias dos M. incognita (J2) tratados in vitro com NpQ (Capítulo III);
- Verificar as influências das exposições com NpQ sobre a germinação de sementes de A. thaliana tipo selvagem (Col-0) e sobre o crescimento de suas plântulas (Capítulo III);
- Averiguar os níveis de ploidia dos núcleos das raízes expostas com NpQ e crescidas in vitro e em solo (in vivo) (Capítulo III).

<u>Capítulo I</u>: Síntese de nanopartículas de prata utilizando extratos aquosos I
 das folhas de *Pterodon emarginatus* (sucupira branca)

Giselle Zayra da Silva de Oliveira^{1,2}, Cláudio Afonso Pinho Lopes³, Marcelo Henrique Sousa⁴, Luciano Paulino Silva^{1,2}

¹Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO), Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, Universidade de Brasília – UnB, Brasília-DF, Brasil.

³Laboratório de Microscopia Eletrônica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília - UnB, Brasília-DF, Brasíl.

⁴Grupo de Nanotecnologia Verde, Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brasil.

RESUMO

A produção de nanopartículas metálicas por rotas de síntese verde consiste na utilização de extratos de tecidos de plantas ou de outros organismos vivos que contêm moléculas capazes de atuar como agentes redutores e estabilizantes desse processo. Tendo em vista que fatores ambientais podem influenciar na disponibilidade de metabólitos secundários nas plantas, o objetivo do presente capítulo I foi avaliar o potencial dos extratos aquosos de folhas de Pterodon emarginatus (sucupira branca) coletadas nas estações de verão (chuvosa) e de inverno (seca) em sintetizar nanopartículas de prata (NpSBs). As folhas foram coletadas para produção de extratos aquosos (nas concentrações finais equivalentes de 10, 20 e 40 mg de folhas frescas/mL), que foram adicionadas às soluções aquosas de nitrato de prata para concentração final de 1 mM. As reações foram incubadas à 75°C por 150 min e monitoradas a cada 30 min por espectroscopia de absorção em 425 nm. Complementarmente, as amostras foram caracterizadas por análises de espalhamento de luz dinâmico, potencial Zeta, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia de força atômica, espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier, espectrometria de massa MALDI-TOF e difração de raios X. Ambos os extratos (verão e inverno) exibiram ação redutora dos íons de prata satisfatória, tendo a concentração de 20 mg/mL melhor capacidade de induzir a formação de NpSBs com estabilidade coloidal considerável. As estações de coleta de folhas interferiram na síntese e no rendimento das NpSBs e também nos seus diâmetros hidrodinâmicos e potenciais Zeta. Entretanto, as partículas apresentaram dimensões secas, perfis moleculares e padrões de cristalinidade dos átomos similares. Em suma, os resultados indicaram que alguns parâmetros das NpSBs são ajustáveis por aspectos sazonais das plantas e, portanto, tais nanomateriais são propícios visando à avaliação futura de suas aplicações em diversas áreas.

Palavras-chaves: Fabaceae; Fatores ambientais; Nanopartículas metálicas; Plantas do Cerrado; Síntese verde.

1. INTRODUÇÃO

A revolução científica da nanotecnologia tem levado ao desenvolvimento de várias estratégias para a produção de nanopartículas de prata (AgNPs). Neste cenário, as técnicas de química verde estão sendo cada vez mais consolidadas utilizando agentes biorredutores e estabilizantes biológicos (p.ex. organismos inteiros ou extratos de tecidos de plantas, algas, cogumelos, leveduras, bactérias, fungos e vírus) de íons prata. Isso é devido ao fato desses recursos biológicos compreenderem proteínas, enzimas, aminoácidos, vitaminas, lipídeos, ácidos nucleicos e metabólitos secundários em suas composições que podem atuar na biossíntese das AgNPs (DURÁN et al., 2011; SRIVASTAVA et al., 2015).

A opção por essa abordagem nanotecnológica sustentável oferece diversas vantagens, como simplicidade de realização, rapidez e custo baixo, o que a torna viável e rentável para diversos processos. Além disso, normalmente envolve processo de uma única etapa de execução com produtos biocompatíveis e não tóxicos, concentrações de íons prata baixas, condições reacionais brandas e utilização de compostos hidrossolúveis. Por conseguinte, todos esses fatores reduzem o risco de toxicidade para vários organismos vivos e para o meio ambiente (KRUMOV et al., 2009; TAVAKOLI et al., 2013).

Nesse contexto, em razão da rica biodiversidade brasileira, alguns estudos na literatura relacionaram o uso de plantas endêmicas do país para a produção de AgNPs (GUIDELLI et al., 2011; RAO et al., 2013; ALBERNAZ, 2014; BONATTO; SILVA, 2014). No entanto, não há relatos publicados mencionando a utilização de extratos das folhas de *Pterodon emarginatus* (sucupira branca) para tal propósito. Esta planta é típica do bioma Cerrado e de acordo com sua classificação taxonômica pertence à família Fabaceae (= Leguminosae) e à subfamília Faboideae, que possui quatro espécies nativas no Brasil: *P. abruptus* Benth, *P. apparicioi* Pedersoli, *P. polygalaeflorus* Benth e *P. emarginatus* Vogel (CARVALHO, 2004).

No perfil fitoquímico das folhas de P. emarginatus, os principais componentes já identificados no óleo essencial foram nove hidrocarbonetos sesquiterpênicos: γ -muuroleno, biciclogermacreno, acifileno, β -elemeno, E-cariofileno, α -humuleno, α -copaeno, α -aromadendreno e δ -cadineno, na ordem de percentuais de teores. Por outro lado, no extrato etanólico bruto foram constatados uma mistura de esteróides

estigmasterol e β-sitosterol (SANTOS et al., 2010); enquanto que Miranda e colaboradores (2014), além de encontrar os esteroides (β-sitosterol e estigmasterol) no extrato etanólico das folhas também evidenciaram a presença de compostos flavonoides (luteolina, kaempferol, quercetina, (+)-catequina, quercetina-3-0- α -Lrhamnopiranosídeo rutina), sesquiterpênicos (rel-2β,6β-epóxi-5β-hidróxiе isodaucano, oplopanona, 1 β,6α-diidróxi-4(15)-eudesmeno, óxido de cariofileno, αcadinol e espatulenol), feofitina (feofitina A) e ácido p-hidroxibenzoico. Estes resultados estão em concordância com Cruz (2016) que estudando as classes de metabólitos secundários detectaram no extrato etanólico das folhas de P. emarginatus evidenciou esteroides, triterpenoides, fenóis, taninos, depsídios e depsidonas. Já no extrato hidroetanólico, os principais constituientes encontrados foram luteolina-7-O-rutinoside, C,O-glicosilflavonas e di-C-glicosilflavonas, além de saponinas em níveis mais baixos (NEGRI; MATTEI; MENDES, 2014). Todos estes compostos têm potencial para contribuir com o objetivo de síntese de AgNPs.

Adicionalmente, tendo em vista que vários fatores ambientais como sazonalidade, ciclo circadiano, temperatura e luminosidade podem influenciar na disponibilidade de metabólitos em plantas (SCOGNAMIGLIO et al., 2015), avaliar os efeitos de alguns desses fatores na síntese de AgNPs é relevante para possível modulação de suas propriedades finais. Diversos elementos próprios das plantas podem influenciar na capacidade de sínteses das AgNPs e suas características, como estação do ano que as plantas são coletadas, presença de agentes bióticos (SILVA et al., 2017), e variação genotípica da planta (KRISHNASWAMY; ORSAT, 2015). Há também uma variação quantitativa e qualitativa de compostos biológicos associados a fatores abióticos como estágio de desenvolvimento, maturação, idade, disponibilidade de água, radiação UV, nutrientes do solo, altitude, composição atmosférica e danos nos tecidos (GOBBO NETO; LOPES, 2007).

Assim, o objetivo deste capítulo I foi avaliar o potencial dos extratos aquosos de folhas de *P. emarginatus* (sucupira branca) coletadas nas estações de verão (chuvosa) e de inverno (seca) na redução de íons prata e estabilização de AgNPs. Sendo, portanto, um trabalho pioneiro na avaliação dos efeitos de fatores ambientais na capacidade de síntese de AgNPs com extratos desta planta.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral do Capítulo I

Avaliar o potencial dos extratos aquosos das folhas de *P. emarginatus* (sucupira branca), coletadas em duas estações do ano, em reduzirem íons prata e estabilizarem AgNPs formadas.

2.2 Objetivos específicos do Capítulo I

- Sintetizar AgNPs utilizando extratos aquosos das folhas de *P. emarginatus* coletadas nas estações de verão chuvoso e de inverno seca no Cerrado (Goiás);
- Caracterizar as NpSBs por meio de técnicas físicas e químicas baseadas em análises de mudanças das colorações dos meios reacionais, espectrofotometria na região do visível (Vis), espalhamento de luz dinâmico (DLS), potencial Zeta, microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia de força atômica (MFA), espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectrometria de massa MALDI-TOF e difração de raios X (DRX);

MATERIAL E MÉTODOS 3.

3.1 Coleta do material biológico

Ramos de P. emarginatus (Figura I-1) com folhas foram coletados e investigados com autorização de acesso ao patrimônio genético (CGEN n. 02001.007580/2014-95) em uma propriedade particular no município de Colinas do Sul-GO (14º N e 48º O) no início de janeiro e de setembro que correspondem às estações de verão e de inverno no hemisfério sul, nessa ordem. No bioma Cerrado, esses períodos equivalem às estações chuvosa (meio) e seca (final), respectivamente. Após a coleta, as folhas foram acondicionadas a -20°C até serem utilizadas para preparo dos extratos aquosos.



6 cm

Fonte: Arquivo Pessoal

Figura I-1: Ramos de *P. emarginatus* (sucupira branca)

3.2 Determinações dos teores de umidade e de cinza das folhas de P. emarginatus

Para determinar o teor de umidade das folhas de P. emarginatus foram adotadas duas técnicas termogravimétricas: avaliação de umidade por exposição à radiação infravermelha e exposição ao aquecimento em estufa. procedimentos foram realizados no Laboratório de Nanobiotecnologia - LNANO (Embrapa Cenargen - Brasília).

Na primeira técnica, foi colocado 1 g das folhas no equipamento de infravermelho (Determinador de umidade por infravermelho, Quimis, Brasil); visto que este permite a quantificação do percentual de água (e demais solventes e compostos voláteis) liberada pelas folhas de forma gradual, uma vez que por meio de tal método expôs-se o material vegetal a ciclos de aquecimento médio de 50°C a cada 2 min. Dessa maneira, as massas das folhas foram registradas até o momento que atingiram valores constantes.

Já na utilização da estufa (Modelo Q819V2, Quimis, Brasil) a 110°C, 1 g das folhas foram colocadas em um cadinho, que teve sua massa aferida previamente, e em seguida este foi colocado na estufa por 2 h. Após esse tempo a massa foi registrada e o cadinho reconduzido para estufa até o alcance dos valores de massa constante. Para determinação do percentual de umidade foi adotado o seguinte cálculo:

% umidade = $100 - (m'/m \times 100)$; m' = massa final e m = massa inicial

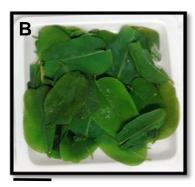
Com relação à determinação do teor de cinzas, as amostras retiradas da estufa foram previamente pesadas e posteriormente conduzidas a um forno tipo mufla (Modelo Q318M, Quimis, Brasil) a 550°C por 4 h. Após esse período, a massa foi novamente registrada. Para a determinação do teor de cinzas foi utilizada o seguinte cálculo:

% cinzas = (m'/m x 100); m' = massa final e m = massa inicial

3.3 Preparação dos extratos aquosos das folhas de P. emarginatus

Antes de serem iniciadas as preparações dos extratos aquosos, as folhas (Figura I-2) foram lavadas com água destilada e depois com água ultrapura (Milli-Q – Tipo I), sendo por fim secas com papel toalha. A seguir, o referido material vegetal foi cortado em pequenos fragmentos (aproximadamente 5 × 5 mm) e adicionado em um béquer contendo água ultrapura (Milli-Q – Tipo I) em ebulição (proporção 1:5 m/v), atingindo uma concentração de 200 mg/mL (folhas brutas em água). Essa mistura foi então colocada sobre uma placa de aquecimento (modelo Q261, Quimis, Brasil) por 2 min e posteriormente filtrada com papel de filtro para obtenção do extrato aquoso das folhas, sendo que a expressão das concentrações de extrato utilizadas ao longo da Tese sempre foram apresentadas em função do equivalente ao peso das folhas utilizadas na preparação dos extratos.





6 cm 1,6 cm Fonte: Arquivo Pessoal

Figura I-2: Folhas de *P. emarginatus* utilizadas para preparação dos extratos aquosos. Os Painéis A e B são referentes às folhas coletadas nas estações de inverno-seca e de verão-chuvoso, respectivamente.

3.4 Síntese verde de AgNPs utilizando extratos aquosos das folhas de *P. emarginatus*

Para o processo de formação das AgNPs sintetizadas com extratos aquosos das folhas de *P. emarginatus* - NpSBs, soluções aquosas de nitrato de prata (concentração final de 1 mM = ~170 μg/mL) foram adicionadas em tubos de ensaio de vidro contendo extratos aquosos das folhas de *P. emarginatus* (concentrações finais de 10, 20 e 40 mg/mL de equivalente às folhas congeladas), na proporção de 1:1 (v/v), atingindo um volume final de 30 mL. Posteriormente, as reações foram incubadas a 75°C por 150 min em banho-maria (Modelo Q334M-24, Quimis, Brasil).

Ao longo desse período, as mudanças de colorações dos meios reacionais foram monitoradas e as cinéticas de formações das NpSBs avaliadas com espectrofotômetro UV-Vis (Modelo Q898U, Quimis, Brasil) no comprimento de onda de 425 nm. Complementarmente, ao término das reações foram realizadas leituras espectrofotométricas (UV mini-1240, Shimadzu, Japão) nos comprimentos de onda que variam de 350 a 550 nm com intervalos de 10 nm para obter curvas de absorção das amostras.

Em adição, para avaliar a reprodutibilidade dos processos de síntese das NpSBs foi adotado o procedimento de produção de diferentes lotes, seguindo os mesmos critérios de síntese pré-estabelecidos. Todos esses procedimentos foram realizados no Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO) e no Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) - Brasília.

3.5 Caracterizações das AgNPs produzidas com extratos aquosos das folhas de *P. emarginatus*

3.5.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta

O uso das técnicas de DLS e potencial Zeta permitiram a obtenção dos valores de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersividade (PdI), potencial Zeta e condutividade elétrica das NpSBs após a conclusão das reações de síntese. Ademais, a fim de monitorar a estabilidade coloidal das características físicas das nanopartículas no decorrer do tempo foram realizadas análises idênticas após 7 dias, 14 dias, 21 dias, 1 mês, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses e 6 meses após as reações de sínteses.

Para isso, 100 μL das amostras de NpSBs e 900 μL de água ultrapura (Milli-Q) foram adicionadas em uma cubeta (DTS 1070, Malvern, Reino Unido), que foi então colocada no equipamento de DLS-Zeta (ZetaSizer Nano ZS, Malvern, Reino Unido) disponível no Laboratório de Nanobiotecnologia - LNANO (Embrapa Cenargen - Brasília). Seguidamente foram aplicados os seguintes critérios operacionais: experimentos em triplicatas, tempo de estabilização de 120 s antes das medições, temperatura de 25°C, ângulo de espalhamento fixado em 173° e aquisições automáticas (com relação ao número e ao tempo de aquisição).

3.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Inicialmente, 2 µL das amostras de NpSBs, diluídas com água na proporção de 1/100, foram depositados sobre telas de cobre de 200 malhas (Electron Microscopy Sciences, EUA) revestidas por uma camada fina de Formvar. Após 12 h de secagem em condições ambientais (25°C), as amostras foram analisadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica (Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro) utilizando um microscópio eletrônico de transmissão (JEM-1011, Jeol, Japão) operado a 100 kV. As fotomicrografias eletrônicas foram obtidas de forma aleatória com câmera CCD - charge-coupled device (Gatan Ultrascan, EUA) e os diâmetros das AgNPs foram medidos com o auxílio do software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, EUA).

3.5.3 Microscopia de força atômica (MFA)

A fim de realizar esta análise, 1 µL de cada amostra de NpSB foi depositado sobre a superfície de mica muscovita recém clivada e montada no topo de um porta-amostra metálico utilizando fita adesiva dupla-face. Após secagem, as amostras foram analisadas no Laboratório de Nanobiotecnologia - LNANO (Embrapa Cenargen - Brasília) em um microscópio de força atômica comercial (SPM 9600, Shimadzu, Japão) operado com ponteira cônica de silício com raio de curvatura inferior a 10 nm e cantilever retangular com constante de mola em torno de 42 N/m e operado a uma frequência de aproximadamente 260 kHz.

As imagens foram adquiridas de forma aleatória selecionando uma área de varredura de 10 μm × 10 μm, utilizando modo de operação dinâmico com modo de aquisição de altura e fase na frequência de varredura de 1 Hz e resolução de 512 linhas × 512 linhas. Em seguida, as imagens foram processadas utilizando o software SPM Manager 3.0 offline (Shimadzu) e as curvas de distribuição de altura das AgNPs foram elaboradas com o software Origin[®] 8 baseadas no parâmetro de alturas médias obtidas.

3.5.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para realização dessas análises, aproximadamente 1 mg das amostras liofilizadas (NpSBs e seus controles) foi misturado com 100 mg de brometo de potássio (KBr), previamente seco em micro-ondas. Posteriormente, para formação das pastilhas, essas amostras experimentais foram submetidas a uma prensa hidráulica sob condição de vácuo e pressão controlada (10 toneladas). Em seguida, as amostras foram direcionadas para análises em espectrofotômetro FTIR (Vertex 70/70v, Bruker Optics, Alemanha), do Laboratório de Espectroscopia Óptica (Instituto de Física da Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro), utilizando região de leitura com faixa de número de onda entre 400 e 4000 cm⁻¹ para obtenção dos espectros no modo de porcentagem de transmissão.

3.5.5 Espectrometria de massa MALDI-TOF

Sobre uma placa de MALDI-TOF de 96 *spots* (MSP96 Polished, Bruker Daltonics, Alemanha) foi aplicado 0,5 µL de misturas de 1 µL de cada uma das

amostras de NpSBs com 3 μL de matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico. A identificação de compostos com m/z (massa-carga) 100-1000 foi realizada, em triplicata, em espectrômetro de massa MALDI-TOF (AutoFlex Speed, Bruker Daltonics, Alemanha) disponível no Laboratório de Espectrometria de Massa (Embrapa Cenargen - Brasília) operado em modo refletido-positivo, com 5.000 disparos de laser, intensidade do laser de 30-40% e calibração externa utilizando os principais íons da matriz (alfa-ciano-4-hidroxicinâmico) como calibrantes internos.

Os programas FlexAnalysis 3.4 e MALDI Biotyper 3.1 foram empregados para realizar as análises espectrais e gerar um dendrograma baseado em distâncias Euclidianas, respectivamente.

3.5.6 Difração de raios X (DRX)

As aquisições dos difratogramas de raios X das amostras de NpSBs exigiram etapas de liofilizações prévias. Em seguida, as amostras foram depositadas sobre a superfície de um disco de vidro contendo uma camada fina de graxa de silicone, necessária para assegurar a fixação dos analitos. Subsequentemente, o disco foi transportado ao difratômetro de raios X (Miniflex600, Rigaku, Japão), disponível no Laboratório de Instrumentação Analítica (Universidade de Brasília - Campus Ceilândia), para análise em uma faixa de 2 θ (graus) variando de 30 a 90 $^{\circ}$ com um passo de 0,05 $^{\circ}$ e tempo de passo de 5 $^{\circ}$ por min, utilizando radiação Cu-K α (λ = 1.541 Å) e operado a 40 kV e 30 mA.

3.6 Análises estatísticas

O software Microsoft Office Excel 2010 foi utilizado para calcular os valores de médias e desvios padrões das médias dos dados. Enquanto que para as demais análises estatísticas foi aplicado o software Past (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001), adotando como abordagem para análise de variância o One-Way ANOVA (*One-way analysis of variance*) seguido do Teste de Tukey com nível de significância fixado em 5% (*P* < 0,05).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Testes termogravimétricos com as folhas de P. emarginatus

Nesse trabalho, as análises termogravimétricas foram realizadas com o objetivo de se conhecer um pouco mais a respeito das características termoanalíticas das folhas de *P. emarginatus* utilizadas nesse estudo. Para isso, foram realizadas avaliações dos teores de umidade e de cinza.

Assim, os resultados de secagem por infravermelho (50°C) apontaram que as folhas coletadas no inverno-seco registraram percentual de umidade de 29,2%, enquanto que as folhas coletadas no verão-chuvoso foram de 58,2%. Já nos testes utilizando estufa (110°C) foi observado que as folhas de inverno-seco apresentaram valores de umidade de 39,5% e as folhas de verão-chuvoso de 67,4%.

Com relação à perda de água por secagem, foram observadas diferenças entre os percentuais de umidade das folhas de sucupira coletadas no verão e no inverno, de modo que as folhas coletadas no verão tiveram maiores teores de umidade do que as folhas coletadas no inverno. Esse fato foi evidenciado pelas duas metodologias trabalhadas, no entanto, os valores desse índice obtidos por estufa foram superiores aos registrados pelo determinador de umidade por exposição ao infravermelho visto que nesse último a temperatura empregada não chegou sequer a ser aquela na qual a água entraria em rápida vaporização.

Assim, essas diferenças de percentuais podem ser explicadas pelo fato de que a secagem de materiais vegetais utilizando estufa (110°C) promove a perda hídrica (água absorvida e adsorvida) juntamente com a remoção de alguns elementos voláteis. Sendo, por isso, identificado um maior teor de umidade do que nos resultados dos testes utilizando exposições de pulsos de infravermelho, técnica que não interfere na liberação de tais compostos voláteis (CAMPOS; TILLMANN, 1996; SALES et al., 2013).

Quanto ao rendimento de matéria seca, foi observado que as folhas de *P. emarginatus* coletadas no inverno-seco tiveram teores de cinzas de 1,7%, ao passo que as coletadas na estação de verão-chuvoso esse índice foi de 1,0%.

As informações fornecidas por esses testes de comportamento térmico permitiram também calcular as concentrações de matéria seca (Cms) contidas nos

extratos utilizados para sintetizar as NpSBs. Partindo do princípio que a concentração úmida das folhas foi de 200 mg/mL e tomando como base os teores de umidade das folhas, foi possível assumir que a Cms^{estufa} dos extratos das folhas de verão-chuvoso é 65,2 mg/mL e dos extratos das folhas de inverno-seco é 121 mg/mL. À medida que utilizando a técnica de infravermelho, a Cms^{infravermelho} para os extratos de verão-chuvoso e inverno-seco fica de e 83,6 e 141,6 mg/mL mg/mL, nessa ordem.

Essas diferenças de concentração de matéria seca podem refletir em uma desigualdade nas concentrações relativas e absolutas das classes de metabólitos secundários dos perfis fitoquímicos das amostras vegetais estudadas, de modo que posteriormente também podem estar relacionadas com as capacidades de síntese das AgNPs, assim como suas características físicas. No entanto, para confirmação dessa hipótese são necessárias caracterizações qualitativas e quantitativas das composições fitoquímicas.

Nessa mesma linha de raciocínio, Costa e Marenco (2007) relataram que situações de suprimento hídrico distintas desencadeiam diferentes mecanismos para acumulação de metabólitos em plantas. Exemplo disso é a osmorregulação para manter a turgescência das células guarda de plantas. Em casos de déficits hídricos, as diminuições do potencial de pressão e do potencial osmótico hidratado acontecem para reduzir a perda de água no interior celular, utilizando da diminuição da condutância estomática e tendo como consequência o armazenamento de solutos.

De acordo com Gobbo Neto e Lopes (2007) vários fatores podem influenciar o conteúdo de metabólitos secundários das plantas medicinais, dentre eles é possível destacar: sazonalidade, ciclo circadiano, temperatura, luminosidade, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude e poluição atmosférica. Além disso, a idade e o estado de desenvolvimento das plantas também podem influenciar a natureza dos constituintes ativos.

Isso reforça o fato da inconstância das concentrações dos metabólitos secundários durante todo o tempo de vida da planta e seus efeitos diretos sobre suas morfologias, fisiologias e metabolismos (GONDIM et al., 2010).

4.2 Sínteses de AgNPs utilizando extratos aquosos das folhas de *P. emarginatus*

4.2.1 Mudança de coloração do meio reacional

Inicialmente foi realizado um ensaio para verificar o potencial do extrato aquoso das folhas de *P. emarginatus* (coletadas no verão) em reduzirem íons prata, como base nas possíveis mudanças de colorações dos meios reacionais. Então foi constatado que a adição de solução do extrato aquoso das folhas de *P. emarginatus* na concentração de 20 mg/mL em solução de nitrato de prata (concentração final de 1 mM) induziu mudanças de colorações nos meios reacionais, de amarelo claro para marrom escuro, indicando a formação de AgNPs durante os 150 min de reação. Tais transformações de cor foram observadas de forma análoga nas sínteses de NpSB-Verão e NpSB-Inverno, e podem ser exemplificada pelas NpSB-Verão na Figura I-3.

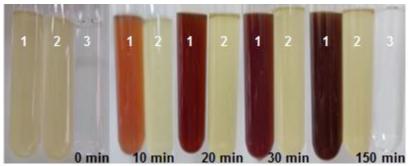


Figura I-3: Monitoramento da mudança de coloração no meio reacional de síntese das AgNPs produzidas com extratos aquosos das folhas de *P. emarginatus* coletadas na estação do verão. Nessa representação, 1 refere-se ao tubo contendo a reação de síntese AgNPs a partir do extrato aquoso de folhas de *P. emarginatus* a uma concentração de 20 mg/mL e nitrato de prata a uma concentração final de 1 mM; 2 refere-se ao controle composto apenas de extrato aquoso de *P. emarginatus* a uma concentração de 20 mg/mL; e 3 ao controle com apenas solução de nitrato de prata a uma concentração final de 1 mM.

Uma explicação para mudanças de intensidade das cores de forma graduais e dependentes do tempo está relacionada com a interação coletiva dos átomos metálicos em um fenômeno de excitação de ressonância plasmônica de superfície (RPS) das AgNPs formadas que tem como consequência a promoção de modificações nas colorações das suspensões durante o processo reacional (AHMED et al., 2015). Esta mesma associação foi realizada por Ali e colaboradores (2015) e Kathiravan e colaboradores (2015) ao observarem alterações de colorações dos meios reacionais de síntese verde de AgNPs utilizando extratos aquosos das folhas

de *Eucalyptus globulus* e *Croton sparsiflorus morong*, nessa ordem. Nesses meios, as transformações de cor também ocorreram de amarelo claro (início) para marrom escuro (final), conforme foi evidenciado no presente estudo com extratos aquosos das folhas de *P. emarginatus*.

E ainda discutindo a interpretação desse parâmetro de formação de AgNPs é importante mencionar o estudo de Pourmortazavi e colaboradores (2015) que salientaram que as condições de síntese dos nanossistemas, como concentração de extrato, concentração de nitrato de prata, duração e temperatura do processo de síntese, entre outras, são fatores que influenciam no tempo necessário para que ocorra a mudança da coloração das suspensões, bem como a intensidade dessas.

No entanto, mesmo esse processo químico sendo bem típico nas AgNPs formadas, torna-se necessário realizar confirmações e complementações quantitativas com leituras espectrofotométricas.

4.2.2 Cinética de formação

A espectroscopia UV-Vis é uma técnica bastante utilizada para verificar a formação e estabilização de AgNPs em suspensões (SHARMA et al., 2014). Nesse estudo, ela foi adotada tanto para atestar as sínteses de AgNPs como verificar as suas cinéticas de formações.

Dessa maneira, as sínteses de AgNPs que empregaram os extratos aquosos das folhas de *P. emarginatus* coletadas na estação do verão (NpSB-Verão) estão representadas na Figura I-4. Esta aponta que entre as concentrações de extratos utilizadas (concentrações finais de 10, 20 e 40 mg/mL de material fresco vegetal) a de 40 mg/mL indicou maior potencial para reduzir os íons de prata, embora a concentração intermediária (20 mg/mL) também tenha apresentado valores de intensidade bastante próximos.

Foi comprovado também que, entre os intervalos de tempo avaliados para monitorar as formações de NpSB-Verão, os maiores valores de absorbância foram alcançados rapidamente em 30 min; seguido por estabilização da absorbância ao longo dos 120 min subsequentes, o que sugere a máxima redução dos íons presentes nas reações (Figura I-4).

Por outro lado, na concentração de 10 mg/mL foi verificado que a estabilização do processo de síntese, por pelo menos dois pontos de leitura, não foi alcançado nos 150 min de reação; ainda que ao final desse período fosse atestado valor de absorbância próximo aos das demais concentrações investigadas (Figura I-4).

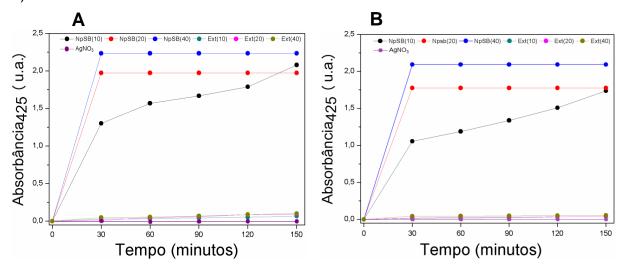


Figura I-4: Monitoramentos cinéticos das formações de NpSB-Verão obtidos por análises espectrofotométricas (425 nm) durante 150 min. **A**= Lote 1 e **B**= Lote 2. Nessas representações gráficas, NpSB (10), NpSB (20) e NpSB (40) referem-se às AgNPs sintetizadas com os extratos aquosos de folhas de *P. emarginatus* nas concentrações de 10, 20 e 40 mg/mL, respectivamente. Enquanto que Ext (10), Ext (20) e Ext (40) representam os extratos aquosos de *P. emarginatus* nas concentrações de 10, 20 e 40 mg/mL, respectivamente.

Então, com base nas cinéticas de formação e nas análises de DLS e potencial Zeta das NpSB-Verão (tópico 4.3.1), os protocolos de síntese de AgNPs mais promissores (sob o ponto de vista de intensidade de absorbância) foram as que continham extrato aquoso das folhas de *P. emarginatus* na concentração de 20 mg/mL. Por esse motivo, se optou por sua utilização na síntese das NpSB-Inverno, visto que na concentração de 40 mg/mL do extrato aquoso das folhas de *P. emarginatus*, o potencial de formação das NpSB-Verão é semelhante ao das NpSB-Verão sintetizadas com extrato aquoso das folhas de *P. emarginatus* na concentração de 20 mg/mL (Figura I-4). Além disso, as NpSB-Verão (40) tiveram uma tendência maior à heterogeneidade de tamanhos (PdI maior), resultados obtidos por meio de análises de DLS imediatamente após suas sínteses (Tabela I-1).

Song e Kim (2009) chamam atenção também para o cuidado ao utilizar alta concentrações de agentes redutores em sínteses biológicas de AgNPs, pois esta

situação propicia a agregação de AgNPs em consequência das interações entre as moléculas adsorvidas nas superfícies das AgNPs e o processo de redução secundária na superfície dos núcleos pré-formados.

Desse modo, foi verificado que de forma análoga às NpSB-Verão, as NpSB-Inverno apresentaram sua máxima absorbância em 30 min de reação, sendo também evidenciada sua estabilização ao longo do restante do tempo de reação (Figura I-5).

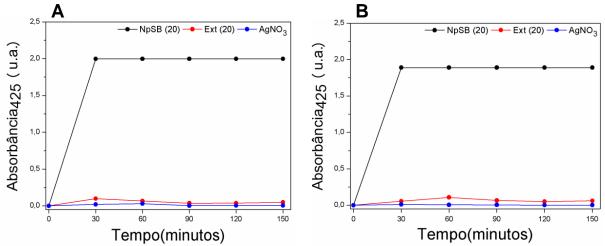


Figura I-5: Monitoramentos cinéticos das formações de NpSB-Inverno obtidos por análises espectrofotométricas (425 nm) durante 150 min. **A**=Lote 1 e **B**=Lote 2. Nessas representações gráficas, NpSB (20) referem-se às AgNPs sintetizadas com o extrato aquoso de folhas de *P. emarginatus* na concentração de 20 mg/mL. Enquanto que Ext (20) representa o extrato aquoso de *P. emarginatus* na concentração de 20 mg/mL.

No presente estudo, o tempo para redução dos íons prata é considerado curto em comparação com várias rotas de síntese verde e até mesmo rotas de síntese química convencionais de AgNPs, uma vez que Guzman e colaboradores (2012), afirmam que processos de síntese de AgNPs envolvendo AgNO₃ e citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇) necessitam de um período reacional de 24 h a 80°C. No entanto, também existem trabalhos que relatam intervalos de tempo de síntese curtos, como a utilização de extratos das folhas de *Solanum muricatum* utilizando 90 s de exposição à radiação de micro-ondas (GORDE et al 2016).

Há outros processos que podem auxiliar na aceleração das reações, por exemplo, a submissão das reações às altas temperaturas de síntese, autoclave, ablação a laser, irradiação gama, irradiação de elétrons, redução química, métodos

fotoquímicos e métodos biológicos sintéticos (HEBBALALU et al., 2013; IRAVANI et al., 2014; VELUSAMY et al., 2015).

4.2.3 Curvas de absorção espectrofotométricas

A realização de leituras espectrofotométricas na região dos comprimentos de onda do UV-Visível é muito útil para atestar a formação de nanopartículas metálicas, como é o caso das AgNPs. Isso porque essas nanoestruturas possuem elétrons livres em abundância, que por sua vez apresentam bandas de condução, que vibram ao entrarem em ressonância com determinados comprimentos de onda da luz, tendo como consequência a manifestação da banda de absorção de RPS (MULVANEY, 1996; KUISMA et al. 2015).

A Figura I-6 permite visualizar as bandas espectrais em torno dos comprimentos de onda de 400-425 nm, confirmando a formação de NpSBs, considerando que Bindhu e Umadevin (2015) citam que este tipo de nanopartículas metálicas exibe uma banda de absorção RPS forte na região de 350 a 500 nm. Achados análogos foram observados em sínteses de AgNPs utilizando extratos das folhas de *Malva parviflora* (ZAYED; EISA; SHABAKA, 2012), de *Fraxinus excelsior* (PARVEEN et al., 2016) e de *Ipomoea eriocarpa* (DAS et al., 2017) e que também revelaram máximos de RPS em torno de 425 nm.

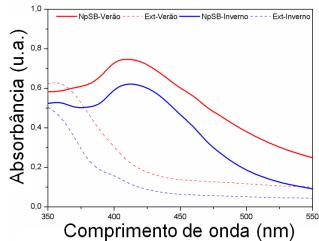


Figura I-6: Curvas representativas das absorções espectrofotométricas das NpSBs e seus respectivos controles. Nessa representação gráfica, as NpSB-Verão e NpSB-Inverno referem-se às AgNPs sintetizadas com os extratos aquosos das folhas de *P. emarginatus* coletadas nas estações de verão e de inverno a uma concentração de 20 mg/mL, respectivamente. Assim como Ext-Verão e Ext-Inverno referem-se aos extratos aquosos das folhas de *P. emarginatus* coletadas nas estações de verão e de inverno a uma concentração de 20 mg/mL, respectivamente.

No entanto, em relação à influência sazonal, foi averiguado que as NpSB-Verão mostraram rendimentos ligeiramente mais elevados no processo de síntese, uma vez que estas partículas apresentaram valores de absorbância superiores aos observados nas NpSB-Inverno.

4.3 Caracterizações das AgNPs produzidas com extratos aquosos das folhas de *P. emarginatus*

4.3.1 Avaliação da cinética de estabilidade coloidal por meio de análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta

NpSB-Verão - Análise imediatamente após a síntese

No primeiro lote de produção das NpSB-Verão foi observado que as suspensões de NpSBs sintetizadas com as três concentrações de extratos das folhas coletadas no verão apresentaram diâmetros hidrodinâmicos (diâmetro médio das populações - distribuição de classes e *Z-Average*) similares. De modo que as NpSB-Verão (10) e as NpSB-Verão (40) apresentaram *Z-Average* de aproximadamente 0,5% e 8% maiores que as NpSB-Verão (20), respectivamente (Tabela I-1).

Com essas três concentrações foram produzidas AgNPs com valores de *Z-Average* de 66,58 a 72,16 nm (Tabela I-1). Em conformidade ao que também foi possível encontrar na literatura com as AgNPs biossintetizadas com extratos aquosos das raízes de *Cibotium barometz* de *Z-Average* de 77,2 nm (WANG et al., 2016).

Já em relação ao PdI foram registrados valores distintos, em que as NpSB-Verão (10) e as NpSB-Verão (40) apresentaram polidispersividades de aproximadamente 23% menor e 56% maior que as NpSB-Verão (20), respectivamente (Tabela I-1). Tal tendência de aumento da heterogeneidade dos tamanhos das AgNPs à medida que se aumenta as concentrações dos extratos bioredutores pode ser sustentado por Kirubha e colaboradores (2015) que salientaram que as concentrações de agentes redutores utilizadas nos meios reacionais influenciam diretamente sobre os valores e a heterogeneidade da distribuição de tamanho das AgNPs. Por outro lado, Augustine e colaboradores

(2014) relataram que o aumento da heterogeneidade de tamanhos das AgNPs produzidas com extratos das folhas de *Piper nigram* está associado também ao aumento da concentração da solução de nitrato de prata, assim como a tendência a aglomerações e irregularidades de suas morfologias.

Por outro lado, a partir das informações obtidas pelos valores de potencial Zeta foi verificado que as NpSB-Verão apresentavam valores negativos bastante semelhantes (NpSB-Verão (10), (20) e (40): -31,2; -33,3 e -31,5 mV, respectivamente) (Tabela I-1) e que se enquadravam na categoria de suspensão coloidal com moderada estabilidade, de acordo com a *American Society for Testing and Materials* (ASTM). Essa sociedade (ASTM) elaborou uma classificação dos comportamentos de estabilidade coloidal considerando os valores de potencial Zeta: entre 0 e ± 5 mV: coagulação rápida ou floculação; entre ±10 e ±30 mV: instabilidade incipiente; entre ±30 e ±40 mV: estabilidade moderada; entre ±40 e ±60 mV: boa estabilidade; e mais que ±61 mV: excelente estabilidade (ASTM, 1985).

No entanto, é muito importante salientar que os valores de potenciais Zeta são apenas um dos parâmetros para definição da estabilidade das suspensões coloidais de nanossistemas. Existem outros fatores que também estão intimamente relacionados com a questão da avaliação de estabilidade das AgNPs, como é o caso do teor de liberação de Ag⁺ por parte das AgNPs (SUN et al., 2014), a mudança da intensidade de pico de RPS (SHARMA et al., 2014) e o monitoramento de seus tamanhos com o passar do tempo.

Ainda sobre esse parâmetro, foi evidenciado também que os potenciais Zeta das NpSB-Verão eram bastante semelhantes às dos seus extratos correspondentes, o que sugere que os extratos devem estar diretamente envolvidos com o recobrimento das AgNPs. Situação concordante ao demonstrado por Song e Kim (2009), ao constatarem, por meio de análises de MET, que é possível observar uma camada de cobertura fina sobre as AgNPs biossintetizadas utilizando extratos vegetais e que tais compostos fitoquímicos podem está relacionados à estabilidade relevante das AgNPs.

Ademais, foi observado que as diferentes concentrações de extrato apresentaram condutividades elétricas inferiores (Ext 10: 11,00 μs/cm; Ext (20): 19,47 μs/cm e Ext (40): 22,40 μs/cm) às de suas respectivas NpSB-Verão (NpSB

(10): 19,87 μs/cm; NpSB (20): 25,27 μs/cm e NpSB (40): 41,07 μs/cm) na diluição avaliada (Tabela I-1). Isso pode ser justificado pelo fato dessas suspensões de AgNPs serem metálicas e estarem em nanoescala, o que confere maior nível de organização e quantidade de elétrons livres e desemparelhados (HU; WU; CUI, 2011).

Tabela I-1: Análises por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta das NpSB-Verão e de

seus respectivos controles (Lote 1).

Amostras (Lote 1)	Diâmetro hidrodinâmico médio das populações de partículas (nm)	Z-Average (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)	Condutividade elétrica (µs/cm)
NpSB (10)	38,94 ± 9,02	66,95 ± 1,39	$0,284 \pm 0,035$	-31,2 ± 0,8	19,87 ± 4,79
NpSB (20)	36,86 ± 8,62	66,58 ± 1,63	$0,370 \pm 0,014$	-33,3 ± 2,7	25,27 ± 0,06
NpSB (40)	31,88 ± 7,15	72,16 ± 3,02	0,580 ± 0,021	-31,5 ± 2,7	41,07 ±0,11
Ext 10	87,21 ± 20,99	398,90 ± 17,16	0,493 ± 0,088	-30,9 ± 3,3	11,00 ± 0,26
Ext 20	114,90 ± 31,80	667,33 ± 21,00	0,564 ± 0,026	-28,6 ± 1,2	19,47 ± 0,06
Ext 40	58,46 ± 9,20 e 100,98 ± 28,69	381,27 ± 31,22	0,525 ± 0,133	-30,8 ± 1,4	22,40 ± 5,37

Os valores representam a média ± desvio padrão da média das análises obtidas em triplicata.

Em outro momento, partindo para as análises das NpSB-Verão obtidas no segundo lote de produção foi verificado também que mesmo utilizando concentrações de extratos de *P. emarginatus* diferentes (10, 20 e 40 mg/mL), as estruturas sintetizadas apresentaram características físicas bem semelhantes às observadas no primeiro lote (Diâmetro hidrodinâmico médio das populações de partículas, Z-Average, PdI, potencial Zeta), contudo com valores de potenciais Zeta que permitem classificá-las como suspensões nanométricas de instabilidade incipiente, de acordo com ASTM (1985), uma vez que foram determinados os valores de -28,0, -25,8 e -27,5 mV para as NpSB (10), (20) e (40), nessa ordem (Tabela I-2).

As NpSB-Verão do segundo lote produzidas com os extratos nas três concentrações (Tabela I-2) tiveram Z-Average com valores de 50,02 a 58,68 nm. Tais resultados são semelhantes aos encontrados por AgNPs sintetizadas com extratos das folhas de *Borago officinalis*, que por sua vez apresentaram Z-Average de 50,86 nm (SINGH; DU; YI, 2017).

Além disto, a tendência das diferenças dos valores de potencial Zeta e condutividade elétrica entre as NpSBs e seus respectivos extratos foram observadas de forma similar às NpSB-Verão do Lote 1 (Tabela I-2).

Tabela I-2: Análises por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta das NpSB-Verão e de

seus respectivos controles (Lote 2).

Amostras (Lote 2)	Diâmetro hidrodinâmico médio das populações de partículas (nm)	Z-Average (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)	Condutividade elétrica (µs/cm)
NpSB (10)	37,19 ± 8,49	58,68 ± 1,09	$0,269 \pm 0,064$	-28,0 ± 1,9	25,27 ± 1,93
NpSB (20)	34,76 ± 3,87	$52,08 \pm 0,65$	$0,285 \pm 0,002$	$-25,8 \pm 2,8$	31,23 ± 0,23
NpSB (40)	27,26 ± 6,15	$50,02 \pm 0,58$	$0,259 \pm 0,003$	$-27,5 \pm 2,0$	49,80 ± 0,17
Ext 10	3,89 ± 3,56 e 45,29 ± 16,49	340,37 ± 108,31	0,487 ± 0,068	-25,4 ± 1,8	14,43 ± 0,23
Ext 20	22,94 ± 2,90 e 47,47 ± 11,31	404,00 ±170,93	0,496 ± 0,165	-25,7 ± 3,2	19,13 ± 0,06
Ext 40	36,45 ± 11,73	308,37 ± 35,89	$0,516 \pm 0,059$	-31,8 ± 2,0	26,17 ± 1,60

Os valores representam a média ± desvio padrão da média das análises obtidas em triplicata.

Monitoramento cinético da estabilidade coloidal das características físicas das NpSB-Verão produzidas no Lote 1

Um dos apelos da utilização de síntese verde de AgNPs utilizando plantas é a estabilidade boa que essa abordagem de síntese proporciona às AgNPs, isso porque extratos vegetais apresentam os principais compostos fitoquímicos capazes de propiciarem os seus recobrimentos e estabilizações (EDISON; SETHURAMAN, 2012). No entanto, essa estabilidade coloidal pode ser afetada por diversos fatores, como pela quantidade de agentes redutores e espécies absorventes (MOSKOVITS; VLCKOVA, 2005; PRATHNA et al., 2014).

Nesse estudo, sobre o monitoramento cinético da estabilidade das NpSB-Verão (20) do Lote 1 foram observados aumentos estatisticamente significativos de 8,0% e 12,1% nos diâmetros hidrodinâmicos, de formas pontuais, no primeiro e no segundo mês após a síntese, em relação às AgNPs recém sintetizadas. Por outro lado, não foram identificadas alterações estatisticamente significativas nos valores de PdI e de potencial Zeta, o que indica que esses nanossistemas não tenderam a agregar mesmo após cinco meses de produção. Sinalizando estabilidade coloidal adequada e condições de homogeneidade boas (Tabela I-4).

Tabela I-4: Monitoramento cinético da estabilidade coloidal das características físicas das NpSB-Verão (20) por meio de análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta – Lote 1.

Intervalo de tempo	Z-Average (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
Recém sintetizadas	66,58 ± 1,63	0.370 ± 0.014	$-33,3 \pm 2,7$
7 dias	62,20 ± 0,78	0,356 ± 0,012	$-36,8 \pm 4,7$
14 dias	62,71 ± 1,00	0,351 ± 0,008	$-36,2 \pm 3,2$
21 dias	$66,86 \pm 0,90$	$0,368 \pm 0,004$	$-29,6 \pm 0,5$
1 mês	$71,89 \pm 0,93$ ^a	0,386 ± 0,011	$-28,5 \pm 0,4$
2 meses	$74,63 \pm 3,63$ ^a	$0,350 \pm 0,006$	-26,4 ± 2,5
3 meses	69,31 ± 1,73	$0,349 \pm 0,021$	-30,9 ± 1,5
4 meses	66,25 ± 0,45	$0,332 \pm 0,046$	$-29,6 \pm 3,4$
5 meses	68,72 ± 1,20	$0,398 \pm 0,059$	-31,3 ± 1,4

Os valores representam a média ± desvio padrão da média das análises obtidas em triplicata. ^aP < 0,05 quando comparado com as AgNPs recém sintetizadas (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey).

Tal tendência cinética também foi observada no monitoramento das NpSB-Verão (10), porém os aumentos das médias dos diâmetros hidrodinâmicos (*Z-Average*) foram de 14,6% e 24,5% no primeiro e no segundo mês, nessa ordem (Tabela I-3). Segundo Prathna e colaboradores (2014), o aumento dos tamanhos das AgNPs pode ser explicado em virtude do acréscimo de espécies absorventes em suas superfícies.

Tabela I-3: Monitoramento cinético da estabilidade coloidal das características físicas das NpSB-Verão (10) por meio de análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta – Lote 1.

Intervalo de tempo	Z-Average (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
Recém sintetizadas	66,95 ±1,39	0,284 ± 0,035	-31,2 ± 0,8
7 dias	70,14 ±3,01	0,311 ± 0,035	-30,6 ± 3,1
14 dias	65,89 ± 0,72	0,272 ± 0,010	$-32,7 \pm 0,6$
21 dias	68,06 ± 1,93	0,331 ± 0,044	-27,8 ± 2,1
1 mês	$76,71 \pm 0,75^{a}$	0,350 ± 0,006	-34,8 ± 8,1
2 meses	$83,37 \pm 0,74$ a	0.348 ± 0.009	-22,7 ± 1,2
3 meses	69,32 ± 0,25	$0,263 \pm 0,003$	-29,9 ± 2,0

Os valores representam a média \pm desvio padrão da média das análises obtidas em triplicata. $^aP < 0.05$ quando comparado com as AgNPs recém sintetizadas (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey).

Quanto às análises de NpSB-Verão (40), notou-se que somente após três meses de síntese é que foram evidenciados aumentos estatisticamente significativos de 45,1% dos diâmetros hidrodinâmicos das AgNPs com relação às recém sintetizadas (Tabela I-5). Comparando esse resultado com os das demais NpSB-Verão (10) e (20), pode ser inferido que as concentrações dos extratos bioredutores são um dos fatores determinantes para estabilidade de um nanossistema biossintetizado (KHATAMI et al., 2017).

Por outro lado, foi observada uma diminuição momentânea e significativa da heterogeneidade das NpSB-Verão (40) de 25,5% após 14 dias de síntese. Já o potencial Zeta novamente não foi um parâmetro que sofreu variações significativas durante o período de monitoramento (Tabela I-5).

Tabela I-5: Monitoramento cinético da estabilidade coloidal das características físicas das NpSB-Verão (40) por meio de análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta – Lote 1.

Intervalo de tempo	Z-Average (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
Recém sintetizadas	72,16 ± 3,02	0,580 ± 0,021	-31,5 ± 2,7
7 dias	71,28 ± 2,10	$0,534 \pm 0,028$	-30,1 ± 1,9
14 dias	66,62 ± 1,92	$0,432 \pm 0,073$ ^a	-35,2 ± 1,0
21 dias	69,25 ± 0,72	0,561 ± 0,019	$-32,5 \pm 4,0$
1 mês	88,04 ± 16,12	0,550 ± 0,025	$-35,9 \pm 4,7$
2 meses	88,24 ± 4,91	$0,543 \pm 0,006$	$-26,2 \pm 3,2$
3 meses	104,72 ± 14,64 a	$0,499 \pm 0,101$	$-32,1 \pm 2,4$

Os valores representam a média \pm desvio padrão da média das análises obtidas em triplicata. $^aP < 0.05$ quando comparado com as AgNPs recém sintetizadas (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey).

Monitoramento cinético da estabilidade coloidal das características físicas das NpSB-Verão produzidas no Lote 2

Foi observado que as NpSB-Verão (10) do Lote 2 apresentaram aumentos crescentes e estatisticamente significativos de diâmetros hidrodinâmicos durante as quatros primeiras semanas de monitoramento (7,3%, 13,3%, 13,9% e 19,8%, respectivamente), assim como tiveram aumentos significativos nos valores de PdI na terceira e na quarta semana do monitoramento (38,3% e 33,8%, respectivamente) (Tabela I-6). Ademais, foi percebido novamente que o tempo após síntese não teve efeito estatisticamente significativo sobre os valores de potencias Zeta dessas AgNPs em suspensão aquosa, situação que se repetiu também nas NpSB-Verão (20) (Tabela I-7) e NpSB-Verão (40) (Tabela I-8).

Tabela I-6: Monitoramento cinético da estabilidade coloidal das características físicas das NpSB-Verão (10) por meio de análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta – Lote 2.

Intervalo de tempo	Z-Average (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
Recém sintetizadas	58,68 ± 1,09	$0,269 \pm 0,006$	-28,0 ± 1,9
7 dias	62,98 ± 0,88 ^a	$0,280 \pm 0,006$	-27.3 ± 0.3
14 dias	66,49 ± 0,31 ^a	$0,290 \pm 0,005$	-29,9 ± 1,1
21 dias	66,86 ± 1,39 ^a	$0,372 \pm 0,020^{a}$	$-27,2 \pm 4,3$
1 mês	$70,33 \pm 0,84^{a}$	$0,360 \pm 0,014$ ^a	-25,8 ±1,6

Os valores representam a média ± desvio padrão da média das análises obtidas em triplicata. ^aP < 0,05 quando comparado com as AgNPs recém sintetizadas (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey).

Adiante foi verificado que da segunda semana até o sexto mês, as NpSB-Verão (20) apresentaram valores de diâmetros hidrodinâmicos estatisticamente superiores aos dos diâmetros das AgNPs recém sintetizadas. No entanto, é interessante destacar que essa situação não ocorreu de forma crescente, uma vez que logo após a segunda semana de síntese esses valores tenderam à estabilização, de modo que os aumentos desse parâmetro foram de 11%, 5,7%, 13,3%, 10,3% e 10,9% nos 14º dia, 21º dia, 1º mês, 4º mês e 6º mês, respectivamente, quando comparados ao dia da síntese. Sobre aos dados de PdI, foi notado que as AgNPs tiveram dois momentos com diferenças estatisticamente significativas (segunda e quarta semana) com aumentos de 38,9% e 40,3% dos valores de PdI, respectivamente, em comparação aos valores iniciais; o que sugere fenômenos momentâneos de aglomerações, já que os diâmetros hidrodinâmicos também aumentaram nessas ocasiões (Tabela I-7).

Tabela I-7: Monitoramento cinético da estabilidade coloidal das características físicas das NpSB-Verão (20) por meio de análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta – Lote 2.

Intervalo de tempo	Z-Average (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
Recém sintetizadas	$52,08 \pm 0,65$	$0,285 \pm 0,002$	-25,8 ± 2,82
7 dias	$52,82 \pm 0,61$	$0,303 \pm 0,007$	-24,1 ± 2,8
14 dias	57,81 ± 0,69 ^a	$0,396 \pm 0,007^{a}$	$-25,8 \pm 3,3$
21 dias	55,03 ± 1,10 ^a	$0,324 \pm 0,032$	$-26,9 \pm 0,7$
1 mês	$59,03 \pm 0,97^{a}$	$0,400 \pm 0,007^{a}$	-27,1 ± 2,2
4 meses	57,45 ± 1,72 ^a	0,292 ± 0,006	$-24,0 \pm 2,6$
6 meses	57,77 ± 0,37 ^a	0,324 ± 0,044	-27,0 ± 2,3

Os valores representam a média ± desvio padrão da média das análises obtidas em triplicata. ^aP < 0,05 quando comparado com as AgNPs recém sintetizadas (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey).

Enquanto isso, no monitoramento da estabilidade das NpSB-Verão (40) durante um mês, foi visualizado que após a segunda semana de síntese ocorreram aumentos estatisticamente significativos dos diâmetros hidrodinâmicos e da homogeneidade das partículas, indicando possível aglomeração das estruturas com o passar do tempo. De modo que nos 14º dia, 21º dia e 1º mês após as sínteses, os aumentos de Z-Average foram de 11,6%, 9,5% e 39,1% e de PdI foram de 27,4%, 27,0% e 34,4%, nessa ordem (Tabela I-8).

Tabela I-8: Monitoramento cinético da estabilidade coloidal das características físicas das NpSB-Verão (40) por meio de análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta – Lote 2.

Intervalo de tempo	Z-Average (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
Recém sintetizadas	$50,02 \pm 0,58$	$0,259 \pm 0,003$	-27,5 ± 2,0
7 dias	52,16 ± 0,23	$0,290 \pm 0,029$	$-27,4 \pm 2,6$
14 dias	55,82 ± 1,39 ^a	$0,330 \pm 0,006$ a	-27,3 ± 1,4
21 dias	54,80 ± 1,37 ^a	0,329 ± 0,016 a	-24,8 ± 6,7
1 mês	69,56 ± 1,00 ^a	$0,348 \pm 0,039$ ^a	$-24,6 \pm 5,4$

Os valores representam a média ± desvio padrão da média das análises obtidas em triplicata. ^aP < 0,05 quando comparado com as AgNPs recém sintetizadas (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey).

Sendo assim, associando os resultados de DLS/potencial Zeta com as cinéticas de formação das NpSBs é possível dizer que a concentração de extrato de *P. emarginatus* de 20 mg/mL se mostrou mais apropriada para a síntese de AgNPs. E ainda, realizando uma comparação entre os dois lotes de NpSB-Verão produzidos foi verificado que as alterações dos valores de diâmetro hidrodinâmico das AgNPs do Lote 1 aconteceram de forma menos expressivas, além dessas apresentarem uma menor variação entre os intervalos de monitoramento. Esses indicativos aliados aos resultados de potenciais Zeta fez com que o Lote 1 fosse o escolhido para continuidade dos testes de caracterização e de atividade biológica *in vitro*.

Ainda nesse contexto, alguns possíveis motivos podem estar relacionados com as diferenças dos resultados entre os lotes de produção de NpSB-Verão. É importante levar em consideração as complexas interações das biomoléculas com os íons metálicos, estas podem estar relacionadas com a disponibilidade de biomoléculas presentes em cada parte vegetal retirada da consequentemente presentes nos extratos. Isto está conectado com a constituição dos componentes biologicamente ativos, que por sua vez são presentes de forma não homogênea, mesmo em um mesmo ramo da planta, podem estes estarem em diferentes combinações e concentrações (SHANKAR et al., 2004; MAKAROV et al., 2014).

NpSB-Inverno - Análises imediatamente após a síntese

Conforme é possível visualizar na Tabela I-9, os dois lotes produziram NpSBs-Inverno com diâmetros hidrodinâmicos distintos entre si, sendo esse parâmetro avaliado pelo diâmetro médio das populações (distribuição de classes) e por *Z-Average*. Com relação ao *Z-Average*, o Lote 1 apresentou valores em média

46,4% maiores do que os identificados no Lote 2, em que as NpSB-Inverno eram de 158,73 e 108,43 nm, respectivamente. Condição concordante ao atestado por Song e Kim (2009), quando utilizaram de concentrações de extratos de folhas superiores a 10% e produziram partículas com tamanhos superior a 100 nm.

Tabela I-9: Análises por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta das NpSB-Inverno e

de seus respectivos controles (Lotes 1 e 2).

L O T E S	Amostras	Diâmetro hidrodinâmico médio das populações de partículas (nm)	Z-Average (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)	Condutividade elétrica (µs/cm)
1	NpSB (20)	54,78 ± 16,10	158,73 ± 9,91	0,674 ± 0,056	$-23,8 \pm 0,9$	44,70 ± 0
	Ext 20	1278,94±357,52	2807,00 ± 610,34	0,568 ± 0,247	-23,5 ± 1,0	36,50 ± 0,10
2	NpSB (20)	19,34 ± 3,03 e 34,09 ± 10,28	108,43 ± 0,91	0,372 ± 0,012	-23,9 ± 0,5	45,63 ± 2,34
	Ext 20	1375,61 ± 291,44 e 848,44 ± 149,96	4229,33±738,83	0,475 ± 0,152	-20,8 ± 0,5	35,93 ± 0,06

Os valores representam a média ± desvio padrão da média das análises obtidas em triplicata.

Essa diferença entre os lotes também foi observada nos valores de PdI. Contudo, no que tange os valores de potenciais Zeta, foi verificado que as NpSB-Inverno dos dois lotes são incluídas na categoria de suspensões com instabilidade incipiente, de acordo com os critérios da ASTM (1985). Foi observado também que os valores de condutividade elétrica foram bastante semelhantes entre os lotes, mas superiores às condutividades elétricas dos extratos, conforme também observado entre os lotes das NpSB-Verão.

Analisando esses resultados é possível verificar o comprometimento da reprodutibilidade das características físicas e químicas das NpSB-Inverno, sendo que tal tendência também foi observada por Silva (2015) ao sintetizar três lotes de nanoemulsões de óleo de canola e perceber que os diâmetros hidrodinâmicos dos nanomateriais de dois lotes apresentaram diâmetros hidrodinâmicos em uma única população, enquanto que o outro lote apresentou duas subpopulações.

Essa situação demonstra que mesmo frente às expressivas vantagens de sintetizar AgNPs com extratos de plantas, esses processos têm como os principais desafios da química verde, os controles dos tamanhos, das formas e das homogeneidades dos nanossistemas biossintetizados em suspensões; o que faz com que elas enfrentem dificuldades tanto nas obtenções de homogeneidade como

nas reprodutibilidades de suas amostras (AKHTAR; PANWAR; YUN, 2013; SILVA et al., 2017). A variedade dos tamanhos de AgNPs produzidas por rotas de síntese verde se dá pela enorme diversidade de fitoquímicos presentes nas fontes biológicas, capazes de reduzir e estabilizar AgNPs (REMYA et al., 2017).

Já com relação às diferenças das características físicas e químicas entre as NpSB-Verão e NpSB-Inverno, há na literatura diversos fatores que são capazes de justificarem tal acontecimento como é o caso de Ganaie e colaboradores (2014) que salientaram que vários fatores abióticos podem influenciar na produção qualitativa e quantitativa de metabólitos secundários e assim comprometerem a reprodutividade das sínteses. Alguns elementos são capazes interferir sob os tamanhos, morfologias e demais propriedades físicas e químicas das AgNPs biossintetizadas por extratos vegetais, a exemplo das variações geográficas e sazonais (BORASE et al., 2014).

A sazonalidade pode ser um dos fatores abióticos que dificultam as padronizações das matérias primas, podendo implicar em alterações físicas e químicas dos componentes e também terem efeitos sobre as inconsistências da reprodutibilidade (PATHAK; MANDAVGANE; KULKARNI, 2017). Inclusive, Daniel e colaboradores (2013), relataram que vários parâmetros da árvore de *Pterodon emarginatus* como altura, diâmetro e volume cilíndrico da copa podem ser influenciados pelas propriedade e qualidades dos solos.

Além desses, o excesso de água advindo de chuvas fortes pode provocar estresse hídrico que pode vir a ter como consequências a inibição do crescimento da maioria das plantas, alterações da capacidade fotossintética, das biomassas, das estruturas celulares, dos estados nutricionais, entre outras variações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (REZVANI; SOROOSHZADEH; FARHADI, 2012).

Monitoramento cinético da estabilidade coloidal das NpSB-Inverno produzidas nos dois lotes

Sobre monitoramento cinético da estabilidade coloidal das NpSB-Inverno, somente no segundo e no quinto mês após a síntese das NpSB-Inverno do Lote 1 é que foram evidenciadas alterações estatisticamente significativas nos valores de *Z-Average* e PdI, com relação às NpSBs recém sintetizadas. De modo que as diminuições de *Z-Average* foram de 34,6% e 67,6% e as de PdI foram de 42,6% e

65,1%, nos respectivos meses (Tabela I-10). Tal situação fez com que após transcorridos cinco meses desde a síntese desse lote, as NpSBs passaram a apresentar diâmetros menores e homogeneidades maiores. Fato justificado por Cumberland e Lead (2013) que noticiaram que uma redução de tamanho das AgNPs pode ser advinda da remoção das partículas por meio de sedimentação.

Tabela I-10: Monitoramento cinético da estabilidade coloidal das características físicas das NpSB-Inverno (20) por meio de análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta – Lote 1.

Intervalo de tempo	Z-Average (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
Recém sintetizadas	158,73 ± 9,91	$0,674 \pm 0,056$	-23.8 ± 0.9
14 dias	165,77 ± 11,50	0,684 ± 0,062	-23,6 ± 1,5
1 mês	169,07 ± 11,66	0,709 ± 0,041	-24,2 ± 0,3
2 meses	103,87 ± 1,50 ^a	0,387 ± 0,010 ^a	-22,3 ± 0,78
5 meses	81,43 ± 1,62 ^a	0,235 ± 0,005 ^a	-22,6 ± 0,2

Os valores representam a média ± desvio padrão da média das análises obtidas em triplicata. ^aP < 0,05 quando comparado com as AgNPs recém sintetizadas (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey).

As NpSB-Inverno se mostraram mais estáveis do que outras AgNPs biossintetizadas e que têm seus resultados retratadas na literatura, como é o caso das AgNPs sintetizadas com extratos das folhas de *Diopyros kaki* (SONG; KIM, 2009), *Alysicarpus monilifer* (KASITHEVAR et al., 2017) e *Mimusops elengi* (PRAKASH et al., 2013), que se apresentaram estáveis por 4 semanas. No entanto, há relatos de AgNPs biossintetizadas estáveis por apenas alguns dias, a exemplo das AgNPs produzidas com extratos da fruta *Crataegus douglasii* que tiveram estabilidades alteradas após 5 dias de sínteses (MOGHADDAM; DABANLOU, 2014).

Já os valores de potenciais Zeta não foram alterados de forma significativas durante os intervalos do monitoramento (Tabela I-10), sendo que tal situação se repetiu no Lote 2 das NpSB-Inverno. Entretanto, no Lote 2 de NpSB-Inverno (20) foi observado um único intervalo de tempo no qual ocorreram alterações das características físicas das AgNPs com relação aos seus valores iniciais. Isto aconteceu após dois meses da síntese, fazendo com que os nanossistemas tivessem uma redução momentânea de 17,6% dos diâmetros hidrodinâmicos e de 32,3% do PdI (Tabela I-11). Esses elementos aliados à ocorrência de que as NpSB-Inverno do Lote 2 apresentaram características físicas mais próximas das NpSB-Verão fizeram com que esse fosse escolhido para continuação dos testes de caracterização e atividade biológica *in vitro*.

Tabela I-11: Monitoramento cinético da estabilidade coloidal das características físicas das NpSB-Inverno (20) por meio de análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta – Lote 2.

Intervalo de tempo	Z-Average (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
Recém sintetizadas	108,43 ± 0,91	$0,372 \pm 0,012$	$-23,9 \pm 0,5$
14 dias	105,83 ± 1,78	0,364 ± 0,015	$-22,0 \pm 0,7$
1 mês	107,30 ± 1,95	0,357 ± 0,008	-22,7 ± 1,0
2 meses	92,61 ± 1,15 ^a	0,252 ± 0,007 ^a	-23.9 ± 0.8
5 meses	110,30 ± 1,56	$0,339 \pm 0,007$	$-22,2 \pm 0,5$

Os valores representam a média ± desvio padrão da média das análises obtidas em triplicata. ^aP < 0,05 quando comparado com as AgNPs recém sintetizadas (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey).

4.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A realização de análises por MET são muito recorrentes em diversas áreas nanotecnológicas, uma vez que por meio desta técnica são obtidas imagens de nanomateriais em duas dimensões, condição esta que permite investigações de morfologias e diâmetros secos. No entanto, a sua utilização tem demonstrado sucesso também na avaliação temporal em processos de formação e degradação de nanossistemas expostos a determinados meios, bem como em análises ultraestruturais que buscam o entendimento dos seus mecanismos de interações com estruturas celulares (EVANS et al., 2011).

No presente estudo, as imagens adquiridas por MET mostraram que as NpSB-Verão e NpSB-Inverno tiveram formas arredondadas com bordas lisas e diâmetros secos de $33,20 \pm 4,85$ nm (r^2 = 0,97) e $28,10 \pm 6,20$ nm (r^2 = 0,96), respectivamente (Figura I-7).

Existem vários relatos na literatura que corroboram com esse formato típico de AgNPs, como é o caso de Rao e Tang (2017) que por meio do uso de MET atestaram formatos arredondados das AgNPs sintetizadas utilizando extratos foliares de *Eriobotrya japonica*. A mesma evidência foi encontrada anteriormente por Ghaedi e colaboradores (2015) ao utilizarem extratos foliares de *Rosmarinus officinalis* para produzirem AgNPs arredondadas e de diâmetros secos médios de 29 nm, medidas semelhantes as evidenciada no presente trabalho.

Por fim, é possível inferir que quaisquer alterações dos perfis fitoquímicos sucedidas de condições ambientais sazonais (típicas dos períodos de verão e inverno) não modificaram expressivamente o processo de formação ou as formas das NpSBs.

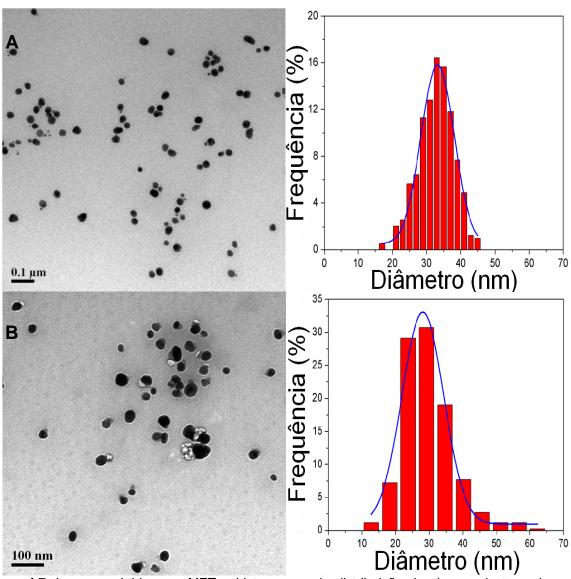


Figura I-7: Imagens obtidas por MET e histogramas da distribuição de classes de tamanhos dos diâmetros secos das NpSB-Verão (Paineis A) e das NpSB-Inverno (Paineis B).

4.3.3 Microscopia de força atômica (MFA)

A MFA é uma técnica que utiliza de uma sonda para realizar análises de varreduras em superfícies amostrais, e conforme o modo de aquisição escolhido é possível extrair informações de topografia, dureza, viscoelasticidade, textura, carga de superfície e campo magnético (MÜLLER; DUFRÊNE, 2011). A MFA foi utilizada no presente estudo para avaliar a morfologia, altura e possível diferença de viscoelasticidade das amostras secas de NpSBs. Desse modo, foi verificado que as NpSB-Verão e as NpSB-Inverno apresentaram formatos esféricos, sem a presença de aglomerados e com alturas médias de $33,96 \pm 5,20$ nm (r^2 =0,99) e $20,70 \pm 7,73$ nm (r^2 =0,92), respectivamente (Figura I-8). Da mesma forma, Gaddam e

colaboradores (2014), Ethiraj e colaboradores (2016), e Kumar e colaboradores (2015) verificaram por MFA as formas esféricas de AgNPs sintetizadas com extratos das folhas de *Cassia alata*, *Alstonia scholaris* e *Morinda tinctoria*, nessa ordem.

Sob outra perspectiva, diferenças de viscoelasticidade na composição das NpSBs foram percebidas pelas imagens de fase, em que a parte interna se mostrou contrastada em relação à superfície, situação ilustrada pela Figura I-9; o que possibilita propor que moléculas do extrato possam estar recobrindo os núcleos metálicos e consequentemente contribuindo para a estabilidade dessas AgNPs. Esse contexto também foi discutido por Kumar e colaboradores (2012) ao utilizarem MFA para caracterizar AgNPs produzidas utilizando extratos aquosos de *Terminalia chebula*. Eles evidenciaram uma fina camada rodeando os núcleos das AgNPs, proporcionando uma cobertura que supostamente seria composta por materiais orgânicos presentes no extrato que estariam atuando na estabilização das AgNPs.

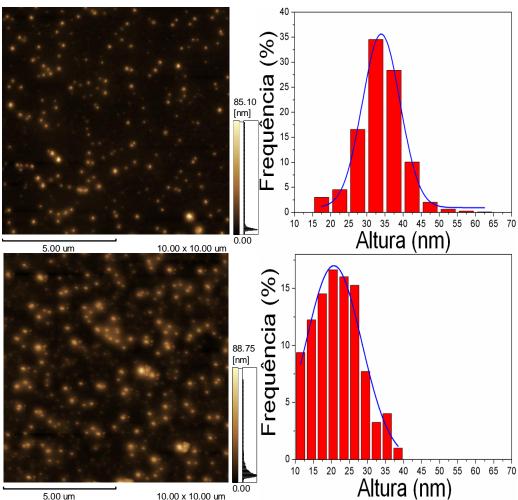


Figura I-8: Imagens de MFA e histogramas de distribuição de classes de tamanhos das alturas secas das NpSB-Verão (Paineis A) e das NpSB-Inverno (Paineis B).

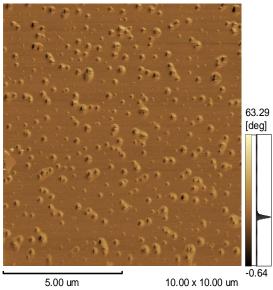


Figura I-9: Imagem de MFA referente à informação de viscoelasticidade das NpSB-Verão.

4.3.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As análises qualitativas dos espectros de FTIR foram utilizadas para verificar se entre os perfis espectrais das NpSBs e seus respectivos controles houveram mudanças proporcionadas pelos comportamentos bioquímicos dos grupos funcionais dos compostos existentes na superfície dessas AgNPs. Ajitha e colaboradores (2015) destacam a importância da caracterização das AgNPs por FTIR, visto que essa técnica tem por finalidade caracterizar e identificar quais os possíveis grupos funcionais das biomoléculas presentes nos extratos das plantas que podem estar envolvidos na formação (biorredução dos íons prata) e no recobrimento das AgNPs.

Nesse contexto, segundo apresentado na Figura I-10, os perfis espectrais dos extratos de *P. emarginatus* por FTIR revelam picos e bandas bastante semelhantes entre si (com leve deslocamento), indicando as mesmas ligações e grupamentos químicos. No extrato das folhas coletadas na estação de verão foram constatado picos proeminentes na região de 1626 e 1057 cm⁻¹, ao passo que no extrato de inverno os picos foram na região de 1628 e 1072 cm⁻¹. Os picos nas regiões de 1626 e 1628 cm⁻¹ podem está atribuídos às vibrações das ligações do grupo funcional de amida I (PRAKASH et al., 2013; BEATTIE et al., 2014), de piridina (BRATSKAYA et al., 2014) ou de grupos carbonilas (1620-1636 cm⁻¹), provavelmente de polifenois (KUMAR; YADAV; YADAV, 2010).

Sobre os picos em 1057 e 1072 cm⁻¹ (Figura I-10), Cruz e colaboradores (2010) afirmaram que tais números de onda são equivalentes a estiramentos vibracionais de C-O-C e C-O em compostos fenólicos, os quais têm participação bem documentada nos processos de biorredução em rotas de síntese verde. Ao tempo que Tameme e colaboradores (2015) salientam que o pronunciamento dos picos 1057 e 1072 cm⁻¹ sugerem ligações do tipo C-O, como ésteres, éteres, álcoois ou ácido carboxílico (TAMEME et al., 2015). Tal hipótese pode ser fortalecida pela presença de bandas largas em todas as amostras analisadas no comprimento de onda de 3400 cm⁻¹, característica de álcoois, reforçando de fato a ocorrência de ácidos carboxílicos, pela comprovação anterior de carbonila. Contudo, tal banda também pode ser indicativa de compostos fenólicos e até da própria água, que pode ter origem amostral ou do próprio KBr por ser altamente higroscópico.

Mohammadlou e colaboradores (2017) relataram por meio de estudos por FTIR que os principais elementos redutores dos extratos foliares apresentam grupos OH (flavonoides, ácido fenólico e ácido cinâmico), enquanto que os principais compostos estabilizantes continham grupos C=C (monoterpenos e sesquiterpenos) em suas estruturas químicas. Corroborando com Panneerselvam e colaboradores (2016) que mencionaram que nas AgNPs sintetizadas com extratos das folhas de *Pteridium aquilinum*, as análises de FTIR apontaram para possíveis presenças de alcalóides, flavonoides, fenóis, proteínas, carboidratos, saponinas, taninos e glicosídeos, os quais podem ser responsáveis pela redução e estabilização.

Já nos espectros das NpSB-Verão e NpSB-Inverno foram observados os mesmos picos identificados nos seus respectivos extratos, mas houve a ocorrência de um pico diferencial no número de onda de 1384 cm⁻¹. Esse pico também foi detectado de forma expressiva no espectro da solução de nitrato de prata, que por sua vez também exibiu um pico em 825 cm⁻¹, sendo este suprimido nas AgNPs (Figura I-10). Tais mudanças espectrais com supressão ou manifestação de picos são sugestivas de biorredução da prata. O pico em 1384 cm⁻¹ na solução de nitrato de prata é bem característico de grupos nitro –NO₂ (1380-1300 cm⁻¹) (LOPES; FASCIO, 2004). O seu aparecimento nas amostras de NpSBs sinaliza que os grupos funcionais de algum metabólito dos extratos se associaram aos íons prata - Ag⁺, modificando o perfil de ligações e possivelmente promovendo a redução em Ag^o.

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

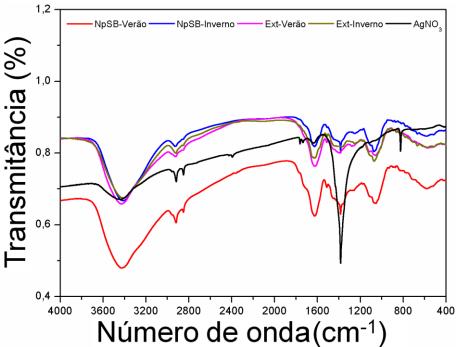


Figura I-10: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (ÉTIR) das NpSBs e seus respectivos controles. Nessa representação, as NpSB-Verão e NpSB-Inverno referem-se às AgNPs sintetizadas com os extratos aquosos das folhas de *P. emarginatus* coletadas nas estações de verão e de inverno a uma concentração de 20 mg/mL, respectivamente. Assim como Ext-Verão e Ext-Inverno referem-se aos extratos aquosos das folhas de *P. emarginatus* coletadas nas estações de verão e de inverno a uma concentração de 20 mg/mL, respectivamente. AgNO₃ refere-se ao material obtido a partir liofilização da solução aquosa de nitrato de prata a uma concentração de 1 mM.

4.3.5 Análises dos perfis moleculares por espectrometria de massa MALDI-TOF

A espectrometria de massa MALDI-TOF (do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*) é uma técnica analítica que ioniza as amostras, por meio de um feixe de laser de alta energia, proporcionando o surgimento e a aceleração de moléculas carregadas (íons) em um campo elétrico ou magnético. Tal ambiente favorece a separação e posterior detecção desses íons moleculares de acordo com sua razão massa/carga. Esse método permite análises de biomoléculas (p. ex. carboidratos, peptídeos, proteínas e ácidos nucléicos) e

também de moléculas orgânicas grandes (p. ex. polímeros e dendrímeros) (CAROLIS et al., 2014; LOU et al., 2015).

Assim, a espectrometria de massa MALDI-TOF foi escolhida com a intenção de avaliar o possível grau de similaridade dos perfis moleculares existente entre as NpSBs e seus respectivos controles e para isso foi adotada a geração de dendrograma dos espectros médios utilizando o método Biotyper. Por definição, dendrograma (diagrama de árvore) é um tipo de sistematização de dados que utiliza de diagramas bidimensionais. Sua construção é realizada levando em consideração análises estatísticas dos elementos obtidos, por meio de métodos quantitativos, que resultam no agrupamento e na ordenação hierárquica das informações de acordo com as suas representações de similaridade (CHONG; LEE; LING, 2013).

As Figuras I-11a e I-11b expõem os espectros de massa, das suspensões aquosas das NpSBs e de seus controles, relativos aos íons compreendidos na faixa m/z de 100 a 1000 como critérios de escolha; enquanto que o dendrograma apresentado na Figura I-12 considerou a abundância e a intensidade dos componentes moleculares detectados por meio do método Biotyper. A partir disso, foi constatado que os controles compostos apenas pelos extratos das folhas de *P. emarginatus* coletadas no período de verão e de inverno apresentaram maior similaridade entre os materiais analisados, sendo que o mesmo ocorreu entre as suspensões aquosas de NpSB-Verão e NpSB-Inverno.

Em geral, observou-se que os extratos tinham perfis de massas moleculares diferentes das NpSBs independentemente da estação de coleta das suas folhas. Isso pode ser explicado como uma consequência do processo de oxirredução visando à formação das AgNPs, no qual a transformação química de algumas moléculas certamente ocorreu, alterando assim a presença ou a abundância dos íons (Figura I-11).

Da mesma forma, a caracterização por MALDI das AgNPs biossintetizadas com extratos aquosos de castanha de caju, revelou que as AgNPs e os seus respectivos extratos sintetizadores pertencem a agrupamentos de perfis de massa moleculares distintos (BONATTO; SILVA, 2014).

A solução de nitrato de prata demonstrou maior paridade com os extratos do que com os nanossistemas (Figura I-12), possivelmente porque o nitrato de prata em

solução aquosa se dissocia, liberando íons de Ag⁺ (massa molecular = 108) e NO³⁻ (massa molecular = 62), ambos com m/z que não permitem serem identificados na faixa molecular pesquisada. O que indica que muitos dos íons observados na Figura I-11 sejam oriundos da ionização da própria matriz (alfa-ciano-4-hidroxicinâmico) utilizada em análises por espectrometria de massa MALDI-TOF.

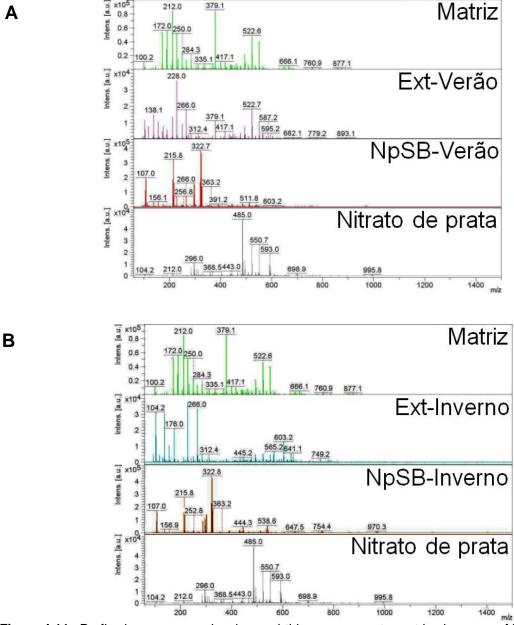


Figura I-11: Perfis de massas moleculares obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF das NpSBs e de seus respectivos controles. Nessas representações, NpSB-Verão e NpSB-Inverno referem-se às AgNPs sintetizadas com extratos das folhas de *P. emarginatus* coletadas nas estações de verão e de inverno a uma concentração de 20 mg/mL, respectivamente. Assim como Ext-Verão e Ext-Inverno referem-se aos extratos aquosos das folhas de *P. emarginatus* coletadas nas estações de verão e de inverno a uma concentração de 20 mg/mL, respectivamente.

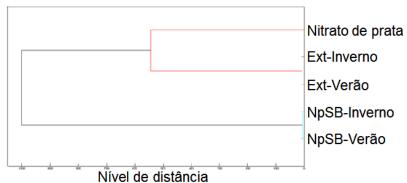


Figura I-12: Dendrograma obtido por espectrometria de massa MALDI-TOF referente aos perfis de similaridade molecular das NpSBs e de seus respectivos controles. Nessa representação, NpSB-Verão e NpSB-Inverno referem-se às AgNPs sintetizadas com extratos das folhas de *P. emarginatus* coletadas nas estações de verão e de inverno a uma concentração de 20 mg/mL, respectivamente. Assim como Ext-Verão e Ext-Inverno referem-se aos extratos aquosos das folhas de *P. emarginatus* coletadas nas estações de verão e de inverno a uma concentração de 20 mg/mL, respectivamente.

4.3.6 Avaliação da cristalinidade por difração de raios X (DRX)

Devido à similaridade entre os perfis moleculares avaliados espectrometria de massa MALDI-TOF entre AgNPs produzidas com extratos de folhas coletadas em diferentes épocas, foi importante avaliar a cristalinidade das NpSBs por meio de análises de DRX, uma vez que esse método analítico é apropriado para se conhecer a organização geométrica dos átomos com base em interpretações dos ângulos de difrações dos raios X emergentes. Isso permite a elucidação das distâncias entre os átomos e consequentemente suas disposições espaciais e nessa maneira é sabido que existem dois tipos de estruturas: amorfas e cristalinas. As primeiras não possuem uma estruturação atômica definida, enquanto que as segundas dispõem de considerável ordenação atômica. O estudo desse parâmetro é de grande relevância, pois ele está diretamente relacionado com as propriedades dos materiais sólidos (MORAM; VICKERS, 2009).

Conforme ilustrado na Figura I-13, os picos de difração atribuídos às reflexões dos planos (111), (200), (220) e (311) foram relacionados à prata com estrutura cúbica de fase centrada, tomando como referência o arquivo de comparação padrão JCPDS N° 04-0783 (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*) e puderam ser observados nas amostras de NpSB-Verão e NpSB-Inverno. De acordo com Anthony e colaboradores (2014), a ausência de picos de outras fases em amostras de AgNPs indica alta pureza dos produtos sintetizados. Assim como Velmurugan e colaboradores (2015), Dhand e colaboradores (2016) e Rónavári e colaboradores

(2017) também relataram esse mesmo padrão de cristalinidade para AgNPs produzidas por rotas de síntese verde.

As constantes de rede, calculadas a partir de padrões, foram de 4,083 Å e 0,4081 Å para as amostras de NpSB-Verão e NpSB-Inverno, respectivamente. Esses valores são muito análogos e consistentes com o valor padrão a = 4,086 Å do arquivo JCPDS N° 04-0783. Adicionalmente, o tamanho cristalino médio das AgNPs foi calculado utilizando a fórmula de Scherrer, tomando como base o pico de difração mais intenso (111). Assim, foram identificados diâmetros médios de 10,9 e 10,4 nm para as amostras das NpSB-Verão e NpSB-Inverno, respectivamente. Uma vez que este é um cálculo baseado na cristalinidade do núcleo das AgNPs, é possível que as diferenças quando comparadas com as medições microscópicas e por DLS estejam relacionadas com os meios distintos de avaliar as amostras e consequentemente as diferenças nos padrões mensuráveis.

A determinação dos tamanhos das AgNPs é conexa com a técnica de caraterização utilizada para tal propósito. No presente estudo, os tamanhos das NpSB determinados por DRX foram menores que os encontrados por DLS, MFA e MET, corroborando com as pesquisas de Sujitha e Kannan (2013) ao constatarem que os tamanhos das AgNPs aumentam da seguinte forma: DLS > TEM > XRD. Isso porque os valores atestados por DLS são justificados em virtude das mensurações dos tamanhos serem feitas com as NPs em meios aquosos, onde os seus núcleos estão envoltas por compostos biológicos orgânicos ou ainda pelas forças de interações das AgNPs em suspensão, a exemplo da força de van der Waals.

Por fim, todas essas evidências confirmam que o arcabouço atômico das NpSBs é equivalente ao de outras AgNPs. Ademais, é possível deduzir que a semelhança entre os perfis espectrais das NpSBs observadas na Figura I-13 demonstra que a época da coleta das folhas de *P. emarginatus* não interferiu na disposição atômica e consequente cristalinidade das AgNPs.

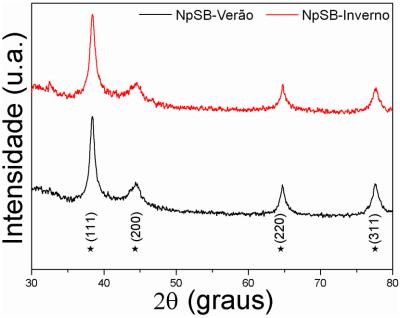


Figura I-13: Difratogramas de raios X das NpSBs, estrelas - prata cúbica Fm-3m, arquivo JCPDS N° 04-0783. Nessa representação, NpSB-Verão e NpSB-Inverno referem-se às AgNPs sintetizadas com extratos das folhas de *P. emarginatus* coletadas nas estações de verão e de inverno a uma concentração de 20 mg/mL, respectivamente.

5. CONCLUSÃO

A diferença sazonal do período de coleta das folhas de *P. emarginatus* (sucupira branca) teve efeito sobre o rendimento do processo de síntese das AgNPs e também nos seus diâmetros hidrodinâmicos e potenciais Zeta. Entretanto, as NpSBs tiveram dimensões secas, perfis de massa molecular e padrões de organização geométrica dos átomos (cristalinidade) similares. Todas essas evidências sinalizam as NpSBs como promissoras para aplicações em diversas áreas da nanobiotecnologia, considerando que elas têm propriedades relativamente semelhantes, mesmo quando a coleta do material biológico ocorre em estações distintas. Além disso, foi possível demonstrar que algumas propriedades podem ser moduladas pela época de coleta das folhas em períodos climáticos distintos, sendo uma característica desejada ao selecionar AgNPs para algumas aplicações.

Agradecimentos: Os envolvidos com o desenvolvimento desse capítulo I da Tese reconhecem o apoio e/ou financiamento das agências e instituições brasileiras CAPES, CNPq, FAPDF, Embrapa e UnB.

Capítulo II: Atividades biológicas in vitro de nanopartículas de prata sintetizadas com extratos aquosos das folhas de P. emarginatus (sucupira branca)

Giselle Zayra da Silva de Oliveira^{1,2}, Alicia Simalie Ombredane², Thiago Cardoso Genaro Mattos³, Carla Becker Soll⁴, Alyne Rodrigues Araújo⁵, Luciano Paulino Silva^{1,2}

RESUMO

Nos últimos tempos vêm se investigando cada vez mais a capacidade de nanopartículas de prata (AgNPs) produzidas por rotas verdes desempenharem atividades biológicas e de terem suas aplicações nas mais diversas áreas da medicina e da agricultura. As AqNPs produzidas utilizando extratos de plantas estão se destacando nesse meio, por oferecerem menores riscos para saúde dos manipuladores e dos consumidores, além de serem produtos mais estáveis, apresentarem menores desperdícios e propiciarem um ambiente de trabalho higiênico. Nesse sentido, esse capítulo II tem como finalidade as atividades citotóxicas, antioxidantes, hemolíticas, antibacterianas e nematotóxicas das AgNPs sintetizadas com extratos aquosos das folhas de sucupira branca (NpSBs) coletadas nos períodos de verão e inverno. Para isso, foram utilizadas linhagens celulares de melanoma murino (B16F10), fibroblasto murino (NIH 3T3) e queratinócito humano (HaCaT) frente às exposições in vitro das NpSBs por 24 e 72h. Enquanto que para investigar o potencial antioxidante in vitro foi analisada a capacidade dos nanossistemas em impedir a degradação de 2-desoxirribose (2-DR). Nos ensaios hemolíticos foram empregadas amostras de sangue bovino frescas, nas avaliações das atividades antibacterianas das NpSB foram utilizadas cepas de Staphylococcus aureus ATCC 29213, Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 e Escherichia coli ATCC 25922, ao tempo que nos testes nematotóxicos foram utilizados nematoides M. incognita juvenis de segundo estádio (J2). Assim, foi verificado que as NpSB-Verão e as NpSB-Inverno apresentaram ação citotóxica expressiva sobre linhagens celulares de melanomas, queratinócitos e fibroblastos. As NpSBs também apresentaram atividade antioxidante marcante na remoção de radicais hidroxilas e insignificante efeito hemolítico. Além disso, foram evidenciadas atividades bactericidas e nematotóxicas acentuadas. Tendo em vista os resultados apresentados, as NpSBs sinalizam potencial terapêutico excelente para patologias neoplásicas, oxidantes, microbianas e causada por fitonematoides, indicando também que são modelos promissores para investigações em modelos in vivo.

Palavras-chaves: Antibacteriana; Antioxidante; Citotoxicidade; Fabaceae; Gramnegativa; Gram-positiva; Hemolítico; Nanopartículas metálicas; Nematoide de galha; Síntese verde.

¹Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO), Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, Brasil.

²Programa de Pós Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, Universidade de Brasília – UnB, Brasília-DF, Brasil.

³Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM), Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, Brasil.

⁴Laboratório de Prospecção de Compostos Bioativos, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, Brasil.

⁵Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, BIOTEC, Campus Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Piauí - UFPI, Parnaíba-PI, Brasil.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente pesquisas em nanotecnologia estão sendo direcionadas para diversos campos de aplicações, como na medicina (diagnósticos, terapêutica e entrega de fármacos: antimicrobianos, antioxidantes, anticâncer, cardiovasculares, entre outros), agricultura (produção de pesticidas), na produção de sensores, indústria para produção de itens de consumo (cosméticos, tintas, entre outros), ciências ambientais, engenharia química, biotecnologia, eletrônica e mecânica (RAJESHKUMAR, 2016).

A utilização da prata e de seus compostos já é adotada na medicina há mais de mil anos como agentes antimicrobianos. No entanto, em virtude das resistências emergentes dos microrganismos e das reduções das eficiências dos antibióticos, as propostas terapêuticas vêm retomando a utilização da prata, no entanto, atualmente sob a forma de AgNPs (EBRAHIMINEZHAD et al., 2017).

As AgNPs despertaram grande interesse em vista de suas propriedades físicas, químicas e biológicas diferencias, fatores que refletem em suas aplicações nas mais diversas áreas. Nesse sentido, está havendo um grande crescimento dos métodos de síntese verde que produzam nanossistemas de forma eficaz e que ao mesmo tempo minimizem a geração de resíduos nocivos para o meio ambiente e para os seres vivos (MAKAROV et al., 2014).

A última década foi de intenso crescimento do número de publicações sobre síntese verde, onde podem ser encontradas mais de 100 fontes biológicas diferentes empregadas para biossíntese de AgNPs (SRIKAR et al., 2016), como é o caso de bactérias, fungos, algas e plantas (SINGH et al., 2016b).

Podem ser encontrados agentes redutores em diversos sistemas biológicos que envolvem organismos vivos desde o reino Monera até os reinos Protista, Fungi e Plantae. Também se tem exemplos de utilizações de membranas, vírus de DNA e diatomáceas. Entre as técnicas de síntese verde, as que empregam extratos de plantas têm demonstrado formação rápida de AgNPs em comparação com os protocolos que utilizam bactérias e fungos, além das manipulações dos fitoconstituintes envolverem uma única etapa de processamento e metodologias de custos baixos, não patogênicas e ecoamigáveis (RAFIQUE et al., 2016).

As AgNPs obtidas por rotas químicas convencionais já tiveram comprovados seus efeitos citotóxicos, próinflamatórios e genotóxicos (SULIMAN et al., 2015). Os efeitos citotóxicos de AgNPs já foram avaliados em hepatócitos (VRČEK et al., 2016) e linhagens celulares de melanoma cutâneo e fibroblastos dérmicos humanos (PÉREZ et al., 2017).

Exemplos de aplicações das AgNPs sintetizadas por métodos de química verde são os seus empregos na obtenção de bioimagens (SANKAR et al., 2017), desenvolvimento de biossensores (LU et al., 2017) e atividades anticâncer (CHUNG et al., 2016); assim como atividades catalíticas, antibiofilmes bacterianos (HAMEDI et 2017) e antioxidantes (RAJAKANNU et al., 2015). Além das atividades anticâncer in vitro contra a linhagem celular de câncer de mama humano (MCF 7) (JANNATHUL; LALITHA, 2015) e atividade antimicrobiana comprovadas com os seguintes microrganismos: Vibrio parahaemolyticus, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus e Candida albicans (ARAVINTHAN et al., 2015) Streptococcus mutans, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae (RAMAR et al., 2015) Pseudomonas fluorescence, Salmonella typhi, Shigella flexneri (MATA; NAKKALA; SADRAS, 2015a), Pseudomonas aeruginosa e Salmonella entérica (MARKUS et al., 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral do capítulo II

Avaliar as atividades biomédicas e agrícolas *in vitro* das nanopartículas de prata sintetizadas com extrato aquoso das folhas de *Pterodon emarginatus* (sucupira branca) (NpSB) coletadas nas estações de verão e de inverno.

2.2 Objetivos específicos do capítulo II

- Analisar as viabilidades celulares de linhagens de melanoma murino (B16F10), fibroblasto murino (NIH 3T3) e queratinócito humano (HaCaT) após exposições in vitro com NpSBs durante 24 e 72h;
- Investigar a capacidade antioxidante in vitro das NpSBs em impedirem a degradação da 2-desoxirribose (2-DR);
- Averiguar o potencial hemolítico in vitro das NpSBs em amostras de sangue bovino fresco:
- Analisar a atividade antibacteriana das NpSB frente às bactérias Staphylococcus aureus ATCC 29213, Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 e Escherichia coli ATCC 25922;
- Avaliar os efeitos nematotóxicos *in vitro* das NpSBs por meio de teste de viabilidade com *Meloidogyne incognita* juvenis de segundo estágio (J2).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

As amostras experimentais adotadas para os testes desse capítulo foram as mesmas sintetizadas e caracterizadas no capítulo I: NpSB-Verão (20 mg/mL de equivalente às folhas brutas em água e 1 mM equivalente ao AgNO₃ livre), NpSB-Inverno (20 mg/mL de equivalente às folhas brutas em água e 1 mM equivalente ao AgNO₃ livre), extratos das folhas de *P. emarginatus* coletadas no verão e no inverno – Ext-Ver e Ext-Inv (20 mg/mL de equivalente às folhas brutas em água) e solução aquosa de nitrato de prata – AgNO₃ (1 mM).

Para estabelecimento das concentrações a serem analisadas em cada teste, tomou-se como referência que 1 mM de nitrato de prata equivale a 170 μg/mL. Assim nas avaliações das atividades citotóxicas, antioxidantes e hemolíticas as amostras foram analisadas nas concentrações de 16, 32 e 48 μg/mL, ao tempo que nas avaliações das atividades bacterianas as concentrações testadas foram de 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,62 μM. Por fim, nos ensaios nematotóxicos as concentrações examinadas foram de 0,16, 1,67 e 16,67 μM.

De acordo com as análises de DLS realizadas no Capítulo I (Tópico 4.3.1), as NpSB-Verão apresentaram diâmetros hidrodinâmicos de 66,58 nm (*Z-Average*), índice de polidispersividade de 0,370 e potencial Zeta de -33,3 mV (Tabela I-1). Enquanto que as NpSB-Inverno apresentaram diâmetros hidrodinâmicos de 108,43 nm (*Z-Average*), índice de polidispersividade de 0,372 e potencial Zeta de -23,9 mV (Tabela I-9).

3.2 Viabilidade celular por MTT

O princípio desse teste se fundamenta na verificação da viabilidade celular tomando como base a avaliação do metabolismo mitocondrial e levando em consideração que em células viáveis as enzimas mitocondriais metabolizam MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) o reduzindo em formazan, que por sua vez tem coloração roxa medida por espectrofotometria (STOCKERT et al., 2012).

As linhagens celulares utilizadas nesses experimentos foram de melanoma murino (B16F10), fibroblasto murino (NIH-3T3) e queratinócito humano (HaCaT), obtidas no Laboratório de Nanobiotecnologia (Instituto de Biologia) da Universidade de Brasília – Campus Darcy Ribeiro, local onde os ensaios também foram realizados. Para a prática desse teste foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais: NpSB-Verão, NpSB-Inverno, Ext-Verão, Ext-Inverno, AgNO₃ e água Milli-Q (veículo diluente – controle negativo). Todos os grupos foram testados em triplicata.

O procedimento comum à todas as linhagens celulares (mencionadas no parágrafo acima) consistiu inicialmente na deposição das células em microplacas de 96 poços (3.000 células/poço) e seus posteriores acondicionamentos em estufa (37°C - 5% de CO₂) por 24 h.

Após essa etapa de plaqueamento, as amostras dos grupos experimentais foram diluídas em meio de cultura [meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco - DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v) e 1% de antibiótico (Penicilina – Streptomicina, Life, EUA) (v/v)] para se obterem as concentrações de 16, 32 e 48 μg/mL equivalente a concentração de AgNO₃. Enquanto que a amostra do controle negativo (veículo diluente) foi preparada com água ultrapura em meio de cultura completo adicionando-se volumes equivalentes aos volumes acrescentados para os grupos experimentais. Terminadas as diluições, 200 μL dessas amostras foram aplicadas nas microplacas contendo as células.

Após 24 e 72h de exposições aos grupos amostrais, os sobrenadantes das culturas celulares foram removidos e 150 μL de solução de sal MTT (1 mg/mL) diluída em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v) e 1% de antibiótico (Penicilina – Streptomicina, Life, EUA) (v/v) foram adicionados. A placa foi novamente incubada por 2 h para metabolização desse sal, e em seguida o meio foi removido para então serem inseridos 150 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). Esse reagente tem por função dissolver os cristais de formazan que podem ter sua absorbância medida no comprimento de onda de 595 nm.

Nesse teste, as maiores absorbâncias refletem maiores viabilidades celulares, assim para o cálculo desse parâmetro assumiu-se que os valores de absorbâncias dos poços com células expostas somente à água representavam 100% de

viabilidade celular, e então por uma equação de regra de três simples foram encontrados os percentuais de viabilidades celulares dos demais grupos.

3.3 Potencial antioxidante

O potencial antioxidante foi investigado por meio de um ensaio *in vitro* que avaliou o quão as NpSBs e respectivos extratos são capazes de impedir a degradação da 2-desoxirribose (2-DR). De modo que em um primeiro momento, as NpSBs (concentrações finais de 16, 32 e 48 μ g/mL equivalente ao nitrato de prata livre) foram adicionadas em microtubos de polipropileno tipo Eppendorf com tampão fosfato de potássio a 20 mM (pH 7,2), 2-DR (concentração final = 5 mM), H₂O₂ (concentração final = 100 μ M) e sulfato ferroso (concentração final = 50 μ M).

Após a adição desses reagentes foi cronometrado o tempo de reação de 10 minutos (24-25°C). Em seguida, foram acrescentados aos meios 500 μL de ácido fosfórico (4%) e 500 μL de ácido tiobarbitúrico (1% em 50 mM de NaOH), então os microtubos foram incubados em banho maria (96°C) por 15 min. Depois desse período, os microtubos foram retirados do banho-maria para que alcançasse temperatura ambiente adequada para o início das leituras espectrofotométricas a 532 nm, comprimento de onda utilizado para medida do malonaldeído formado. Todas as reações foram realizadas em triplicatas.

Para verificar a oxidação a Fe³⁺ interferente foram realizados experimentos à parte com o mesmo racional descrito anteriormente, mas utilizando solução de cloreto férrico (concentração final = 50 μM) como fonte de íons férricos. Tal procedimento teve o intuito de eliminar a possível interferência desses íons nos resultados das reações de degradação da 2-DR. Para a diluição desse sal foi utilizada solução de ácido clorídrico a 10 mM. Posteriormente, foram subtraídas as absorbâncias das reações realizadas com sulfato ferroso das reações utilizando cloreto férrico.

3.4 Ensaio hemolítico

Para avaliações de possíveis efeitos citotóxicos das NpSBs sobre hemácias foram realizados testes hemolíticos no Laboratório de Prospecção de Compostos

Bioativos (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - EMBRAPA) utilizando sangue bovino fresco contendo anticoagulante EDTA.

Após a constatação de que o sangue estava adequado para uso (não coagulado e não hemolisado), iniciou-se o procedimento de lavagem. Para isso, este foi conduzido para centrífuga (5810, Eppendorf, Alemanha) por 5 min a 1385 g. Posteriormente, o soro foi retirado e volume igual de solução salina (0,9% - 25°C) foi introduzida no tubo tipo Falcon contendo as hemácias. Esse material foi homogeneizado com bastante cuidado e em seguida conduzido para uma nova centrifugação. A lavagem do sangue foi repetida por três vezes para adequado isolamento do *pool* de hemácias.

Esse teste teve os seguintes grupos experimentais: NpSB-Verão, NpSB-Inverno, Ext-Verão, Ext-Inverno e AgNO₃ (16, 32 e 48 μg/mL). Além de ter água ultrapura (Milli-Q) e Triton X-100 a 1%, como controles negativo e positivo, respectivamente.

Os ensaios foram realizados em microplaca de 96 poços com fundo chato, onde foram adicionados 20 μ L das amostras dos grupos experimentais juntamente com 180 μ L do material sanguíneo lavado (8%). Em seguida, a mistura foi levada para uma câmara incubadora com agitação orbital (MA 830, Marconi, Brasil) por 30 minutos a 31,2 g (37°C). Após esse período, foi realizada centrifugação (1385 g - 4°C) da placa por 5 min.

Posteriormente, 100 µL do sobrenadante resultante foram transferidos para outra microplaca de 96 poços para serem realizadas leituras espectrofotométricas a 540 nm, comprimento de onda referente à determinação da hemoglobina presente em solução, índice fundamental para quantificação do percentual de hemólise.

3.5 Atividade antibacteriana

Para a avaliação da atividade antibacteriana das NpSBs foram utilizadas duas linhagens bacterianas Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e uma linhagem Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 25922. Para tanto, inicialmente foram determinadas suas Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) pelo método de microdiluição em caldo, conforme normas preconizadas pela CLSI (2012). De modo que após semeio em

ágar Mueller-Hinton (Difco™) e incubação em estufa bacteriológica a 37°C/24 h, as colônias isoladas foram suspensas em solução salina estéril [NaCl 0,85% (p/v)], até que fossem obtidas absorbâncias nos intervalos de 0,08 a 0,1 sob o comprimento de onda de 625 nm, o que corresponde a 0,5 na escala de McFarland (aproximadamente 1-2 × 10⁸ UFC/mL). A partir destas suspensões bacterianas, os inóculos foram confeccionados em caldo Mueller-Hinton (MH), de maneira que a concentração bacteriana final fosse equivalente a 5 × 10⁵ UFC/mL.

Cada estirpe bacteriana foi exposta a diluições seriadas de NpSB-Verão e NpSB-Inverno com concentrações variando de 500 a 15,62 μM de prata. O mesmo procedimento foi realizado para os Ext-Verão e Ext-Inverno (10 a 0,32 mg/mL). Como controle positivo foi determinado a CIM do nitrato de prata – AgNO₃ e dos antibióticos padrão, efetivos contra as bactérias testadas: Oxacilina (*S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. aureus* ATCC 29213) e Meropenem (*E. coli* ATCC 25922). Além disso, também foram realizados controles de esterilidade (caldo MH estéril) e de crescimento (caldo MH inoculado). Após a determinação de todos esses grupos, prosseguiu-se a incubação a 37°C e após 24 h o resultado foi verificado com a adição de 10 μL de Azul de Resazurina (0,01%). A adição desse reagente proporcionou mudança de coloração de azul para rosa mediante o crescimento microbiano.

Após a avaliação do potencial antibacteriano, por meio do ensaio de CIM, foi averiguado também o potencial bactericida dos grupos que apresentaram inibição do crescimento bacteriano. Para isso, foi investigada a Concentração Bactericida Mínima (CBM). Nesse teste, uma alíquota de 10 µL do meio de cultura proveniente dos poços com concentração igual ou maior que a CIM foi inoculada em placas de ágar MH que seguiram para incubação por 24h a 37°C em condições aeróbicas. Por fim, foi identificado o valor de CBM pela menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano sobre o ágar. Os experimentos foram realizados em triplicata e em condições adequadas de assepsia e biossegurança.

3.6 Ensaio nematotóxico

Para efetuação desse teste, 150 µL de suspensão aquosa contendo 60 nematoides *M. incognita* juvenis de segundo estádio (J2) foram colocados em

microtubos tipo Eppendorf juntamente com 150 µL das amostras experimentais. E após 48 h em repouso à temperatura ambiente (21-23°C), as amostras foram depositadas em placa de Peters e levadas ao microscópio para quantificação do percentual de nematoides móveis e paralisados.

Esse experimento teve como controles negativo e positivo a água destilada e o álcool 70%, respectivamente. Enquanto que as amostras (NpSB-Verão, NpSB-Inverno, Ext-Verão, Ext-Inverno e AgNO₃) foram testadas em concentrações finais 0,16, 1,67 e 16,67 μM (equivalente em AgNO₃). Cada exposição foi realizada em triplicata.

3.7 Análises estatísticas

O software Microsoft Office Excel 2010 foi utilizado para calcular os valores das médias e desvios padrões dos dados. Enquanto que o software Past foi aplicado para as demais análises estatísticas (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001), adotando como abordagem de análise de variância o One-Way ANOVA seguido do Teste de Tukey com nível de significância fixado em 5% (*P* < 0.05).

4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 Viabilidade celular por MTT

No presente estudo, esse ensaio teve a finalidade de estimar o comprometimento da viabilidade celular *in vitro* das NpSB-Verão, das NpSB-Inverno e de seus respectivos controles, inicialmente em linhagens neoplásicas típicas de câncer de pele melanômico (B16F10) e posteriormente em células não neoplásicas (NIH 3T3 e HaCAT). As avaliações dos resultados ocorreram após 24 h e 72 h do início dos testes.

4.1.1 Linhagem celular melanômica (B16F10)

Nos experimentos com as células B16F10 foi possível averiguar que todos os grupos testados tiveram reduções das viabilidades celulares em relação ao controle negativo (água). Além disso, todas as concentrações dos extratos testadas diferiram estatisticamente dos seus respectivos nanossistemas, seja nos intervalos de 24 h ou

72 h, demonstrando que as NpSBs apresentaram maiores efeitos citotóxicos em células B16F10 do que os extratos das folhas *P. emarginatus* (Figuras II-1 e II-2).

Na Figura II-1, que faz menção à incubação por 24 h das células B16F10, pode se depreender que na concentração de 16 μg/mL não foram evidenciadas diferenças de efeitos citotóxicos entre as NpSB-Verão e as NpSB-Inverno. No entanto, quando ocorre o aumento da concentração para 32 μg/mL é possível perceber que há uma diminuição acentuada da viabilidade das células B16F10, em que as NpSB-Verão se tornam mais citotóxicas do que a NpSB-Inverno, tendo ainda as NpSB-Verão efeito antiproliferativo *in vitro* comparado ao da solução de AgNO₃, na concentração correspondente. Adicionalmente, foi visto que o aumento das concentrações das NpSBs para 48 μg/mL não proporcionaram aumentos ou diminuições estatísticos das viabilidades das células B16F10 com relação às concentrações anteriores (32 μg/mL) das NpSBs.

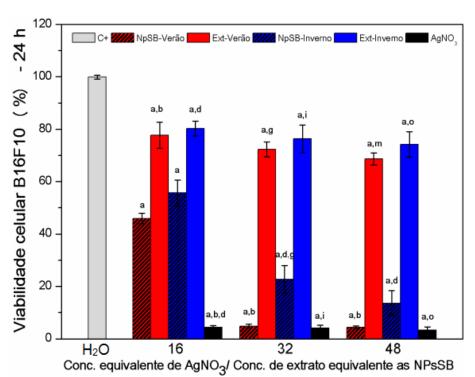


Figura II-1: Viabilidades de linhagens celulares de melanoma murino (B16F10) após exposição *in vitro* com as NpSB-Verão, NpSB-Inverno e seus respectivos controles no intervalo de 24 h. Nessas representações gráficas, os valores representam as médias \pm desvios padrões dos experimentos. a= H₂O (veículo diluente), b= NpSB-Verão (16 μg/mL), c= Ext-Verão (16 μg/mL), d= NpSB-Inverno (16 μg/mL), e= Ext-Inverno (16 μg/mL), f= AgNO₃ (16 μg/mL), g= NpSB-Verão (32 μg/mL), h= Ext-Verão (32 μg/mL), i= NpSB-Inverno (32 μg/mL), i= NpSB-Inverno (32 μg/mL), n= Ext-Inverno (48 μg/mL), p= Ext-Inverno (48 μg/mL), p= Ext-Inverno (48 μg/mL) (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey, P < 0.05).

Outro exemplo de AgNPs biogênicas com efeito citotóxico em células melanômicas pode ser citado por Mukherjee e colaboradores (2014) ao produzirem AgNPs a partir de extratos das folhas de *Olax scandens* que por sua vez não apresentaram toxicidade, por meio de teste MTT (24 h), para as linhagens de células cancerosas como melanoma (B16), câncer de mama humano (MCF7) e câncer de pulmão (A549). No entanto, as AgNPs manifestaram citotoxicidade frente às células normais (células endoteliais da veia umbilical humana – HUVEC e células do cardiomioblasto de rato - H9C2). Nas células melanômicas, esses nanossistemas biossintetizadas proporcionaram inibição da proliferação de células B16 de 35-90% de modo dose dependente (3, 7,5, 15 e 30 µM). Nesse caso, a morte celular estava relacionada com a elevação da população celular na fase sub-G1, que por sua vez está associada diretamente com a indução de apoptose.

Em complemento, Ahmed e colaboradores (2017) enfatizam que as concentrações de AgNPs sintetizadas por rotas de síntese verde necessárias para exercer as inibições das células cancerosas de modo eficiente e com baixa toxicidade para células normais são inferiores às das sintetizadas por vias convencionais.

Em um segundo momento, analisando os experimentos realizados com um tempo de incubação das células B16F10 com as NpSBs por 72 h foram observadas reduções adicionais das viabilidades celulares em todos os grupos avaliados em comparação com as células B16F10 incubadas com NpSBs por 24 h. Também foi verificado que as NpSB-Verão na concentração de 16 µg/mL promoveram perdas das viabilidades das células B16F10 de forma mais significativas estatisticamente do que as incubadas com as NpSB-Inverno na mesma concentração (Figura II-2).

Os aumentos das concentrações para 32 µg/mL garantiram as continuidades dos efeitos antiproliferativos fortes das NpSB-Verão e das NpSB-Inverno frente às células B16F10, sendo que as NpSB-Verão tiveram atividades comparáveis às da solução de AgNO₃ (na concentração correspondente). Por fim, as NpSB-Verão e as NpSB-Inverno nas concentrações de 48 µg/mL não modificaram estatisticamente os efeitos antiproliferativos das células B16F10 em comparação aos efeitos citotóxicos proporcionados pelas NpSB-Verão e as NpSB-Inverno nas concentrações de 32 µg/mL (Figura II-2).

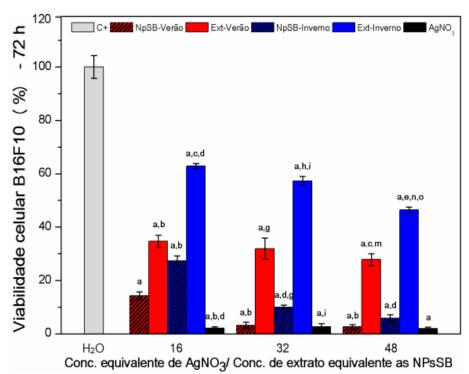


Figura II-2: Viabilidades de linhagens celulares de melanoma murino (B16F10) após exposição *in vitro* com as NpSB-Verão, NpSB-Inverno e seus respectivos controles no intervalo de 72 h. Nessas representações gráficas, os valores representam as médias \pm desvios padrões dos experimentos. a= H₂O (veículo diluente), b= NpSB-Verão (16 μg/mL), c= Ext-Verão (16 μg/mL), d= NpSB-Inverno (16 μg/mL), e= Ext-Inverno (16 μg/mL), f= AgNO₃ (16 μg/mL), g= NpSB-Verão (32 μg/mL), h= Ext-Verão (32 μg/mL), i= NpSB-Inverno (32 μg/mL), i= NpSB-Inverno (32 μg/mL), m= NpSB-Verão (48 μg/mL), n= Ext-Verão (48 μg/mL), o= NpSB-Inverno (48 μg/mL), p= Ext-Inverno (48 μg/mL) e q= AgNO₃ (48 μg/mL) (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey, *P<0,05*).

Também com tempo de incubação de 72 h das linhagens celulares melanômicas com AgNPs sintetizadas utilizando extrato aquoso do pó de ginseng berry foi visto que o aumento da citotoxicidade aconteceu de forma dose dependente (1, 10 e 100 μg/mL), além de serem antioxidantes. No entanto, as AgNPs apresentaram menores toxicidades em relação às linhagens de fibroblasto dérmico humano - HDF. Em contraste, as nanopartículas de ouro não tiveram os mesmos efeitos citotóxicos frente às células melanômicas (PÉREZ et al., 2017).

Nesse contexto, alguns fatores podem influenciar nas toxicidades das AgNPs frente às cancerosas e às células infecciosas, como é o caso dos tamanhos das AgNPs, as menores manifestam maiores toxidades do que as maiores, e isso acontece em virtude das suas áreas de superfícies maiores (KHATOON et al., 2015; ZHANG et al., 2016). Além disso, as citotoxicidades das AgNPs também estão associadas às oxidações da prata metálica em íons Ag⁺, sendo que quanto maiores

as liberações intracelulares dos íons Ag⁺, maiores as toxicidades para as células e os sistemas biológicos (YANG et al., 2012; GLIGA et al., 2014).

Embora a elucidação definitiva do mecanismo de ação das AgNPs não seja completamente esclarecida é sabido que as respostas celulares acontecem quando os nanossistemas entram em contato com as células ou depois de suas internalizações, ou ainda em virtude do mecanismo de captação (GOU; HAYDEN; GU, 2010). As AgNPs, uma vez em contato com as células, alteram a permeação das membranas celulares, fazendo com que ocorra a entrada de íons de Ca⁺, que por sua vez ativam enzimas (p.ex. proteases e endonucleases), reduzem os potenciais das membranas mitocondriais e provocam disfunções das membranas mitocondriais (MOLINA et al., 2010; AKHTAR et al., 2015).

As AgNPs também manifestam seus efeitos citotóxicos por meio das interações físicas e químicas ativas dos átomos de prata com os grupos funcionais proteicos intracelulares e com as bases nitrogenadas e com os grupamentos fosfato do DNA (SATYAVANI et al., 2011). Ademais, há indução da condensação de cromatina e/ou de fragmentação de DNA, anormalidades cromossômicas e mutagenicidade (ZHANG et al., 2014; AKHTAR et al., 2015).

Essas consequências acontecem especialmente em células tumorais e em menor extensão nas células normais, pois as nanopartículas metálicas tipicamente induzem respostas diferentes nesses dois estados celulares (RIVERA et al., 2013). Como por exemplo, elas podem induzir apoptose e autofagia em células cancerosas em determinadas concentrações que não são tóxicas para células não cancerosas (AKHTAR et al., 2015).

Já sobre os mecanismos envolvidos nas terapias neoplásicas com AgNPs biogênicas, Ovais e colaboradores (2016) relatam que esses processos culminam em morte celular, com aprisionamento das células na fase Sub-G1, produção de EROs em células cancerosas, ativação da via apoptótica com regulação positiva de p53, inibição da permeabilidade vascular induzida por VEGF e proliferação celular por meio de vias dependentes de Src e PI3K / Akt. A liberação de íons prata leva à morte celular e tal liberação acontece de forma mais favorecida em células cancerosas devido aos seus ambientes mais ácidos do que em células normais. Assim, esses ambientes ácidos dos tumores propiciam a liberação de

fitoconstituintes presentes nas superfícies das AgNPs biogênicas, potencializando a ação anticâncer.

Os efeitos antiproliferativos das AgNPs biogênicas podem propiciar também a maior permeação dos bioflavonoides contidos nas superfícies das nanopartículas, o que pode desencadear maior propagação do efeito citotóxico (BANU et al., 2018).

4.1.2 Linhagem celular de fibroblastos (NIH-3T3)

Dando continuidade às avaliação de possíveis comprometimentos celulares proporcionados pelas exposições às NpSBs foram realizados também ensaios utilizando fibroblastos, células mais abundantes nos tecidos conjutivos. Na intenção também de simular *in vitro* uma situação em que essas AgNPs ultrapassem o extrato córneo. Sendo assim, esse tipo de ensaio é sugestivo do nível de nanotoxicidade das AgNPs. Saez e colaboradores (2015) enfatizam a importância de se realizarem testes de biocompatibilidade das AgNPs com fibroblastos de pele, visto que seus resultados garantiriam as utilizações de produtos de forma segura e com mínima toxicidade, principalmente em casos de aplicações cutâneas.

Assim, partindo para as análises com as AgNPs foi constatado que as NpSB-Verão na concentração de 16 µg/mL não apresentaram comprometimento da viabilidade celular de fibroblastos (NIH-3T3) de forma significativa em comparação ao controle negativo (veículo diluente - água), situação distinta das NpSB-Inverno que acarretaram em diminuição significativa da viabilidade dos fibroblastos na mesma concentração (Figura II-3). Segundo Foldbjerg e colaboradores (2011), esse metal apresenta toxicidade baixa para as células animais saudáveis e potenciais citotóxicos altos para controlar as células cancerosas. Cherukuri e colaboradores (2010) mencionaram ainda o fato dos seus tamanhos reduzidos propiciarem interações mais efetivas com as biomoléculas celulares, minimizarem as chances de toxicidade sistêmica, além de promoverem uma liberação lenta e controlada dos nanossistemas.

Os aumentos das concentrações de NpSB-Verão e NpSB-Inverno para 32 e 48 µg/mL não promoveram acréscimos estatisticamente significativos dos comprometimentos celulares das NIH-3T3 em relação aos efeitos antiproliferativos

das NpSB-Verão e NpSB-Inverno na concentração de 16 µg/mL, mantendo as NpSB-Inverno em uma posição de maior promotor de citotoxicidade do que as NpSB-Verão, sendo aquelas comparáveis inclusive às soluções de nitrato de prata (Figura II-3).

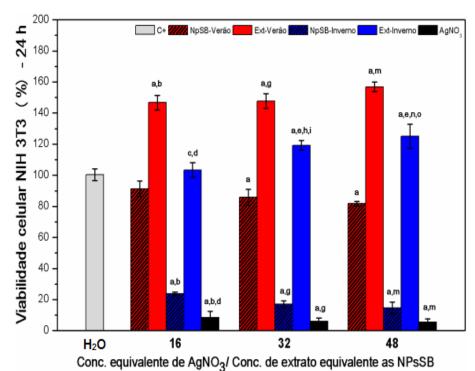


Figura II-3: Viabilidades de linhagens celulares de fibroblastos (NIH 3T3) após exposição *in vitro* com as NpSB-Verão, NpSB-Inverno e seus respectivos controles no intervalo de 24 h. Nessas representações gráficas, os valores representam as médias \pm desvios padrões dos experimentos. a= H₂O (veículo diluente), b= NpSB-Verão (16 μg/mL), c= Ext-Verão (16 μg/mL), d= NpSB-Inverno (16 μg/mL), e= Ext-Inverno (16 μg/mL), f= AgNO₃ (16 μg/mL), g= NpSB-Verão (32 μg/mL), h= Ext-Verão (32 μg/mL), i= NpSB-Inverno (32 μg/mL), i= NpSB-Inverno (32 μg/mL), n= NpSB-Verão (48 μg/mL), n= Ext-Verão (48 μg/mL), o= NpSB-Inverno (48 μg/mL), p= Ext-Inverno (48 μg/mL) e q= AgNO₃ (48 μg/mL) (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey, P < 0.05).

Essa situação também foi verificada por Galandáková e colaboradores (2016), ao identificarem uma toxicidade significativamente maior para as soluções de prata iônica do que as AgNPs (sintetizadas quimicamente), isso em relação a duas linhagens de fibroblastos dérmicos humanos normais (NHDF) e de queratinócitos epidérmicos humanos normais (NHEK) durante 24 h de exposição em ensaios de MTT. Foi visto também que as AgNPs uma vez em contato com as células NIH 3T3 se localizaram em compartimentos endossômicos intracelulares (LEE et al., 2014b), enquanto que AgNPs incubadas por 24 h com fibroblastos gengivais humanos

adentraram nas membranas celulares e se depositaram no interior de mitocôndrias (STEPNIAK et al., 2014).

Já em relação às incubações por 24 h das células NIH-3T3 com os extratos das folhas de *P. emarginatus* coletadas no verão e no inverno foi verificado que estes promoveram aumentos significativos das proliferações celulares em comparação ao controle negativo (veículo diluente - água), mesmo que esse aumento não tenha acontecido de forma dose dependente (Figura II-3). Uma hipótese para tal acontecimento ter ocorrido se encontra no fato de que nesses extratos serem possíveis encontrar diversas fontes de energia que favorecem não só a sobrevivência como a proliferação celular em microambientes como é o caso dos poços das placas, tendo o papel de suprimento energético, pelo quais os extratos das folhas de *P. emarginatus* coletadas no verão se destacam (Figura II-3).

Já quando as análises foram feitas com incubações de NIH-3T3 com NpSBs por 72 h se notaram decréscimos nas viabilidades celulares de todos os grupos experimentais, de modo que os grupos expostos as NpSBs mantiveram, de certa forma (Figura II-4), o mesmo padrão verificado no tempo de incubação de 24 h (Figura II-3).

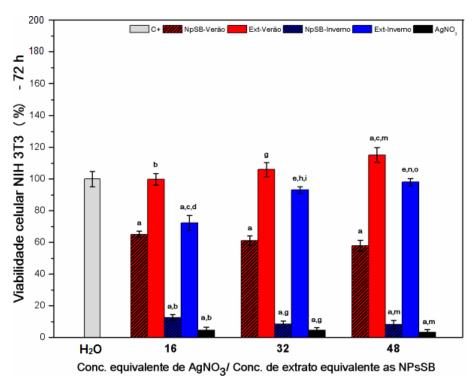


Figura II-4: Viabilidades de linhagens celulares de fibroblastos (NIH 3T3) após exposição *in vitro* com as NpSB-Verão, NpSB-Inverno e seus respectivos controles no intervalo de 72 h. Nessas representações gráficas, os valores representam as médias \pm desvios padrões dos experimentos. a= H₂O (veículo diluente), b= NpSB-Verão (16 μg/mL), c= Ext-Verão (16 μg/mL), d= NpSB-Inverno (16 μg/mL), e= Ext-Inverno (16 μg/mL), f= AgNO₃ (16 μg/mL), g= NpSB-Verão (32 μg/mL), h= Ext-Verão (32 μg/mL), i= NpSB-Inverno (32 μg/mL), i= NpSB-Inverno (32 μg/mL), n= NpSB-Verão (48 μg/mL), n= Ext-Verão (48 μg/mL), o= NpSB-Inverno (48 μg/mL), p= Ext-Inverno (48 μg/mL) e q= AgNO₃ (48 μg/mL) (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey, *P<0,05*).

4.1.3 Linhagem celular de queratinócitos (HaCAT)

Os queratinócitos são as células epiteliais que estão em abundância nos tecidos epiteliais e constituem a primeira barreira para um medicamento ao entrar em contato com a pele (RICE; MAURO, 2009). Assim, para finalizar essa etapa de análises *in vitro* que estuda as consequências das NpSBs em contato com culturas celulares foram realizados ensaios com queratinócitos (HaCAT). No entanto, nesse ensaio foi adicionada uma concentração abaixo das comumente testadas, a de 8 µg/mL, em virtude da concentração de 16 µg/mL ter apresentado comprometimento celular superior a 50%.

Assim, sobre os efeitos das NpSBs foi possível concluir que na concentração de 8 µg/mL não foram observadas diferenças significativas entre as NpSB-Verão e NpSB-Inverno. No entanto, as concentrações de 16 µg/mL de ambas as NpSBs promoveram diminuições estatisticamente significativas das viabilidades das células

HaCAT em relação aos efeitos provocados pelas NpSB-Verão e NpSB-Inverno nas concentrações de 8 μg/mL. Os aumentos das concentrações (32 e 48 μg/mL) não promoveram alterações estatisticamente significativas adicionais (Figura II-5).

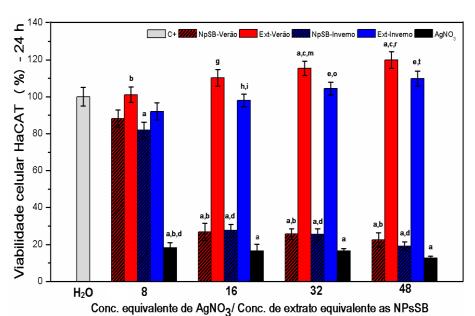


Figura II-5: Viabilidades de linhagens celulares de queratinócitos (HaCAT) após exposição *in vitro* com as NpSB-Verão, NpSB-Inverno e seus respectivos controles no intervalo de 24 h. Nessas representações gráficas, os valores representam as médias \pm desvios padrões dos experimentos. a= H_2O (veículo diluente), b= NpSB-Verão (8 μg/mL), c= Ext-Verão (8 μg/mL), d= NpSB-Inverno (8 μg/mL), e= Ext-Inverno (8 μg/mL), f= AgNO₃ (8 μg/mL), g= NpSB-Verão (16 μg/mL), h= Ext-Verão (16 μg/mL), i= NpSB-Inverno (16 μg/mL), j= Ext-Inverno (16 μg/mL), l= AgNO₃ (16 μg/mL), m= NpSB-Verão (32 μg/mL), n= Ext-Verão (32 μg/mL), o= NpSB-Inverno (32 μg/mL), p= Ext-Inverno (32 μg/mL) e q= AgNO₃ (32 μg/mL), r= NpSB-Verão (48 μg/mL), s= Ext-Verão (48 μg/mL), t= NpSB-Inverno (48 μg/mL), u= Ext-Inverno (48 μg/mL) e v= AgNO₃ (48 μg/mL) (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey, P<0.05).

Outros estudos com AgNPs também exploram atividades tóxicas sobre queratinócitos, como é o caso das AgNPs sintetizadas quimicamente e revestidas com polivinilpirrolidona, que uma vez em contato com queratinócitos epidérmicos humanos primários normais (NHEK) resultaram em reduções de suas viabilidades celulares e de seus potenciais proliferativos e migratórios. Corroborando também com Szmyd e colaboradores (2013) que observaram reduções de 30% da viabilidade de queratinócitos em ensaios de MTT por um período de incubação de 24 h com as AgNPs. E ainda, Franková e colaboradores (2016) revelaram que em incubações de AgNPs por 24 h e 48 h com queratinócitos epidérmicos humanos normais (NHEKs) e fibroblastos dérmicos humanos normais (NHDFs), os NHEKs foram mais sensíveis do que as NHDFs em contato com AgNPs.

Sobre os experimentos de incubação das HaCAT por 72 h com NpSB foi verificado que na concentração de 8 µg/mL, as NpSB-Inverno se apresentaram de forma mais citotóxica do que as NpSB-Verão (Figura II-6), situação não observada no experimento de exposição por 24 h (Figura II-5). Com as demais concentrações de NpSBs foram percebidos padrões similares aos observados na Figura II-5, em que os aumentos das concentrações promoveram reduções significativas das viabilidades celulares, porém sem aumentos adicionais do comprometimento das viabilidade de HaCAT quando a comparação foi realizada entre as concentrações de 16, 32 e 48 µg/mL.

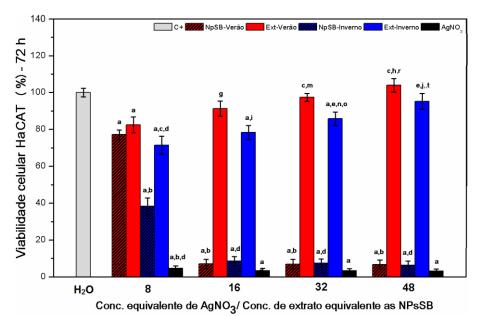


Figura II-6: Viabilidades de linhagens celulares de queratinócitos (HaCAT) após exposição *in vitro* com as NpSB-Verão, NpSB-Inverno e seus respectivos controles no intervalo de 72 h. Nessas representações gráficas, os valores representam as médias \pm desvios padrões dos experimentos. a= H₂O (veículo diluente), b= NpSB-Verão (8 μg/mL), c= Ext-Verão (8 μg/mL), d= NpSB-Inverno (8 μg/mL), e= Ext-Inverno (8 μg/mL), f= AgNO₃ (8 μg/mL), g= NpSB-Verão (16 μg/mL), h= Ext-Verão (16 μg/mL), i= NpSB-Inverno (16 μg/mL), j= Ext-Inverno (16 μg/mL), l= AgNO₃ (16 μg/mL), m= NpSB-Verão (32 μg/mL), n= Ext-Verão (32 μg/mL), o= NpSB-Inverno (32 μg/mL), p= Ext-Inverno (32 μg/mL) e q= AgNO₃ (32 μg/mL), r= NpSB-Verão (48 μg/mL), s= Ext-Verão (48 μg/mL), t= NpSB-Inverno (48 μg/mL), u= Ext-Inverno (48 μg/mL) e v= AgNO₃ (48 μg/mL) (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey, P < 0.05).

4.2 Potencial antioxidante

O estresse oxidativo é apontado com a causa central de doenças crônicas como cânceres e patologias cardiovasculares (MATSUDA; SHIMOMURA, 2013). Nesse contexto, as substâncias antioxidantes podem prevenir doenças associadas ao estresse oxidativo por sofrerem oxidações, neutralizando os radicais livres e

protegerem as células dos seus efeitos danosos (XIA et al., 2006; RAHAL et al., 2014).

Assim, foram realizados também experimentos para avaliar os potenciais efeitos antioxidantes das NpSB-Verão, das NpSB-Inverno e de seus respectivos controles, por meio de análises da atividade de degradação de uma aldopentose conhecida por 2-desoxirribose (2-DR).

O ensaio que avalia a degradação da 2-DR é muito conhecido e utilizado para investigar o potencial anti- ou pró-oxidante que compostos apresentam de sequestrar radicais hidroxilas (-OH). A importância de se avaliar a atividade de sequestro de radicais hidroxilas se dá pelo fato de eles serem uma das EROs mais potentes, sendo capazes de interagir com ácidos graxos poliinsaturados das membranas, ocasionando danos às células (HUANG; ZHANG; CHEN, 2016).

O critério de análise desse teste se baseia na medida de malonaldeído, produto imediato da degradação da 2-DR (MATTOS et al., 2009). Isso porque os radicais hidroxilas ao entrarem em contato com essa aldopentose induzem a formação de malonaldeído, substância que em meio ácido e sob aquecimento, se condensa na presença de ácido tiobarbitúrico, levando à formação da sua forma cromógena que absorve radiação em 532 nm. Para esse ensaio, o potencial antioxidante de um composto está na sua capacidade de remover os radicais hidroxilas do meio reacional, impedindo assim sua interação com a 2-DR e consequente formação de malonaldeído (NASCIMENTO et al., 2014).

A importância de se realizar ensaios como esse em um estudo que também analisam efeitos antiproliferativos *in vitro* de uma substância, encontra-se no fato de que é muito comum o estado oxidativo das células e dos tecidos envolvidos estarem em desequilibrio em processos neoplásicos, de modo que esse estresse oxidativo propicia a ativação de inúmeras cascatas envolvidas em processos fisiológicos que podem agravar a situação neoplásica (GUPTA et al., 2014).

Outros fatores que revelam as consequências diretas da elevação dos níveis de EROs sobre os processos neoplásicos é que elas atuam regulando vias de transdução de sinais que irão influenciar em várias etapas de transformação e progressão tumoral, como por exemplo, a autossuficiência em sinais de crescimento, ilimitado potencial de replicação, insensibilidade a sinais antiproliferativos, evasão da

apoptose, neo-angiogênese e metástase; uma vez que atua diretamente no ciclo celular, envolvendo etapas de diferenciação, transformação e sobrevivência celular. Além de influenciar no metabolismo geral das células envolvidas e circulantes, desencadeando também fenômenos inflamatórios (HANAHAN; WEINBERG, 2011; SILVA; JASIULIONIS, 2014).

As NpSB-Verão e as NpSB-Inverno revelaram uma redução significativa da degradação da 2-desoxirribose, indicando forte capacidade sequestradora de radicais hidroxilas por parte desses nanomateriais (Figura II-7). Analisando a relação entre o aumento da concentração e o efeito inibitório que as NpSBs proporcionaram, é possível inferir que as concentrações apresentaram significativas e crescentes ações protetoras, em especial as concentrações de 32 e 48 µg/mL que exibiram essa atividade de forma mais marcante. Tal situação foi observada pelas NpSB-Verão e NpSB-Inverno, sem diferenças estatísticas significativas quando a comparação é realizada entre os percentuais protetores, nas respectivas concentrações, embora seja observado que as NpSB-Verão demonstraram maiores valores do que as NpSB-Inverno (Figura II-7).

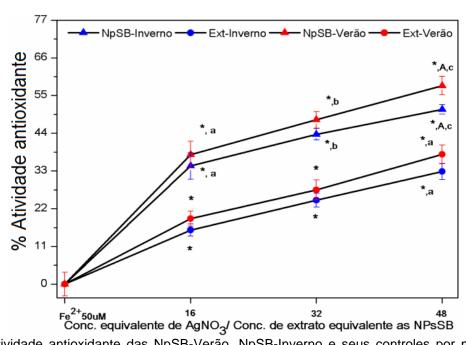


Figura II-7: Atividade antioxidante das NpSB-Verão, NpSB-Inverno e seus controles por meio dos seus potenciais de degradação da 2 desoxirribose. Os valores representam as médias \pm desvios padrões dos experimentos. Nessas representações gráficas, as letras maiúsculas referem-se às nanopartículas, as letras minúsculas referem-se aos extratos, *= Fe²+ 50 μM, Letra a=concentração 16 μg/mL, Letra b=concentração 32 μg/Ml e Letra c= concentração 48 μg/mL (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey, P<0,05).

Nas AgNPs produzidas com extratos aquosos das nozes de *Areca catechu*, a capacidade de eliminação de radicais hidroxilas aumenta conforme a utilização de suas concentrações mais elevadas (RAJAN; VILAS; PHILIP, 2015). Esse efeito de dose dependência também pode ser observado nos experimentos que avaliaram as atividades antioxidantes de AgNPs sintetizadas com extratos aquosos das folhas de *Elephantopus scaber* (KHARAT; MENDHULKAR, 2016), *Fraxinus Excelsior* (PARVEEN et al., 2016), *Prunus japonica* (SARAVANAKUMAR et al., 2017) e *Cassia tora* (SARAVANAKUMAR et al., 2015).

As AgNPs são consideradas agentes antioxidantes ótimos e essa capacidade é proporcional às suas ações redutoras (transferência de elétrons ou hidrogênio) (JENA et al., 2016). Alguns mecanismos de ação antioxidantes são atribuídos às AgNPs, como é caso dos grupos funcionais dos compostos fitoquímicos (compostos fenólicos, fenóis e flavonoides) existentes nos extratos vegetais e aderidos nos revestimentos das superfícies metálicas e que apresentam funções eliminadoras de radicais livres (RAFIE; HAMED, 2014; BHAKYA et al, 2016a; SHMGANI et al., 2017). Segundo Inbathamizh e colaboradores (2013), nas AgNPs sintetizadas com extratos das folhas de *Morinda pubescens*, o seu sucesso na eliminação de radicais hidroxílicos pode estar conexo com os compostos fenólicos presentes.

A presença da prata metálica também eleva a atividade antioxidante (PALANISAMY et al., 2017), assim como as dispersões e a natureza cristalina das AgNPs (BHAKYA et al., 2016b) também contribuem para essa atividade. Adicionalmente, Rajan e colaboradores (2015), relataram que as AgNPs menores demonstraram maiores atividades antioxidantes do que as maiores, isso porque aquelas possuem maiores áreas superficiais.

Em relação aos extratos foi visto que ambos exibiram atividades antioxidantes semelhantes, embora tenham manifestado atividades sequestradoras inferiores às das AgNPs nas concentrações correspondentes (Figura II-7). Todavia, tal capacidade protetora não pode ser desconsiderada, uma vez que esses também são partes componentes dos nanossistemas; sendo, portanto, importante a participação dos extratos em uma formulação futura. Essa situação também foi observada por Banerjee e Narendhirakannan (2011) quando atestaram que AgNPs sintetizadas com extratos das sementes de *Syzygium cumini* apresentam potencial

antioxidante superiores aos respectivos extratos. Da mesma forma que as AgNPs biossintetizadas com os extratos aquosos das folhas de *Iresine herbstii* (DIPANKAR; MURUGAN, 2012) e das pétalas de *Calendula officinalis* (FIERASCU et al., 2014).

Fazendo um confrontamento com os resultados dos testes de MTT, onde foi percebido que a concentração das NpSBs mais adequada para se prosseguir seria a de 32 µg/mL, foi averiguado por meio desse ensaio de degradação da 2-DR que de fato essa possa vir a ser uma boa escolha, uma vez que ela foi responsável por promover proteção antioxidante de 47,9% (NpSB-Verão) e 43,7% (NpSB-Inverno), respectivamente. Frente a isso, pode ser relacionado com a literatura que o efeito anticancerígeno das AgNPs se dá por meio de eliminações de radicais livres e que substâncias antioxidantes manifestam atividades inibitórias de crescimentos e também apoptóticas em células cancerígenas, proporcionando um possível tratamento terapêutico sem efeitos colaterais. Tal resultado pode ser observado com as AgNPs produzidas com extratos aquosos de folhas de Clerodendrum phlomidis (SRIRANJANI et al., 2016). Nesse estudo, foi visto que as NpSBs produziram efeitos antioxidantes e citotóxicos in vitro, de forma semelhante ao que também foi encontrado como as AgNPs produzidas com extratos aguosos de Cymodocea serrulata (CHANTHINI et al., 2015), Cleistanthus collinus (KANIPANDIAN et al., 2014) e das algas Sargassum polycystum (PALANISAMY et al., 2017).

4.3 Ensaio hemolítico

O crescente avanço das pesquisas sobre as propriedades biomédicas de nanossistemas tem aumentado as chances de suas aplicações na área clínica, e para que cheguem nesse estágio de investigação, as realizações de testes nanotoxicológicos são necessárias para garantir a aplicação segura dos mesmos (MARTINEZ; ALVES, 2013). Nesse contexto, os testes hemolíticos são essenciais para avaliação da biocompatibilidade de materiais em glóbulos vermelhos, em relação aos grupos controles, o que torna as suas utilizações nas mais várias áreas mais seguras (PAN et al., 2018). No caso das AgNPs, essa avaliação é bastante pertinente em virtude das diversas possibilidades de destinações e consequente capacidade de entrarem em contato com o sangue (HUANG et al., 2016).

Dessa forma, um dos testes de grande importância a serem realizados é o ensaio de hemólise *in vitro*, por esse permitir a avaliação, mesmo que de forma preliminar, das possíveis consequências de uma eventual exposição das AgNPs na corrente sanguínea; informação de muito relevância, uma vez que o estado hemolítico pode induzir quadros de anemias, toxicidade renal e hipertensão, entre outras patologias. É ponderoso ressaltar que as propriedades físicas, químicas e a estabilidade fisiológica dos nanossistemas podem influenciar no potencial hemolítico das nanoformulações, de modo que os tamanhos, os métodos de síntese, a capacidade de liberação dos íons prata, entre outras questões, podem interferir no percentual de hemólise gerado em organismos (CHOI et al., 2011).

Com base nos resultados obtidos foi atestado que todos os grupos apresentaram valores significativamente inferiores ao controle positivo (Triton 1%). Vale salientar que esses grupos exibiram percentuais hemolíticos muito baixos, não alcançando 5% de hemólise nem mesmo nas maiores concentrações testadas (Figura II-8). Assim, as NpSBs possivelmente podem ser consideradas seguras para fins biológicos, posto que de acordo com a ISO/TR 7406, para um material biológico ser considerado seguro e hemocompatível precisa ter um percentual hemolítico menor que 5% (REJINOLD et al., 2011; GHOSH et al., 2016). Percentual hemolítico semelhante (5,6%) foi observado com as AgNPs sintetizadas utilizando extratos alcóolicos das folhas de tulsi (KHATOON et al., 2015).

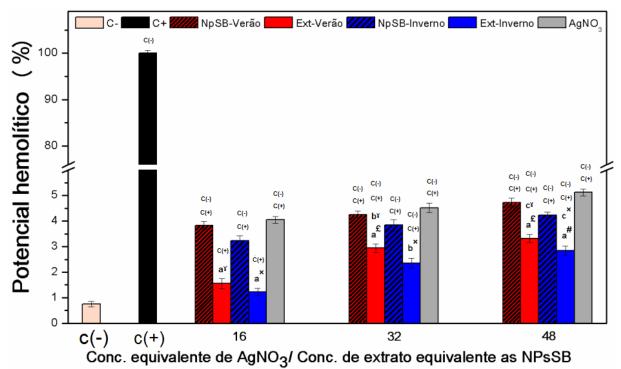


Figura II-8: Avaliação do potencial hemolítico *in vitro* das NpSB-Verão, NpSB-inverno e de seus respectivos controles. Os valores representam as médias \pm desvios padrões dos experimentos. Nessas representações gráficas, C(-) = controle negativo (H₂O), C(+) = controle positivo (Triton 1%), Símbolo $^{\Upsilon}$ = NpSB-Verão, Símbolo $^{\Xi}$ = Ext-Verão, Símbolo $^{\Xi}$ = NpSB-Inverno, Símbolo $^{\Xi}$ = Ext-Inverno, Símbolo $^{\Xi}$ = AgNO₃, a= 16 μg/mL, b= 32 μg/mL e c= 48 μg/mL (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey, p<0,05).

Demais exemplos de AgNPs que não são hemolíticas podem ser encontradas naquelas produzidas com o sumo da fruta Longan que demonstraram percentual hemolítico inferior a 2% em glóbulos vermelhos de rato Wistar albino (KHAN et al., 2016). De modo semelhante, as AgNPs sintetizadas com extratos aquosos de pétalas de *Rosa damascena* revelaram atividade hemolítica de 1,2-1,3% em hemácias de rato Wistar albino (VENKATESAN et al., 2014).

Segundo Chen e colaboradores (2015), a citotoxicidade hemolítica das AgNPs se dá pela interação direta das partículas com as hemácias, o que ocasiona estresse oxidativo, lesão de membrana e consecutiva hemólise. Além das AgNPs, outras nanopartículas metálicas como as de cobre e de ferro, sintetizadas com extratos aquosos de tubérculo de *Curcuma longa*, manifestaram taxas de hemólise inferiores a 1% nos glóbulos vermelhos de ratos (SANKAR et al., 2017).

De forma geral, foi observado também que ambas as nanopartículas (NpSB-Verão e NpSB-Inverno) expressaram maiores potenciais hemolíticos do que seus respectivos extratos. Mas quando a comparação foi realizada entre as concentrações de NpSB-Verão e NpSB-Inverno se evidenciou que não existiam diferenças estatísticas significativas entre elas quanto às suas capacidades de promoverem hemólise. O mesmo foi observado entre os extratos das folhas de *P. emarginatus* coletadas no verão e no inverno (Figura II-8). Uma possível explicação para a atividade hemolítica baixa pode estar relacionada com o fato dessas AgNPs biosintetizadas apresentarem propriedades antioxidantes e compostos fitoquímicos que fazem com que haja uma elevação da capacidade antioxidante plasmática, o que deixa as membranas das hemácias menos propensas a oxidações, levando a um aumento da resistência à hemólise (ZHU et al., 2002).

Também foi evidenciado que as elevações das concentrações das substâncias proporcionaram aumentos hemolíticos, embora nem sempre essas elevações fossem significativos entre as concentrações (Figura II-8). Este fato corrobora os achados de Kim e Shin (2014) que mencionam que a capacidade hemolítica de uma substância é dependente das suas concentrações, ou seja, quanto maior a concentração, maior a percentual hemolítico. Ademais foi certificado que as partículas menores causam mais hemólise do que as maiores.

Sobre o mecanismo hemolítico *in vivo*, este não está esclarecido, mas o que se conhece a respeito aponta que uma substância ao adentrar a via venosa é prontamente recoberta pelos componentes sanguíneos, o que possibilita o reconhecimento por parte do sistema reticuloendotelial e dos macrófagos. De acordo com a Asharani e colaboradores (2010), a hemólise está conectada com a ação das AgNPs, no entanto, Sopjani e colaboradores (2009), associa a capacidade de liberação de íons prata também com o potencial de induzir lise nos eritrócitos.

4.4 Atividade antibacteriana

Com relação às avaliações das atividades antibacterianas, foi visto que as bactérias *S. epidermidis* (Gram positiva) e *E. coli* (Gram negativa) tiveram suas concentrações inibitórias de crescimento (CIMs) de 250 µM com as suspensões de NpSB-Verão, 125 µM com as suspensões de NpSB-Inverno e 62,5 µM com a solução de AgNO₃. Enquanto no teste realizado contra *S. aureus* foi observado que nenhuma das concentrações das suspensões de NpSB-Verão utilizadas nesse ensaio foi suficiente para inibir o crescimento da cepa dessa espécie, ao tempo que

a suspensão de NpSB-Inverno e a solução de AgNO₃ tiveram CIMs de 500 μM e 125 μM, respectivamente (Tabela II-1).

A partir desse resultado, é possível assumir que entre as bactérias Grampositivas, a cepa de *S. epidermidis* foi mais sensível à ação das NpSBs do que a cepa de *S. aureus* (Tabela II-1). Situação também atestada por Arokiyaraj e colaboradores (2014) ao averiguarem que os valores de CIMs das AgNPs sintetizadas usando extratos aquosos de flores *Chrysanthemum indicum* foram maiores para *S. aureus* (>25 μg/mL) do que as *S. epidermidis* (25 μg/mL).

E ainda, a bactéria Gram-negativa *E. coli* foi mais sensível às ações da NpSBs do que as *S. aureus* (Tabela II-1). Nesse contexto, Tamboli e Lee (2013) e Suganya e colaboradores (2015) explicam as diferenças existentes entre as atividades das AgNPs frente às bactérias Gram-positivas e -negativas. Isso porque as Gram-positivas têm paredes celulares com camadas peptidoglicanas mais espessas do que as Gram-negativas, assim em virtude da rigidez da estrutura, há maior dificuldade de penetração das AgNPs e consequente desnaturação e morte.

Podem também ser encontrados na literatura exemplos de AgNPs com atividade bacteriana contra *S. epidermidis*, *S. aureus* e *E. coli*, como é o caso das AgNPs produzidas a partir de extratos aquosos das folhas de *Solanum nigrum* (JINU et al., 2017) e *Arbutus andrachne* (ERDOĞAN et al., 2016). Adicionalmente, Mukherjee e colaboradores (2014) relataram que as AgNPs sintetizadas com materiais biológicos manifestam maiores atividades bacterianas do que as AgNPs sintetizadas quimicamente.

Entre as três substâncias testadas, a solução de AgNO₃ apresentou maior potencial inibitório do que as NpSB-Verão e NpSB-Inverno, mas quando a comparação foi realizada entre as AgNPs, as NpSB-Inverno foram mais potentes do que as NpSB-Verão (Tabela II-1).

Tabela II-1: Concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações bactericidas mínimas (CBM) das NpSB-Verão e NpSB-Inverno frente aos crescimentos das bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*

CIM	Verão		Inverno			СВМ	NPs Verão	NPs Inverno
	NPs	Ext	NPs	Ext	AgNO ₃			
S. aureus ATCC 29213	-	-	500 μM	-	125 µM		-	> 500 µM
S. epidermidis ATCC 12228	250 µM	-	125 µM	-	62,5 µM		> 500 µM	> 500 µM
<i>E. coli</i> ATCC 25922	250 μM	-	125 µM	-	62,5 µM		250 μΜ	125 µM

(-) não apresentou efeito inibitório

Algumas propostas são levantadas para as potentes ações bactericidas das AgNPs, como é o caso delas estarem em escala nanométricas, ou seja, com uma superfície de contato grande, o que propicia uma maior permeação nas membranas bacterianas (RAMESH; KOKILA; GEETHA, 2015). Além disso, a atração eletrostática também pode ser considerada um fator auxiliar na atividade bactericida das AgNPs, uma vez que os íons prata são carregados positivamente, enquanto as células bacterianas são carregadas negativamente e tal situação favorece as adsorções das partículas e as posteriores deformações das membranas e das paredes celulares bacterianas (ZHOU et al., 2014).

Com relação à localização das AgNPs, ao entrarem em contato com as bactérias podem se localizar nas superfícies das membranas e/ou nos seus interiores, podendo interagir com as mitocôndrias, bloquear a cadeia respiratória e inativar as replicações e as interações com proteínas contendo enxofre (como o DNA). As AgNPs também liberam íons prata, propiciando a geração de radicais livres e consequentemente de estresse oxidativo. Bem como podem resultar em danos membranares com formação de poros, extravasamento do conteúdo intracelular, perda de viabilidade, lise e morte celular (KIM et al., 2011; SAHAYARAJ; RAJESH, 2011; KHATOON; AHMAD; SARDAR, 2015).

Já sobre os extratos das folhas de *P. emarginatus* coletadas no verão e no inverno, pode ser visualizado que ambas as amostras não apresentaram efeitos

inibitórios frente às cepas *S. aureus, S. epidermidis* e *E. coli* (Tabela II-1). Estes resultados estão em concordância ao que foi verificado com as AgNPs produzidas utilizando folhas de *Tinospora cordifolia*, em cujas AgNPs demonstraram atividades antibacterianas superiores aos seus extratos sintetizadores (SELVAM et al., 2017).

Foi verificado que tanto na cepa de *S. aureus* como na de *S. epidermidis*, as concentrações de NpSB-Verão e NpSB-Inverno necessárias para exercerem os efeitos bactericidas (CBM) foram maiores do que as concentrações empregadas para realizarem os efeitos inibitórios. Já em relação à *E. coli* foi visto que as concentrações de NpSB-Verão e NpSB-Inverno responsáveis para exercerem os efeitos bactericidas (CBM) são as mesmas para os efeitos inibitórios (Tabela II-1).

4.5 Ensaio nematotóxico

No que tange às avaliações biológicas direcionadas para aplicações agrícolas, essa sessão está destinada para investigação da atividade nematicida de NpSB-Verão e NpSB-Inverno nas concentrações de 0,16, 1,67 e 16,67 μM (equivalente em AgNO₃), tendo álcool como controle positivo e água como controle negativo. Na Figura II-9, as suspensões de NpSB-Verão, NpSB-Inverno e a solução de AgNO₃, nas concentrações de 16,67 e 1,67 μM, resultaram em paralisações de 100% dos *M. incognita* juvenis de segundo estádio (J2), semelhante ao controle positivo (álcool). Enquanto isso, na concentração de 0,16 μM, as suspensões de NpSB-Verão, NpSB-Inverno e a solução de AgNO₃ proporcionaram paralisações de 91,37 ± 6,03%; 86,78 ± 5,38% e 92,99 ± 1,85% dos J2, respectivamente. Vale salientar que esse estudo é pioneiro em demonstrar a atividade nematicida de NpSBs contra *M. incognita*. Tais resultados demonstraram que as estratégias nanotecnológicas envolvendo sínteses de AgNPs apresentam grande potencial para aplicações nematicidas.

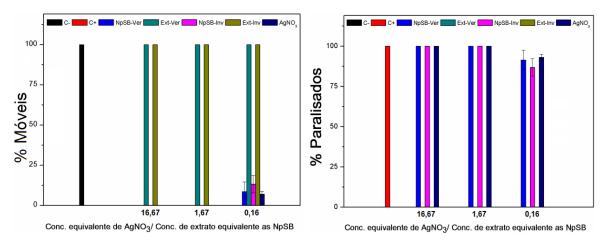


Figura II-9: Avaliação dos efeitos nematotóxicos *in vitro* das NpSBs e seus respectivos controles. Nessa representação gráfica, NpSB-Verão e NpSB-Inverno referem-se às AgNPs sintetizadas com extratos aquosos das folhas de *P. emarginatus* coletadas nas estações de verão e de inverno, respectivamente. Assim como Ext-Ver e Ext-Inv referem-se aos extratos aquosos das folhas de *P. emarginatus* coletadas nas estações de verão e de inverno, respectivamente.

Resultados semelhantes podem ser averiguados também em outras sínteses biológicas de nanopartículas metálicas, a exemplo das AgNPs produzidas por extratos das folhas de *Urtica urens* que demonstraram atividade nematicida marcante contra ovos e larvas (J2) de *M. incognita* (NASSAR, 2016). Da mesma forma que as AgNPs sintetizadas com os extratos aquosos das folhas de *Tridax procumbens* que proporcionaram *in vitro* 100% da mortalidade de *M. incognita* e 91,5% de inibição da eclosão de seus ovos (SUREGA, 2015). Pode ser encontrado na literatura também que as AgNPs sintetizadas por via química inativaram 100% dos J2 de *M. incognita* (CROMWELL et al., 2014). Além das AgNPs, há outros relatos de nanoformulações metálicas produzidas por rotas verdes que apresentam capacidade para manejo de pragas envolvendo ouro, cobre e cádmio (BHAU et al., 2016).

O mecanismo de ação pelo qual as nanopartículas agem sobre os nematoides fitoparasitas *M. incognita* precisa ser estudado, mas acredita-se que este possa acontecer por efeitos físicos com o bloqueio das aberturas sensoriais e das estruturas de alimentação, ou ainda por meio da toxicidade metabólica direta advinda da ingestão de partículas (ARDAKANI, 2013). Em adição, há relatos que frisam que o modo de ação das AgNPs frente aos nematoides de raiz não é específico, e estão relacionados com o bloqueio e ao mau desempenho dos

mecanismos celulares, a exemplo da permeabilidade à membrana, síntese de ATP e resposta ao estresse oxidativo (ROH et al., 2009; LIM et al., 2012).

Em relação aos extratos das folhas de P. emarginatus coletadas no verão e no inverno foi averiguado que estes apresentaram percentuais de paralisação de J2 semelhantes ao do controle negativo (água) em todas as concentrações testadas, ou seja, não manifestaram paralisações de J2 (0%) (Figura II-9). Até o momento, não há evidências de que extratos das folhas de P. emarginatus em qualquer concentração apresentem atividades nematicidas contra M. incognita. O que pode ser encontrado na literatura a esse respeito foi documentado por Forno e colaboradores (2016) ao descreverem que os óleos das frutas secas de P. emarginatus proporcionam ação antioxidante em Caenorhabditis elegans (nematoides de vida livre – não patógenos) proporcionando redução da produção de EROs e elevação dos níveis de enzimas antioxidantes. Tais resultados aumentaram o tempo de sobrevida dos nematoides, não interferiram sobre suas capacidades reprodutivas, protegeram os danos oxidativos e modularam os metabolismos lipídicos.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados é possível inferir que as AgNPs sintetizadas com extratos aquosos das folhas de P. emarginatus coletadas no verão e no inverno são nanossistemas bastante promissores do ponto de vista terapêutico e biotecnológico por terem apresentado efeitos citotóxicos expressivos sobre linhagens celulares melanômicas (NpSB-Verão e NpSB-Inverno: 16, 32 e 48 μg/mL − 24 e 72h), fibroblastos (NpSB-Verão: 32 e 48 μg/mL − 24 e 72h e NpSB-Inverno: 16, 32 e 48 μg/mL – 24 e 72h) e queratinócitos (NpSB-Verão: 16, 32 e 48 μg/mL – 24 e 72h e NpSB-Inverno: 8, 16, 32 e 48 μg/mL – 24 e 72h) não tiveram o mesmo efeito. As NpSBs também demostraram atividade antioxidante marcante na remoção de radicais hidroxilas, sem comprometer a viabilidade eritrocítica. Além disso, foram evidenciadas acentuadas atividades bactericidas е nematotóxicas contra Meloidogyne incognita juvenis de segundo estágio (J2).

Agradecimento: Os envolvidos com o desenvolvimento desse capítulo II da tese reconhecem o apoio e/ou financiamento das agências e instituições brasileiras CAPES, FAPDF, Embrapa e UnB.

CAPÍTULO III: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEMATOTÓXICO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS COM O METABÓLITO I SECUNDÁRIO (QUERCETINA) ENCONTRADO EM FOLHAS DE Pterodon emarginatus (sucupira branca)

OLIVEIRA, G. Z. S.^{1,2}; ROCHA, T. L.³; ENGLER, G.⁴; ENGLER, J. A.⁴; SILVA, L. P. ^{1,2}

RESUMO

A meloidoginose é uma patologia causada pelo *Meloidogyne incognita*, um nematoide que infesta às raízes de plantas produzindo galhas e causando perdas econômicas expressivas no setor agrícola. A nanotecnologia apresenta-se como estratégia útil para o controle desses fitoparasitas. Nesse sentido, o objetivo do presente capítulo III foi sintetizar AgNPs utilizando soluções aquosas de quercetina (NpQ), metabólito secundário encontrado em folhas de Pterodon emarginatus (sucupira branca), visando avaliar os potenciais efeitos nematicidas in vitro e em solo; além de analisar a ação desses nanossistemas no desenvolvimento da planta modelo Arabidopsis thaliana. Portanto, soluções aquosas de quercetina nas concentrações finais de 5, 10 e 20 µM foram adicionadas às soluções aquosas de nitrato de prata na concentração final de 1 mM. As reações foram submetidas à 75°C por 15 min e monitoradas por espectroscopia de absorção em 425 nm. Assim, foi verificado que a formação de NpQ aconteceu com um rendimento mais satisfatório utilizando a concentração de 20 µM de quercetina - NpQ (20), esses nanossistemas apresentaram, de acordo com DLS, diâmetros hidrodinâmicos de 29,06 nm (Z-Average), índice de polidispersividade de 0,561 e potencial Zeta de -23, 7 mV. Foi observado também que diluindo as NpQ (20) e NpQ (10) com água na proporção de 1/500 e 1/5.000, respectivamente, estas promoveram a mortalidade in vitro de 100% dos nematoides, não impediram a germinação das sementes de A. thaliana, bem como não influenciaram no crescimento de plântulas e na regulação de divisões celulares. Ademais foi atestado em experimentos em solo que a exposição durante 5 semanas (1 vez/semana) com NpQ (20) (1/500) resultou na manifestação de efeitos nematotóxico em A. thaliana infectadas por M. incognita, sem provocar desregulações nas divisões nucleares das células das raízes dessa planta. Portanto, a partir desses resultados é possível inferir que a quercetina apresenta satisfatória capacidade formadora de AgNPs, e por sua vez esses nanossistemas sinalizam para relevante nematotoxicidade in vitro e em solo, sem comprometer o desenvolvimento vegetal de A. thaliana.

Palavras-chave: Arabidopsis thaliana; Divisão celular; Fabaceae; Flavonoide; Germinação; *Meloidogyne incognita;* Nanobiotecnologia; Nanopartículas metálicas; Nematoide de nó de raiz; Nematotoxicidade; Plântulas; Síntese verde.

¹Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO), Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, Universidade de Brasília - UnB, Brasília-DF, Brasil.

³Laboratório de Prospecção de Compostos Bioativos, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, Brasil.

⁴Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Recherche PACA, Sophia Antipolis, França.

1. INTRODUÇÃO

O nematoide das galhas, Meloidogyne incognita, está entre uma das principais pragas de importância mundial devido às perdas agrícolas proporcionadas, aos efeitos no campo e às dificuldades de controle (PUERARI et al., 2015; AYDINLI; MENNAN, 2016). Esses vermes são endoparasitas sedentários de diversas raízes de plantas, como milho (PUERARI et al., 2015), cana-de-açúcar (CHAVES et al., 2016), quiabo (MUKHTAR; HUSSAIN; KAYANI, 2017), arroz (NGUYEN et al., 2014), café (BARROS et al., 2014), ervas daninhas (NTIDI; FOURIE; DANEEL, 2016), entre outras. As consequências fisiológicas dessa infestação são atraso na maturidade das plantas, quedas de suas partes vegetais, redução do número de frutos, dentre outros; o que implica em prejuízos econômicos e elevação dos custos de produção (ONKENDI et al., 2014).

O ciclo de vida de *M. incognita* possui os seguintes estádios: ovo, J2, J3, J4 e adulto fêmea/macho. As fêmeas eclodem os ovos nas proximidades das raízes, estes se transformam em juvenis J2, etapa em que eles apresentam potencial infeccioso para adentrarem as raízes e estabelecerem sítios de alimentações e ali permanecem sedentários, condição que se estende para as fases de juvenis J3 e J4, para em seguida se transformarem em adultos machos e fêmeas. Por fim, somente as fêmeas produzem e eclodem os ovos fora do tecido radicular assumindo, portanto, papel de destaque visto que os machos não participam da reprodução (SUBRAMANIAN et al., 2017).

Esses tipos de parasitas ao colonizarem os vegetais tem como estratégia a expressão de supressores imunes que irão suplantar as defesas dos hospedeiros, de maneira a modular as respostas defensivas das plantas (NGUYĒN et al., 2014). Assim, o sucesso dos cultivares irá depender de suas capacidades adaptativas mesmo frente às infecções pelos nematoides (MUKHTAR; HUSSAIN; KAYANI, 2017). Uma das maneiras de disseminação da praga é por meio do plantio de mudas infectadas (BARROS et al., 2014).

No Brasil, os recursos para controle de *M. incognita* consistem na rotação de culturas, pousio, solarização do solo, tratamento térmico, melhoria da estrutura do solo e da fertilidade, manejo com matéria orgânica, introdução de fungos e de bactérias, controle biológico, plantio de cultivares resistentes e uso de nematicidas.

Todavia, a diminuição de aplicações de nematicidas químicos em áreas de plantio é uma crescente, em razão da preocupação com a segurança da saúde humana e preservação ambiental (AKHTAR; MALIK, 2000; BONTEMPO et al., 2014; HUSSAIN; MUKHTAR; KAYANI, 2014; ONKENDI et al., 2014; VIGGIANO; FREITAS; LOPES, 2014). Há também a necessidade de uma colaboração mundial envolvendo a participação de pesquisadores, agricultores, produtores e governantes para a instalação e o cumprimento de medidas fitossanitárias que evitem a introdução de *Meloidogyne* spp., assim como sejam incorporadas tecnologias novas às clássicas para identificação e combate dessa parasitose (ONKENDI et al., 2014).

Nesse contexto, surgiu a possibilidade da utilização de recursos nanotecnológicos para minimizar os obstáculos advindos das escolhas terapêuticas empregadas para controle de nematoides, visto que os métodos existentes não são muito eficientes. A utilização de nanoestruturas traria como vantagens seus tamanhos pequenos, grande relação área de superfície/volume e sua liberação lenta, controlada e direcionada por períodos mais prolongados; trazendo assim uma opção para prevenção e tratamento de nematoides patogênicos, além de poder proporcionar um monitoramento mais efetivo (BHAU et al., 2016).

A proposta da inserção da nanotecnologia também têm como objetivos diminuir o uso indiscriminado de pesticidas convencionais, reduzir as doses de aplicação, minimizar os impactos ao meio ambiente e a exposição humana, além de proteger os agentes nematicidas da degradação, melhorar suas solubilidades, permeabilidades e estabilidades. Os polímeros, sílica porosa e argila são alguns exemplos de materiais que tiveram sucesso na nanoencapsulação de pesticidas e no controle de pragas na agricultura (NURUZZAMAN et al., 2016), como por exemplo, as formulações de microcápsulas inseticidas (ZHANG et al., 2016), nanopartículas poliméricas fungicida (XU et al., 2014), nanocápsulas nematicidas (YIN et al., 2012), entre outros.

É importante destacar a importância da utilização de tecnologia verde para produção de sistemas nanométricos para fins de controle de pragas agrícolas, uma vez que tais abordagens têm como proposta trazer uma contribuição importante para redução de riscos ambientais e exposição humana (NURUZZAMAN et al., 2016).

Nesse cenário, as nanopartículas metálicas obtidas por síntese verde surgem como uma interessante possibilidade para avaliação de seus efeitos nematicidas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral do capítulo III

Avaliar o potencial nematotóxico de AgNPs sintetizadas com um metabólito secundário (quercetina) encontrado nas folhas de *P. emarginatus*, visando ao controle do fitoparasita *M. incognita* e análise da ação desses nanossistemas no desenvolvimento de *A. thaliana*.

2.2 Objetivos específicos do capítulo III

- Sintetizar AgNPs utilizando um metabólito secundário (quercetina) encontrado nas folhas de *Pterodon emarginatus* - NpQ;
- Caracterizar as NpQ por meio de técnicas físicas e químicas baseadas em análises de mudanças das colorações dos meios reacionais, espectrofotometria na região do visível (UV-Vis), espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta;
- Avaliar os efeitos nematotóxicos in vitro das NpQ sobre a viabilidade de M. incognita juvenis de segundo estágio (J2);
- Analisar as morfologias dos M. incognita (J2) tratados com NpQ;
- Verificar as influências das exposições com NpQ sobre a germinação de sementes de A. thaliana tipo selvagem (Col-0) e sobre o crescimento de plântulas;
- Averiguar os níveis de ploidia dos núcleos das raízes tratadas com NpQ e crescidas in vitro e em solo;
- Avaliar os efeitos nematotóxicos das NpQ em solo utilizando A. thaliana como planta modelo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparação da solução aquosa de quercetina

Em um béquer, 3 mg de quercetina (massa molar: 302,236 g/mol), obtida comercialmente (Sigma), foram adicionados a 50 mL de água ultrapura (Milli-Q), atingindo uma concentração de 200 µM. Após mistura, o recipiente foi direcionado para uma placa de aquecimento com agitação magnética (Modelo 34532, Snijders, Holanda) por aproximadamente 30 min, alcançando assim a solubilização da quercetina (Figura III-1).

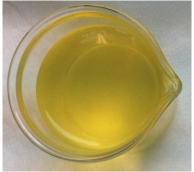


Figura III-1: Solução aquosa de quercetina na concentração de 200 µM.

3.2 Sínteses de nanopartículas de prata utilizando soluções aquosas de quercetina (NpQ)

No processo de formação das NpQ, soluções aquosas de nitrato de prata (concentração final de 1 mM = ~ 170 μg/mL) foram adicionadas em tubos de ensaio de vidro contendo soluções aquosas de quercetina com pH=11 (concentrações finais de 5, 10 e 20 μM), na proporção de 1:1 (v/v), de modo a se obter um volume final de 3 mL. Posteriormente, as reações foram direcionadas ao banho-maria (GD 100, Grant, Reino Unido) e submetidas à temperatura de 75°C por 15 min. Durante esse período, as mudanças de colorações dos meios reacionais foram monitoradas e as cinéticas de formações das NpQ foram avaliadas com espectrofotômetro UV-Vis (UVmc2, Safas Monaco, Mônaco) no comprimento de onda de 425 nm.

Ao término das reações também foram realizadas leituras espectrofotométricas (UVmc2, Safas Monaco, Mônaco) entre os comprimentos de onda de 350 a 550 nm, com intervalos de 5 nm, para observar a possível formação da banda de ressonância plasmônica superficial (RPS) das NpQ.

Esses procedimentos foram realizados no Institut Sophia Agrobiotech (ISA), INRA, UNS, CNRS, Sophia Antipolis, França; e também depois reproduzidos no Laboratório de Nanobiotecnologia – LNANO (Embrapa Cenargen, Brasília- DF).

3.3 Caracterizações das nanopartículas de prata produzidas com soluções aquosas de quercetina (NpQ)

As caracterizações das NpQ foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia – LNANO (Embrapa Cenargen, Brasília- DF), onde foram utilizadas análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta, seguindo as mesmas metodologias descritas do Capítulo I (tópicos 3.5.1).

3.4 Atividades biológicas in vitro das NpQ

Esses experimentos foram realizados sob orientação da Dra. Janice de Almeida Engler e co-orientação do Dr. Gilbert Engler durante um período com bolsa do CNPq de Doutorado Sanduíche em 2016 no "Institut Sophia Agrobiotech" (ISA), INRA, UNS, CNRS, Sophia Antipolis, França.

3.4.1 Avaliação dos efeitos nematotóxicos in vitro das NpQ

Para preparo desse teste, 150 μL de suspensões aquosas contendo 60 nematoides *M. incognita* juvenis de segundo estádio (J2) foram colocados em microtubos tipo Eppendorf juntamente com 150 μL das amostras a serem testadas. Nesse experimento foram estabelecidos os seguintes grupos testes: AgNPs sintetizadas com solução aquosa de quercetina na concentração final de 10 μM – NpQ (10), AgNPs sintetizadas com solução aquosa de quercetina na concentração final de 20 μM – NpQ (20), solução aquosa de quercetina na concentração final de 10 μM – Querc (10), solução aquosa de quercetina na concentração final de 20 μM – Querc (20) e solução aquosa de nitrato de prata na concentração final de 1 mM – AgNO₃ (1 mM).

Todas essas amostras foram testadas com diluições aquosas de 1/500, 1/5.000 e 1/50.000. Além disso, foram utilizados álcool 70% e água destilada como controles positivo e negativo, respectivamente. Cada exposição foi realizado em triplicata. Após 48 h em repouso à temperatura ambiente (21-23°C), as amostras

foram depositadas em lâmina de Peters e levadas ao microscópio para quantificação do percentual de nematoides móveis e paralisados.

3.4.2 Análises morfológicas dos M. incognita (J2) tratados com NpQ

Após avaliações dos efeitos nematotóxicos *in vitro* (Tópico 3.4.1) , 50 μL nas amostras contendo *M. incognita* (J2) incubadas por 48 h com suspensões de NpQ (20) 1/500, Querc (20) 1/500 e AgNO₃ 1/500 foram colocadas em lâminas de vidro e recobertas por lamínulas. Em seguida, foram direcionadas para visualização em microscópio de luz transmitida (Axioplan 2, Carl Zeiss, Alemanha) no modo DIC (*Differential interference contrast optics*) com objetiva de 20 x. O registro das imagens dos nematoides foi realizado com uso de uma câmera fotográfica (Axiocam ICc 1, Carl Zeiss, Alemanha) acoplada ao microscópio.

Esses experimentos foram realizados no Plateau de microscopie do Institut Sophia Agrobiotech, Sophia Antipolis, França.

3.4.3 Teste de germinação de sementes e crescimento de plântulas de *A. thaliana* expostas às NpQ

Com o intuito de investigar os efeitos das NpQ sobre a germinação das sementes de *Arabidopsis thaliana* tipo selvagem (Col-0), estas foram depositadas sobre placas contendo meio MS (Murasige e Skoog) a 1% de sacarose e logo depois foram acondicionadas a 4°C (geladeira) por 48 h, tempo necessário para sincronizar a germinação das sementes.

Após esse período, as placas foram levadas ao fluxo laminar (Vertical tipo V, ADS Laminaire, França) para receberem aplicações de 100 μL de cada grupo amostral sobre as sementes. Nesse teste, foram utilizadas NpQ (10), Querc (10) e AgNO₃ (1 mM) diluídos com água na proporção de 1/5.000, bem como NpQ (20), Querc (20) e AgNO₃ (1 mM) diluídos com água na proporção de 1/500. Também foi estabelecido um grupo teste que teve administração somente de água Milli-Q (controle positivo). É importante observar que todas as amostras foram filtradas (filtro de 0,45 μm) antes do início dos testes.

As sementes presentes no meio MS receberam duas aplicações das grupos amostrais: Depois da retirada da geladeira – início do teste (Dia 0) e sete dias após

o início do teste (Dia 7). Durante esse período, as placas permaneceram em sala de cultivo vegetal *in vitro* (Dagard, França) com 8 h de iluminação artificial/dia a 20°C.

Em um segundo momento, com a finalidade de prosseguir com as averiguações dos efeitos das NpQ sobre o desenvolvimento das *A. thaliana*, as plântulas germinadas em meio MS (uma média de 19 plântulas) foram transferidas para placas com meio de cultivo Knop, que por sua vez possui elementos em sua constituição que favorecem o desenvolvimento de raízes. Após três dias da presença das plântulas nesse meio foram retomados as exposições com as NpQ e seus respectivos controles.

Assim, as plântulas presentes no meio Knop receberam duas aplicações dos grupos amostrais: após 17 e 24 dias do início do teste (Dia 17 e 24). Durante esse período, as placas permaneceram em sala de cultivo vegetal *in vitro* (Dagard, França) com 8 h de iluminação artificial/dia a 20°C.

Os efeitos acumulativos das aplicações de NpQ e seus respectivos controles sobre a germinação e o crescimento das plântulas de *A. thaliana* foram avaliados por meio de registros de imagens das placas por câmera fotográfica e câmera acoplada (Axiocam ICc 1, Carl Zeiss, Alemanha) a lupa binocular (lente ocular de 10x e lente objetiva de 1,25x). Para isso foram adotados os seguintes intervalos de análises: 7, 14, 24 e 31 dias após o início do teste (Dias 7, 14, 24 e 31).

Esses experimentos foram realizados no setor de transgênese (Institut Sophia Agrobiotech, INRA, Sophia Antipolis, França).

3.4.4 Análises dos níveis de ploidia dos núcleos das raízes de *A. thaliana* crescidas *in vitro* e tratadas com NpQ

Ao final do teste anterior (tópico 3.4.3), as raízes advindas do crescimento das plântulas foram retiradas do meio Knop, lavadas em água corrente e levemente secas em papel toalha.

Posteriormente, as porções das raízes sem a presença de galhas foram colocadas em placa de Petri e 200 μ L de tampão de isolamento de núcleos (45 mM de MgCL₂ 6H₂O, 30 mM de Na₃C₆H₅O₇, 20 mM MOPS pH 7,0 e 0,1% Triton X-100 (m/v)) foram adicionados em sua superfície e então, com o auxilio de uma lâmina, foi iniciada a fragmentação manual dessa estrutura vegetal por 2 min. Depois de 5 min

de repouso, 100 µL de tampão de isolamento de núcleos foram acrescentados sobre as raízes. Subsequentemente, todo o conteúdo líquido da placa de Petri foi coletado com uma pipeta e direcionado para filtração em uma tela de nylon de 50 µL (*Partec CellTrics*[®]). Por fim, o filtrado foi colocado em um microtubo tipo Eppendorf e as etapas de adição de tampão e fragmentação, descritas acima, foram mais uma vez repetidas.

Os passos seguintes consistiram no acondicionamento das amostras em gelo, acréscimo de 6 μ L de iodeto de propídio (1 μ g/mL) e análises em citômetro de fluxo (LSR Fortessa, BD Biosciences, Estados Unidos) sob as condições de laser de excitação de 561 nm, filtro óptico BP 605/40 e detector de comprimento de luz 585 < λ < 625 nm (Figura III-2). Esses experimentos foram realizados no Laboratoire de Cytométrie en flux et tri cellulaire (Institut de Pharmacologie Moleculaire et Cellulaire, Sophia Antipolis, França).



Figura III-2: Citômetro de fluxo utilizado para as análises dos níveis de ploidia dos núcleos das raízes de *A. thaliana* crescidas *in vitro* e em solo.

3.5 Avaliações das atividades biológicas em solo das NpQ

Nos testes de atividades biológicas em solo foram utilizadas plantas A. thaliana tipo selvagem (Col-0). No entanto, para obtenção desse modelo vegetal alguns procedimentos foram realizados antes do início dos experimentos. Inicialmente, as sementes de A. thaliana foram colocadas em potes médios (4,5 × 4,5 × 5,0 cm) contendo uma mistura de terra e areia. Em seguida, esses potes foram transportados para geladeira a 4° C, onde permaneceram por 2 dias, visando à sincronização do crescimento das sementes.

A seguir, os recipientes foram direcionados para sala de cultivo vegetal de dia curto (8 h de iluminação artificial/dia à 21°C) para que houvesse a germinação das sementes e crescimento das plantas. Depois de 15 dias, as plantas foram transferidas individualmente para novos potes com as mesmas dimensões dos anteriores (1 planta/pote), o que propiciou o melhor crescimento.

Após um mês, cada planta teve sua raiz infectada com cerca de 500 nematoides (*M. incognita*) e foram direcionadas para sala de crescimento vegetal de dia longo (Dagard, França) a 22°C e sob iluminação artificial por 16 h/dia.

Decorridos 5 dias da infecção, foram estabelecidos quatro grupos amostrais de exposições das plantas: NpQ (20), Querc (20), AgNO₃ (1 mM) e água destilada. Cada grupo contendo 10 plantas. Antes de ser administrada, cada amostra foi diluída com água na proporção 1/500. O cronograma de aplicação consistiu da introdução no solo de 300 µL de cada amostra, uma vez por semana durante 5 semanas. Registros fotográficos das plantas foram realizados no início e ao término do período de tratamento. Esses procedimentos foram realizados no setor de transgênese (ISA, Sophia Antipolis, França).

Por fim, após 42 dias da infecção das plantas com os nematoides, as raízes foram retiradas dos potes e lavadas cuidadosamente, estando, portanto, prontas para os ensaios de avaliação do nível de ploidia nuclear e teste de resistência.

3.5.1 Análises dos níveis de ploidia dos núcleos das raízes de *A. thaliana* crescidas em solo e tratadas com NpQ

Esse teste foi executado de maneira semelhante ao mencionado no tópico 3.4.4.

3.5.2 Avaliação nematotóxica em solo

Após lavagem, as raízes foram colocadas em placas de Petri e direcionadas para lupa binocular. Esse ensaio teve como objetivo avaliar a atividade nematotóxica o das NpQ em plantas *A. thaliana* infectadas com *M. incognita* por meio da quantificação do número total de galhas e do número de galhas com massas de ovos (Figura III-3). Esses procedimentos foram realizados no ISA (Sophia Antipolis, França).

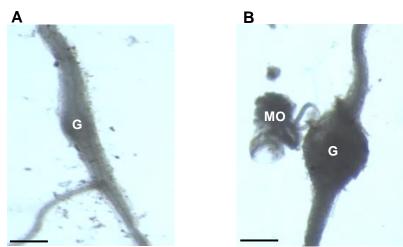


Figura III-3: Raízes de *A. thaliana* infectadas por *M. incognita* na forma de galhas sem (**a**) e com (**b**) massas de ovos. Escala ——: 0,8 mm.

3.6 Análises estatísticas

Com a finalidade de calcular os valores de média e desvio padrão da média dos dados foi utilizado o programa Microsoft Office Excel 2010. Enquanto que para as demais análises estatísticas foi aplicado o programa estatístico Past (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001), adotando como abordagem de análise de variância o One-Way ANOVA seguido do Teste de Tukey com nível de significância fixado em 5% (*P* <0,05).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sínteses de nanopartículas de prata utilizando soluções aquosas de quercetina (NpQ)

Alguns componentes de extratos vegetais são elencados como responsáveis pela redução dos íons de prata e pela estabilização de AgNPs, é o caso dos flavonoides, polissacarídeos, taninos, glicosídeos fenólicos, açúcares redutores (PÉREZ et al., 2017), terpenoides (RAO et al., 2013), ácidos fenólicos (YASIN; LIU; YAO, 2013), polifenóis, proteínas e saponinas (KUMAR et al., 2017); tendo inclusive na literatura relatos a respeito de sínteses de AgNPs utilizando metabólitos isolados, a exemplo de ácido tânico (AHMAD, 2014), ácido gálico (CASTANON et al., 2008), ácido fúlvico (ADEGBOYEGA et al., 2013), polissacarídeos (RAFIE; RAFIE; ZAHRAN, 2013) e aminoácidos (SHANKAR; RHIM, 2015).

Dentre esses elementos, diversas evidências demonstram que flavonoides encontrados em extratos de plantas são os principais compostos redutores responsáveis pela formação de AgNPs (MITTAL et al., 2014; ZUAS; HAMIM; SAMPORA, 2014; SATHISHKUMAR et al., 2016b). Como é o caso da utilização dos flavonoides isolados: quercetina, dihidroquercetina, rutina e morina, dissolvidos em etanol, para formação de AgNPs à temperatura ambiente (TERENTEVA et al., 2015). A quercetina também foi citada como um elemento chave para redução do nitrato de prata em reações envolvendo extratos das folhas de *Acalypha indica* para sintetizar AgNPs (KRISHNARAJ et al., 2012a).

No presente estudo, as soluções incolores de nitrato de prata (concentração final de 1 mM) ao entrarem em contato com as três soluções aquosas e incolores de quercetina (concentrações finais de 5, 10 e 20 μM), induziram mudanças imediatas nas tonalidades dos meios reacionais para amarronzado. A intensificação dessa coloração aconteceu de acordo com o aumento da concentração de quercetina (Figuras III-4a e III-4c). Após 15 min de reação, foi observado também que a suspensão de NpQ (5) praticamente não teve alteração colorimétrica acentuada, permanecendo amarronzada. Ao passo que a suspensão de NpQ (10) assumiu tonalidade castanho-amarelada, nuance que pode ser vista com mais intensidade na suspensão de NpQ (20) (Figura III-4c). Também pode ser notado que diferente dos meios contendo AgNPs, as soluções de quercetina e de nitrato de prata não tiveram alterações de suas colorações ao longo do período reacional (Figuras III-4b e III-4d).

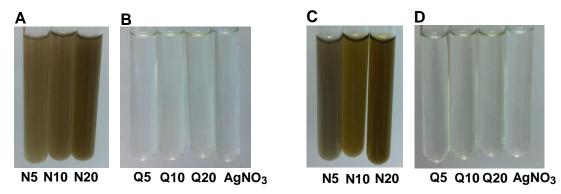


Figura III-4: Mudanças de colorações dos meios reacionais de síntese de AgNPs produzidas com soluções aquosas de quercetina (NpQ). Os painéis A e B são relativos ao início das reações e os painéis C e D ao término das reações. Nas legendas, N5 referem-se às AgNPs sintetizadas com solução aquosa de quercetina na concentração final de 5 μM, N10 às sintetizadas com solução aquosa de quercetina na concentração final de 10 μM e N20 às soluções aquosas de quercetina na concentração final de 20 μM. Assim como Q5, Q10 e Q20 representam as soluções aquosas de quercetina nas concentrações finais de 5, 10 e 20 μM, respectivamente.

Tais transformações de cor dos meios reacionais são indícios de formações de AgNPs rápidas. Uma explicação para esses dois fatores estarem relacionados encontra-se no fato de que a excitação da RPS nas AgNPs é capaz de promover modificações nas colorações das suspensões durante o processo reacional de síntese (SADEGHI; GHOLAMHOSEINPOOR, 2015).

A constatação de que a solução aquosa de quercetina age como um agente redutor relevante de íons prata é suportada por Yuan e colaboradores (2016) que destaca a capacidade da quercetina em doar elétrons ou átomos de hidrogênio dos seus grupos hidroxilas livres, podendo fácil e rapidamente reduzir os íons prata, além de também poder atuar como elemento para evitar aglomeração das AgNPs. Na Figura III-5, Bose e Chatterjee (2016), propuseram um esquema reacional para a redução dos íons de prata pela quercetina.

Figura III-5: Esboço da reação de redução dos íons Ag^+ (a) e recobrimento das AgNPs (b) por quercetina (Fonte: BOSE; CHATTERJEE, 2016).

No tocante aos monitoramentos cinéticos de formações das AgNPs foi possível constatar que as NpQ atingiram a máxima intensidade de absorbância, indicativa de completa redução iônica, após 10 min do início das reações. Para mais,

entre as concentrações de quercetina empregadas no ensaio (concentrações finais de 5, 10 e 20 μM), a que apresentou maior potencial para reduzir os íons prata foi a de 20 μM, seguida pela concentração intermediária de10 μM (Figura III-6).

Esse tempo reacional de 10 min também foi observado por Raja e colaboradores (2017) ao sintetizarem AgNPs com extrato das folhas de *Calliandra haematocephala* à temperatura de 80°C; período de tempo curto em comparação com sínteses que podem necessitar de horas (KHAN et al., 2014; MIE et al., 2014).

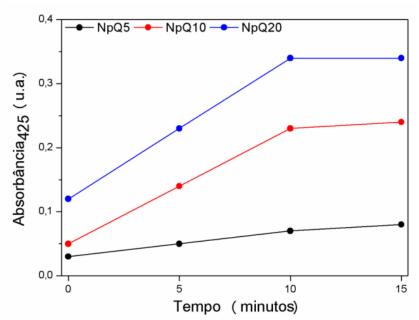


Figura III-6: Monitoramentos cinéticos de formações das NpQ por leituras espectrofotométricas (425 nm) durante 15 min. Nessa representação gráfica, NpQ (5) referem-se às AgNPs sintetizadas com solução aquosa de quercetina na concentração final de 5 μM, NpQ (10) às sintetizadas com solução aquosa de quercetina na concentração final de 10 μM e NpQ (20) às sintetizadas com solução aquosa de quercetina na concentração final de 20 μM.

A realização de leituras espectrofotométricas e obtenção de curvas de absorção na região do UV-Vis foi outro modo muito útil para evidenciar a formação de AgNPs. Nesse trabalho, foi verificado que apenas os meios reacionais contendo soluções de quercetina nas concentrações finais de 10 e 20 µM e nitrato de prata apresentaram bandas espectrais em torno dos comprimentos de onda de 400 a 425 nm (Figura III-7), ratificando a presença de AgNPs.

Esses resultados corroboram com relatos da literatura que documentaram que em AgNPs, a banda de RPS, geralmente, é detectada na região de 350 a 500 nm (BINDHU; UMADEVI, 2015). Este fenômeno também foi descrito por

Anandalakshmi e colaboradores (2016) ao postularem que a banda de absorção de RPS se manifesta por meio de uma vibração conjunta dos elétrons das AgNPs ao serem atingidos por determinados comprimentos de onda da luz.

E ainda, concatenando com a literatura, a banda evidenciada no presente estudo (400 - 420 nm) foi semelhante à observada por Yuan e colaboradores (2017) ao sintetizarem AgNPs com pico máximo de absorção em 420 nm. No entanto, a referida reação aconteceu a partir da incubação da solução de AgNO₃ com quercetina dissolvida em DMSO (dimetilsulfóxido) por 1 h a 40°C.

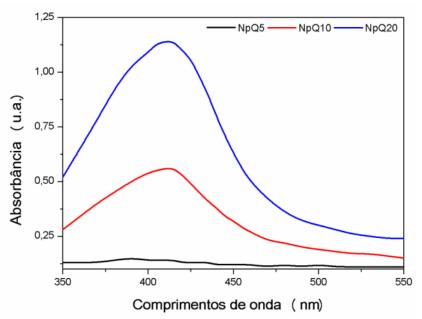


Figura III-7: Curvas de absorções das AgNPs sintetizadas com soluções aquosas de quercetina (NpQ). Nessa representação gráfica, NpQ (5) referem-se às AgNPs sintetizadas com solução aquosa de quercetina na concentração final de 5 μ M, NpQ (10) às sintetizadas com solução aquosa de quercetina na concentração final de 10 μ M e NpQ (20) às sintetizadas com solução aquosa de quercetina na concentração final de 20 μ M.

4.2 Caracterizações das nanopartículas de prata produzidas com soluções aquosas de quercetina (NpQ)

4.2.1 Análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta

A partir das análises por DLS foi observado que as suspensões de NpQs tiveram seus diâmetros hidrodinâmicos (*Z-Average*) diminuídos à medida que a concentração de quercetina foi aumentada no meio reacional, com as NpQ (5), NpQ (10) e NpQ (20) apresentando diâmetros hidrodinâmicos de 81,94 ± 1,92 nm, 57,31

± 1,16 nm e 29,06 ± 0,17 nm, respectivamente. Nesse contexto, os valores de *Z-Average* das NpQ (5) e das NpQ (10) foram aproximadamente 182,0% e 97,2% maiores em média que os valores das NpQ (20), respectivamente (Tabela III-1). Enquanto que as AgNPs sintetizadas com solução de quercetina dissolvida em DMSO (dimetilsulfóxido), com tempo de reação de 40°C durante 1 h, apresentam tamanho hidrodinâmico médio de 20 nm (YUAN; PENG; GURUNATHAN, 2017).

Já em relação ao PdI foi identificado que as NpQ (5) e NpQ (10) apresentaram polidispersidades semelhantes e inferiores aos valores das NpQ (20), tendo as NpQ (5) e as NpQ (10) valores de PdI aproximadamente 25,1% e 19,1% menores em média do que os valores das NpQ (20); demonstrando que o aumento da concentração da solução aquosa de quercetina no meio reacional promoveu uma elevação da heterogeneidade dos tamanhos das AgNPs (Tabela III-1).

Por outro lado, a partir das informações obtidas pelos valores de potenciais Zeta foi verificado que as NpQs analisadas no presente trabalho apresentaram-se carregadas negativamente e com valores entre -23,7 e -29,5 mV (Tabela III-1), o que as caracterizam como nanossistemas de instabilidade incipiente segundo a ASTM (1985). Em adição, não foi possível observar uma linearidade entre o aumento da concentração da solução de quercetina no meio reacional e os valores de potenciais Zeta, as NpQ (5) e as NpQ (10) apresentaram valores de potenciais Zeta aproximadamente 24,5% e 41,3% maiores que as NpQ (20), respectivamente.

De acordo com Bollella e colaboradores (2017), a razão das AgNPs sintetizadas com quercetina serem carregadas negativamente pode estar vinculada às moléculas de quercetina adsorvidas nas superfícies das AgNPs. Esses pesquisadores chegaram à essa conclusão ao sintetizarem AgNPs com soluções de quercetina solubilizada em NaOH (temperatura ambiente e pH 7) com Z-Average de $10,06 \pm 0,60$ nm e potencial Zeta de -39 ± 1.3 mV.

Por fim, as NpQ (5) e NpQ (10) nas diluições investigadas apresentaram capacidade de condutividades elétricas semelhantes e inferiores aos valores das NpQ (20). Além disso, é possível atestar que os valores de condutividade elétrica das NpQs apresentam valores maiores que aqueles observados para as soluções de quercetina (Tabela III-1). Além das NpQ (5) e as NpQ (10) apresentarem

condutividades elétricas aproximadamente 43,9% e 44,6% menores que as NpQ (20), respectivamente.

Tabela III-1: Análises por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta das NpQ e de seus

respectivos	controles
163pectivos	COLLINGS.

Amostras	Z-Average (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)	Condutividade elétrica (µs/cm)
NpQ (5)	81,94 ± 1,92	$0,421 \pm 0,027$	$-29,5 \pm 0,1$	63,00 ± 1,73
NpQ (10)	57,31 ± 1,16	$0,454 \pm 0,007$	$-33,5 \pm 0,5$	$62,23 \pm 2,0$
NpQ (20)	$29,06 \pm 0,17$	$0,561 \pm 0,002$	$-23,7 \pm 0,4$	$112,33 \pm 0,58$
Querc (5)	225,63 ± 42,96	$0,430 \pm 0,158$	-16,5 ± 1,8	$51,43 \pm 0,06$
Querc (10)	493,97 ± 222,97	0,891 ± 0,171	-4.7 ± 0.9	$50,03 \pm 2,32$
Querc (20)	188,90 ± 48,18	$0,409 \pm 0,114$	$-9,3 \pm 5,3$	44,50 ± 1,73

Os valores representam a média ± desvio padrão da média das análises obtidas em triplicata.

Ao se realizar uma comparação entre as características físicas (DLS) das NpSB-Verão (20) e das NpSB-Inverno (20) (Capítulo I) com as características físicas (DLS) das NpQ (20), pode ser observado que as NpQ (20) apresentaram diâmetros hidrodinâmicos menores (29,06 nm - *Z-Average*) que as NpSB-Verão (20) (66,58 nm - *Z-Average*) e que as NpSB-Inverno (20) (108,43 nm - *Z-Average*). Essa diferença de valores também foi observada em relação ao PdI, em que as NpQ (20) (0,561) apresentaram maior heterogeneidade nos tamanhos das nanopartículas do que as NpSB-Verão (0,370) e NpSB-Inverno (0,372). Por fim, quando se refere ao potencial Zeta, as NpQ (20) (-23,7 mV) possuem valores semelhantes as NpSB-Inverno (-23,9 mV) e inferiores que as NpSB-Verão (-33,3 mV).

4.3 Atividades biológicas in vitro das NpQ

4.3.1 Avaliação dos efeitos nematotóxicos in vitro das NpQ

Nesse experimento foram utilizadas NpQ (10), NpQ (20) e seus respectivos controles, uma vez que as condições empregadas em suas sínteses demonstraram serem mais eficientes para formações de AgNPs. Assim foi possível constatar que na diluição de 1/500, as NpQ (10), NpQ (20) e AgNO₃ apresentaram um potencial de paralisar 100% dos *M. incognita* (J2) em relação controle negativo (C-= água), dados semelhantes ao efeito do controle positivo (C+= álcool 70%) (Figura III-8).

Já observando os resultados obtidos para diluição 1/5.000 foi visto que as NpQ (10) e AgNO₃ continuaram apresentando potencial para paralisar 100% dos

nematoides. Por outro lado, as NpQ (20) na mesma diluição promoveram paralisação de apenas aproximadamente 30% dos *M. incognita* (J2), efeito estatisticamente inferior aos grupos NpQ (10) - 1/5.000, AgNO₃ - 1/5.000 e NpQ (20) – 1/500, no entanto, sua atividade paralisante de J2 continua sendo superior ao grupo C- (Figura III-8).

Por fim, quando se analisa os efeitos das NpQ (10), NpQ (20) e AgNO₃, diluídas em água na proporção de 1/50.000, foi notado que seus efeitos paralisaram aproximadamente 22%, 17% e 15 % dos J2, respectivamente; de modo que a NpQ (10) 1/50.000 apresentou resultado estatisticamente inferior à diluição de NpQ (10) 1/5.000 e as NpQ (20) 1/50.000 não teve modificação estatisticamente significativa em relação à NpQ (20) 1/5.000. Já a solução de AgNO₃ diluída a 1/50.000 demonstrou resposta estatisticamente inferior ao C+ e a AgNO₃ - 1/5.000, mesmo esta amostra ainda sendo estatisticamente superior ao C- (Figura III-8).

Assim, foi possível inferir que as NpQ (10) e as NpQ (20), diluídas com água na proporção de 1/5.000 e 1/500, respectivamente, foram as diluições das suspensões de AgNPs mais adequadas para continuidade das investigações, pois ambas promoveram a paralização de 100% dos nematoides J2.

Sobre as três diluições empregadas (1/500, 1/5.000 e 1/50.000), as soluções de Quer (10) e Querc (20) foram estatisticamente inferiores às suas respectivas NpQ correspondentes, com exceção da Quer (20) - 1/50.000 que não apresentou diferença estatística com a NpQ (20) – 1/50.000 (Figura III-8).

A referida inibição de 100% do J2 já foi observada em estudo envolvendo sínteses química (HASSAN, 2016) e biológica de AgNPs (SUREGA, 2015). No entanto, a elucidação do mecanismo de ação de AgNPs frente a *M. incognita* não está completamente definida, porém já se sabe que o modo de ação das AgNPs frente aos nematoides das galhas não é específico, podendo este também estar relacionado aos de outros gêneros de fitonematoides e de fungos fitoparasitas. De maneira que este efeito está associado à uma pausa ou a um mau funcionamento dos mecanismos celulares, a exemplo da permeabilidade às membranas, da síntese de ATP e das respostas ao estresse oxidativo (LIM et al., 2012; HAMED et al., 2016).

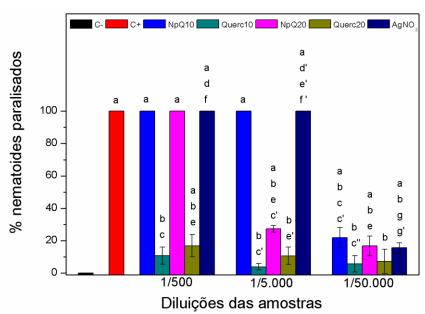


Figura III-8: Avaliação dos efeitos nematotóxicos *in vitr*o das NpQ e seus respectivos controles. Nessa representação gráfica, as NpQ (10) e NpQ (20) referem-se às nanopartículas sintetizadas com soluções aquosas de quercetina nas concentrações finais de 10 μM e de 20 μM, respectivamente. Assim como Querc (10) e Querc (20) representam as soluções aquosas de quercetina nas concentrações finais de 10 e 20 μM, respectivamente. E ainda, AgNO₃ representa solução aquosa de nitrato de prata a 1 mM. Os valores representam as médias ± desvios padrões dos experimentos. a=controle negativo - água (C˙), b=controle positivo - álcool 70% (C⁺), c, d, e, f, g: NpQ (10), Querc (10), NpQ (20), Querc (20) e AgNO₃ (diluídos na proporção de 1/500), c', d', e', f', g': NpQ (10), Querc (10), NpQ (20), Querc (20) e AgNO₃ (diluídos na proporção de 1/50.000), c", d", e", f", g": NpQ (10), Querc (10), NpQ (20), Querc (20) e AgNO₃ (diluídos na proporção de 1/50.000), respectivamente. (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey, *P*<0,05).

4.3.2 Análises morfológicas dos M. incognita (J2) tratados com NpQ

Os J2 de *M. incognita* expostos à água (controle) apresentaram formato serpentiforme com preservação de suas estruturas internas, sendo visualizado o tubo esofágico e demais órgãos (Figura III-9a). Efeitos semelhantes foram observados com a exposição a Querc (20) 1/500 (Figura III-9c). Todavia, foi observado que a exposição com NpQ (20) 1/1500 além de proporcionar paralização dos *M. incognita* (J2) e comprometer completamente suas estruturas morfológicas internas, também pode ter tido efeito sobre a contração muscular da cauda desses parasitas (Figura III-9b). Ao mesmo tempo, a exposição à solução de AgNO₃ (1 mM) diluída 1/500 resultou no dilaceramento dos órgãos dos nematoides, não sendo mais possível à distinção de suas estruturas (Figura III-9d).

Resultados semelhantes foram mencionados por Silva (2014) que observou que tanto os J2 tratados com AgNPs sintetizadas por extrato das folhas de *Hancornia speciosa* como os tratados com solução de AgNO₃ apresentavam

morfologias esticadas e paralisadas; mas os J2 expostos somente à solução de AgNO₃ tiveram suas estruturas internas com pigmentações escuras, tal coloração foi intensificada conforme o aumento da concentração de nitrato de prata.

Já Surega (2015) verificou outra modificação morfológica dos J2 de *M. incognita* ao expô-los às AgNPs biossintetizadas com extrato aquosos das folhas de *Tridax procumbens*, que era a deformação de suas estruturas com rompimento de suas paredes celulares e vazamento de fluidos corporais. A degradação de suas paredes celulares dos J2 também foi atestada por Hassan e colaboradores (2016) ao entrarem em contato com AgNPs sintetizadas por rota química, ao tempo que nematicidas (fenamifos e oxamilo) provocaram paralização dos J2.

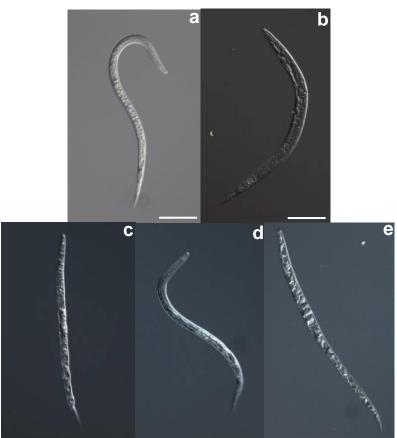
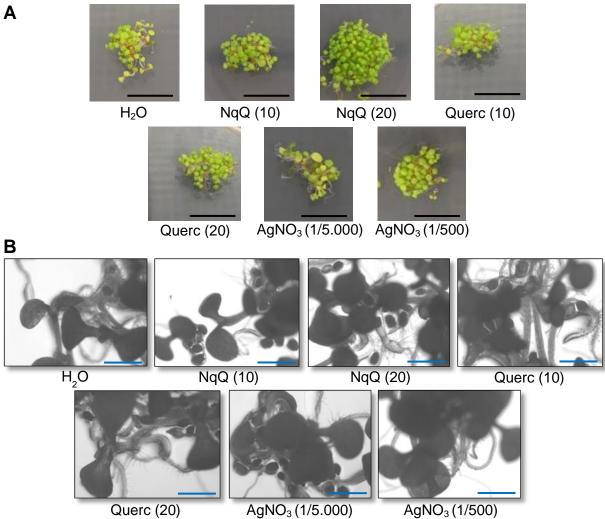


Figura III-9: Morfologias de *M. incognita* (J2) tratados por 48 h com H_2O - controle (a), álcool 70% (b), AgNPs sintetizadas com solução aquosa de quercetina - NpQ (c), solução aquosa de quercetina (d) e solução de nitrato de prata (e). Escala: ----0.5 mm.

4.3.3 Teste de germinação de sementes e crescimento de plântulas de *A. thaliana* expostas às NpQ

Nesse teste foram realizadas aplicações de NpQ (10), Querc (10) e $AgNO_3$ (diluídos com água na proporção de 1/5.000) e NpQ (20), Querc (20) e $AgNO_3$

(diluídos com água na proporção de 1/500). Os resultados da primeira aplicação das amostras sobre as sementes de *A. thaliana* (Col-0) em meio MS puderam ser observadas no sétimo dia do início do teste (Dia 7). Esses indicaram que as amostras não influenciaram a capacidade de germinação quando comparado com o grupo que recebeu apenas administração de água (controle) (Figuras III-10a e III-10b).



Já os efeitos acumulativos da primeira e da segunda aplicações dos grupos amostrais foram observados no décimo quarto dia do início do teste (Dia 14). Esse

foi o momento experimental que confirmou que nenhum dos grupos testes adotados nesse experimento interferiram sobre o processo de desenvolvimento das plântulas, sendo semelhante ao do controle (H_2O) (Figuras III-11a e III-11b).

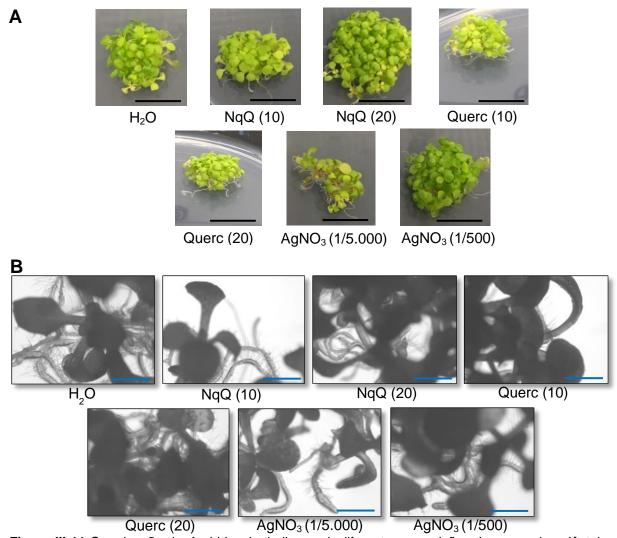


Figura III-11:Germinação de *Arabidopsis thaliana* sob diferentes exposições. Imagens das plântulas obtidas por registros fotográficos - Painel A (Escala ——— : 30 mm) e por lupa binocular - Painel B (Escala ——— : 0,8 mm). O teste de germinação foi observado após sete dias das segundas aplicações dos grupos amostrais em sementes de *A. thaliana* tipo selvagem (Col-0) semeadas em meio MS (Dia 14). Nessa representação, as NpQ (10) e NpQ (20) referem-se às nanopartículas sintetizadas com soluções aquosas de quercetina nas concentrações finais de 10 μM e de 20 μM, respectivamente. Assim como Querc (10) e Querc (20) representam as soluções aquosas de quercetina nas concentrações finais de 10 e 20 μM, respectivamente.

De modo semelhante, Lee e colaboradores (2012) mostraram que aplicações de AgNPs (20, 40 and 80 nm) não interferiram na germinação das sementes de *A. thaliana* tipo selvagem (Col-0) em condições hidropônicas, assim como Qian e colaboradores (2013) notaram que as AgNPs (10 nm) não comprometem a

germinação das sementes de *A. thaliana*, embora tivessem efeito inibitório sobre o crescimento de suas raízes em meio MS. Outros relatos também atestaram que tratamentos com AgNPs não impediram a germinação de sementes de abobrinha (*Cucurbita pepo*) (STAMPOULIS; SINHA; WHITE, 2009) e de rabanete (*Raphanus sativus*) (MENA et al., 2016). Em contrapartida, as AgNPs melhoram a germinação das sementes de melancia e de abobrinha em comparação aos controles não tratados (ALMUTAIRI; ALHARBI, 2015). Da mesma forma que AgNPs biossintetizadas com extrato das cascas de *Boswellia ovalifoliolata* favoreceram a germinação de sementes e o crescimento de mudas de *B. ovalifoliolata*, assim como auxiliaram na penetração de água e de nutrientes (SAVITHRAMMA; ANKANNA; BHUMI, 2012).

Já segundo Thuesombat e colaboradores (2014), a diminuição da germinação e consequente crescimento das mudas de arroz (*Oryza sativa*) ocorreu conforme o aumento do tamanho e da concentração de AgNPs (diâmetro: 20, 30-60, 70-120 nm; e 0,1, 1, 10, 100 e 1000 mg/L). Esses autores também realçaram que as AgNPs de menores diâmetros favoreceram maior absorção e retenção radicular.

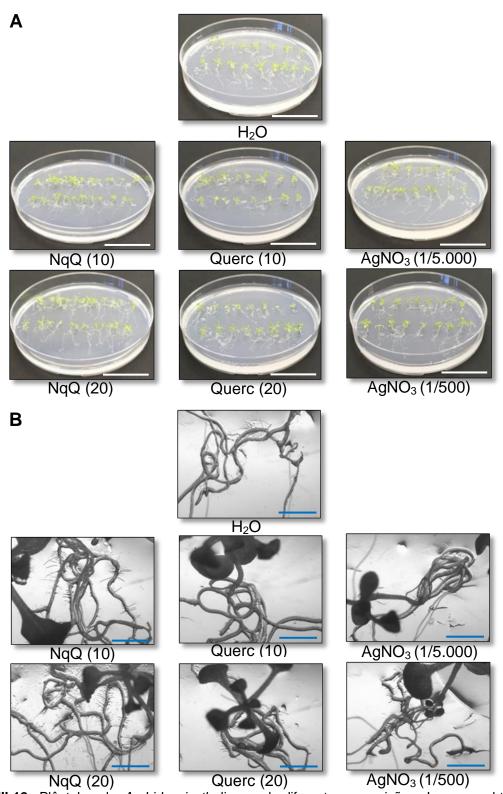
Correlacionando aos resultados, o presente experimento sinaliza que as NpQs uma vez aplicadas em meio MS não influenciariam no desenvolvimento das *A. thaliana*, mas a partir dos demais exemplos mencionados pode se inferir que os efeitos das AgNPs sobre a germinação pode ser influenciados pelo tamanhos, concentrações ou tipos de espécies vegetais. Amooaghaie e colaboradores (2015) observaram outros aspectos na influência das AgNPs sobre as germinações de sementes ao comparar os efeitos fitotóxicos da AgNPs sintetizadas por rota verde (com extrato das folhas de *Nigella sativa*) e por rota química (borohidreto de sódio – citrato de sódio) sobre a germinação de sementes e crescimento das plântulas de seis plantas diferentes (lolium, trigo, feijão, ervilha, alface e canola).

Nesse estudo, as AgNPs sintetizadas por rota verde demonstraram ser mais seguras do que as produzidas por rota química, visto que seus valores de IC50 (concentrações inibitórias de 50%) são maiores para a germinação de sementes e também, para o comprimento das raízes e dos caules. Essa maior segurança pode ser atribuída ao fato das AgNPs biossintetizadas terem uma cobertura orgânica que reduz a toxicidade. No entanto, o aumento da concentração prejudica os parâmetros

acima citados. Esse estudo também menciona que as diferenças de fitotoxicidade são atribuídas aos modos de preparo das AgNPs e não às suas diferenças de diâmetros.

Já com relação aos efeitos das primeiras aplicações de NpQ e seus controles sobre o crescimento da raiz das plântulas em meio Knop, observações foram efetuadas no vigésimo quarto dia do início do teste (Dia 24) quando as amostras apresentaram padrões de crescimento semelhantes (Figura III-12a). Pode ser observado também que as raízes das plântulas apresentaram o desenvolvimento radicular normal (Figura III-12b).

Em adição, observações e registros de imagens feitos no trigésimo primeiro dia do início do teste constataram a continuidade do desenvolvimento normal das plântulas com integridade de suas estruturas aéreas e radiculares (Figura III-13a e 13b). Da mesma forma, AgNPs sintetizadas com extrato aquoso das folhas de *Acalypha indica* não comprometeram a germinação e o desenvolvimento normal das raízes de *Bacopa monnieri* em comparação com o controle (KRISHNARAJ et al., 2012b).



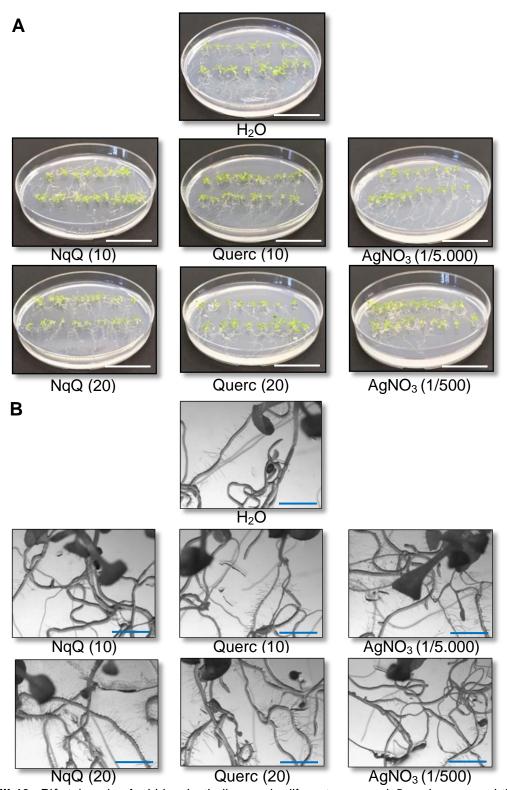


Figura III-13: Plântulas de *Arabidopsis thaliana* sob diferentes exposições. Imagens obtidas por registros fotográficos - Painel A (Escala ———: 30 mm) e por lupa binocular - Painel B (Escala ———: 0,8 mm) após sete dias das segundas aplicações dos grupos amostrais em plântulas de *A. thaliana* crescendo em meio Knop (Dia 31). Nessa representação, as NpQ (10) e NpQ (20) referem-se às AgNPs sintetizadas com soluções aquosas de quercetina nas concentrações finais de 10 μM e de 20 μM, respectivamente. Assim como Querc (10) e Querc (20) representam as soluções aquosas de quercetina nas concentrações finais de 10 e 20 μM, respectivamente.

Por outro lado, Mishra e Singh (2015) elencaram que AgNPs biossintetizadas aumentaram o crescimento de plantas, além de controlarem algumas fitopatologias, sendo portanto uma importante estratégia agrícola. As AgNPs também melhoram o crescimento das raízes de *Brassica juncea*, por meio da modulação do estado antioxidante das mudas (SHARMA et al., 2012).

No presente estudo não foi possível constatar diferenças no desenvolvimento das raízes de *A. thaliana* tratadas com as NpQs e suas respectivas soluções de AgNO₃. Já Vannini e colaboradores (2013) constataram que os tratamentos das raízes de *Eruca sativa* com AgNPs e AgNO₃ provocaram aumentos nos comprimentos das raízes dessas espécies, mas que as reações proteicas provocadas por esses dois tratamentos, durante 5 dias, são distintas. De forma semelhante, Wang e colaboradores (2013) verificaram que as concentrações de AgNPs de 0,01, 0,1 e 1 mg/L tiveram efeitos estimulantes sobre o crescimento radicular em *A. thaliana*, contudo concentrações altas como 100 mg/L, tiveram efeitos inibitórios.

Similarmente, AgNPs com concentrações acima de 300 mg/L impediram o alongamento das raízes de *A. thaliana* e as expansões de suas folhas (SOSAN et al., 2016). AgNPs também diminuíram os comprimentos das raízes e dos caules de trigo, de forma dependente da dose (DIMKPA et al., 2013). Todavia, os efeitos tóxicos das AgNPs sobre as plantas dependem de suas espécies, das concentrações, das composições, dos tamanhos, das formas e dos modos de aplicações das AgNPs (SIDDIQUI et al., 2015).

Quanto ao deslocamento dentro das plantas, Bao e colaboradores (2016) identificaram que as AgNPs (10 nm - 0,02 mg/L) em tecidos vegetais de *A. thaliana* (crescidas em meio MS) se concentram principalmente nos apoplastos dos tecidos radiculares (espaço intercelular); e que uma vez no interior das plantas, as AgNPs estavam presentes na forma de agregados e/ou individualizadas de modo intacto.

4.3.4 Análises dos níveis de ploidia dos núcleos das raízes de *A. thaliana* crescidas *in vitro* e tratadas com NpQ

A citometria de fluxo é considerada uma opção quantitativa para o fornecimento de informações a respeito da contagem e da classificação celular. Tais

suspensões celulares em fluxo são previamente coradas com um fluorocromo como iodeto de propídio, o que permite suas identificações conforme as intensidades de fluorescências emitidas ao serem alcançadas por feixes de luz de comprimentos de ondas determinados (CUI et al., 2015).

Essa é uma técnica simples, rápida, barata e precisa que propicia conhecimentos sobre medidas físicas e químicas de organelas, cromossomos, núcleos e células, sendo bem adotada para análises de plantas em processos de melhoramentos genéticos (CAMPOS, 2007). Dessa maneira, sua utilização permite que sejam feitas avaliações dos níveis de ploidias, dos conteúdos de DNA nucleares, de ciclos de endorreduplicações celulares, análises e separações dos números de cromossomos (ORZECHOWSKA et al., 2013; SAINI et al., 2017), estimativa do tamanho do genoma, determinação do sexo numa fase prévia do crescimento e análises de genotoxicidade (LOUREIRO; SANTOS, 2004).

No presente estudo, a citometria de fluxo foi utilizada para avaliar o nível de ploidia dos núcleos das raízes de *A. thaliana* crescidas *in vitro* e tratadas com NpQ e seus demais controles. Assim, a partir dos resultados apresentados na Figura III-14, é possível concluir que todos os grupos testados apresentaram o mesmo padrão de ploidia nuclear, isto é, o mesmo conteúdo de ADN (ácido desoxirribonucleico) presente nos núcleos das células das raízes. O padrão foi semelhante ao controle tratado com água (H₂O).

Com isso, fica certificado que as exposições com diferentes concentrações de NpQ (10), NpQ (20) e seus controles não somente não interferiram na germinação e no crescimento das plântulas de *A. thaliana*, como também na síntese de ADN (medido por citometria de fluxo) ocorrendo normalmente nas raízes de *A. thaliana* crescidas *in vitro*.

De acordo com Howard e Pelc (1986), o ciclo celular contém quatro etapas: uma fase de síntese de ADN denominada de "S" e outra fase "M" que é a mitose. Essas duas fases são intercaladas por dois intervalos denominados G₁ (gap 1) e G₂ (gap 2). Na fase S ocorre a duplicação do material nuclear, de modo que na fase G₂ o conteúdo de ADN apresente-se no nível 4C necessário para a mitose subsequente. Uma vez então que o núcleo passe da mitose, este possui o conteúdo 2C (C: conteúdo de um conjunto haploide de cromossomas) de ADN, e nesse

momento o núcleo apresenta duas cópias de cada gene, sendo assim a célula diploide. Cada célula se divide, culminando na formação de duas células filhas que possuem um conteúdo 2C cada. Posteriormente, é frequente em células vegetais a mudança do ciclo mitótico para o ciclo da endorreduplicação, quando o ADN replica sem divisão nuclear aumentando assim sua ploidia. Essas células apresentam o conteúdo de ADN que passa de 2C para 4C, 8C, 16C... dependendo da ploidia da célula.

No caso das *A. thaliana* ecotipo Columbia, suas células diploides (2n) possuem 10 cromossomos (LERMONTOVA et al., 2006) e consoante ao documentado por Åsberg e colaboradores (2015), as células das *A. thaliana* apresentaram conteúdos celulares variando de 2C a 32C, corroborando com células das raízes das *A. thaliana* examinadas nesse estudo, sendo a maior parte das células estão diploides (2C) e tetraploides (4C) (Figura III-14). De acordo com Fleury e colaboradores (2007), os níveis de ploidia representadas pelos conteúdos de DNA (2C, 4C...) refletem as transições das fases G1 e G2 ao longo da divisão ciclo celular mitótica.

Resumindo, é possível observar que os conteúdos nucleares das células das raízes de *A. thaliana*, independente das administrações dos grupos amostrais adotadas nesse teste, apresentaram replicação de ADN como normalmente observado em células vegetais. O ciclo celular não foi afetado pelas exposições dos grupos amostrais confirmando as observações morfológicas do crescimento normal das plantas e suas raízes. Essa observação é de grande importância considerandose a potencial aplicação das AgNPs sintetizadas com soluções aquosas de quercetina no solo para o controle de nematoides de plantas de interesse agronômico.

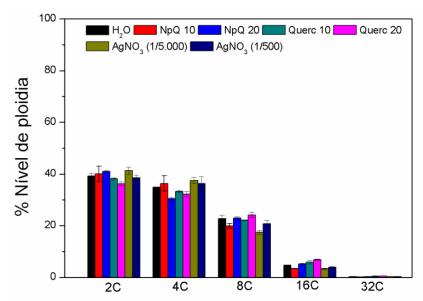


Figura III-14: Avaliação dos níveis de ploidia dos núcleos de células de raízes de *A. thaliana* crescidas *in vitro* após exposições com NpQ e seus respectivos controles. Nessa representação gráfica, as NpQ (10) e NpQ (20) referem-se às AgNPs sintetizadas com soluções aquosas de quercetina nas concentrações finais de 10 μM e de 20 μM, respectivamente. Assim como Quer (10) e Quer (20) representam as soluções aquosas de quercetina nas concentrações finais de 10 e 20 μM, respectivamente.

4.4 Avaliações das atividades biológicas em solo das NpQ

4.4.1 Análises dos níveis de ploidia dos núcleos das raízes de *A. thaliana* crescidas em solo

A Figura III-15 ilustra as plantas no início (Painel 1) e ao término (Painel 2) do período do tratamento de cinco semanas, sendo que essas tiveram seus crescimentos normais quando comparado com o grupo que recebeu aplicações somente de água (controle) e portanto sendo provável que as mudanças morfológicas verificadas sejam referentes à passagem dos 42 dias de tratamento.

Essa situação foi encontrada também por Lee e colaboradores (2014a) ao realizarem irrigação regular de 75 μg/L de AgNPs (20 nm) em *A. thaliana* e não atestarem alterações evidentes nas morfologias das plantas. Contudo, nesse experimento as AgNPs provocaram toxicidade reprodutiva no referido modelo vegetal. Foi também verificado em relação ao transporte desse nanossistema nas *A. thaliana*, que nos sete dias depois do plantio das espécies vegetais e aplicação das AgNPs, que essas nanopartículas localizaram-se nas superfícies das raízes primárias e depois se inseriram em suas extremidades. E assim, 14 dias depois do

plantio, as AgNPs progressivamente se deslocaram para as raízes primárias, laterais e células ciliadas das raízes. Após 17 dias do plantio foi observado AgNPs no tecido vascular, xilema e floema, com potencial para se direcionar para todas as partes da planta. Sendo, por fim, averiguado que as AgNPs também podem se acumular de forma intensa nos estômatos e nos sulcos das paredes celulares das células dos pavimentos adjacentes.

Em referência a outras plantas, foi verificado por Cromwell e colaboradores (2014) que a aplicação de AgNPs elevaram a qualidade das gramíneas e não induziram fitotoxicidade. De forma semelhante, os tratamentos de AgNPs em berinelas propiciaram o melhor crescimento dessas planta sem causar fitotoxicidade (ABDELLATIF; HAMOUDA; ANSARY, 2016).

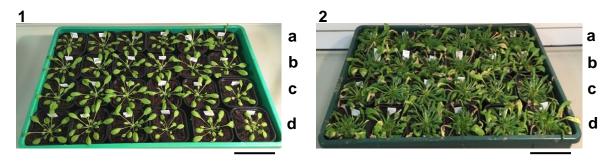


Figura III-15: Plantas infectadas com *M. incognita* antes (Painel 1) e depois (Painel 2) de cinco semanas de tratamentos. Nessa representação, (**a**) refere-se a exposição com água (controle), (**b**) a exposição com NpQ (20) 1/500, (**c**) a exposição com Querc (20) 1/500 e (**d**) a exposição com AgNO₃ (1 mM) 1/500. Escala ———: 55 mm.

Dando continuidade, ao término dos tratamentos, as raízes dessas plantas foram lavadas para serem realizadas análises dos níveis de ploidia dos núcleos das raízes, sem a presença de galhas. Na Figura III-16 pode ser visualizado que tanto as aplicações de NpQ (20) 1/500 como as de seus respectivos controles resultaram na expressão de padrões de ploidia similares entre si e também em relação ao controle (H₂O), indicando que não ocorreram alterações nas etapas de suas divisões celulares em razão dos tratamentos.

Além disso, pode ser observado que tal resultado é representativo de células que apresentam o conteúdo em ADN diploide, uma vez que a maioria (~60%) dos núcleos celulares estão com 2C (C: conteúdo de um conjunto haplóide de cromossomas), ou seja, com duas cópias de cada gene. De maneira análoga, Fleury

e colaboradores (2007) retrataram que em *A. thaliana* tipo selvagem, os percentuais de células em 2C e 4C são de 66,2% e 33,8%, respectivamente. E ainda, Hemerly e colaboradores (1992) descrevem que os núcleos que estão em 2C representam as fases G0-G1, ao tempo que as 4C remetem à fase G2, sinalizando que a maioria das células examinadas nesse estudo estavam nas fases G0-G1.

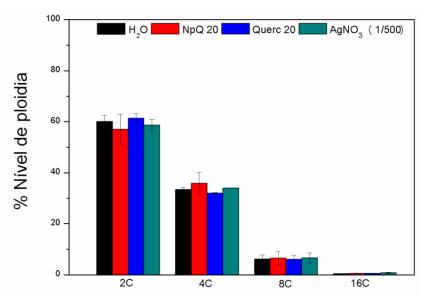


Figura III-16: Avaliação dos níveis de ploidia dos núcleos contidos nas raízes de A. thaliana crescidas em solo após receberem exposições com NpQ e seus respectivos controles. Nessa representação gráfica, as NpQ (20) referem-se às AgNPs sintetizadas com solução aquosa de quercetina na concentração final de 20 μ M e Querc (20) representam a solução aquosa de quercetina na concentração final de 20 μ M.

4.4.2 Avaliação nematotóxica em solo

Por meio da execução desse ensaio, frequentemente chamado de teste de resistência (Figura III-17) foi possível visualizar que o índice de galhas e número de galhas com massa de ovos manifestados pelas plantas tratadas com NpQ (20) 1/500 foi inferior ao encontrado no grupo das plantas tratadas somente com água (controle). Este fato sugere um efeito nematotóxico desses nanossistemas contra *M. incognita* também em solo, por promover o atraso no desenvolvimento das galhas, o que pode favorecer a continuidade do desenvolvimento das plantas infectadas por esses fitoparasitas, impedindo que essas venham a adoecer ou morrer em virtude dos sintomas advindos pela parasitose.

Em relação a outros modelos vegetais, a atividade nematicida de AgNPs (síntese química) em solo contendo dois tipos de gramíneas (*Cynodon dactylon* e *C.*

transvaalensis) infectadas com *Meloidogyne graminis* foi revelada pela diminuição significativa da quantidade de J2 e redução da formação de galhas (CROMWELL et al., 2014). Já sobre as AgNPs produzidas por rota de síntese verde, Abdelmoneim e Massoud (2016) verificaram que ao realizar uma pré-exposição de 40 min de AgNPs biossintetizadas por *Pseudomonas aeruginosa* (18,9 a 23,4 nm), nas concentrações de 200 e 250 μg/mL, com suspensões de J2 e depois exporem os J2 em solos contendo mudas de tomates, houve redução da quantidade de J2 no solo (40 e 56%) e dentro das raízes de tomate (30 e 44%). Além de haver a diminuição do números de galhas (46 e 68%) e da massa de ovos/g de raiz (50 e 76%) em comparação com o controle.

Além das AgNPs, há também relatos na literatura de outras nanoformulações metálicas produzidas por rotas de síntese verde que apresentam capacidade para manejo de pragas envolvendo Au, Cu e Cd. Algumas características das nanoestruturas podem está associadas aos seus benefícios para a prevenção e o tratamento de nematoides patogênicos, como é o caso dos seus tamanhos pequenos, relação área de superfície/volume alta e sua liberação lenta, controlada e direcionada por períodos mais prolongados. O fato das estruturas estarem em escala nanométricas também favorece a distribuição e a cobertura das plantas (BHAU et al., 2016; NASSAR, 2016).

Lee e colaboradores (2012) verificaram que utilizando AgNPs, estabilizadas com citrato, em *A. thaliana* ocorreram maiores teores de acumulação de prata do que nas plantas que foram expostas a soluções AgNO₃. A sequência de acumulação das AgNPs se deu na seguinte ordem: células de fronteira, coifa, iniciações de columela e columela, sendo possível identificar que os transportes das AgNPs nos sistemas vasculares acontecem apoplasticamente (entre os espaços intercelulares) e ficam agregadas em plasmodesmos. Segundo as avaliações ultraestruturais por MET de Mazumdar e Ahmed (2011), as AgNPs (25 nm), ao penetrarem as células das raízes de *Oryza sativa*, danificam as paredes celulares e os vacúolos. A capacidade de absorção e de transporte das AgNPs depende do tamanho, da forma, da composição química e da anatomia da planta (NAIR et al., 2010).

Além desses fatores, a absorção e toxicidade das AgNPs estão associadas à natureza, funcionalização e agregação, além de condições experimentais como

tempo de reação, temperatura, espécies das plantas e métodos de exposição (suspensões celulares / mudas / sementes) (NOWACK; BUCHELI, 2007; MA et al., 2010; AMOOAGHAIE; SAERI; AZIZI, 2015), demostrando que tais efeitos não podem ser atribuídos somente há liberação de íons prata.

No presente estudo, a diminuição do número de galhas e massa de ovos depositados pelas fêmeas (indicativo de reprodução) durante as análises também foram observadas nas plantas tratadas com solução de AgNO₃ (1 mM) 1/500. No entanto, as plantas tratadas com solução aquosa de Querc (20) 1/500 apresentaram índice de galhas e número de galhas com massa de ovos semelhantes em comparação ao grupo que teve aplicações somente de água (Figura III-17). Esse resultado indica que as soluções de quercetina testadas nesse trabalho não tiveram atividade nematotóxica em solo, corroborando com o que já foi evidenciado no teste de atividade nematotóxica *in vitro* (Figura III-8).

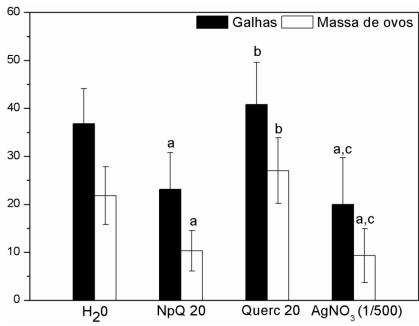


Figura III-17: Avaliação nematotóxica em solo das NpQ (20) 1/500 e seus respectivos controles em raízes de *A. thaliana* infectadas com *M. incognita*. Nessa representação gráfica, as NpQ (20) referemse às AgNPs sintetizadas com solução aquosa de quercetina na concentração final de 20 μ M e Querc (20) representam a solução aquosa de quercetina na concentração final de 20 μ M. Os valores representam as médias \pm desvios padrões dos experimentos. $^aP < 0.05$ quando comparado com o grupo que recebeu aplicação de H_2O , $^bP < 0.05$ quando comparado com o grupo que recebeu aplicação de Querc (20) (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey).

5. CONCLUSÃO

A partir desses resultados é possível depreender que soluções aquosas de quercetina apresentaram potenciais formadores de AgNPs rápidos e satisfatórios, sobretudo as NpQ (20) que apresentaram diâmetros hidrodinâmicos de 29,06 nm (*Z-Average*), índice de polidispersividade de 0,561 e potencial Zeta de -23, 7 mV. Esses nanossistemas demonstraram capacidade nematotóxica *in vitro* de paralisar 100% dos *M. incognita* (J2), além de comprometerem completamente suas estruturas morfológicas internas. Ademais manifestaram atividade nematotóxica em solo contendo *A. thaliana* infectadas por *M. incognita*, ao diminuírem seus índices de galhas e os números de galhas com massa de ovos. Além disso, as NpQ (20) não comprometeram as etapas do ciclo celular, as germinações de suas sementes e os desenvolvimentos das plântulas de *A. thaliana*. Esses achados conceituam a abordagem como uma opção potencial para manejo e prevenção de fitonematoides do gênero Meloidogyne.

Agradecimentos: Os envolvidos com o desenvolvimento do capítulo III da tese reconhecem o apoio e/ou financiamento das agências e instituições FAPDF, CNPq, Embrapa, Institut de Pharmacologie Moleculaire et Cellulaire e INRA.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por fim, a partir dos estudos realizados nessa Tese pode ser inferido que *P. emarginatus* é uma planta representante da biodiversidade brasileira com potencial de utilização em nanotecnologia verde para produção de AgNPs. Além disso, a presente Tese apresentou a importância do conhecimento das influências que os fatores ambientais podem expressar sobre os metabólitos presentes em plantas e consequentemente seus papeis nas formações e nos rendimentos de produção das AgNPs. Uma vez que foi demostrado no presente estudo que a diferença sazonal na coleta das folhas de *P. emarginatus* (sucupira branca) teve efeito sobre o rendimento do processo de síntese de AgNPs e de algumas propriedades físicas e químicas.

Tal descoberta serve de alerta para a importância da continuidade das análises de demais fatores e condições ambientais associados às plantas que estão sendo utilizadas para produção de nanomateriais, pois essas respostas trazem compreensões à respeito dos mecanismos de formação das AgNPs, o que propicia uma melhor modulação das características que se deseja obter.

Além disso, os resultados aqui expostos também revelaram os potenciais terapêuticos das AgNPs sintetizadas com extratos das folhas de *P. emarginatus* nas manifestações de efeitos citotóxicos, antioxidantes, não hemolíticos e nematotóxicos *in vitro*, sem comprometimento do funcionamento de células normais. Tais evidências despertam o interesse de pesquisas desses efeitos em modelos *in vivo*. Além disso, também abrem prerrogativas para investigações em demais áreas da nanobiotecnologia, considerando que as NpSBs têm propriedades relativamente semelhantes mesmo quando a coleta de material biológico ocorre em épocas distintas do ano.

Por fim, por meio desse estudo foi demostrado ainda a relação de um dos metabólitos presentes nas folhas da referida planta no sucesso da síntese de AgNPs, apontando a importância do prosseguimento de pesquisas sobre os demais componentes foliares que podem atuar na formação de nanomateriais preparados por rotas de síntese verde. Isto é possível uma vez que soluções aquosas de quercetina apresentaram ações formadoras de AgNPs rápidas e satisfatórias, indicando esse nanossistema como potencial agente de controle para meloidoginoses que acometem plantas de grande importância agrícola.

5. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Levantamento bibliográfico X X X X X X X X X X X X X X X X X X X
Cursar disciplinas X X X X X Separação dos extratos X X X X X X X X X X X X X X X X X X X
Preparação dos extratos Síntese e caracterização das NpSBs Avaliação da viabilidade celular por MTT das NpSBs Ensaios antioxidantes in vitro das NpSBs Ensaios antioxidantes in vitro das NpSBs Atividade bacteriana das NpSBs Atividade nematotóxica das NpSBs Atividade nematotóxica das NpSBs Preparação do exame da qualificação Exame de qualificação Correções da qualificação Exame de qualificação ATIVIDADES Levantamento bibliográfico X Protocolos para realização do doutorado sanduiche Experimentos em parceria com INRA-UFRJ (extra projeto de doutorado) Otimização da preparação das soluções aquosas de quercetina Sínteses de NpQ Testes de atividades nematotóxicas in vitro das NpQ Análises morfológicas dos M. incognita (J2) tratados com NpQ Teste de germinação de sementes e crescimento de plântulas de A. thaliana tratados com NpQ Análises dos níveis de ploidia dos núcleos das raízes de A. thaliana crescidas in vitro e
Síntese e caracterização das NpSBs Avaliação da viabilidade celular por MTT das NpSBs Ensaios antioxidantes in vitro das NpSBs Testes hemolíticos in vitro das NpSBs Atividade bacteriana das NpSBs Atividade nematotóxica das NpSBs Preparação do exame da qualificação Exame de qualificação Correções da qualificação ATIVIDADES Levantamento bibliográfico Protocolos para realização do doutorado sanduiche Experimentos em parceria com INRA-UFRJ (extra projeto de doutorado) Otimização da preparação das soluções aquosas de quercetina Sínteses de NpQ Testes de atividades nematotóxicas in vitro das NpQ Análises morfológicas dos M. incognita (J2) tratados com NpQ Análises dos níveis de ploidia dos núcleos das raízes de A. thaliana crescidas in vitro e
Avaliação da viabilidade celular por MTT das NPSBs Ensaios antioxidantes in vitro das NPSBs Testes hemolíticos in vitro das NPSBs Atividade bacteriana das NPSBs Atividade nematotóxica das NPSBs Atividade nematotóxica das NPSBs Preparação do exame da qualificação Exame de qualificação Correções da qualificação ATIVIDADES 2015.2 2016.1 2016.2 2017.1 2017.2 Levantamento bibliográfico X X X X X X X X X X X X X X X X X X X
Ensaios antioxidantes in vitro das NpSBs Testes hemolíticos in vitro das NpSBs Atividade bacteriana das NpSBs Atividade nematotóxica das NpSBs Preparação do exame da qualificação Exame de qualificação Correções da qualificação ATIVIDADES Levantamento bibliográfico X Protocolos para realização do doutorado sanduiche Experimentos em parceria com INRA-UFRJ (extra projeto de doutorado) Otimização da preparação das soluções aquosas de quercetina Sínteses de NpQ Testes de atividades nematotóxicas in vitro das NpQ Análises morfológicas dos M. incognita (J2) tratados com NpQ Teste de germinação de sementes e crescimento de plântulas de A. thaliana tratados com NpQ Análises dos níveis de ploidia dos núcleos das raízes de A. thaliana crescidas in vitro e
Testes hemolíticos in vitro das NpSBs Atividade bacteriana das NpSBs Atividade nematotóxica das NpSBs Preparação do exame da qualificação Exame de qualificação Correções da qualificação ATIVIDADES 2015.2 2016.1 2016.2 2017.1 2017.2 Levantamento bibliográfico X X X X X X X X X X X X X X X X X X X
Atividade bacteriana das NpSBs Atividade nematotóxica das NpSBs Preparação do exame da qualificação Exame de qualificação Correções da qualificação ATIVIDADES Protocolos para realização do doutorado sanduiche Experimentos em parceria com INRA-UFRJ (extra projeto de doutorado) Otimização da preparação das soluções aquosas de quercetina Sínteses de NpQ Testes de atividades nematotóxicas in vitro das NpQ Análises morfológicas dos M. incognita (J2) tratados com NpQ Teste de germinação de sementes e crescimento de plântulas de A. thaliana tratados com NpQ Análises dos níveis de ploidia dos núcleos das raízes de A. thaliana crescidas in vitro e
Atividade nematotóxica das NpSBs Preparação do exame da qualificação Exame de qualificação Correções da qualificação ATIVIDADES 2015.2 Levantamento bibliográfico Protocolos para realização do doutorado sanduiche Experimentos em parceria com INRA-UFRJ (extra projeto de doutorado) Otimização da preparação das soluções aquosas de quercetina Sínteses de NpQ Testes de atividades nematotóxicas in vitro das NpQ Análises morfológicas dos M. incognita (J2) tratados com NpQ Teste de germinação de sementes e crescimento de plântulas de A. thaliana tratados com NpQ Análises dos níveis de ploidia dos núcleos das raízes de A. thaliana crescidas in vitro e
Preparação do exame da qualificação Exame de qualificação Correções da qualificação ATIVIDADES 2015.2 2016.1 2016.2 2017.1 2017.2 Levantamento bibliográfico X Protocolos para realização do doutorado sanduiche Experimentos em parceria com INRA-UFRJ (extra projeto de doutorado) Otimização da preparação das soluções aquosas de quercetina Sínteses de NpQ Testes de atividades nematotóxicas in vitro das NpQ Análises morfológicas dos M. incognita (J2) tratados com NpQ Teste de germinação de sementes e crescimento de plântulas de A. thaliana tratados com NpQ Análises dos níveis de ploidia dos núcleos das raízes de A. thaliana crescidas in vitro e
Exame de qualificação Correções da qualificação ATIVIDADES Levantamento bibliográfico Protocolos para realização do doutorado sanduiche Experimentos em parceria com INRA-UFRJ (extra projeto de doutorado) Otimização da preparação das soluções aquosas de quercetina Sínteses de NpQ Testes de atividades nematotóxicas in vitro das NpQ Análises morfológicas dos M. incognita (J2) tratados com NpQ Teste de germinação de sementes e crescimento de plântulas de A. thaliana tratados com NpQ Análises dos níveis de ploidia dos núcleos das raízes de A. thaliana crescidas in vitro e
Correções da qualificação ATIVIDADES 2015.2 2016.1 2016.2 2017.1 2017.2 Levantamento bibliográfico X X X X X X X X X X X X X
ATIVIDADES 2015.2 2016.1 2016.2 2017.1 2017.2 Levantamento bibliográfico X X X X X X X X X X X X X X X X X X X
Levantamento bibliográfico X X X X X X X X X X X X X X X X X X X
Protocolos para realização do doutorado sanduiche Experimentos em parceria com INRA-UFRJ (extra projeto de doutorado) Otimização da preparação das soluções aquosas de quercetina Sínteses de NpQ Testes de atividades nematotóxicas in vitro das NpQ Análises morfológicas dos M. incognita (J2) tratados com NpQ Teste de germinação de sementes e crescimento de plântulas de A. thaliana tratados com NpQ Análises dos níveis de ploidia dos núcleos das raízes de A. thaliana crescidas in vitro e
Experimentos em parceria com INRA-UFRJ (extra projeto de doutorado) Otimização da preparação das soluções aquosas de quercetina Sínteses de NpQ Testes de atividades nematotóxicas in vitro das NpQ Análises morfológicas dos M. incognita (J2) tratados com NpQ Teste de germinação de sementes e crescimento de plântulas de A. thaliana tratados com NpQ Análises dos níveis de ploidia dos núcleos das raízes de A. thaliana crescidas in vitro e
(extra projeto de doutorado) Otimização da preparação das soluções aquosas de quercetina Sínteses de NpQ Testes de atividades nematotóxicas in vitro das NpQ Análises morfológicas dos M. incognita (J2) tratados com NpQ Teste de germinação de sementes e crescimento de plântulas de A. thaliana tratados com NpQ Análises dos níveis de ploidia dos núcleos das raízes de A. thaliana crescidas in vitro e
aquosas de quercetina Sínteses de NpQ Testes de atividades nematotóxicas in vitro das NpQ Análises morfológicas dos M. incognita (J2) tratados com NpQ Teste de germinação de sementes e crescimento de plântulas de A. thaliana tratados com NpQ Análises dos níveis de ploidia dos núcleos das raízes de A. thaliana crescidas in vitro e
Testes de atividades nematotóxicas in vitro das NpQ Análises morfológicas dos M. incognita (J2) tratados com NpQ Teste de germinação de sementes e crescimento de plântulas de A. thaliana tratados com NpQ Análises dos níveis de ploidia dos núcleos das raízes de A. thaliana crescidas in vitro e
das NpQ Análises morfológicas dos <i>M. incognita</i> (J2) tratados com NpQ Teste de germinação de sementes e crescimento de plântulas de <i>A. thaliana</i> tratados com NpQ Análises dos níveis de ploidia dos núcleos das raízes de <i>A. thaliana</i> crescidas <i>in vitro</i> e
tratados com NpQ Teste de germinação de sementes e crescimento de plântulas de <i>A. thaliana</i> tratados com NpQ Análises dos níveis de ploidia dos núcleos das raízes de <i>A. thaliana</i> crescidas <i>in vitro</i> e
crescimento de plântulas de <i>A. thaliana</i> tratados com NpQ Análises dos níveis de ploidia dos núcleos das raízes de <i>A. thaliana</i> crescidas <i>in vitro</i> e
das raízes de <i>A. thaliana</i> crescidas <i>in vitro</i> e
Atividade nematotóxica das NpQ em solo X
Redação e submissão de artigo X
Elaboração da tese X X
Aguardar a resposta da revista científica X
Realização das correções e sugestões do Orientador
Pedido de prorrogação da defesa da tese X
ATIVIDADES 2018.1
Levantamento bibliográfico X
Síntese e caracterização das NpQ X
Aguardar a resposta da revista científica X
Conclusão da escrita da tese X
Realização das correções e sugestões do Orientador
Encaminhamento da documentação para marcação da defesa
Defesa do doutorado X

6. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2016/2: Doutorado sanduíche no Institut National de la Recherche Agronomique. Sophia Antipolis – França. Supervisora no exterior: Dra. Janice de Almeida Engler.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

2013 – 2017: Doutoranda. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, Brasília-DF, Brasil.

PROJETOS DE PESQUISA

2013 – 2018: Síntese verde de nanopartículas metálicas utilizando extratos das folhas de plantas do cerrado brasileiro e investigações das suas potenciais atividades biológicas. Coordenador: Dr. Luciano Paulino da Silva. Agência de fomento: Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

2016 – 2017: Biotechnology strategies to obtain resistant plants against plant parasitic root-knot nematodes: transgenic crops and plant compounds. Coordenador: Dr. Thales Lima Rocha. Agência de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

APRESENTAÇÕES DE TRABALHOS

OLIVEIRA, G. Z. S.; ROCHA, T. L.; ENGLER, J. A.; SILVA, L. P. Avaliação do potencial nematotóxico de nanopartículas de prata sintetizadas com metabólito secundário (quercetina) encontrado em folhas de *Pterodon emarginatus* (sucupira branca). In: **III Simpósio do LNANO**, 2016, Brasília-DF.

OLIVEIRA, G. Z. S.; ROCHA, T. L.; ENGLER, J. A.; SILVA, L. P. Síntese de nanopartículas de prata utilizando soluções de quercetina e avaliação do seu potencial nematicida sobre *Meloidogyne incognita*. In: **II Simpósio do LNANO**, 2016, Brasília-DF.

OLIVEIRA, G. Z. S.; OMBREDANE, A. S.; SOLL, C. B.; LOPES, C. A. P.; MATTOS, T. C. G.; SILVA, L. P. Investigações de atividades biológicas de nanopartículas de prata sintetizadas utilizando extratos das folhas de *Pterodon emarginatus*. In: **I Simpósio do LNANO**, 2016, Brasília-DF.

OLIVEIRA, G. Z. S.; LOPES, C. A. P.; SILVA, L. P. Síntese e caracterização de nanopartículas de prata produzidas por síntese verde a partir de extratos das folhas de sucupira branca (*Pterodon emarginatus*). In: **XIX Encontro do Talento Estudantil, 2014**, Brasília-DF.

OLIVEIRA, G. Z. S.; ALBANEZ, V. L.; SILVA, L. P. Síntese de nanopartículas de prata obtidas a partir de extratos das folhas de sucupira branca. In: **XVIII Talento Estudantil**, 2013, Brasília-DF.

ARTIGOS

Artigo submetido: OLIVEIRA, G. Z. S.; LOPES, C. A. P.; SOUSA, M. H.; SILVA, L. O. Synthesis of silver nanoparticles using aqueous extracts of *Pterodon emarginatus* leaves collected in the summer and winter seasons. Revista: International Nano Letters.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS E CURSOS DE FORMAÇÃO

III Simpósio do LNANO. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, Brasília-DF. 2016.

Il Simpósio do LNANO. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, Brasília-DF. 2016.

I Simpósio do LNANO. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, Brasília-DF. 2016.

II Nano-Workshop Embrapa - TecSinapse. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, Brasília-DF. 2016.

Curso: Nanotecnologia para inovação da produção de biofármacos. Universidade de São Paulo – USP. 2015.

Curso de Introdução a Práticas de Laboratório. Universidade de Brasília - UnB. 2015.

Curso de Bioimagem: Microscópio Confocal TCS SP8. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, Brasília-DF. 2014.

Seminário Edital Rede de Nanobiotec. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES. Brasília-DF. 2014.

XVIII Encontro do Talento Estudantil. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, Brasília-DF. 2014.

Inglês - UnB Idiomas. Universidade de Brasília. 2014-2016.

OUTRAS INFORMAÇÕES

Aprovada na qualificação de doutorado em outubro de 2015.

Classificada em 2º lugar no processo seletivo para professor substituto no Instituto Federal de Goiás - Campus Águas Lindas - Dezembro de 2016.

Professora do Centro Universitário de Brasília (UDF) - 1º semestre de 2018.

REFERÊNCIAS

- ABAD, P.; FAVERY, B.; ROSSO, M. N.; SERENO, P. C. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 4, p. 217-224, 2003.
- ABBASI, E.; MILANI, M.; AVAL, S. F.; KOUHI, M.; AKBARZADEH, A.; NASRABADI, H. T.; NIKASA, P.; JOO, S. W.; HANIFEHPOUR, Y.; KOSHKI, K. N.; SAMIEI, M. Silver nanoparticles: synthesis methods, bio-applications and properties. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 173-180, 2016.
- ABDELLATIF, K. F.; HAMOUDA, R. A.; ANSARY, M. S. M. E. Green nanoparticles engineering on root-knot nematode infecting eggplant plants and their effect on plant DNA modification. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 250-259, 2016.
- ABDELMONEIM, T.; MASSOUD, S. I. Biosynthesis of silver nanoparticles (AgNPs) by *Pseudomonas aeruginosa* and their potential as nematicidal activity. **Journal of Nematology**, v. 48, n. 4, p. 297-387, 2016.
- ADEGBOYEGA, N. F.; SHARMA, V. K.; SISKOVA, K.; ZBOŘIL, R.; SOHN, M.; SCHULTZ, B. J.; BANERJEE, S. Interactions of aqueous Ag⁺ with fulvic acids: mechanisms of silver nanoparticle formation and investigation of stability. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 2, p. 757-764, 2013.
- AGHAMOOSA, M.; SABOKBAR, A. Antifungal activity of silver nanoparticle in different sizes against some pathogenic fungi. **Journal of Applied Chemical Research**, v. 8, n. 4, p. 115-122, 2014.
- AGNIHOTRI, S.; MUKHERJI, S.; MUKHERJI, S. Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver. **Nanoscale**, v. 5, n. 16, p. 7328-7340, 2013.
- AHMAD, T. Reviewing the tannic acid mediated synthesis of metal nanoparticles. **Journal of Nanotechnology**, v. 2014, p. 1-11, 2014.
- AHMED, M. J.; MURTAZA, G.; MEHMOOD, A.; BHATTI, T. M. Green synthesis of silver nanoparticles using leaves extract of *Skimmia laureola*: characterization and antibacterial activity. **Materials Letters**, v. 153, p. 10-13, 2015.
- AHMED, K. B. R.; NAGY, A. M.; BROWN, R. P.; ZHANG, Q.; MALGHAN, S. G.; GOERING, P. L. Silver nanoparticles: significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of *in vitro* cytotoxicity studies. **Toxicology in Vitro**, v. 38, p. 179-192, 2017.
- AHN, J. M.; EOM, H. J.; YANG, X.; MEYER, J. N.; CHOI, J. Comparative toxicity of silver nanoparticles on oxidative stress and DNA damage in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. **Chemosphere**, v. 108, p. 343-352, 2014.

- AISSANI, N.; TEDESCHI, P.; MAIETTI, A.; BRANDOLINI, V.; GARAU, V. L.; CABONI, P. Nematicidal activity of allylisothiocyanate from Horseradish (*Armoracia rusticana*) roots against *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 20, p. 4723-4727, 2013.
- AJITHA, B.; REDDY, A. K.; REDDY, P. S. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Lantana camara* leaf extract. **Materials Science and Engineering C**, v. 49, p. 373-381, 2015.
- AKHTAR, M. J.; ALHADLAQ, H. A.; KUMAR, S.; ALROKAYAN, S. A.; AHAMED, M. Selective cancer-killing ability of metal-based nanoparticles: implications for cancer therapy. **Archives of Toxicology**, v. 189, n. 11, p. 1895-1907, 2015.
- AKHTAR, M.; MALIK, A. Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 35-47, 2000.
- AKHTAR, M. S.; PANWAR, J.; YUN, Y. S. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 1, n. 6, p. 591-602, 2013.
- AKRAM, M.; RIZVI, R.; SUMBUL, A.; ANSARI, R. A.; MAHMOOD, I. Potential role of bio-inoculants and organic matter for the management of root-knot nematode infesting chickpea. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 1183457-1183469, 2016.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143-152, 2013.
- ALAM, M. M.; MEERZA, D.; NASEEM, I. Protective effect of quercetin on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in alloxan induced type 2 diabetic mice. **Life Sciences**, v. 109, n. 1, p. 8-14, 2014.
- ALARCÓN, C. L.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1-10, 2013.
- ALARIFI, S.; ALI, D.; ALKAHTANI, S.; VERMA, A.; AHAMED, M.; AHMED, M.; ALHADLAQ, H. A. Induction of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in a malignant human skin melanoma cell line after exposure to zinc oxide nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 983-993, 2013.
- ALBERNAZ, V. L. Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização fisicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico. 2014. 121 f. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) Universidade de Brasília, Brasília. 2014.

- ALBERNAZ, V. L.; JOANITTI, G. A.; LOPES, C. A. P.; SILVA, L. P. Cellulose nanocrystals obtained from rice by-products and their binding potential to metallic ions. **Journal of Nanomaterials**, v. 2015, p. 1-8, 2015.
- ALI, K.; AHMED, B.; DWIVEDI, S.; SAQUIB, Q.; ALKHEDHAIRY, A. A.; MUSARRAT, J. Microwave accelerated green synthesis of stable silver nanoparticles with *Eucalyptus globulus* leaf extract and their antibacterial and antibiofilm activity on clinical isolates. **PloS One**, v. 10, n. 7, p. 1-20, 2015.
- ALMUTAIRI, Z. M.; ALHARBI, A. Effect of silver nanoparticles on seed germination of crop plants. **Journal of Advances in Agriculture**, v. 4, n. 1, p. 283-288, 2015.
- ALONSO, S. R.; ORTIZ, P.; POLLÁN, M.; GÓMEZ, B. P.; SÁNCHEZ, L.; ACUÑA, M. J.; PAJARES, R.; TELLO, F. J. M.; HORTELANO, C. M.; PIRIS, M. A.; PERALTO, J. L. R. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 1, p. 193-203, 2004.
- ALQAHTANI, S.; SIMON, L.; ASTETE, C. E.; ALAYOUBI, A.; SYLVESTER, P. W.; NAZZAL, S.; SHEN, Y.; XU, Z.; KADDOUMI, A.; SABLIOV, C. M. Cellular uptake, antioxidant and antiproliferative activity of entrapped α -tocopherol and γ -tocotrienol in poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) and chitosan covered PLGA nanoparticles (PLGA-Chi). **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 445, p. 243-251, 2015.
- AMINI, E.; NABIUNI, M.; BAHARARA, J.; PARIVAR, K.; ASILI, J. Hemolytic and cytotoxic effects of saponin like compounds isolated from Persian Gulf brittle star (*Ophiocoma erinaceus*). **Journal of Coastal Life Medicine**, v. 2, n. 10, p. 762-768, 2014.
- AMOOAGHAIE, R.; SAERI, M. R.; AZIZI, M. Synthesis, characterization and biocompatibility of silver nanoparticles synthesized from *Nigella sativa* leaf extract in comparison with chemical silver nanoparticles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 400-408, 2015.
- ANANDALAKSHMI, K.; VENUGOBAL, J.; RAMASAMY, V. Characterization of silver nanoparticles by green synthesis method using *Pedalium murex* leaf extract and their antibacterial activity. **Applied Nanoscience**, v. 6, n. 3, p. 399-408, 2016.
- ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green chemistry: theory and practice**. New York: Oxford University Press, 2000. 30 p.
- ANBALAKAN, K.; BANU, S. H. A. S. Synthesis, characterization and evaluation of its antibacterial activity of silver nanoparticles. **Asian Journal of Innovative Research**, v. 1, n. 3, p. 7-12, 2016.
- ANDRADE, P. F.; FARIA, A. F.; OLIVEIRA, S. R.; ARRUDA, M. A. Z.; GONÇALVES, M. C. Improved antibacterial activity of nanofiltration polysulfone membranes modified with silver nanoparticles. **Water Research**, v. 81, p. 333-342, 2015.

- ANNAPURNA, A.; ANSARI, M. A.; MANJUNATH, P. M. Partial role of multiple pathways in infarct size limiting effect of quercetin and rutin against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 17, n. 4, p. 491-500, 2013.
- ANTHONY, K. J. P.; MURUGAN, M.; JEYARAJ, M.; RATHINAM, N. K.; SANGILIYANDI, G. Synthesis of silver nanoparticles using pine mushroom extract: a potential antimicrobial agent against *E. coli* and *B. subtilis.* **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 2325-2331, 2014.
- ANTUNES, F. S.; DAL'ACQUA, N.; BERGMANN, C. P.; GIOVANELA, M. Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 9, n. 1, p. 20-26, 2013.
- ARAÚJO, L. A.; ASSUNÇÃO, L. A.; SILVA JUNIOR, N. J.; LEMES, S. R.; REIS, P. R. M. Angiogenic activity of sucupira (*Pterodon emarginatus*) oil. **Scientia Medica**, v. 25, n. 2, p. 20351-20357, 2015.
- ARAVINTHAN, A.; GOVARTHANAN, M.; SELVAM, K.; PRABURAMAN, L.; SELVANKUMAR, T.; BALAMURUGAN, R.; KANNAN, S. K.; KIM, J. H. Sunroot mediated synthesis and characterization of silver nanoparticles and evaluation of its antibacterial and rat splenocyte cytotoxic effects. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 1977-1983, 2015.
- ARDAKANI, A. S. Toxicity of silver, titanium and silicon nanoparticles on the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, and growth parameters of tomato. **Nematology**, v. 15, n. 6, p. 671-677, 2013.
- AROKIYARAJ, S.; ARASU, M. V.; VINCENT, S.; PRAKASH, N. U.; CHOI, S. H.; OH, Y. K.; CHOI, K. C.; KIM, K. H. Rapid green synthesis of silver nanoparticles from *Chrysanthemum indicum* L and its antibacterial and cytotoxic effects: an *in vitro* study. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 379-388, 2014.
- ARUNACHALAM, K. D.; ARUN, L. B.; ANNAMALAI, S. K.; ARUNACHALAM, A. M. Potential anticancer properties of bioactive compounds of *Gymnema sylvestre* and its biofunctionalized silver nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 31-41, 2015.
- ÅSBERG, S. E.; BONES, A. M.; ØVERBY, A. Allyl isothiocyanate affects the cell cycle of *Arabidopsis thaliana*. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 364-374, 2015.
- ASHARANI, P. V.; HANDE, M. P.; VALIYAVEETTIL, S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. **BMC Cell Biology**, v. 10, n. 1, p. 65-78, 2009.
- ASHARANI, P. V.; SETHU, S.; VADUKUMPULLY, S.; ZHONG, S.; LIM, C. T.; HANDE, M. P.; VALIYAVEETTIL, S. Investigations on the structural damage in human erythrocytes exposed to silver, gold, and platinum nanoparticles. **Advanced Functional Materials**, v. 20, n. 8, p. 1233-1242, 2010.

- ASTM. Standard test method for oil and grease and petroleum hydrocarbons in water. **American Society for Testing and Materials**, p. 3921-3985, 1985.
- AUGUSTINE, R.; KALARIKKAL, N.; THOMAS, S. A facile and rapid method for the black pepper leaf mediated green synthesis of silver nanoparticles and the antimicrobial study. **Applied Nanoscience**, v. 4, n. 7, p. 809-818, 2014.
- AUSTIN, L. A.; MACKEY, M. A.; DREADEN, E. C.; SAYED, M. A. E. The optical, photothermal, and facile surface chemical properties of gold and silver nanoparticles in biodiagnostics, therapy, and drug delivery. **Archives of Toxicology**, v. 88, n. 7, p. 1391-1471, 2014.
- AVIDOS, F. D.; BONATTO, C. C.; SILVA, L. P. Efeitos da senescência celular vegetal na síntese verde de nanopartículas de prata como modelo o extrato aquoso de *Annona muricata*. In: XIX Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2014, Brasília. **Anais do XIX Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, 2014.
- AYDINLI, G.; MENNAN, S. Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) from greenhouses in the middle black sea region of Turkey. **Turkish Journal of Zoology**, v. 40, n. 5, p. 675-685, 2016.
- AZIZ, M. S. A.; SHAHEEN, M. S.; NEKEETY, A. A. E.; WAHHAB, M. A. A. Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles biosynthesized using *Chenopodium murale* leaf extract. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 4, p. 356-363, 2014.
- BAHARARA, J.; NAMVAR, F.; RAMEZANI, T.; HOSSEINI, N.; MOHAMAD, R. Green synthesis of silver nanoparticles using *Achillea biebersteinii* flower extract and its anti-angiogenic properties in the rat aortic ring model. **Molecules**, v. 19, n. 4, p. 4624-4634, 2014.
- BALLARIN, B.; MIGNANI, A.; MOGAVERO, F.; GABBANINI, S.; MORIGI, M. Hybrid material based on ZnAl hydrotalcite and silver nanoparticles for deodorant formulation. **Applied Clay Science**, v. 114, p. 303-308, 2015.
- BANERJEE, J.; NARENDHIRAKANNAN, R. T. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Syzygium cumini* (L.) seed extract and evaluation of their *in vitro* antioxidant activities. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 6, n. 3, p. 961-968, 2011.
- BANERJEE, P.; SATAPATHY, M.; MUKHOPAHAYAY, A.; DAS, P. Leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles from widely available Indian plants: synthesis, characterization, antimicrobial property and toxicity analysis. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 1, n. 1, p. 3-12, 2014.

- BANU, H.; RENUKA, N.; FAHEEM, S. M.; ISMAIL, R.; SINGH, V.; SAADATMAND, Z.; KHAN, S. S.; NARAYANAN, K.; RAHEEM, A.; PREMKUMAR, K.; VASANTHAKUMAR, G. Gold and silver nanoparticles biomimetically synthesized using date palm pollen extract-Induce apoptosis and regulate p53 and Bcl-2 expression in human breast adenocarcinoma cells. **Biological trace element research**, p. 1-13, 2018.
- BAO, D.; OH, Z. G.; CHEN, Z. Characterization of silver nanoparticles internalized by *Arabidopsis* plants using single particle ICP-MS analysis. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1-8, 2016.
- BARBARY, A.; CAPORALINO, C. D.; PALLOIX, A.; SERENO, P. C. Host genetic resistance to root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., in Solanaceae: from genes to the field. **Pest Management Science**, v. 71, n. 12, p. 1591-1598, 2015.
- BARROS, A. F.; OLIVEIRA, R. D. L.; LIMA, I. M.; COUTINHO, R. R.; FERREIRA, A. O.; COSTA, A. Root-knot nematodes, a growing problem for conilon coffee in Espirito Santo state, Brazil. **Crop Protection**, v. 55, p. 74-79, 2014.
- BASHA, S. H.; BETHAPUDI, P.; RAMBABU, M.; FIROZ, A.; MURTY, N. V. S. V.; REDDY, S. Anti-angiogenesis property by quercetin compound targeting VEGFR2 elucidated in a computational approach. **European Journal of Biotechnology and Bioscience**, v. 2, n. 6, p. 30-46, 2014.
- BASTÚS, N. G.; MERKOÇI, F.; PIELLA, J.; PUNTES, V. Synthesis of highly monodisperse citrate-stabilized silver nanoparticles of up to 200 nm: kinetic control and catalytic properties. **Chemistry of Materials**, v. 26, n. 9, p. 2836-2846, 2014.
- BAYAT, M.; KHATIBZADEH, M. A review on green methods for synthesis of silver nanoparticles. **Proceedings of the International Conference Nanomaterials: Applications and Properties**, v. 2, n. 2, p. 1-6, 2013.
- BEAR, A. S.; KENNEDY, L. C.; YOUNG, J. K.; PERNA, S. K.; ALMEIDA, J. P. M.; LIN, A. Y.; ECKELS, P. C.; DREZEK, R. A.; FOSTER, A. E. Elimination of metastatic melanoma using gold nanoshell-enabled photothermal therapy and adoptive T cell transfer. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69073-e69085, 2013.
- BEATTIE, D. A.; MENSAH, J. A.; BEAUSSART, A.; FRANKS, G. V.; YEAP, K. Y. *In situ* particle film ATR FTIR spectroscopy of poly (*N*-isopropyl acrylamide) (PNIPAM) adsorption onto talc. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, n. 45, p. 25143-25151, 2014.
- BENELLI, G. Green synthesized nanoparticles in the fight against mosquito-borne diseases and câncer a brief review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 95, p. 58-68, 2016a.

- BENELLI, G. Plant-mediated synthesis of nanoparticles: a newer and safer tool against mosquito-borne diseases? **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 4, p. 353-354, 2016b.
- BERLINCK, R. G.; BORGES, W. D. S.; SCOTTI, M. T.; VIEIRA, P. C. A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706-710, 2018.
- BHAKYA, S.; MUTHUKRISHNAN, S.; SUKUMARAN, M.; GRIJALVA, M.; CUMBAL, L.; BENJAMIN, J. F.; KUMAR, T. S.; RAO, M. V. Antimicrobial, antioxidant and anticancer activity of biogenic silver nanoparticles an experimental report. **RSC Advances**, v. 6, n. 84, p. 81436-81446, 2016b.
- BHAKYA, S.; MUTHUKRISHNAN, S.; SUKUMARAN, M.; MUTHUKUMAR, M. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their antioxidant and antibacterial activity. **Applied Nanoscience**, v. 6, n. 5, p. 755-766, 2016a.
- BHAT, J. S. A. Heralding a new future-nanotechnology? **Current Science**, v. 85, n. 2, p. 147-154, 2003.
- BHAU, B. S.; PHUKON, P.; AHMED, R.; GOGOI, B.; BORAH, B.; BARUAH, J.; SHARMA, D. K.; WANN, S. B. A novel tool of nanotechnology: nanoparticle mediated control of nematode infection in plants. In: SINGH, D. P.; SINGH, H. B.; PRABHA, R. **Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity**. Índia: Springer India, 2016. p. 253-269.
- BINDHU, M. R.; UMADEVI, M. Antibacterial and catalytic activities of green synthesized silver nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 135, p. 373-378, 2015.
- BIRD, D. M. Signaling between nematodes and plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 4, p. 372-376, 2004.
- BIRD, D. M.; KALOSHIAN, I. Are roots special? nematodes have their say. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 62, n. 2, p. 115-123, 2003.
- BOLLELLA, P.; SCHULZ, C.; FAVERO, G.; MAZZEI, F.; LUDWIG, R.; GORTON, L.; ANTIOCHIA, R. Green synthesis and characterization of gold and silver nanoparticles and their application for development of a third generation lactose biosensor. **Electroanalysis**, v. 29, n. 1, p. 77-86, 2017.
- BONATTO, C. C.; JOANITTI, G. A.; SILVA, L. P. *In vitro* cytotoxic activity of chitosan–bullfrog oil microemulsion against melanoma cells. **IET nanobiotechnology**, v. 9, n. 4, p. 172-177, 2015.
- BONATTO, C. C.; SILVA, L. P. Higher temperatures speed up the growth and control the size and optoelectrical properties of silver nanoparticles greenly synthesized by cashew nutshells. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 46-54, 2014.

- BONDARENKO, O.; JUGANSON, K.; IVASK, A.; KASEMETS, K.; MORTIMER, M.; KAHRU, A. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells *in vitro*: a critical review. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 7, p. 1181-1200, 2013.
- BONTEMPO, A. F.; FERNANDES, R. H.; LOPES, J.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A. *Pochonia chlamydosporia* controls *Meloidogyne incognita* on carrot. **Australasian Plant Pathology**, v. 43, n. 4, p. 421-424, 2014.
- BONTEMPO, A. F.; LOPES, E. A.; FERNANDES, R. H.; FREITAS, L. G.; GIARETTA, R. D. Dose-response effect of *Pochonia chlamydosporia* against *Meloidogyne incognita* on carrot under field conditions. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 1, p. 258-262, 2017.
- BORASE, H. P.; SALUNKE, B. K.; SALUNKHE, R. B.; PATIL, C. D.; HALLSWORTH, J. E.; KIM, B. S.; PATIL, S. V. Plant extract: a promising biomatrix for ecofriendly, controlled synthesis of silver nanoparticles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 1, p. 1-29, 2014.
- BRATSKAYA, S. Y.; ZHELEZNOV, V. V.; PRIVAR, Y. O.; MECHAEV, A. V.; ZUB, Y. L.; PESTOV, A. V. Pentacyanoferrate (II) complexes with N-containing derivatives of chitosan and polyallylamine: synthesis and cesium uptake properties. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 460, p. 145-150, 2014.
- BREWER, M. S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 221-247, 2011.
- BUMBUDSANPHAROKE, N.; KO, S. Nano-food packaging: an overview of market, migration research, and safety regulations. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 5, p. 910-923, 2015.
- BUSTAMANTE, K. G. L.; LIMA, A. D. F.; SOARES, M. L.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; BARA, M. T. F.; PIMENTA, F. C.; PAULA, J. R. Evaluation of antimicrobial activity of crude ethanol extract from the bark of sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel) Fabaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 3, p. 341-345, 2010.
- CABONI, P.; SABA, M.; OPLOS, C.; AISSANI, N.; MAXIA, A.; SPIROUDI, U. M.; CASU, L.; NTALLI, N. Nematicidal activity of furanocoumarins from parsley against *Meloidogyne* spp. **Pest Management Science**, v. 71, n. 8, p. 1099-1105, 2015.
- CAMILLO, J.; BARA, M. T. F.; OLIVEIRA, P. C.; PAULA, J. R.; VIEIRA, R. F. *Pterodon emarginatus Pterodon pubescens* sucupira-branca. In: VIEIRA, R. F.; CAMILLO, J.; CORADIN, L. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial plantas para o futuro região centro-oeste**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2016. p. 861-874.

- CAMPOS, J. M. S. D. **Obtenção de híbridos hexaplóides e análise genômica de Pennisetum sp. por citometria de fluxo**. 2007. 128 f. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- CAMPOS, V. C.; TILLMANN, M. A. Comparação entre os métodos oficiais de estufa para determinação do grau de umidade de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 18, n. 1, p. 134-137, 1996.
- CAROLIS, E.; VELLA, A.; VACCARO, L.; TORELLI, R.; SPANU, T.; FIORI, B.; POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 9, p. 1081-1088, 2014.
- CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. 1ª ed. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. 480 p.
- CASTANON, G. A. M.; MARTINEZ, N. N.; GUTIERREZ, F. M.; MENDOZA, J. R. M.; RUIZ, F. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, n. 8, p. 1343-1348, 2008.
- CASTILHO, I. G.; SOUSA, M. A. A.; LEITE, R. M. S. Fotoexposição e fatores de risco para câncer da pele: uma avaliação de hábitos e conhecimentos entre estudantes universitários. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 2, p. 173-178, 2010.
- CHAKRABORTY, R.; BASU, T. Metallic copper nanoparticles induce apoptosis in a human skin melanoma A-375 cell line. **Nanotechnology**, v. 28, n. 10, p. 105101-105133, 2017.
- CHANG, W. W.; HU, F. W.; YU, C. C.; WANG, H. H.; FENG, H. P.; LAN, C.; TSAI, L. L.; CHANG, Y. C. Quercetin in elimination of tumor initiating stem-like and mesenchymal transformation property in head and neck cancer. **Head & Neck**, v. 35, n. 3, p. 413-419, 2013.
- CHANTHINI, A. B.; BALASUBRAMANI, G.; RAMKUMAR, R.; SOWMIYA, R.; BALAKUMARAN, M. D.; KALAICHELVAN, P. T.; PERUMAL, P. Structural characterization, antioxidant and *in vitro* cytotoxic properties of seagrass, *Cymodocea serrulata* (R.Br.) Asch. & Magnus mediated silver nanoparticles. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 153, p. 145-152, 2015.
- CHAVES, A.; PEDROSA, E. M. R.; WILLADINO, L.; CARDOSO, M. S. D. O. Activation of resistance to *Meloidogyne incognita* in sugarcane treated with pyraclostrobin. **Nematoda**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2016.
- CHEN, L. Q.; FANG, L.; LING, J.; DING, C. Z.; KANG, B.; HUANG, C. Z. Nanotoxicity of silver nanoparticles to red blood cells: size dependent adsorption, uptake, and hemolytic activity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 501-509, 2015.

- CHEN, S. F.; ZHANG, H. Aggregation kinetics of nanosilver in different water conditions. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 3, n. 3, p. 35006-35009, 2012.
- CHENG, C. H.; HSIAO, H. L.; CHU, S. I.; SHIEH, Y. Y.; SUN, C. Y.; PENG, C. Low cost silver alloy wire bonding with excellent reliability performance. **Electronic Components & Technology Conference**, p. 1569-1573, 2013.
- CHERUKURI, P.; GLAZER, E. S.; CURLEY, S. A. Targeted hyperthermia using metal nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 3, p. 339-345, 2010.
- CHHIPA, H. Nanofertilizers and nanopesticides for agriculture. **Environmental Chemistry Letters**, v. 15, n. 1, p. 15-22, 2017.
- CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 221-49, 2002.
- CHO, W. S.; THIELBEER, F.; DUFFIN, R.; JOHANSSON, E. M.; MEGSON, I. L.; MACNEE, W.; BRADLEY, M.; DONALDSON, K. Surface functionalization affects the zeta potential, coronal stability and membranolytic activity of polymeric nanoparticles. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 2, p. 202-211, 2014.
- CHOI, J.; REIPA, V.; HITCHINS, V. M.; GOERING, P. L.; MALINAUSKAS, R. A. Physicochemical characterization and *in vitro* hemolysis evaluation of silver nanoparticles. **Toxicological Sciences**, v. 123, n. 1, p. 133-143, 2011.
- CHONG, C. Y.; LEE, S. P.; LING, T. C. Efficient software clustering technique using an adaptive and preventive dendrogram cutting approach. **Information and Software Technology**, v. 55, n. 11, p. 1994-2012, 2013.
- CHUNG, I. M.; PARK, I.; HYUN, K. S.; THIRUVENGADAM, M.; RAJAKUMAR, G. Plant-mediated synthesis of silver nanoparticles: their characteristic properties and therapeutic applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, n. 40, p. 1-14, 2016.
- CLSI Clinical Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M02–A10. Wayne, Pa, 2012.
- COSTA, G. F.; MARENCO, R. A. Fotossíntese, condutância estomática e potencial hídrico foliar em árvores jovens de andiroba (*Carapa guianensis*). **Acta Amazonica**, v. 37, n. 2, p. 229-234, 2007.
- CROMWELL, W. A.; YANG, J.; STARR, J. L.; JO, Y. K. Nematicidal effects of silver nanoparticles on root-knot nematode in bermudagrass. **Journal of Nematology**, v. 46, n. 3, p. 261-266, 2014.

- CRUZ, S. A. B. Avaliação da atividade tóxica e do perfil fitoquímico de duas espécies da família fabaceae: *Bowdichia virgilioides* KUNTH e *Pterodon emarginatus* VOGEL. 2016. 56 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Licenciatura em Química) Instituto Federal de Goiás, Anápolis. 2016.
- CRUZ, D.; FALÉ, P. L.; MOURATO, A.; VAZ, P. D.; SERRALHEIRO, M. L.; LINO, A. R. Preparation and physicochemical characterization of Ag nanoparticles biosynthesized by *Lippia citriodora* (Lemon Verbena). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 1, p. 67-73, 2010.
- CRUZ, R. A. S.; OLIVEIRA, L. P.; CALDEIRA, F. H. B.; MENDOÇA, F. S.; BACHA, F. B.; POTT, A.; LEMOS, R. A. A.; COLODEL, E. M. Intoxicação espontânea e experimental por *Pterodon emarginatus* (Fabaceae Faboideae) em bovinos e experimental em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 11, p. 1087-1094, 2012.
- CUI, M.; LIN, Y.; ZU, Y.; EFFERTH, T.; LI, D.; TANG, Z. Ethylene increases accumulation of compatible solutes and decreases oxidative stress to improve plant tolerance to water stress in Arabidopsis. **Journal of Plant Biology**, v. 58, n. 3, p. 193-201, 2015.
- CUMBERLAND, S. A.; LEAD, J. R. Synthesis of NOM-capped silver nanoparticles: size, morphology, stability, and NOM binding characteristics. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 1, p. 817-825, 2013.
- DANG, T. M. D.; LE, T. T. T.; BLANC, E. F.; DANG, M. C. Influence of surfactant on the preparation of silver nanoparticles by polyol method. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 3, n. 3, p. 35004-35007, 2012.
- DANIEL, O.; PEZZONI, T.; NOGUEIRA, I. M. B.; CREMON, T.; VITORINO, A. C. T. Relações alométricas em árvores de *Pterodon emarginatus* vogel em um sistema silvipastoril. **Cerne**, v. 19, n. 1, p. 141-149, 2013.
- DAS, D. K.; CHAKRABORTY, A.; BHATTACHARJEE, S.; DEY, S. Biosynthesis of stabilised gold nanoparticle using an aglycone flavonoid, quercetin. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 8, n. 4, p. 649-655, 2013b.
- DAS, S.; DAS, J.; SAMADDER, A.; BHATTACHARYYA, S. S.; DAS, D.; BUKHSH, A. R. K. Biosynthesized silver nanoparticles by ethanolic extracts of *Phytolacca decandra*, *Gelsemium sempervirens*, *Hydrastis canadensis* and *Thuja occidentalis* induce differential cytotoxicity through G2/M arrest in A375 cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 325-336, 2013a.
- DAS, M.; MONDAL, A.; PATOWARY, K.; MALIPEDDI, H. Biosynthesis of AgNPs using aqueous leaf extract of *Ipomoea eriocarpa* and their anti-inflammatory effect on carrageenan-induced paw edema in male wistar rats. **IET Nanobiotechnology**, v. 11, n. 3, p. 1-14, 2016.

- DEVI, L. S.; JOSHI, S. R. Ultrastructures of silver nanoparticles biosynthesized using endophytic fungi. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 3, n. 1, p. 29-37, 2015.
- DHAND, V.; SOUMYA, L.; BHARADWAJ, S.; CHAKRA, S.; BHATT, D.; SREEDHAR, B. Green synthesis of silver nanoparticles using *Coffea arabica* seed extract and its antibacterial activity. **Materials Science and Engineering: C**, v. 58, p. 36-43, 2016.
- DIMKPA, C. O.; MCLEAN, J. E.; MARTINEAU, N.; BRITT, D. W.; HAVERKAMP, R.; ANDERSON, A. J. Silver nanoparticles disrupt wheat (*Triticum aestivum* L.) growth in a sand matrix. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 2, p. 1082-1090, 2013.
- DIPANKAR, C.; MURUGAN, S. The green synthesis, characterization and evaluation of the biological activities of silver nanoparticles synthesized from *Iresine herbstii* leaf aqueous extracts. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 98, p. 112-119, 2012.
- DOLATABADI, J. E. N.; MOKHTARZADEH, A.; GHAREGHORAN, S. M.; DEHGHAN, G. Synthesis, characterization and antioxidant property of quercetin-Tb (III) complex. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, n. 2, p. 101-104, 2014.
- DRAKE, P. L.; HAZELWOOD, K. J. Exposure-related health effects of silver and silver compounds: a review. **The Annals of Occupational Hygiene**, v. 49, n. 7, p. 575-585, 2005.
- DURÁN, N.; DURÁN, M.; JESUS, M. B.; SEABRA, A. B.; FÁVARO, W. J.; NAKAZATO, G. Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 12, n. 3, p. 789-799, 2016.
- DURÁN, N.; MARCATO, P. D.; DURÁN, M.; YADAV, A.; GADE, A.; RAI, M. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 5, p. 1609-1624, 2011.
- DUTRA, R. C. Avaliação fitoquímica e farmacológica das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. 2008. 244 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Instituto de Ciências Biológicos, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora. 2008.
- DUTRA, R. C.; BRAGA, F. G.; COIMBRA, E. S.; SILVA, A. D.; BARBOSA, N. R. Antimicrobial and leishmanicidal activities of seeds of *Pterodon emarginatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 429-435, 2009a.
- DUTRA, R. C.; FAVA, M. B.; ALVES, C. C. S.; FERREIRA, A. P.; BARBOSA, N. R. Antiulcerogenic and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Pterodon emarginatus* seeds. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 2, p. 243-250, 2009c.

- DUTRA, R. C.; PITTELLA, F.; DITTZ, D.; MARCON, R.; PIMENTA, D. S.; LOPES, M. T.; RAPOSO, N. R. Chemical composition and cytotoxicity activity of the essential oil of *Pterodon emarginatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 971-978, 2012b.
- DUTRA, R. C.; PITTELLA, F.; FERREIRA, A. S.; LARCHER, P.; FARIAS, R. E.; BARBOSA, N. R. Efeito cicatrizante das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel e modelos de úlceras dérmicas experimentais em coelhos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 3, p. 375-382, 2009b.
- DUTRA, R. C.; SILVA, P. S.; PITTELLA, F.; VICCINI, L. F.; LEITE, M. N.; RAPOSO, N. R. B. Caracterização fitoquímica e citogenética das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. **Revista Técnico Científica do Instituto Federal de Santa Catarina**, v. 1, n. 2, p. 99-109, 2012a.
- DZIEDZIC, A.; KUBINA, R.; BUŁDAK, R. J.; SKONIECZNA, M.; CHOLEWA, K. Silver nanoparticles exhibit the dose-dependent anti-proliferative effect against human squamous carcinoma cells attenuated in the presence of berberine. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 1-17, 2016.
- EBRAHIMINEZHAD, A.; TAGHIZADEH, S. M.; TAGHIZADEH, S.; GHASEMI, Y. Chemical and biological approaches for the synthesis of silver nanoparticles; a mini review. **Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 55-62, 2017.
- EDISON, T. J. I.; SETHURAMAN, M. G. Instant green synthesis of silver nanoparticles using *Terminalia chebula* fruit extract and evaluation of their catalytic activity on reduction of methylene blue. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 9, p. 1351-1357, 2012.
- ELUMALAI, D.; KALEENA, P. K.; ASHOK, K.; SURESH, A.; HEMAVATHI, M. Green synthesis of silver nanoparticle using *Achyranthes aspera* and its larvicidal activity against three major mosquito vectors. **Engineering in Agriculture, Environment and Food**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2016.
- ERDOĞAN, T.; YILMAZ, F. F.; KIVÇAK, B.; ÖZYAZICI, M. Green synthesis of silver nanoparticles using *Arbutus andrachne* leaf extract and its antimicrobial activity. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 6, p. 1129-1136, 2016.
- ESCOBAR, C.; BARCALA, M.; CABRERA, J.; FENOLL, C. Chapter one-overview of root-knot nematodes and giant cells. **Advances in Botanical Research**, v. 73, p. 1-32, 2015.
- ETHIRAJ, A. S.; JAYANTHI, S.; RAMALINGAM, C.; BANERJEE, C. Control of size and antimicrobial activity of green synthesized silver nanoparticles. **Materials Letters**, v. 185, p. 526-529, 2016.

- EUZÉBIO, F. P.; SANTOS, F. J.; VELOSO, D. P.; RUIZ, A. L. T.; CARVALHO, J. E.; ALVES, D. L. F.; FÁTIMA, Â. Effect of 6α, 7β-dihydroxyvouacapan-17β-oic acid and its lactone derivatives on the growth of human cancer cells. **Bioorganic Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 96-100, 2009.
- EVANS, J. E.; JUNGJOHANN, K. L.; BROWNING, N. D.; ARSLAN, I. Controlled growth of nanoparticles from solution with *in situ* liquid transmission electron microscopy. **Nano Letters**, v. 11, n. 7, p. 2809-2813, 2011.
- FARAMARZI, M. A.; SADIGHI, A. Insights into biogenic and chemical production of inorganic nanomaterials and nanostructures. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 189-190, p. 1-20, 2013.
- FAURI, J. A. C.; DIEHL, E. S.; CARTELL, A.; BAKOS, L.; EDELWEISS, M. I. A. A proteína p16 e o melanoma cutâneo. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, v. 54, n. 1, p. 81-91, 2010.
- FAVERY, B.; QUENTIN, M.; POSSAMAI, S. J.; ABAD, P. Gall-forming root-knot nematodes hijack key plant cellular functions to induce multinucleate and hypertrophied feeding cells. **Journal of Insect Physiology**, v. 84, p. 60-69, 2016.
- FELFILI, J. M.; FAGG, C. W.; SILVA, J. C. S.; OLIVEIRA, E. C. L.; PINTO, J. R. R.; SILVA JUNIOR, M. C.; RAMOS, K. M. O. **Plantas da APA Gama e cabeça de veado: espécies ecossistemas e recuperação**. Brasília: Universidade de Brasília, 2002. 52p.
- FENG, Y.; SUN, C.; YUAN, Y.; ZHU, Y.; WAN, J.; FIREMPONG, C. K.; SIAW, E. O.; XU, Y.; PU, Z.; YU, J.; XU, X. Enhanced oral bioavailability and *in vivo* antioxidant activity of chlorogenic acid via liposomal formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 501, n. 1-2, p. 342-349, 2016.
- FIERASCU, I.; BUNGHEZ, I. R.; FIERASCU, R. C.; ION, R. M.; PÎRVU, C. E. D.; NUTA, D. Characterization and antioxidant activity of phytosynthesised silver nanoparticles using *Calendula officinalis* extract. **Farmacia**, v. 62, n. 1, p. 129-136, 2014.
- FLEURY, D.; HIMANEN, K.; CNOPS, G.; NELISSEN, H.; BOCCARDI, T. M.; MAERE, S.; BEEMSTER, G. T. S.; NEYT, P.; ANAMI, S.; ROBLES, P.; MICOL, J. L.; INZÉ, D.; LIJSEBETTENS, M. V. The *Arabidopsis thaliana* homolog of yeast *BRE1* has a function in cell cycle regulation during early leaf and root growth. **The Plant Cell**, v. 19, n. 2, p. 417-432, 2007.
- FOLDBJERG, R.; DANG, D. A.; AUTRUP, H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 7, p. 743-750, 2011.

- FORNAGUERA, C.; CALDERÓ, G.; MITJANS, M.; VINARDELL, M. P.; SOLANS, C.; VAUTHIER, C. Interactions of PLGA nanoparticles with blood components: protein adsorption, coagulation, activation of the complement system and hemolysis studies. **Nanoscale**, v. 7, n. 14, p. 6045-6058, 2015.
- FORNO, A. H. D.; CÂMARA, D.; PARISE, B.; RODRIGUES, C. F.; SOARES, J. J.; WAGNER, R.; RIBEIRO, S. R.; FOLMER, V.; PUNTEL, R.; HASS, S. E.; FARIAS, F. M.; DENARDIN, E. L. G.; DENARDIN, C. C.; AVILA, D. S. Antioxidant and lipid lowering effects of dried fruits oil extract of *Pterodon emarginatusin* in *Caenorhabditis elegans*. **Arabian Journal of Chemistry**, p. 1-11, 2016.
- FRANCI, G.; FALANGA, A.; GALDIERO, S.; PALOMBA, L.; RAI, M.; MORELLI, G.; GALDIERO, M. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8856-8874, 2015.
- FRANKOVÁ, J.; PIVODOVÁ, V.; VÁGNEROVÁ, H.; JURÁŇOVÁ, J.; ULRICHOVÁ, J. Effects of silver nanoparticles on primary cell cultures of fibroblasts and keratinocytes in a wound-healing model. **Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials**, v. 14, n. 2, p. e137-e142, 2016.
- GADDAM, S. A.; KOTAKADI, V. S.; GODAL, D. V. R. S.; RAO, Y. S.; REDDY, A. V. Efficient and robust biofabrication of silver nanoparticles by *cassia alata* leaf extract and their antimicrobial activity. **Journal of Nanostructure in Chemistry**, v. 4, n. 82, p. 1-9, 2014.
- GAILLET, S.; ROUANET, J. M. Silver nanoparticles: their potential toxic effects after oral exposure and underlying mechanisms a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 77, p. 58-63, 2015.
- GALANDÁKOVÁ, A.; FRANKOVÁ, J.; AMBROŽOVÁ, N.; HABARTOVÁ, K.; PIVODOVÁ, V.; ZÁLEŠÁK, B.; ŠAFÁŘOVÁ, K.; SMÉKALOVÁ, M.; ULRICHOVÁ, J. Effects of silver nanoparticles on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. **Human & Experimental Toxicology**, v. 35, n. 9, p. 946-957, 2016.
- GANAIE, S. U.; ABBASI, T.; ANURADHA, J.; ABBASI, S. A. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles using the amphibious weed ipomoea and their application in pollution control. **Journal of King Saud University-Science**, v. 26, n. 3, p. 222-229, 2014.
- GAO, H.; QI, G.; YIN, R.; ZHANG, H.; LI, C.; ZHAO, X. *Bacillus cereus* strain S2 shows high nematicidal activity against *Meloidogyne incognita* by producing sphingosine. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-11, 2016.
- GARBE, C.; PERIS, K.; HAUSCHILD, A.; SAIAG, P.; MIDDLETON, M.; SPATZ, A.; GROB, J. J.; MALVEHY, J.; BISHOP, J. N.; STRATIGOS, A.; PEHAMBERGER, H.; EGGERMONT, A. Diagnosis and treatment of melanoma: european consensus-based interdisciplinary guideline. **European Journal of Cancer**, v. 46, n. 2, p. 270-283, 2010.

- GE, L.; LI, Q.; WANG, M.; OUYANG, J.; LI, X.; XING, M. M. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 2399-2407, 2014.
- GHAEDI, M.; YOUSEFINEJAD, M.; SAFARPOOR, M.; KHAFRI, H. Z.; PURKAIT, M. K. *Rosmarinus officinalis* leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles and investigation of its antimicrobial properties. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 31, p. 167-172, 2015.
- GHOSH, P.; ROY, A. S.; CHAUDHURY, S.; JANA, S. K.; CHAUDHURY, K.; DASGUPTA, S. Preparation of albumin based nanoparticles for delivery of fisetin and evaluation of its cytotoxic activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 408-417, 2016.
- GHOSH, N.; SANDUR, R.; GHOSH, D.; ROY, S.; JANADRI, S. Acute, 28 days sub acute and genotoxic profiling of quercetin-magnesium complex in swiss albino mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 86, p. 279-291, 2017.
- GLIGA, A. R.; SKOGLUND, S.; WALLINDER, I. O.; FADEEL, B.; KARLSSON, H. L. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 11, n. 1, p. 11-27, 2014.
- GOBBO NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GONDIM, T. M. S.; CAVALCANTE, L. F.; BELTRAO, N. E. M. Aquecimento global: salinidade e consequências no comportamento vegetal. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 14, n. 1, p. 37-54, 2010.
- GORBE, M.; BHAT, R.; AZNAR, E.; SANCENÓN, F.; MARCOS, M. D.; HERRAIZ, F. J.; PROHENS, J.; VENKATARAMAN, A.; MÁÑEZ, R. M. Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using pepino (*Solanum muricatum*) leaf extract and their cytotoxicity on HeLa cells. **Materials**, v. 9, n. 5, p. 325-339, 2016.
- GOU, N.; HAYDEN, A. O.; GU, A. Z. Mechanistic toxicity assessment of nanomaterials by whole-cell-array stress genes expression analysis. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 15, p. 5964-5970, 2010.
- GOVERSE, A.; ENGLER, J. A.; VERHEES, J.; KROL, S.; HELDER, J.; GHEYSEN, G. Cell cycle activation by plant parasitic nematodes. **Plant Molecular Biology**, v. 43, n. 5-6, p. 747-761, 2000.
- GOVINDARAJAN, M.; RAJESWARY, M.; VEERAKUMAR, K.; MUTHUKUMARAN, U.; HOTI, S. L.; BENELLI, G. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles fabricated using *Anisomeles indica*: mosquitocidal potential against malaria, dengue and japanese encephalitis vectors. **Experimental Parasitology**, v. 161, p. 40-47, 2016.

- GOYAL, R.; MACRI, L. K.; KAPLAN, H. M.; KOHN, J. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 240, p. 77-92, 2016.
- GUIDELLI, E. J.; RAMOS, A. P.; ZANIQUELLI, M. E. D.; BAFFA, O. Green synthesis of colloidal silver nanoparticles using natural rubber latex extracted from *Hevea brasiliensis*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 82, n. 1, p. 140-145, 2011.
- GUPTA, R. K.; PATEL, A. K.; SHAH, N.; CHAUDHARY, A. K.; JHA, U. K.; YADAV, U. C.; GUPTA, P. K.; PAKUWAL, U. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, p. 4405-4409, 2014.
- GUPTA, R.; TIWARI, S.; SAIKIA, S. K.; SHUKLA, V.; SINGH, R.; SINGH, S. P.; KUMAR, P. V. A.; PANDEY, R. Exploitation of microbes for enhancing bacoside content and reduction of *Meloidogyne incognita* infestation in *Bacopa monnieri L.* **Protoplasma**, v. 252, n. 1, p. 53-61, 2015.
- GUROO, J. A.; KHAN, M.; AHMAD, A.; AZAM, A.; SIDDIQUI, Z. A. Management of *Meloidogyne incognita* and *Macrophomina phaseolina* by graphene oxide on *Lens culinaris*. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**, v. 51, n. 1, p. 43-56, 2016.
- GURUNATHAN, S.; HAN, J. W.; KWON, D. N.; KIM, J. H. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against gram-negative and gram-positive bacteria. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 373-389, 2014.
- GUZMAN, M.; DILLE, J.; GODET, S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bactéria. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 1, p. 37-45, 2012.
- HA, T. V. A.; KIM, S.; CHOI, Y.; KWAK, H. S.; LEE, S. J.; WEN, J.; OEY, I.; KO, S. Antioxidant activity and bioaccessibility of size-different nanoemulsions for lycopene-enriched tomato extract. **Food Chemistry**, v. 178, p. 115-121, 2015.
- HÄDRICH, G.; VAZ, G. R.; MAIDANA, M.; KRATZ, J. M.; NECKEL, G. L.; FAVARIN, D. C.; ROGERIO, A. P.; SILVA JUNIOR, F. M. R.; BAISCH, A. L. M.; DORA, C. L. Anti-inflammatory effect and toxicology analysis of oral delivery quercetin nanosized emulsion in rats. **Pharmaceutical Research**, v. 33, n. 4, p. 983-993, 2016.
- HAIDER, A.; KANG, I. K. Preparation of silver nanoparticles and their industrial and biomedical applications: a comprehensive review. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2015, p. 1-16, 2015.
- HAMED, S. M.; MOSTAFA, A. M. A.; RAOUF, N. A.; IBRAHEEM, I. B. M. Biosynthesis of silver and silver chloride nanoparticles by *Parachlorella kessleri* SAG 211-11 and evaluation of its nematicidal potential against the root-knot nematode; *Meloidogyne incognita*. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 10, n. 18, p. 354-364, 2016.

- HAMEDI, S.; SHOJAOSADATI, S. A.; MOHAMMADI, A. Evaluation of the catalytic, antibacterial and anti-biofilm activities of the *Convolvulus arvensis* extract functionalized silver nanoparticles. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 167, p. 36-44, 2017.
- HAMIDA, A. O.; HODA, A. A.; MOHAMED, M. M.; SONAA, H. E.; SALWA, S. G. Control of *Meloidogyne incognita* on potato plant and its associated weeds with some bioactive agents and chemicals under field conditions. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 26, n. 3, p. 503-508, 2016.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software for education and data analysis. **Palaeonlogia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- HANSEN, D.; HARAGUCHI, M.; ALONSO, A. Pharmaceutical properties of 'sucupira' (*Pterodon* spp.). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 4, p. 607-616, 2010.
- HANSEN, D.; NAKAHATA, A. M.; HARAGUCHI, M.; OKAMOTO, O. K.; GONCALEZ, E.; ALONSO, A. 14, 15-epoxygeranylgeraniol and extracts isolated from *Pterodon emarginatus* Vog. fruits: antitumor activity on glioblastoma cells. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 9, p. 20-24, 2012.
- HAO, J.; GUO, B.; YU, S.; ZHANG, W.; ZHANG, D.; WANG, J.; WANG, Y. Encapsulation of the flavonoid quercetin with chitosan-coated nano-liposomes. **LWT** Food Science and Technology, v. 85, p. 37-44, 2017.
- HASSAN, M. E. M.; ZAWAM, H. S.; NAHAS, S. E. M. E.; DESOUKEY, A. F. Comparison study between silver nanoparticles and two nematicides against *Meloidogyne incognita* on tomato seedlings. **Plant Pathology Journal**, v. 15, p. 144-151, 2016.
- HE, W.; LIU, X.; KIENZLE, A.; MULLER, W. E. G.; FENG, Q. *In vitro* uptake of silver nanoparticles and their toxicity in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 1, p. 219-228, 2016.
- HEBBALALU, D.; LALLEY, J.; NADAGOUDA, M. N.; VARMA, R. S. Greener techniques for the synthesis of silver nanoparticles using plant extracts, enzymes, bacteria, biodegradable polymers, and microwaves. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 1, n. 7, p. 703-712, 2013.

- HEBEISH, A.; RAFIE, M. H. E.; SHEIKH, M. A. E; SELEEM, A. A.; NAGGAR, M. E. E. Antimicrobial wound dressing and anti-inflammatory efficacy of silver nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, p. 509-515, 2014.
- HEMERLY, A.; BERGOUNIOUX, C.; MONTAGU, M. V.; INZE, D.; FERREIRA, P. Genes regulating the plant cell cycle: isolation of a mitotic-like cyclin from *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 8, p. 3295-3299, 1992.
- HOSEINZADEH, E.; MAKHDOUMI, P.; TAHA, P.; HOSSINI, H.; STELLING, J.; KAMAL, M. A.; ASHRAF, G. M. A review on nano-antimicrobials: metal nanoparticles, methods and mechanisms. **Current Drug Metabolism**, v. 18, n. 2, p. 120-128, 2017.
- HOWARD, A.; PELC, S. R. Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. **International Journal of Radiation Biology**, v. 6, n. 2, p. 261-273, 1953.
- HU, L.; WU, H.; CUI, Y. Metal nanogrids, nanowires, and nanofibers for transparente electrodes. **Materials Research Society Bulletin**, v. 36, n. 10, p. 760-765, 2011.
- HUANG, H.; LAI, W.; CUI, M.; LIANG, L.; LIN, Y.; FANG, Q.; LIU, Y.; XIE, L. An evaluation of blood compatibility of silver nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 6, p. 25518-25532, 2016.
- HUANG, J. F.; SHI, Q. S.; FENG, J.; CHEN, M. J.; LI, W. R.; LI, L. Q. Facile pyrolysis preparation of rosin-derived biochar for supporting silver nanoparticles with antibacterial activity. **Composites Science and Technology**, v. 145, p. 89-95, 2017a.
- HUANG, J.; WANG, Q.; LI, T.; XIA, N.; XIA, Q. Nanostructured lipid carrier (NLC) as a strategy for encapsulation of quercetin and linseed oil: preparation and *in vitro* characterization studies. **Journal of Food Engineering**, v. 215, p. 1-12, 2017b.
- HUANG, S.; WANG, L.; LIU, L.; HOU, Y.; LI, L. Nanotechnology in agriculture, livestock, and aquaculture in China. a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, n. 2, p. 369-400, 2015.
- HUANG, W. J.; ZHANG, X.; CHEN, W. W. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. **Biomedical Reports**, v. 4, n. 5, p. 519-522, 2016.
- HUSSAIN, M. A.; FATIMA, I.; MUKHTAR, T.; ASLAM, M. N.; KAYANI, M. Z. Effect of inoculum density of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on damage potential in eggplant. **Mycopath**, v. 13, n. 1, p. 33-36, 2015.

- HUSSAIN, M. A.; MUKHTAR, T.; KAYANI, M. Z. Characterization of susceptibility and resistance responses to root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) infection in okra germplasm. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 51, n. 2, p. 108-112, 2014.
- INBATHAMIZH, L.; PONNU, T. M.; MARY, E. J. *In vitro* evaluation of antioxidant and anticancer potential of *Morinda pubescens* synthesized silver nanoparticles. **Journal of Pharmacy Research**, v. 6, n. 1, p. 32-38, 2013.
- IRAVANI, S.; KORBEKANDI, H.; MIRMOHAMMADI, S. V.; ZOLFAGHARI, B. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 6, p. 385-406, 2014.
- ISLAM, M. R.; ZAMAN, A.; JAHAN, I.; CHAKRAVORTY, R.; CHAKRABORTY, S. *In silico* QSAR analysis of quercetin reveals its potential as therapeutic drug for Alzheimer's disease. **Journal of Young Pharmacists**, v. 5, n. 4, p. 173-179, 2013.
- JAGTAP, U. B.; BAPAT, V. A. Green synthesis of silver nanoparticles using *Artocarpus heterophyllus* Lam. seed extract and its antibacterial activity. **Industrial Crops and Products**, v. 46, p. 132-137, 2013.
- JANG, J. Y.; CHOI, Y. H.; SHIN, T. S.; KIM, T. H.; SHIN, K. S.; PARK, H. W.; KIM, Y. H.; KIM, H.; CHOI, G. J.; JANG, K. S.; CHA, B.; KIM, I. S.; MYUNG, E. J.; KIM, J. C. Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Aspergillus niger* F22 producing oxalic acid. **PloS One**, v. 11, n. 6, p. 1-15, 2016.
- JANNATHUL, F. M.; LALITHA, P. Apoptotic efficacy of biogenic silver nanoparticles on human breast cancer MCF-7 cell lines. **Progress in Biomaterials**, v. 4, n. 2, p. 113-121, 2015.
- JENA, S.; SINGH, R. K.; PANIGRAHI, B.; SUAR, M.; MANDAL, D. Photobioreduction of Ag⁺ ions towards the generation of multifunctional silver nanoparticles: mechanistic perspective and therapeutic potential. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 164, p. 306-313, 2016.
- JESWANI, G.; ALEXANDER, A.; SARAF, S.; SARAF, S.; QURESHI, A.; AJAZUDDIN. Recent approaches for reducing hemolytic activity of chemotherapeutic agents. **Journal of Controlled Release**, v. 211, p. 10-21, 2015.
- JIA, C.; RUAN, W. B.; ZHU, M. J.; REN, A. Z.; GAO, Y. B. Potential antagnosim of cultivated and wild grass-endophyte associations towards *Meloidogyne incognita*. **Biological Control**, v. 64, n. 3, p. 225-230, 2013.
- JINU, U.; JAYALAKSHMI, N.; ANBU, A. S.; MAHENDRAN, D.; SAHI, S.; VENKATACHALAM, P. Biofabrication of cubic phase silver nanoparticles loaded with phytochemicals from *Solanum nigrum* leaf extracts for potential antibacterial, antibiofilm and antioxidant activities against MDR human pathogens. **Journal of Cluster Science**, v. 28, n. 1, p. 489-505, 2017.

- JOHNSTON, H. J.; HUTCHISON, G.; CHRISTENSEN, F. M.; PETERS, S.; HANKIN, S.; STONE, V. A review of the *in vivo* and *in vitro* toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 40, n. 4, p. 328-346, 2010.
- KAH, M.; HOFMANN, T. Nanopesticide research: current trends and future priorities. **Environment International**, v. 63, p. 224-235, 2014.
- KAHN, N.; LAVIE, O.; PAZ, M.; SEGEV, Y.; HAICK, H. Dynamic nanoparticle-based flexible sensors: diagnosis of ovarian carcinoma from exhaled breath. **Nano Letters**, v. 15, n. 10, p. 7023-7028, 2015.
- KALANGI, S. K.; DAYAKAR, A.; GANGAPPA, D.; SATHYAVATHI, R.; MAURYA, R. S.; RAO, D. N. Biocompatible silver nanoparticles reduced from *Anethum graveolens* leaf extract augments the antileishmanial efficacy of miltefosine. **Experimental Parasitology**, v. 170, p. 184-192, 2016.
- KANIPANDIAN, N.; KANNAN, S.; RAMESH, R.; SUBRAMANIAN, P.; THIRUMURUGAN, R. Characterization, antioxidant and cytotoxicity evaluation of green synthesized silver nanoparticles using *Cleistanthus collinus* extract as surface modifier. **Materials Research Bulletin**, v. 49, p. 494-502, 2014.
- KARUPPAGOUNDER, S. S.; MADATHIL, S. K.; PANDEY, M.; HAOBAM, R.; RAJAMMA, U.; MOHANAKUMAR, K. P. Quercetin up-regulates mitochondrial complex-I activity to protect against programmed cell death in rotenone model of Parkinson's disease in rats. **Neuroscience**, v. 236, p. 136-148, 2013.
- KASITHEVAR, M.; SARAVANAN, M.; PRAKASH, P.; KUMAR, H.; OVAIS, M.; BARABADI, H.; SHINWARI, Z. K. Green synthesis of silver nanoparticles using *Alysicarpus monilifer* leaf extract and its antibacterial activity against MRSA and CoNS isolates in HIV patients. **Journal of Interdisciplinary Nanomedicine**, v. 2, n. 2, p. 131-141, 2017.
- KATHIRAVAN, V.; RAVI, S.; ASHOKKUMAR, S. Synthesis of silver nanoparticles from *Melia dubia* leaf extract and their *in vitro* anticancer activity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 130, p. 116-121, 2014.
- KATHIRAVAN, V.; RAVI, S.; ASHOKKUMAR, S.; VELMURUGAN, S.; ELUMALAI, K.; KHATIWADA, C. P. Green synthesis of silver nanoparticles using *croton sparsiflorus morong* leaf extract and their antibacterial and antifungal activities. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 139, p. 200-205, 2015.
- KATZ, N.; SANTOS FILHO, D.; SARTI, S. J.; MENDES, N. M.; ROCHA, P.; ARAÚJO, N. Atividade quimioprofilática na esquistossomose mansoni de sabonetes contendo óleo essencial de frutos de *Pterodon pubescens*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. 2, p. 183-191, 1993.

- KAUR, S. Antihypertensive properties of an apple peel-can apple a day keep a doctor away? **Bulletin of Pharmaceutical and Medical Sciences**, v. 1, n. 1, p. 9-16, 2013.
- KHAN, M.; KHAN, S. T.; KHAN, M.; ADIL, S. F.; MUSARRAT, J.; KHEDHAIRY, A. A. A.; WARTHAN, A. A.; SIDDIQUI, M. R. H.; ALKHATHLAN, H. Z. Antibacterial properties of silver nanoparticles synthesized using *Pulicaria glutinosa* plant extract as a green bioreductant. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 3551-3561, 2014.
- KHAN, A. U.; WEI, Y.; AHMAD, A.; KHAN, Z. U. H.; TAHIR, K.; KHAN, S. U.; MUHAMMAD, N.; KHAN, F. U.; YUAN, Q. Enzymatic browning reduction in white cabbage, potent antibacterial and antioxidant activities of biogenic silver nanoparticles. **Journal of Molecular Liquids**, v. 215, p. 39-46, 2016.
- KHARAT, S. N.; MENDHULKAR, V. D. Synthesis, characterization and studies on antioxidant activity of silver nanoparticles using *Elephantopus scaber* leaf extract. **Materials Science and Engineering: C**, v. 62, p. 719-724, 2016.
- KHATAMI, M.; MORTAZAVI, S. M.; FARAHANI, Z. K.; AMINI, A.; AMINI, E.; HELI, H. Biosynthesis of silver nanoparticles using pine pollen and evaluation of the antifungal efficiency. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 95-101, 2017.
- KHATOON, N.; AHMAD, R.; SARDAR, M. Robust and fluorescent silver nanoparticles using *Artemisia annua*: biosynthesis, characterization and antibacterial activity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 102, p. 91-97, 2015.
- KHATOON, N.; MISHRA, A.; ALAM, H.; MANZOOR, N.; SARDAR, M. Biosynthesis, characterization, and antifungal activity of the silver nanoparticles against pathogenic *Candida* species. **BioNanoScience**, v. 5, n. 2, p. 65-74, 2015.
- KIM, S. H.; LEE, H. S.; RYU, D. S.; CHOI, S. J.; LEE, D. S. Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Korean Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 77-85, 2011.
- KIM, M. J.; SHIN, S. Toxic effects of silver nanoparticles and nanowires on erythrocyte rheology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 67, p. 80-86, 2014.
- KIRUBAHARAN, C. J.; KALPANA, D.; LEE, Y. S.; KIM, A. R.; YOO, D. J.; NAHM, K. S; KUMAR, G. G. Biomediated silver nanoparticles for the highly selective copper (II) ion sensor applications. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 21, p. 7441-7446, 2012.
- KIRUBHA, E.; VISHISTA, K.; PALANISAMY, P. K. Gripe water-mediated green synthesis of silver nanoparticles and their applications in nonlinear optics and surface-enhanced Raman spectroscopy. **Applied Nanoscience**, v. 5, n. 7, p. 777-786, 2015.

- KLASEN, H. J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. **Burns**, v. 26, n. 2, p. 131-138, 2000.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.
- KÖLLER, M.; BELLOVA, P.; JAVID, S. M.; MOTEMANI, Y.; KHARE, C.; SENGSTOCK, C.; TSCHULIK, K.; SCHILDHAUER, T. A.; LUDWIG, A. Antibacterial activity of microstructured sacrificial anode thin films by combination of silver with platinum group elements (platinum, palladium, iridium). **Materials Science and Engineering: C**, v. 74, p. 536-541, 2017.
- KOTB, S.; DETAPPE, A.; LUX, F.; APPAIX, F.; BARBIER, E. L.; TRAN, V. L.; PLISSONNEAU, M.; GEHAN, H.; LEFRANC, F.; LAFRASSE, C. R.; VERRY, C.; BERBECO, R.; TILLEMENT, O.; SANCEY, L. Gadolinium-based nanoparticles and radiation therapy for multiple brain melanoma metastases: proof of concept before phase I trial. **Theranostics**, v. 6, n. 3, p. 418-427, 2016.
- KRISHNARAJ, C.; JAGAN, E. G.; RAMACHANDRAN, R.; ABIRAMI, S. M.; MOHAN, N.; KALAICHELVAN, P. T. Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. Plant growth metabolism. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 651-658, 2012b.
- KRISHNARAJ, C.; RAMACHANDRAN, R.; MOHAN, K.; KALAICHELVAN, P. T. Optimization for rapid synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 93, p. 95-99, 2012a.
- KRISHNASWAMY, K.; ORSAT, V. Insight into the nanodielectric properties of gold nanoparticles synthesized from maple leaf and pine needle extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 131-136, 2015.
- KRUMOV, N.; NOCHTA, I. P.; ODER, S.; GOTCHEVA, V.; ANGELOV, A.; POSTEN, C. Production of inorganic nanoparticles by microorganisms. **Chemical Engineering & Technology**, v. 32, n. 7, p. 1026-1035, 2009.
- KUISMA, M.; SAKKO, A.; ROSSI, T. P.; LARSEN, A. H.; ENKOVAARA, J.; LEHTOVAARA, L.; RANTALA, T. T. Localized surface plasmon resonance in silver nanoparticles: atomistic first-principles time-dependent density-functional theory calculations. **Physical Review B**, v. 91, n. 11, p. 115431-115438, 2015.
- KULKARNI, N.; MUDDAPUR, U. Biosynthesis of metal nanoparticles: a review. **Journal of Nanotechnology**, v. 2014, p. 1-8, 2014.
- KUMAR, V.; GULERIA, P.; MEHTA, S. K. Nanosensors for food quality and safety assessment. **Environmental Chemistry Letters**, v. 15, n. 2, p. 165-177, 2017.

- KUMAR, K. R.; NATTUTHURAI, N.; GOPINATH, P.; MARIAPPAN, T. Synthesis of eco-friendly silver nanoparticles from *Morinda tinctoria* leaf extract and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. **Parasitology Research**, v. 114, n. 2, p. 411-417, 2015.
- KUMAR, K. M.; SINHA, M.; MANDAL, B. K.; GHOSH, A. R.; KUMAR, K. S.; REDDY, P. S. Green synthesis of silver nanoparticles using *Terminalia chebula* extract at room temperature and their antimicrobial studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 91, p. 228-233, 2012.
- KUMAR, B.; SMITA, K.; CUMBAL, L.; DEBUT, A. Green synthesis of silver nanoparticles using Andean blackberry fruit extract. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 1, p. 45-50, 2017.
- KUMAR, V.; YADAV, S. C.; YADAV, S. K. *Syzygium cumini* leaf and seed extract mediated biosynthesis of silver nanoparticles and their characterization. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 10, p. 1301-1309, 2010.
- KYNDT, T.; FERNANDEZ, D.; GHEYSEN, G. Plant-parasitic nematode infections in rice: molecular and cellular insights. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, p. 135-153, 2014.
- LEE, J. G.; BROOKS, M.; GERFEN, J. R.; WANG, Q.; FOTIS, C.; SPARER, A.; MA, X.; BERG, R. H.; GEISLER, M. Reproductive toxicity and life history study of silver nanoparticle effect, uptake and transport in *Arabidopsis thaliana*. **Nanomaterials**, v. 4, n. 2, p. 301-318, 2014a.
- LEE, Y. H.; CHENG, F. Y.; CHIU, H. W.; TSAI, J. C.; FANG, C. Y.; CHEN, C. W.; WANG, Y. J. Cytotoxicity, oxidative stress, apoptosis and the autophagic effects of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts. **Biomaterials**, v. 35, n. 16, p. 4706-4715, 2014b.
- LEE, J. G.; WANG, Q.; YAO, Y.; ZHANG, W.; GEISLER, M.; LI, K.; HUANG, Y.; CHEN, Y.; KOLMAKOV, A.; MA, X. Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. **Nanotoxicology**, v. 7, n. 3, p. 323-337, 2012.
- LERMONTOVA, I.; SCHUBERT, V.; FUCHS, J.; KLATTE, S.; MACAS, J.; SCHUBERT, I. Loading of *Arabidopsis* centromeric histone CENH3 occurs mainly during G2 and requires the presence of the histone fold domain. **The Plant Cell**, v. 18, n. 10, p. 2443-2451, 2006.
- LIJAKOVIC, I. P. Erythrocytes under osmotic stress-modeling considerations. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 117, n. 1, p. 113-124, 2015.
- LIM, D.; ROH, J. Y.; EOM, H. J.; CHOI, J. Y.; HYUN, J.; CHOI, J. Oxidative stress-related PMK-1 P38 MAPK activation as a mechanism for toxicity of silver

- nanoparticles to reproduction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, p. 585-592, 2012.
- LIMA, H.C.; LIMA, I. B. 2015. *Pterodon* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB29842. Acesso em: 21 ago. 2017.
- LIU, Y.; GUO, M. Studies on transition metal-quercetin complexes using electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8583-8594, 2015.
- LIU, Y.; WANG, G.; LI, C.; ZHOU, Q.; WANG, M.; YANG, L. A novel acetylcholinesterase biosensor based on carboxylic graphene coated with silver nanoparticles for pesticide detection. **Materials Science and Engineering: C**, v. 35, p. 253-258, 2014.
- LOGESWARI, P.; SILAMBARASAN, S.; ABRAHAM, J. Ecofriendly synthesis of silver nanoparticles from commercially available plant powders and their antibacterial properties. **Scientia Iranica**, v. 20, n. 3, p. 1049-1054, 2013.
- LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.
- LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de plantas Arbóreas Nativas do Brasil. 4ª ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002, v. 2, 368p.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas**. 2ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008, 544p.
- LOU, X.; WAAL, B. F.; MILROY, L. G.; DONGEN, J. L. A sample preparation method for recovering suppressed analyte ions in MALDI TOF MS. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 50, n. 5, p. 766-770, 2015.
- LOUREIRO, J.; SANTOS, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, p. 18-29, 2004.
- LOZA, K.; DIENDORF, J.; SENGSTOCK, C.; GONZALEZ, L. R.; CALBET, J. M. G.; REGI, M. V.; KÖLLER, M.; EPPLE, M. The dissolution and biological effects of silver nanoparticles in biological media. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 12, p. 1634-1643, 2014.
- LU, Q.; WANG, H.; LIU, Y.; HOU, Y.; LI, H.; ZHANG, Y. Graphitic carbon nitride nanodots: as reductant for the synthesis of silver nanoparticles and its biothiols biosensing application. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, p. 411-416, 2017.

- MA, X.; LEE, J. G.; DENG, Y.; KOLMAKOV, A. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 16, p. 3053-3061, 2010.
- MAALIK, A.; KHAN, F. A.; MUMTAZ, A.; MEHMOOD, A.; AZHAR, S.; ATIF, M.; KARIM, S.; ALTAF, Y.; TARIQ, I. Pharmacological applications of quercetin and its derivatives: a short review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 9, p. 1561-1566, 2014.
- MACHADO, R. R. P.; DUTRA, R. C.; PITTELLA, F.; RAPOSO, N. R. B.; LESCHE, B.; DUARTE, R. S.; SOARES, G. L. G.; KAPLAN, M. A. C. Screening antimycobacterial activity of *Baccharis dracunculifolia*, *Centella asiatica*, *Lantana camara* and *Pterodon emarginatus*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 4, p. 891-899, 2015.
- MAJUMDAR, D.; DAS, A.; SAHA, C. Catalase inhibition an anti cancer property of flavonoids: a kinetic and structural evaluation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 929-935, 2017.
- MAKAROV, V. V.; LOVE, A. J.; SINITSYNA, O. V.; MAKAROVA, S. S.; YAMINSKY, I. V.; TALIANSKY, M. E.; KALININA, N. O. "Green" nanotechnologies: synthesis of metal nanoparticles using plants. **Acta Naturae**, v. 6, n. 1, p. 35-44, 2014.
- MAKAROV, V. V.; MAKAROVA, S. S.; LOVE, A. J.; SINITSYNA, O. V.; DUDNIK, A. O.; YAMINSKY, I. V.; TALIANSKY, M. E.; KALININA, N. O. Biosynthesis of stable iron oxide nanoparticles in aqueous extracts of *Hordeum vulgare* and *Rumex acetosa* plants. **Langmuir**, v. 30, n. 20, p. 5982-5988, 2014.
- MANJUMEENA, R.; DURAIBABU, D.; SUDHA, J.; KALAICHELVAN, P. Biogenic nanosilver incorporated reverse osmosis membrane for antibacterial and antifungal activities against selected pathogenic strains: an enhanced eco-friendly water disinfection approach. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 49, n. 10, p. 1125-1133, 2014.
- MARKUS, J.; WANG, D.; KIM, Y. J.; AHN, S.; MATHIYALAGAN, R.; WANG, C.; YANG, D. C. Biosynthesis, characterization, and bioactivities evaluation of silver and gold nanoparticles mediated by the roots of chinese herbal *Angelica pubescens* Maxim. **Nanoscale Research Letters**, v. 12, n. 1, p. 46-57, 2017.
- MARTINEZ, D. S. T.; ALVES, O. L. Interação de nanomateriais com biossistemas e a nanotoxicologia: na direção de uma regulamentação. **Ciência e Cultura**, v. 65, n. 3, p. 32-36, 2013.
- MARUNAKA, Y.; MARUNAKA, R.; SUN, H.; YAMAMOTO, T.; KANAMURA, N.; INUI, T.; TARUNO, A. Actions of quercetin, a polyphenol, on blood pressure. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 209-220, 2017.

- MATA, R.; NAKKALA, J. R.; SADRAS, S. R. Biogenic silver nanoparticles from *Abutilon indicum*: their antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects *in vitro*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 128, p. 276-286, 2015a.
- MATA, R.; NAKKALA, J. R.; SADRAS, S. R. Catalytic and biological activities of green silver nanoparticles synthesized from *Plumeria alba* (frangipani) flower extract. **Materials Science and Engineering: C**, v. 51, p. 216-225, 2015b.
- MATSUDA, M.; SHIMOMURA, L. Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 7, n. 5, p. e330-e341, 2013.
- MATOS, A. R. **Síntese de nanopartículas de prata utilizando o ácido ascórbico (vitamina C)**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Farmacêuticas) Universidade de Brasília. Brasília. 2016.
- MATTOS, T. C. M.; DALVI, L. T.; OLIVEIRA, R. G.; GINANI, J. S.; LIMA, M. H. Reevaluation of the 2-deoxyribose assay for determination of free radical formation. **Biochimica et Biophysica Acta General Subjects**, v. 1790, n. 12, p. 1636-1642, 2009.
- MATTOS, V. S.; FURLANETTO, C.; SILVA, J. G.; SANTOS, D. F.; ALMEIDA, M. R. A.; CORREA, V. R.; MOITA, A. W.; SERENO, P. C.; CARNEIRO, R. M. *Meloidogyne* spp. populations from native Cerrado and soybean cultivated areas: genetic variability and aggressiveness. **Nematology**, v. 18, n. 5, p. 505-515, 2016.
- MAZUMDAR, H.; AHMED, G. U. Phytotoxicity effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa*. **International Journal of ChemTech Research**, v. 3, n. 3, p. 1494-1500, 2011.
- MEDEIROS, K. A.; SILVA, L. P. Chitosan particles associated with targeting peptide for melittin release towards breast cancer cells *in vitro*. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 12, p. 12792-12797, 2016.
- MEENA, K. S.; RAMYABHARATHI, S. A.; RAGUCHANDER, T.; JONATHAN, E. I. *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* interaction in Gerbera. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 18, p. 1281-1285, 2015.
- MEHERETU, G. M.; CIALLA, D.; POPP, J. Surface enhanced raman spectroscopy on silver nanoparticles. **International Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 2, n. 4, p. 63-67, 2014.
- MENA, N. Z.; ARMENDARIZ, R.; VIDEA, J. R. P.; TORRESDEY, J. L. G. Effects of silver nanoparticles on radish sprouts: root growth reduction and modifications in the nutritional value. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p.1-11, 2016.

- MENDY, B.; WANG'OMBE, M. W.; RADAKOVIC, Z. S.; HOLBEIN, J.; ILYAS, M.; CHOPRA, D.; HOLTON, N.; ZIPFEL, C.; GRUNDLER, F. M. W.; SIDDIQUE, S. Arabidopsis leucine-rich repeat receptor-like kinase NILR1 is required for induction of innate immunity to parasitic nematodes. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 4, p. 1-22, 2017.
- MIE, R.; SAMSUDIN, M. W.; DIN, L. B.; AHMAD, A.; IBRAHIM, N.; ADNAN, S. N. A. Synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity using the lichen *Parmotrema praesorediosum*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 121-127, 2014.
- MIRANDA, M. L. D.; GARCEZ, F. R.; ABOT, A. R.; GARCEZ, W. S. Sesquiterpenos e outros constituintes das folhas de *Pterodon pubescens* Benth (Leguminosae). **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 473-476, 2014.
- MIRPOOR, S. F.; HOSSEINI, S. M. H.; NEKOEI, A. R. Efficient delivery of quercetin after binding to beta-lactoglobulin followed by formation soft-condensed core-shell nanostructures. **Food Chemistry**, v. 233, p. 282-289, 2017.
- MISHRA, S.; SINGH, H. B. Biosynthesized silver nanoparticles as a nanoweapon against phytopathogens: exploring their scope and potential in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1097-1107, 2015.
- MITTAL, A. K.; BHAUMIK, J.; KUMAR, S.; BANERJEE, U. C. Biosynthesis of silver nanoparticles: elucidation of prospective mechanism and therapeutic potential. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 415, p. 39-47, 2014.
- MITTAL, A. K.; TRIPATHY, D.; CHOUDHARY, A.; AILI, P. K.; CHATTERJEE, A.; SINGH, I. P.; BANERJEE, U. C. Bio-synthesis of silver nanoparticles using *Potentilla fulgens* Wall. ex Hook and its therapeutic evaluation as anticancer and antimicrobial agent. **Materials Science and Engineering: C**, v. 53, p. 120-127, 2015.
- MODY, V. V.; SIWALE, R.; SINGH, A.; MODY H. R. Introduction to metallic nanoparticles. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 282-289, 2010.
- MOGHADDAM, M. G.; DABANLOU, R. H. Plant mediated green synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles using *Crataegus douglasii* fruit extract. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 739-744, 2014.
- MOHAMMADLOU, M.; MALMIRI, H. J.; MAGHSOUDI, H. Hydrothermal green synthesis of silver nanoparticles using *Pelargonium/Geranium* leaf extract and evaluation of their antifungal activity. **Green Processing and Synthesis**, v. 6, n. 1, p. 31-42, 2017.

- MOLINA, M. A. F.; GAMBOA, E. M.; RIVERA, C. A. S.; FLORES, R. A. G.; BENAVIDES, P. Z.; TELLO, P. C.; GONZÁLEZ, J. M. A.; HERNÁNDEZ, D. F. M.; GUERRA, R. S. T.; PADILLA, C. R. Antitumor activity of colloidal silver on MCF-7 human breast cancer cells. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 29, n. 1, p. 148-154, 2010.
- MORAES, W. F.; GALDINO, P. M.; NASCIMENTO, M. V. M.; VANDERLINDE, F. A.; BARA, M. T. F.; COSTA, E. A.; PAULA, J. R. Triterpenes involved in the anti-inflammatory effect of ethanolic extract of *Pterodon emarginatus* Vogel stem bark. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, n. 1, p. 202-207, 2012.
- MORAES, W. F.; MATOS, L. G.; NASCIMENTO, M. V. M.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F.; CUNHA, L. C.; VALADARES, M. C.; COSTA, E. A. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of stem bark alcohol extract. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, p. 146-150, 2009.
- MORAM, M. A.; VICKERS, M. E. X-ray diffraction of III-nitrides. **Reports on Progress in Physics**, v. 72, n. 3, p. 1-40, 2009.
- MORZELLE, M. C.; BACHIEGA, P.; SOUZA, E. C.; BOAS, E. V. B. V.; LAMOUNIER, M. L. Caracterização química e física de frutos de curriola, gabiroba e murici provenientes do cerrado brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 1, p. 93-106, 2015.
- MOSKOVITS, M.; VLCKOVA, B. Adsorbate-induced silver nanoparticle aggregation kinetics. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 31, p. 14755-14758, 2005.
- MUELLER, D. W.; BOSSERHOFF, A. K. Role of miRNAs in the progression of malignant melanoma. **British Journal of Cancer**, v. 101, n. 4, p. 551-556, 2009.
- MUKHERJEE, P.; AHMAD, A.; MANDAL, D.; SENAPATI, S.; SAINKAR, S. R.; KHAN, M. I.; PARISHCHA, R.; AJAYKUMAR, P. V.; ALAM, M.; KUMAR, R.; SASTRY, M. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: a novel biological approach to nanoparticle synthesis. **Nano Letters**, v. 1, n. 10, p. 515-519, 2001.
- MUKHERJEE, S.; CHOWDHURY, D.; KOTCHERLAKOTA, R.; PATRA, S.; VINOTHKUMAR, B.; BHADRA, M. P.; SREEDHAR, B.; PATRA, C. R. Potential theranostics application of bio-synthesized silver nanoparticles (4-in-1 system). **Theranostics**, v. 4, n. 3, p. 316-335, 2014.
- MUKHERJEE, S.; PATRA, C. R. Biologically synthesized metal nanoparticles: recent advancement and future perspectives in cancer theranostics. **Future Science AO**, v. 3, n. 3, p. 1-4, 2017.

- MUKHOPADHYAY, P.; PRAJAPATI, A. K. Quercetin in anti-diabetic research and strategies for improved quercetin bioavailability using polymer-based carriers a review. **RSC Advances**, v. 5, n. 118, p. 97547-97562, 2015.
- MUKHTAR, T.; AROOJ, M.; ASHFAQ, M.; GULZAR, A. Resistance evaluation and host status of selected green gram germplasm against *Meloidogyne incognita*. **Crop Protection**, v. 92, p. 198-202, 2017.
- MUKHTAR, T.; HUSSAIN, M. A.; KAYANI, M. Z. Yield responses of 12 okra cultivars to southern root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). **Bragantia**, v. 76, n. 1, p. 108-112, 2017.
- MUKHTAR, T.; KAYANI, M. Z.; HUSSAIN, M. A. Nematicidal activities of *Cannabis* sativa L. and *Zanthoxylum alatum* Roxb. against *Meloidogyne incognita*. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 447-453, 2013.
- MÜLLER, D. J.; DUFRÊNE, Y. F. Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface. **Trends in Cell Biology**, v. 21, n. 8, p. 461-469, 2011.
- MULVANEY, P. Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. **Langmuir**, v. 12, n. 3, p. 788-800, 1996.
- NAGARAJU, M. Eco-friendly management of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* using organic amendments on tomato. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 4, p. 530-532, 2016.
- NAGDI, W. M. E.; YOUSSEF, M. M. A. Nematicidal effect of some aqueous extracts of botanicals and a commercial bacterial byproduct for biocontrolling root knot nematode, *Meloidogyne incognita* infecting sugar beet. **Scientia**, v. 10, n. 2, p. 55-58, 2015.
- NAIR, R.; VARGHESE, S. H.; NAIR, B. G.; MAEKAWA, T.; YOSHIDA, Y.; KUMAR, D. S. Nanoparticulate material delivery to plants. **Plant Science**, v. 179, n. 3, p. 154-163, 2010.
- NAM, J. S.; SHARMA, A. R.; NGUYEN, L. T.; CHAKRABORTY, C.; SHARMA, G.; LEE, S. S. Application of bioactive quercetin in oncotherapy: from nutrition to nanomedicine. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 108-130, 2016.
- NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 156, n. 1, p. 1-13, 2010.
- NASCIMENTO, J. L.; COÊLHO, A. G.; BARROS, Y. S. O.; SILVA, O. A.; FREITAS, R. M.; ROCHA, M. S.; DAVID, J. M.; COSTA JÚNIOR, J. S.; ARCANJO, D. D. R.; OLIVEIRA, R. C. M.; CITÓ, A. M. D. G. L. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do extrato hexânico da semente do bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e de seu complexo de inclusão com β-ciclodextrina. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 2, p. 44-53, 2014.

- NASSAR, A. M. K. Effectiveness of silver nano-particles of extracts of *Urtica urens* (Urticaceae) against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Asian Journal of Nematology**, v. 5, n. 1, p. 14-19, 2016.
- NATARAJ, N.; ANJUSREE, G. S.; MADHAVAN, A. A.; PRIYANKA, P.; SANKAR, D.; NISHA, N.; LAKSHMI, S. V.; JAYAKUMAR, R.; BALAKRISHNAN, A.; BISWAS, R. Synthesis and anti-staphylococcal activity of TiO₂ nanoparticles and nanowires in *ex vivo* porcine skin model. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 5, p. 864-870, 2014.
- NATSUKI, J.; NATSUKI, T.; HASHIMOTO, Y. A review of silver nanoparticles: synthesis methods, properties and applications. **International Journal of Materials Science and Applications**, v. 4, n. 5, p. 325-332, 2015.
- NAZ, I.; RIUS, J. E. P.; SAIFULLAH; BLOK, V.; KHAN, M. R.; ALI, S.; ALI, S. *In vitro* and *in planta* nematicidal activity of *Fumaria parviflora* (Fumariaceae) against the southern root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Plant Pathology**, v. 62, n. 4, p. 943-952, 2013.
- NECKEL, G. L.; BUBNIAK, L. S.; MAZZARINO, L.; JACQUES, A. V.; MOCCELIN, B.; SILVA, M. C. S.; SENNA, E. L. Orally administered chitosan-coated polycaprolactone nanoparticles containing curcumin attenuate metastatic melanoma in the lungs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 10, p. 3524-3534, 2015.
- NEGRI, G.; MATTEI, R.; MENDES, F. R. Antinociceptive activity of the HPLC- and MS-standardized hydroethanolic extract of *Pterodon emarginatus* Vogel leaves. **Phytomedicine**, v. 21, p. 1062-1069, 2014.
- NETHRAVATHI, P. C.; SHRUTHI, G. S.; SURESH, D.; UDAYABHANU, H.; NAGABHUSHANA, H.; SHARMA, S. C. *Garcinia xanthochymus* mediated green synthesis of ZnO nanoparticles: photoluminescence, photocatalytic and antioxidant activity studies. **Ceramics International**, v. 41, n. 7, p. 8680-8687, 2015.
- NGUYĒN, P. V.; BELLAFIORE, S.; PETITOT, A. S.; HAIDAR, R.; BAK, A.; ABED, A.; GANTET, P.; MEZZALIRA, I.; ENGLER, J. A.; FERNANDEZ, D. *Meloidogyne incognita* rice (*Oryza sativa*) interaction: a new model system to study plant-root-knot nematode interactions in monocotyledons. **Rice**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2014.
- NIKOLAOU, V. A.; STRATIGOS, A. J.; FLAHERTY, K. T.; TSAO, H. Melanoma: new insights and new therapies. **Journal of Investigative Dermatology,** v. 132, n. 3, p. 854-863, 2012.
- NOWACK, B.; BUCHELI, T. D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environmental Pollution**, v. 150, n. 1, p. 5-22, 2007.
- NOWACK, B.; KRUG, H. F.; HEIGHT, M. 120 years of nanosilver history: implications for policy makers. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 4, p. 1177-1183, 2011.

- NTIDI, K. N.; FOURIE, H.; DANEEL, M. Greenhouse and field evaluations of commonly occurring weed species for their host suitability to *Meloidogyne* species. **International Journal of Pest Management**, v. 62, n. 1, p. 11-19, 2016.
- NURUZZAMAN, M.; RAHMAN, M. M.; LIU, Y.; NAIDU, R. Nanoencapsulation, nanoguard for pesticides: a new window for safe application. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 7, p. 1447-1483, 2016.
- ODEYEMI, I. S.; AFOLAMI, S. O.; DARAMOLA, F. Evaluation of *Tithonia diversifolia* and *Chromolaena odorata* residues as potential organic compost materials for the management of *Meloidogyne incognita* on cowpea (*Vigna unguiculata* L. WALP). **Journal of Agricultural Science and Environment**, v. 14, n. 2, p. 73-81, 2016.
- OLALEYE, M. T.; CROWN, O. O.; AKINMOLADUN, A. C.; AKINDAHUNSI, A. A. Rutin and quercetin show greater efficacy than nifedipin in ameliorating hemodynamic, redox, and metabolite imbalances in sodium chloride-induced hypertensive rats. **Human & Experimental Toxicology**, v. 33, n. 6, p. 602-608, 2014.
- OMBREDANE, A. S. Síntese verde de nanopartículas de prata a partir de extrato aquoso do tubérculo de *Curcuma longa* L. associadas à quitosana e avaliação da atividade antitumoral *in vitro* em câncer de pele não melanoma (linhagem A431). 2016. 146 f. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) Universidade de Brasília, Brasília. 2016.
- ONKENDI, E. M. Molecular characterization of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) parasitizing potatoes (*Solanum tuberosum*) in South Africa. 2012. 141 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Department of microbiology and plant pathology, University of Pretoria, South Africa. 2012.
- ONKENDI, E. M.; KARIUKI, G. M.; MARAIS, M.; MOLELEKI, L. N. The threat of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Africa: a review. **Plant Pathology**, v. 63, n. 4, p. 727-737, 2014.
- ORZECHOWSKA, M.; STĘPIEŃ, K.; KAMIŃSKA, T.; SIWIŃSKA, D. Chromosome variations in regenerants of *Arabidopsis thaliana* derived from 2-and 6-week-old callus detected using flow cytometry and FISH analyses. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 112, n. 3, p. 263-273, 2013.
- OVAIS, M.; KHALIL, A. T.; RAZA, A.; KHAN, M. A.; AHMAD, I.; ISLAM, N. U.; SARAVANAN, M.; UBAID, M. F.; ALI, M.; SHINWARI, Z. K. Green synthesis of silver nanoparticles via plant extracts: beginning a new era in cancer theranostics. **Nanomedicine**, v. 11, n. 23, p. 3157-3177, 2016.
- ÖZYÜREK, M.; GÜNGÖR, N.; BAKI, S.; GÜÇLÜ, K.; APAK, R. Development of a silver nanoparticle-based method for the antioxidant capacity measurement of polyphenols. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 18, p. 8052-8059, 2012.

- PALANISAMY, S.; RAJASEKAR, P.; VIJAYAPRASATH, G.; RAVI, G.; MANIKANDAN, R.; PRABHU, N. M. A green route to synthesis silver nanoparticles using *Sargassum polycystum* and its antioxidant and cytotoxic effects: an *in vitro* analysis. **Materials Letters**, v. 189, p. 196-200, 2017.
- PALZA, H. Antimicrobial polymers with metal nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 1, p. 2099-2116, 2015.
- PAN, D. C.; MYERSON, J. W.; BRENNER, J. S.; PATEL, P. N.; ANSELMO, A. C.; MITRAGOTRI, S.; MUZYKANTOV, V. Nanoparticle properties modulate their attachment and effect on carrier red blood cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1615-1626, 2018.
- PANNANGPETCH, P.; LAUPATTARAKASEM, P.; KUKONGVIRIYAPAN, V.; KUKONGVIRIYAPAN, U.; KONGYINGYOES, B.; AROMDEE, C. Antioxidant activity and protective effect against oxidative hemolysis of *Clinacanthus nutans* (Burm. f) Lindau. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 29, n. 1, p. 1-9, 2007.
- PANNEERSELVAM, C.; MURUGAN, K.; RONI, M.; AZIZ, A. T.; SURESH, U.; RAJAGANESH, R.; MADHIYAZHAGAN, P.; SUBRAMANIAM, J.; DINESH, D.; NICOLETTI, M.; HIGUCHI, A.; ALARFAJ, A. A.; MUNUSAMY, M. A.; KUMAR, S.; DESNEUX, N.; BENELLI, G. Fern-synthesized nanoparticles in the fight against malaria: LC/MS analysis of *Pteridium aquilinum* leaf extract and biosynthesis of silver nanoparticles with high mosquitocidal and antiplasmodial activity. **Parasitology Research**, v. 115, n. 3, p. 997-1013, 2016.
- PANTIDOS, N.; HORSFALL, L. E. Biological synthesis of metallic nanoparticles by bacteria, fungi and plants. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 5, n. 5, p.1-10, 2014.
- PARASHAR, S.; SHARMA, H.; GARG, M. Antimicrobial and antioxidant activities of fruits and vegetable peels: a review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 3, n. 1, p. 160-164, 2014.
- PAREEK, V.; BHARGAVA, A.; GUPTA, R.; JAIN, N.; PANWAR, J. Synthesis and applications of noble metal nanoparticles: a review. **Advanced Science, Engineering and Medicine**, v. 9, n. 7, p. 527-544, 2017.
- PARK, M. V.; NEIGH, A. M.; VERMEULEN, J. P.; FONTEYNE, L. J.; VERHAREN, H. W.; BRIEDÉ, J. J.; LOVEREN, H.; JONG, W. H. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 36, p. 9810-9817, 2011.
- PARVEEN, M.; AHMAD, F.; MALLA, A. M.; AZAZ, S. Microwave-assisted green synthesis of silver nanoparticles from *Fraxinus excelsior* leaf extract and its antioxidant assay. **Applied Nanoscience**, v. 6, n. 2, p. 267-276, 2016.

- PATHAK, P. D.; MANDAVGANE, S. A.; KULKARNI, B. D. Valorization of pomegranate peels: a biorefinery approach. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 4, p. 1127-1137, 2017.
- PATRA, M.; MUKHERJEE, R.; BANIK, M.; DUTTA, D.; BEGUM, N. A.; BASU, T. Calcium phosphate-quercetin nanocomposite (CPQN): a multi-functional nanoparticle having pH indicating, highly fluorescent and anti-oxidant properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 154, p. 63-73, 2017.
- PAULA, F. B. A.; GOUVEA, C. M. C. P.; ALFREDO, P. P.; SALGADO, I. Protective action of a hexane crude extract of *Pterodon emarginatus* fruits against oxidative and nitrosative stress induced by acute exercise in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 17, p. 1-9, 2005.
- PAVAN, C.; RABOLLI, V.; TOMATIS, M.; FUBINI, B.; LISON, D. Why does the hemolytic activity of silica predict its pro-inflammatory activity? **Particle and Fibre Toxicology**, v. 11, n. 1, p. 76-86, 2014.
- PEREIRA, M. F.; MARTINO, T.; DALMAU, S. R.; ALBANO, R. M.; FEREZOU, J. P.; COSTA, S. S.; COELHO, M. G. P.; SABINO, K. C. C. Terpenic subfraction of *Pterodon pubescens* induces apoptosis of K562 leukemic cells by modulating gene expression. **Oncology Reports**, v. 25, p. 215-221, 2011.
- PEREIRA, L. C.; SOUZA, A. O.; BERNARDES, M. F. F.; PAZIN, M.; TASSO, M. J.; PEREIRA, P. H.; DORTA, D. J. A perspective on the potential risks of emerging contaminants to human and environmental health. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 18, p. 13800-13823, 2015.
- PÉREZ, Z. E. J.; MATHIYALAGAN, R.; MARKUS, J.; KIM, Y. J.; KANG, H. M.; ABBAI, R.; SEO, K. H.; WANG, D.; SOSHNIKOVA, V.; YANG, D. C. Ginseng-berry-mediated gold and silver nanoparticle synthesis and evaluation of their *in vitro* antioxidant, antimicrobial, and cytotoxicity effects on human dermal fibroblast and murine melanoma skin cell lines. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 709-723, 2017.
- PETERS, R. J.; BOUWMEESTER, H.; GOTTARDO, S.; AMENTA, V.; ARENA, M.; BRANDHOFF, P.; MARVIN, H. J. P.; MECH, A.; MONIZ, F. B.; PESUDO, L. Q.; RAUSCHER, H.; SCHOONJANS, R.; UNDAS, A. K.; VETTORI, M. V.; WEIGEL, S.; ASCHBERGER, K. Nanomaterials for products and application in agriculture, feed and food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 54, p. 155-164, 2016.
- PIAUILINO, R. F. **Projeto de paisagismo da Associação dos Docentes da Universidade de Brasília ADUnB**. 2012. 58 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília. 2012.
- PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

- POLTE, J. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles a new perspective. **CrystEngComm**, v. 17, n. 36, p. 6809-6830, 2015.
- POURMORTAZAVI, S. M.; TAGHDIRI, M.; MAKARI, V.; NASRABADI, M. R. Procedure optimization for green synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of *Eucalyptus oleosa*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 136, p. 1249-1254, 2015.
- POWERS, C. M.; BADIREDDY, A. R.; RYDE, I. T.; SEIDLER, F. J.; SLOTKIN, T. A. Silver nanoparticles compromise neurodevelopment in PC12 cells: critical contributions of silver ion, particle size, coating, and composition. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, n. 1, p. 37-44, 2011.
- PRAKASH, P.; GNANAPRAKASAM, P.; EMMANUEL, R.; AROKIYARAJ, S.; SARAVANAN, M. Green synthesis of silver nanoparticles from leaf extract of *Mimusops elengi*, Linn. for enhanced antibacterial activity against multi drug resistant clinical isolates. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 108, p. 255-259, 2013.
- PRASAD, R.; BHATTACHARYYA, A.; NGUYEN, Q. D. Nanotechnology in sustainable agriculture: recent developments, challenges, and perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1014-1026, 2017.
- PRATHNA, T. C.; RAICHUR, A. M.; CHANDRASEKARAN, N.; MUKHERJEE, A. Sunlight irradiation induced green synthesis of stable silver nanoparticles using Citrus limon extract. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 84, n. 1, p. 65-70, 2014.
- PUERARI, H. H.; ARIEIRA, C. R. D.; CARDOSO, M. R.; HERNANDES, I.; BRITO, O. D. C. Resistance inducers in the control of root lesion nematodes in resistant and susceptible cultivars of maize. **Phytoparasitica**, v. 43, n. 3, p. 383-389, 2015.
- QIAN, H.; PENG, X.; HAN, X.; REN, J.; SUN, L.; FU, Z. Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Environmental Sciences**, v. 25, n. 9, p. 1947-1956, 2013.
- RAFIE, H. M. E.; HAMED, M. A. Z. Antioxidant and anti-inflammatory activities of silver nanoparticles biosynthesized from aqueous leaves extracts of four *Terminalia* species. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 5, n. 3, p. 35008-35018, 2014.
- RAFIE, H. M. E.; RAFIE, M. H. E.; ZAHRAN, M. K. Green synthesis of silver nanoparticles using polysaccharides extracted from marine macro algae. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, n. 2, p. 403-410, 2013.

- RAFIQUE, M.; SADAF, I.; RAFIQUE, M. S.; TAHIR, M. B. A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 45, n. 7, p. 1272-1291, 2016.
- RAHAL, A.; KUMAR, A.; SINGH, V.; YADAV, B.; TIWARI, R.; CHAKRABORTY, S.; DHAMA, K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-19, 2014.
- RAI, M.; INGLE, A. P.; BIRLA, S.; YADAV, A.; SANTOS, C. A. D. Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 696-719, 2016.
- RAJA, S.; RAMESH, V.; THIVAHARAN, V. Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Calliandra haematocephala* leaf extract, their antibacterial activity and hydrogen peroxide sensing capability. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 253-261, 2017.
- RAJA, A.; SALIQUE, S. M.; GAJALAKSHMI, P.; JAMES, A. Antibacterial and hemolytic activity of green silver nanoparticles from Catharanthus roseus. International Journal of **Pharmaceutical** Sciences and Nanotechnology, v. 9, n. 1, p. 3112-3117, 2016.
- RAJAKANNU, S.; SHANKAR, S.; PERUMAL, S.; SUBRAMANIAN, S.; DHAKSHINAMOORTHY, G. P. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Garcinia mangostana* fruit extract and their antibacterial, antioxidant activity. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 1, p. 944-952, 2015.
- RAJAN, A.; VILAS, V.; PHILIP, D. Catalytic and antioxidant properties of biogenic silver nanoparticles synthesized using *Areca catechu* nut. **Journal of Molecular Liquids**, v. 207, p. 231-236, 2015.
- RAJESHKUMAR, S. Green synthesis of different sized antimicrobial silver nanoparticles using different parts of plants a review. **International Journal of ChemTech Research**, v. 9, n. 4, p. 197-208, 2016.
- RAMAR, M.; MANIKANDAN, B.; MARIMUTHU, P. N.; RAMAN, T.; MAHALINGAM, A.; SUBRAMANIAN, P.; KARTHICH, S.; MUNUSAMY, A. Synthesis of silver nanoparticles using *Solanum trilobatum* fruits extract and its antibacterial, cytotoxic activity against human breast cancer cell line MCF 7. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 140, p. 223-228, 2015.
- RAMESH, P. S.; KOKILA, T.; GEETHA, D. Plant mediated green synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles using *Emblica officinalis* fruit extract. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 142, p. 339-343, 2015.

- RAO, M. L.; BHUMI, G.; SAVITHRAMMA, N. Green synthesis of silver nanoparticles by *Allamanda cathartica* L. leaf extract and evaluation for antimicrobial activity. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**, v. 6, n. 4, p. 2260-2268, 2013.
- RAO, Y. S.; KOTAKADI, V. S.; PRASAD, T. N. V. K. V.; REDDY, A. V.; GOPAL, D. S. Green synthesis and spectral characterization of silver nanoparticles from Lakshmi tulasi (*Ocimum sanctum*) leaf extract. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 103, p. 156-159, 2013.
- RAO, B.; TANG, R. C. Green synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activities using aqueous *Eriobotrya japonica* leaf extract. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2017
- RATHORE, Y. S.; TIWARI, S. N. Relationships of different species of root-knot nematodes to their host taxonomic groupings. **International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences**, v. 7, n. 1, p. 29-36, 2017.
- RAUWEL, P.; KÜÜNAL, S.; FERDOV, S.; RAUWEL, E. A review on the green synthesis of silver nanoparticles and their morphologies studied via TEM. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2015, p. 1-9, 2015.
- REJINOLD, N. S.; MUTHUNARAYANAN, M.; DIVYARANI, V. V.; SREEREKHA, P. R.; CHENNAZHI, K. P.; NAIR, S. V.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. Curcuminloaded biocompatible thermoresponsive polymeric nanoparticles for cancer drug delivery. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 360, n. 1, p. 39-51, 2011.
- REMYA, V. R.; ABITHA, V. K.; RAJPUT, P. S.; RANE, A. V.; DUTTA, A. Silver nanoparticles green synthesis: a mini review. **Chemistry International**, v. 3, n. 2, p. 165-171, 2017.
- REZVANI, N.; SOROOSHZADEH, A.; FARHADI, N. Effect of nano-silver on growth of saffron in flooding stress. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 6, n. 1, p. 517-522, 2012.
- RICE, R. H.; MAURO, T. M. Respostas tóxicas da pele. In: KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull (Lange)**. Porto Alegre: AMGH Editora, 2009. p. 270-280.
- RIVERA, C. A. S.; MOLINA, M. A. F.; GAMBOA, E. M.; BENAVIDES, P. Z.; GUERRA, R. S. T.; PADILLA, C. R. Potential of colloidal or silver nanoparticles to reduce the growth of B16F10 melanoma tumors. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 22, p. 2745-2750, 2013.
- RIZZO, L. Y.; THEEK, B.; STORM, G.; KIESSLING, F.; LAMMERS, T. Recent progress in nanomedicine: therapeutic, diagnostic and theranostic applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 1159-1166, 2013.

- ROCHA, R. O.; MORAIS, J. K. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; OLIVEIRA, H. D.; SOUSA, D. O. B.; SOUZA, C. E. A.; MORENO, F. B.; MOREIRA, A. C. O. M.; SOUZA JÚNIOR, J. D. A.; SÁ, M. F. G.; VASCONCELOS, I. M. Proteome of soybean seed exudates contains plant defense-related proteins active against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 22, p. 5335-5343, 2015.
- ROCHA, T. L.; SOLL, C. B.; BOUGHTON, B. A.; SILVA, T. S.; OLDACH, K.; FIRMINO, A. A. P.; CALLAHAN, D. L.; SHEEDY, J.; SILVEIRA, E. R.; CARNEIRO, R. M. D. G.; SILVA, L. P.; POLEZ, V. L. P.; PELEGRINI, P. B.; BACIC, A.; GROSSI M. F. S.; ROESSNER, U. Prospection and identification of nematotoxic compounds from *Canavalia ensiformis* seeds effective in the control of the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, p. 87-100, 2017.
- ROH, J. Y.; SIM, S. J.; YI, J.; PARK, K.; CHUNG, K. H.; RYU, D. Y.; CHOI, J. Ecotoxicity of silver nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using functional ecotoxicogenomics. **Environmental Science and Technology**, v. 43, p. 3933-3940, 2009.
- ROLDÁN, M. V.; PELLEGRI, N.; SANCTIS, O. Electrochemical method for Ag-PEG nanoparticles synthesis. **Journal of Nanoparticles**, v. 2013, p. 1-7, 2013.
- RÓNAVÁRI, A.; KOVÁCS, D.; IGAZ, N.; VÁGVÖLGYI, C.; BOROS, I. M.; KÓNYA, Z.; PFEIFFER, I.; KIRICSI, M. Biological activity of green-synthesized silver nanoparticles depends on the applied natural extracts: a comprehensive study. **Internacional Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 871-883, 2017.
- ROQUE, F. P.; ANÍBAL, P. C.; BUSATO, S. N.; BONI, G. C.; HÖFLING, J. F.; QUEIROZ, N. C. A.; FOGLIO, M. A. *In vitro* anti-fungal activity of a new compound isolated from *Pterodon pubescens* Benth. **Advancement in Medicinal Plant Research**, v. 3, n. 2, p. 55-61, 2015.
- ROY, M. K.; JUNEJA, L. R.; ISOBE, S.; TSUSHIDA, T. Steam processed broccoli (*Brassica oleracea*) has higher antioxidant activity in chemical and cellular assay systems. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 263-269, 2009.
- RUTTER, W. B.; HEWEZI, T.; ABUBUCKER, S.; MAIER, T. R.; HUANG, G.; MITREVA, M.; HUSSEY, R. S.; BAUM, T. J. Mining novel effector proteins from the esophageal gland cells of *Meloidogyne incognita*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 27, n. 9, p. 965-974, 2014.
- SAAD, A. S. A; RADWAN, M. A.; MESBAH, H. A.; IBRAHIM, H. S.; KHALIL, M. S. Evaluation of some non-fumigant nematicides and the biocide avermactin for managing *Meloidogyne incognita* in tomatoes. **Pakistan Journal of Nematology**, v. 35, n. 1, p. 85-92, 2017.

- SADEGHI, B.; GHOLAMHOSEINPOOR, F. A study on the stability and green synthesis of silver nanoparticles using *Ziziphora tenuior* (*Zt*) extract at room temperature. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 134, p. 310-315, 2015.
- SAEZ, S.; FASCIANI, C.; STAMPLECOSKIE, K. G.; GAGNON, L. B. P.; MAH, T. F.; MARIN, M. L.; ALARCON, E. I.; SCAIANO, J. C. Photochemical synthesis of biocompatible and antibacterial silver nanoparticles embedded within polyurethane polymers. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 14, n. 4, p. 661-664, 2015.
- SAHAYARAJ, K.; RAJESH, S. Bionanoparticles: synthesis and antimicrobial applications. In: VILAS, A. M. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Badajoz: Formatex Research Center, 2011. p. 228-244.
- SAIKIA, S. K.; TIWARI, S.; PANDEY, R. Rhizospheric biological weapons for growth enhancement and *Meloidogyne incognita* management in *Withania somnifera* cv. Poshita. **Biological Control**, v. 65, n. 2, p. 225-234, 2013.
- SAINI, K.; MARKAKIS, M. N.; ZDANIO, M.; BALCEROWICZ, D. M.; BEECKMAN, T.; VEYLDER, L.; PRINSEN, E.; BEEMSTER, G. T. S.; VISSENBERG, K. Alteration in auxin homeostasis and signaling by overexpression of PINOID kinase causes leaf growth defects in *Arabidopsis thaliana*. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1009-1024, 2017.
- SALES, V. H. G.; OLIVEIRA, E. M.; SALES, P. V. G.; RODRIGUES, F. M.; VIROLI, S. L. M. Determinação da curva de secagem de farinha de carne e ossos em balança de infravermelho. **Acta Tecnológica**, v. 7, n. 2, p. 13-17, 2013.
- SANKAR, R.; RAHMAN, P. K.; VARUNKUMAR, K.; ANUSHA, C.; KALAIARASI, A.; SHIVASHANGARI, K. S. Facile synthesis of *Curcuma longa* tuber powder engineered metal nanoparticles for bioimaging applications. **Journal of Molecular Structure**, v. 1129, p. 8-16, 2017.
- SANT'ANA, F. J. F.; PERIN, J. N.; BILEGO, U. O.; RABELO, R. E.; VULCANI, V. A. S.; PAULA, E. M. N. Intoxicação espontânea por *Pterodon emarginatus* (Fabaceae) em bovinos no estado de Goiás. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 6, p. 485-489, 2012.
- SANTIAGO, T. R.; SILVA, L. P. Nanotechnology in the management of phytopathogens: current trends and issues. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 25, p. 59-73, 2017.

- SANTOS, A. P.; ZATTA, D. T.; MORAES, W. F.; BARA, M. T. F.; FERRI, P. H.; SILVA, M. R. R.; PAULA, J. R. Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 891-896, 2010.
- SARAVANAKUMAR, A.; GANESH, M.; JAYAPRAKASH, J.; JANG, H. T. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Cassia tora* leaf extract and its antioxidant and antibacterial activities. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 28, p. 277-281, 2015.
- SARAVANAKUMAR, A.; PENG, M. M.; GANESH, M.; JAYAPRAKASH, J.; MOHANKUMAR, M.; JANG, H. T. Low-cost and eco-friendly green synthesis of silver nanoparticles using *Prunus japonica* (Rosaceae) leaf extract and their antibacterial, antioxidant properties. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 45, n. 6, p. 1165-1171, 2017.
- SATHISHKUMAR, G.; JHA, P. K.; VIGNESH, V.; RAJKUBERAN, C.; JEYARAJ, M.; SELVAKUMAR, M.; JHA, R.; SIVARAMAKRISHNAN, S. Cannonball fruit (*Couroupita guianensis*, Aubl.) extract mediated synthesis of gold nanoparticles and evaluation of its antioxidant activity. **Journal of Molecular Liquids**, v. 215, p. 229-236, 2016a.
- SATHISHKUMAR, P.; VENNILA, K.; JAYAKUMAR, R.; YUSOFF, A. R. M.; HADIBARATA, T.; PALVANNAN, T. Phyto-synthesis of silver nanoparticles using *Alternanthera tenella* leaf extract: an effective inhibitor for the migration of human breast adenocarcinoma (MCF-7) cells. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 4, p. 651-659, 2016b.
- SATYAVANI, K.; GURUDEEBAN, S.; RAMANATHAN, T.; BALASUBRAMANIAN, T. Biomedical potential of silver nanoparticles synthesized from calli cells of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, n. 1, p. 43-50, 2011.
- SAVITHRAMMA, N.; ANKANNA, S.; BHUMI, G. Effect of nanoparticles on seed germination and seedling growth of *Boswellia ovalifoliolata* an endemic and endangered medicinal tree taxon. **Nano Vision**, v. 2, p. 61-68, 2012.
- SCAMPICCHIO, M.; WANG, J.; BLASCO, A. J.; ARRIBAS, A. S.; MANNINO, S.; ESCARPA, A. Nanoparticle-based assays of antioxidant activity. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 6, p. 2060-2063, 2006.
- SCHADICH, E.; HLAVÁČ, J.; VOLNÁ, T.; VARANASI, L.; HAJDÚCH, M.; DŽUBÁK, P. Effects of ginger phenylpropanoids and quercetin on Nrf2-ARE pathway in human BJ fibroblasts and HaCaT keratinocytes. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-6, 2016.
- SCOGNAMIGLIO, M.; D'ABROSCA, B.; ESPOSITO, A.; FIORENTINO, A. Chemical composition and seasonality of aromatic mediterranean plant species by NMR-based metabolomics. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

- SELVAM, K.; SUDHAKAR, C.; GOVARTHANAN, M.; THIYAGARAJAN, P.; SENGOTTAIYAN, A.; SENTHILKUMAR, B.; SELVANKUMAR, T. Eco-friendly biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Tinospora cordifolia* (Thunb.) Miers and evaluate its antibacterial, antioxidant potential. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 10, n. 1, p. 6-12, 2017.
- SERENO, P. C.; DANCHIN, E. G. J. Parasitic success without sex-the nematode experience. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 27, n. 7, p. 1323-1333, 2014.
- SHABBIR, M.; KHAN, M. R.; SAEED, N. Assessment of phytochemicals, antioxidant, anti-lipid peroxidation and anti-hemolytic activity of extract and various fractions of *Maytenus royleanus* leaves. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 143-155, 2013.
- SHAHAZAD, A.; HUSSNAIN, S. Z. U. Grower's corner. **Pakistan Sugar Journal**, v. 28, n. 2, p. 44, 2013.
- SHANKAR, S.; RHIM, J. W. Amino acid mediated synthesis of silver nanoparticles and preparation of antimicrobial agar/silver nanoparticles composite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 353-363, 2015.
- 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**, v. 275, n. 2, p. 496-502, 2004.
- SHARAF, A. E. M. M. A.; KAILLA, A. M.; ATTIA, M. S.; NOFAL, M. M. Evaluation of biotic and abiotic elicitors to control *Meloidogyne incognita* infecting tomato plants. **Nature and Science**, v. 14, n. 11, p. 125-137, 2016.
- SHARMA, P.; BHATT, D.; ZAIDI, M. G.; SARADHI, P. P.; KHANNA, P. K.; ARORA, S. Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 167, p. 2225-2233, 2012.
- SHARMA, I. P.; SHARMA, A. K. Effects of initial inoculums levels of *Meloidogyne incognita* J2 on development and growth of tomato cv. PT-3 under control conditions. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 20, p. 1376-1380, 2015.
- SHARMA, V. K.; SISKOVA, K. M.; ZBORIL, R.; TORRESDEY, J. L. G. Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: fate, stability and toxicity. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 204, p. 15-34, 2014.
- SHENASHEN, M. A.; SAFTY, S. A. E.; ELSHEHY, E. A. Synthesis, morphological control, and properties of silver nanoparticles in potential applications. **Particle & Particle Systems Characterization**, v. 31, n. 3, p. 293-316, 2014.

- SHMGANI, H. S. A. A.; MOHAMMED, W. H.; SULAIMAN, G. M.; SAADOON, A. H. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Catharanthus roseus* leaf extract and assessing their antioxidant, antimicrobial, and wound-healing activities. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 45, n. 6, p. 1234-1240, 2017.
- SIDDIQUI, M. H.; WHAIBI, M. H. A.; FIROZ, M.; KHAISHANY, M. Y. A. Role of nanoparticles in plants. In: SIDDIQUI, M. H.; WHAIBI, M. H. A.; FIROZ, M. **Nanotechnology and Plant Sciences**. Suíça: Springer International Publishing, 2015. p. 19-35.
- SILVA, L. D. Síntese verde, caracterização e atividade biológica de nanopartículas de prata obtidas utilizando extratos de *Hancornia speciosa* Gomes Apocynaceae (mangabeira). 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) Universidade de Brasília, Brasília. 2014.
- SILVA, A. B. Síntese e caracterização de nanoemulsão de óleo de canola e nanopartículas de quitosana contendo acetato de retinol para serem veiculadas por película comestível elaborada pela combinação de biopolímeros para revestimento de frutas. 2015. 94 f. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) Universidade de Brasília, Brasília. 2015.
- SILVA, L. P.; BONATTO, C. C.; PEREIRA, F. D. E. S.; SILVA, L. D.; ALBERNAZ, V. L.; POLEZ, V. L. P. Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas. In: RESENDE, R. R. (Org.). **Biotecnologia aplicada à agro & indústria:** fundamentos e aplicações. São Paulo: Blucher, 2017. p. 967-1012.
- SILVA, L. P.; BONATTO, C. C.; POLEZ, V. L. P. Green synthesis of metal nanoparticles by fungi: current trends and challenges. In: PRASAD, R. (Org.). **Advances and applications through fungal nanobiotechnology**. Estados Unidos: Springer International Publishing, 2016. p. 71-89.
- SILVA, C. T. D.; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 38-42, 2014.
- SILVA, S. L.; LUQUEÑO, F. F.; VALDEZ, F. L. Silver nanoparticles (AgNP) in the environment: a review of potential risks on human and environmental health. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, n. 9, p. 306-325, 2016.
- SILVA, E. H.; MATTOS, V. S.; FURLANETO, C.; GIBAND, M.; BARROSO, P. A. V.; MOITA, A. W.; JORGE JUNIOR, A.; CORREA, V. R.; SERENO, P. C.; CARNEIRO, R. M. D. G. Genetic variability and virulence of *Meloidogyne incognita* populations from Brazil to resistant cotton genotypes. **European Journal of Plant Pathology**, v. 139, n. 1, p. 195-204, 2014b.
- SILVA, W. W. A.; NUNES, P. S. G.; CARVALHO, J. D.; BRUNE, M. W.; LIMA, C. A.; BATALINI, C. Preliminary phytochemical and antileishmanial studies of the ethanolic extracts of *Pterodon pudescens*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 3, p. 561-565, 2014a.

- SILVA, I. D.; TAKATSUKA, F. S.; ROCHA, M. R.; CUNHA, M. G. Efeito do extrato de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vog.) sobre o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, n. 2, p. 109-115, 2005.
- SILVA JUNIOR, M. C. **100 Árvores do cerrado: guia de campo**. Brasília: Rede de Sementes do Cerrado, 2005. 278p.
- SILVEIRA, A. P.; BONATTO, C. C.; LOPES, C. A. P.; RIVERA, L. M. R.; SILVA, L. P. Physicochemical characteristics and antibacterial effects of silver nanoparticles produced using the aqueous extract of *llex paraguariensis*. **Materials Chemistry and Physics**, v. 216, p. 476-484, 2018.
- SINGH, H.; DU, J.; YI, T. H. Green and rapid synthesis of silver nanoparticles using *Borago officinalis* leaf extract: anticancer and antibacterial activities. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 45, n. 7, p. 1310-1316, 2017.
- SINGH, P.; KIM, Y. J.; WANG, C.; MATHIYALAGAN, R.; YANG, D. C. *Weissella oryzae* DC6-facilitated green synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial potential. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, n. 6, p. 1569-1575, 2016a.
- SINGH, P.; KIM, Y. J.; ZHANG, D.; YANG, D. C. Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 7, p. 588-599, 2016b.
- SINGH, R.; SHEDBALKAR, U. U.; WADHWANI, S. A.; CHOPADE, B. A. Bacteriagenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 11, p. 4579-4593, 2015.
- SONG, W.; DERITO, C. M.; LIU, M. K.; HE, X.; DONG, M.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity of common vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 6621-6629, 2010.
- SONG, J. Y.; KIM, B. S. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, n. 1, p. 79-84, 2009.
- SOPJANI, M.; FÖLLER, M.; HAENDELER, J.; GOETZ, F.; LANG, F. Silver ion-induced suicidal erythrocyte death. **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, n. 6, p. 531-536, 2009.
- SOSAN, A.; SVISTUNENKO, D.; STRALTSOVA, D.; TSIURKINA, K.; SMOLICH, I.; LAWSON, T.; SUBRAMANIAM, S.; GOLOVKO, V.; ANDERSON, D.; SOKOLIK, A.; COLBECK, I.; DEMIDCHIK, V. Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify the physiology of *Arabidopsis thaliana* plants. **The Plant Journal**, v. 85, n. 2, p. 245-257, 2016.

- SOUZA, G. D. S.; RODRIGUES, M. A.; SILVA, P. P.; GUERRA, W. Prata: breve histórico, propriedades e aplicações. **Educación Química**, v. 24, n. 1, p. 14-16, 2013.
- SPINDOLA, H. M.; CARVALHO, J. E. D.; RUIZ, A. L. T.; RODRIGUES, R. A.; DENNY, C.; SOUSA, I. M.; TAMASHIRO, J. Y.; FOGLIO, M. A. Furanoditerpenes from *Pterodon pubescens* Benth with selective *in vitro* anticancer activity for prostate cell line. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 3, p. 569-575, 2009.
- SRIKAR, S. K.; GIRI, D. D.; PAL, D. B.; MISHRA, P. K.; UPADHYAY, S. N. Green synthesis of silver nanoparticles: a review. **Green and Sustainable Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 34-56, 2016.
- SRIRANJANI, R.; SRINITHYA, B.; VELLINGIRI, V.; BRINDHA, P.; ANTHONY, S. P.; SIVASUBRAMANIAN, A.; MUTHURAMAN, M. S. Silver nanoparticle synthesis using *Clerodendrum phlomidis* leaf extract and preliminary investigation of its antioxidant and anticancer activities. **Journal of Molecular Liquids**, v. 220, p. 926-930, 2016.
- SRIVASTAVA, S.; OGINO, C.; KONDO, A. Nanoparticle synthesis by biogenic approach. In: BASIUK, V. A.; BASIUK, E. V. **Green processes for nanotechnology**. Switzerland: Springer International Publishing, 2015. p. 237-257.
- STAMPOULIS, D.; SINHA, S. K.; WHITE, J. C. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. **Environmental Science & Technology**, v. 43, p. 9473-9479, 2009.
- STEPNIAK, I. I.; MARTINEZ, M. J. S.; MEDINA, C.; RADOMSKI, M. W. Pharmacological and toxicological effects of co-exposure of human gingival fibroblasts to silver nanoparticles and sodium fluoride. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1677-1687, 2014.
- STOCKERT, J. C.; CASTRO, A. B.; CAÑETE, M.; HOROBIN, R. W.; VILLANUEVA, A. MTT assay for cell viability: intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, v. 114, n. 8, p. 785-796, 2012.
- STOEHR, L. C.; GONZALEZ, E.; STAMPFL, A.; CASALS, E.; DUSCHL, A.; PUNTES, V.; OOSTINGH, G. J. Shape matters: effects of silver nanospheres and wires on human alveolar epithelial cells. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 8, n. 36, p. 3-15, 2011.
- SUBRAMANIAN, P.; OH, B. J.; MANI, V.; LEE, J. K.; LEE, C. M.; SIM, J. S.; KOO, J. C.; HAHN, B. S. Differential metabolic profiles during the developmental stages of plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1351-1365, 2017.

- SUGANYA, K. U.; GOVINDARAJU, K.; KUMAR, V. G.; DHAS, T. S.; KARTHICK, V.; SINGARAVELU, G.; ELANCHEZHIYAN, M. Blue green alga mediated synthesis of gold nanoparticles and its antibacterial efficacy against gram positive organisms. **Materials Science and Engineering: C**, v. 47, p. 351-356, 2015.
- SUJITHA, M. V.; KANNAN, S. Green synthesis of gold nanoparticles using Citrus fruits (*Citrus limon, Citrus reticulata* and *Citrus sinensis*) aqueous extract and its characterization. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 102, p. 15-23, 2013.
- SUJITHA, V.; MURUGAN, K.; PAULPANDI, M.; PANNEERSELVAM, C.; SURESH, U.; RONI, M.; NICOLETTI, M.; HIGUCHI, A.; MADHIYAZHAGAN, P.; SUBRAMANIAM, J.; DINESH, D.; VADIVALAGAN, C.; CHANDRAMOHAN, B.; ALARFAJ, A. A.; MUNUSAMY, M. A.; BARNARD, D. B.; BENELLI, G. Greensynthesized silver nanoparticles as a novel control tool against dengue virus (DEN-2) and its primary vector *Aedes aegypti*. **Parasitology Research**, v. 114, n. 9, p. 3315-3325, 2015.
- SULIMAN, Y. A. O.; ALI, D.; ALARIFI, S.; HARRATH, A. H.; MANSOUR, L.; ALWASEL, S. H. Evaluation of cytotoxic, oxidative stress, proinflammatory and genotoxic effect of silver nanoparticles in human lung epithelial cells. **Environmental Toxicology**, v. 30, n. 2, p. 149-160, 2015.
- SUN, Q.; CAI, X.; LI, J.; ZHENG, M.; CHEN, Z.; YU, C. P. Green synthesis of silver nanoparticles using tea leaf extract and evaluation of their stability and antibacterial activity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 444, p. 226-231, 2014.
- SURAPANENI, K. M.; PRIYA, V. V.; MALLIKA, J. Pioglitazone, quercetin and hydroxy citric acid effect on cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) enzyme levels in experimentally induced non alcoholic steatohepatitis (NASH). **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 18, n. 18, p. 2736-2741, 2014.
- SUREGA, R. Green synthesis of bioactive silver nanoparticles using plant extracts and their antinemic properties. 2015. 216 f. Tese (Doutorado em nematologia) Tamil Nadu Agricultural University Coimbatore, Coimbatore. 2015.
- SZMYD, R.; GORALCZYK, A. G.; SKALNIAK, L.; CIERNIAK, A.; LIPERT, B.; FILON, F. L.; CROSERA, M.; BOROWCZYK, J.; LACZNA, E.; DRUKALA, J.; KLEIN, A.; JURA, J. Effect of silver nanoparticles on human primary keratinocytes. **Biological Chemistry**, v. 394, n. 1, p. 113-123, 2013.
- TAMBOLI, D.; LEE, D. S. Mechanistic antimicrobial approach of extracellularly synthesized silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. **Journal of Hazardous Materials**, v. 260, p. 878-884, 2013.

- TAMEME, H. J. A.; HAMEED, I. H.; IDAN, S. A.; HADI, M. Y. Biochemical analysis of *Origanum vulgare* seeds by fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 7, n. 9, p. 221-237, 2015.
- TANGSAENGVIT, N.; KITPHATI, W.; TADTONG, S.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; NUKOOLKARN, V. Neurite outgrowth and neuroprotective effects of quercetin from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. on cultured P19-derived neurons. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-7, 2013.
- TAVAKOLI, F.; NIASARI, M. S.; MOHANDES, F. Green synthesis of flower-like Cul microstructures composed of trigonal nanostructures using pomegranate juice. **Materials Letters**, v. 100, p. 133-136, 2013.
- TAVARES, D. V. L.; MARTINS, N. P.; BARROS, W. S.; SOUZA, L. Metodologia de quebra de dormência em sementes de sucupira-branca. **Revista Conexão Eletrônica**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2015.
- TERENTEVA, E. A.; APYARI, V. V.; DMITRIENKO, S. G.; ZOLOTOV, Y. A. Formation of plasmonic silver nanoparticles by flavonoid reduction: a comparative study and application for determination of these substances. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 151, p. 89-95, 2015.
- THAKKAR, K. N.; MHATRE, S. S.; PARIKH, R. Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 6, n. 2, p. 257-262, 2010.
- THEPHINLAP, C.; PANGJIT, K.; SUTTAJIT, M.; SRICHAIRATANAKOOL, S. Antioxidant properties and anti-hemolytic activity of *Psidium guajava*, *Pandanous odorus* and *Rhinacanthus nasutus*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 27, p. 2001-2009, 2013.
- THUESOMBAT, P.; HANNONGBUA, S.; AKASIT, S.; CHADCHAWAN, S. Effect of silver nanoparticles on rice (*Oryza sativa* L. cv. *KDML 105*) seed germination and seedling growth. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, p. 302-309, 2014.
- TIEN, D. C.; TSENG, K. H.; LIAO, C. Y.; HUANG, J. C.; TSUNG, T. T. Discovery of ionic silver in silver nanoparticle suspension fabricated by arc discharge method. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 463, n. 1, p. 408-411, 2008.
- TIWARI, N.; MISHRA, A.; BHATT, G.; CHAUDHARY, A. Anti-stress activity of bioflavonoid: quercetin from *Euporbia hirta*. **Journal of Pharmacy Research**, v. 6, n. 2, p. 68-75, 2015.
- TRAN, Q. H.; NGUYEN, V. Q.; LE, A. T. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 4, n. 3, p. 33001-33020, 2013.

- TROTTER, S. C.; SROA, N.; WINKELMANN, R. R.; OLENCKI, T.; BECHTEL, M. A Global review of melanoma follow-up guidelines. **The Journal of Clinical and Aesthetic**, v. 6, n. 9, p. 18-26, 2013.
- VANNINI, C.; DOMINGO, G.; ONELLI, E.; PRINSI, B.; MARSONI, M.; ESPEN, L.; BRACALE, M. Morphological and proteomic responses of *Eruca sativa* exposed to silver nanoparticles or silver nitrate. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68752- e68759, 2013.
- VEDAKUMARI, W. S.; AYAZ, N.; KARTHICK, A. S.; SENTHIL, R.; SASTRY, T. P. Quercetin impregnated chitosan–fibrin composite scaffolds as potential wound dressing materials-fabrication, characterization and *in vivo* analysis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, p. 106-112, 2017.
- VELMURUGAN, P.; CHO, M.; LIM, S. S.; SEO, S. K.; MYUNG, H.; BANG, K. S.; SIVAKUMAR, S.; CHO, K. M.; OH, B. T. Phytosynthesis of silver nanoparticles by *Prunus yedoensis* leaf extract and their antimicrobial activity. **Materials Letters**, v. 138, p. 272-275, 2015.
- VELUSAMY, P.; DAS, J.; PACHAIAPPAN, R.; VASEEHARAN, B.; PANDIAN, K. Greener approach for synthesis of antibacterial silver nanoparticles using aqueous solution of neem gum (*Azadirachta indica* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 103-109, 2015.
- VENKATESAN, B.; SUBRAMANIAN, V.; TUMALA, A.; VELLAICHAMY, E. Rapid synthesis of biocompatible silver nanoparticles using aqueous extract of *Rosa damascena* petals and evaluation of their anticancer activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, p. S294-S300, 2014.
- VERMA, R.; KUSHWAH, L.; GOHEL, D.; PATEL, M.; MARVANIA, T.; BALAKRISHNAN, S. Evaluating the ameliorative potential of quercetin against the bleomycin-induced pulmonary fibrosis in wistar rats. **Pulmonary Medicine**, v. 2013, p. 1-10, 2013.
- VERMA, N.; TREHAN, N. HPLC analysis of methanolic extract of herbs for quercetin content. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, n. 1, p. 159-162, 2013.
- VIDHU, V. K.; PHILIP, D. Catalytic degradation of organic dyes using biosynthesized silver nanoparticles. **Micron**, v. 56, p. 54-62, 2014.
- VIGGIANO, J. R.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A. Use of *Pochonia chlamydosporia* to control *Meloidogyne javanica* in cucumber. **Biological Control**, v. 69, p. 72-77, 2014.
- VINARDELL, M. P.; SORDÉ, A.; DÍAZ, J.; BACCARIN, T.; MITJANS, M. Comparative effects of macro-sized aluminum oxide and aluminum oxide nanoparticles on erythrocyte hemolysis: influence of cell source, temperature, and size. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n. 2, p. 80-89, 2015.

- VOLKOVOVA, K.; BILANICOVA, D.; BARTONOVA, A.; LETAŠIOVÁ, S.; DUSINSKA, M. Associations between environmental factors and incidence of cutaneous melanoma. **Environmental Health**, v. 11, p. 1-13, 2012.
- VRČEK, I. V.; ŽUNTAR, I.; PETLEVSKI, R.; PAVIČIĆ, I.; SIKIRIĆ, M. D.; ĆURLIN, M.; GOESSLER, W. Comparison of *in vitro* toxicity of silver ions and silver nanoparticles on human hepatoma cells. **Environmental Toxicology**, v. 31, n. 6, p. 679-692, 2016.
- WANG, J.; KOO, Y.; ALEXANDER, A.; YANG, Y.; WESTERHOF, S.; ZHANG, Q.; SCHNOOR, J. L.; COLVIN, V. L.; BRAAM, J.; ALVAREZ, P. J. Phytostimulation of poplars and *Arabidopsis* exposed to silver nanoparticles and Ag⁺ at sublethal concentrations. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 10, p. 5442-5449, 2013.
- WANG, D.; MARKUS, J.; WANG, C.; KIM, Y. J.; MATHIYALAGAN, R.; ACEITUNO, V. C.; AHN, S.; YANG, D. C. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using aqueous extract of *Cibotium barometz* root. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 45, n. 8, p. 1548-1555, 2017.
- WANG, W.; SUN, C.; MAO, L.; MA, P.; LIU, F.; YANG, J.; GAO, Y. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 56, p. 21-38, 2016.
- WEI, L.; LU, J.; XU, H.; PATEL, A.; CHEN, Z. S.; CHEN, G. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 5, p. 595-601, 2015.
- WILLEMS, V. D. W. Roadmap report on nanoparticles. **W&W Espana sI, Barcelona, Spain**, v. 157, p. 1-57, 2005.
- WILLIAMS, D. The relationship between biomaterials and nanotechnology. **Biomaterials**, v. 29, p. 1737-1738, 2008.
- WU, H.; LIN, J.; LIU, P.; HUANG, Z.; ZHAO, P.; JIN, H.; WANG, C.; WE, L.; GU, N. Is the autophagy a friend or foe in the silver nanoparticles associated radiotherapy for glioma? **Biomaterials**, v. 62, p. 47-57, 2015.
- XU, L.; CAO, L. D.; LI, F. M.; WANG, X. J.; HUANG, Q. L. Utilization of chitosan-lactide copolymer nanoparticles as controlled release pesticide carrier for pyraclostrobin against *Colletotrichum gossypii* southw. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 35, n. 4, p. 544-550, 2014.
- XIA, T.; KOVOCHICH, M.; BRANT, J.; HOTZE, M.; SEMPF, J.; OBERLEY, T.; SIOUTAS, C.; YEH, J. I.; WIESNER, M. R.; NEL, A. E. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. **Nano Letters**, v. 6, n. 8, p. 1794-1807, 2006.

- YANG, X.; GONDIKAS, A. P.; MARINAKOS, S. M.; AUFFAN, M.; LIU, J.; KIM H. H.; MEYER, J. N. Mechanism of silver nanoparticle toxicity is dependent on dissolved silver and surface coating in *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 2, p. 1119-1127, 2012.
- YANG, F.; SONG, L.; WANG, H.; WANG, J.; XU, Z.; XING, N. Quercetin in prostate cancer: chemotherapeutic and chemopreventive effects, mechanisms and clinical application potential (review). **Oncology Reports**, v. 33, n. 6, p. 2659-2668, 2015.
- YASIN, S.; LIU, L.; YAO, J. Biosynthesis of silver nanoparticles by bamboo leaves extract and their antimicrobial activity. **Journal of Fiber Bioengineering and Informatics**, v. 6, n. 1, p. 77-84, 2013.
- YIN, Y. H.; GUO, Q. M.; YUN, H.; WANG, L. J.; WAN, S. Q. Preparation, characterization and nematicidal activity of lansiumamide B nano-capsules. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 11, n. 7, p. 1151-1158, 2012.
- YOUSSEF, M. M. A.; EISSA, M. F. M. Biofertilizers and their role in management of plant parasitic nematodes. a review. **Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2014.
- YUAN, Y. G.; PENG, Q. L.; GURUNATHAN, S. Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-infected goats: an alternative approach for antimicrobial therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p. 569-590, 2017.
- ZARSCHLER, K.; ROCKS, L.; LICCIARDELLO, N.; BOSELLI, L.; POLO, E.; GARCIA, K. P.; COLA, L.; STEPHAN, H.; DAWSON, K. A. Ultrasmall inorganic nanoparticles: state-of-the-art and perspectives for biomedical applications. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 12, n. 6, p. 1663-1701, 2016.
- ZAYED, M. F.; EISA, W. H.; SHABAKA, A. A. *Malva parviflora* extract assisted green synthesis of silver nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 98, p. 423-428, 2012.
- ZHANG, D. X.; LI, B. X.; ZHANG, X. P.; ZHANG, Z. Q.; WANG, W. C.; LIU, F. Phoxim microcapsules prepared with polyurea and urea—formaldehyde resins differ in photostability and insecticidal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 14, p. 2841-2846, 2016.
- ZHANG, X. F.; LIU, Z. G.; SHEN, W.; GURUNATHAN, S. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1534, 2016.

- ZHANG, X. F.; SHEN, W.; GURUNATHAN, S. Silver nanoparticle-mediated cellular responses in various cell lines: an *in vitro* model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1603, 2016.
- ZHANG, T.; WANG, L.; CHEN, Q.; CHEN, C. Cytotoxic potential of silver nanoparticles. **Yonsei Medical Journal**, v. 55, n. 2, p. 283-291, 2014.
- ZHOU, H.; YANG, D.; IVLEVA, N. P.; MIRCESCU, N. E.; NIESSNER, R.; HAISCH, C. SERS detection of bacteria in water by in situ coating with Ag nanoparticles. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 3, p. 1525-1533, 2014.
- ZHU, Q. Y.; HOLT, R. R.; LAZARUS, S. A.; OROZCO, T. J.; KEEN, C. L. Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis. **Experimental Biology and Medicine**, v. 227, n. 5, p. 321-329, 2002.
- ZHU, C.; HU, W.; WU, H.; HU, X. No evident dose-response relationship between cellular ROS level and its cytotoxicity—a paradoxical issue in ROS-based cancer therapy. **Scientific Reports**, v. 4, p. 5029-5038, 2014.
- ZUAS, O.; HAMIM, N.; SAMPORA, Y. Bio-synthesis of silver nanoparticles using water extract of *Myrmecodia pendan* (Sarang Semut plant). **Materials Letters**, v. 123, p. 156-159, 2014.