



**Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE MICRO- E  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA OBTIDAS POR SÍNTESE VERDE  
UTILIZANDO PLANTAS DO CERRADO**

**Cíntia Caetano Bonatto**

**Brasília  
2016**



**Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE MICRO- E  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA OBTIDAS POR SÍNTESE VERDE  
UTILIZANDO PLANTAS DO CERRADO**

**Cíntia Caetano Bonatto**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

Orientador: Dr. Luciano Paulino da Silva

**Brasília  
2016**



---

***Recursos Genéticos e  
Biotecnologia***

**Estudo desenvolvido no Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob orientação do Pesquisador Doutor Luciano Paulino da Silva, orientador credenciado junto ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília (UnB).**

**Suporte Financeiro: CNPq, CAPES, FAPDF, Embrapa.**

**Brasília  
2016**

## ***Agradecimentos...***

*O desenvolvimento deste trabalho foi possível graças:*

*A Deus por me abençoar e iluminar meus caminhos.*

*Aos meus amados pais, Lúcia e Marcos pela confiança, ensinamentos, incentivo, amizade, companheirismo e a todo o amor dedicado a mim, pois sem vocês eu não seria simplesmente nada.*

*A minha irmã Raquel Caetano Bonatto pelo amor, pela amizade, companheirismo, por me ensinar a ser uma pessoa melhor e acreditar em mim quando eu mesma não acreditava que seria possível, e por nos presentear com a princesinha mais linda do mundo Sofia Bonatto Passos.*

*As minhas avós Terezinha Gomes Caetano (in memorian) e Maria de Lourdes Bonatto, aos meus avôs Eurípedes Caetano (in memorian) e Ermes Bonatto (in memorian).*

*A todos os meus familiares Caetano's e Bonatto's em especial a querida e amada Alice Caetano dos Santos por seu amor puro, verdadeiro e singelo.*

*Ao orientador e amigo Luciano Paulino da Silva pela oportunidade, apoio, ensinamentos, paciência, compreensão, incentivo e acreditar em meu potencial, muitas vezes quando eu mesma desacreditava.*

*A querida biotecnologista Ivy Garcez Reis pelo auxílio nos experimentos, companheirismo e amizade durante todo o período de desenvolvimento da Tese.*

*Aos meus queridos amigos e amigas: Bruna Carla Agustini, Danielle Vasconcelos Rosa, Glenda Nalygia Lopes, Janaína Almeida Fernandes, Paula Emmert, Tainá Batista de Assis, Rodrigo Borges, Vera Lucia Perussi Polez e Zara Guimarães Sobrinha, pela compreensão, apoio, incentivo e por simplesmente existirem e fazerem parte da minha vida.*

*A todos os integrantes, que fazem ou fizeram parte, do Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em especial à Ariane, Clara, Carolina, Douglas, Eduardo, Ivy, Kelliane, Flávio, Luciane e*

*Vanessa onde foram realizadas a síntese, caracterização e avaliação das atividades biológicas das micro- e nanopartículas de prata, por proporcionarem as mais diversas situações as quais contribuíram grandemente para o meu desenvolvimento e crescimento pessoal e profissional.*

*As Professoras Maria Rita Avanzi e Zara Faria Guimarães Sobrinha, e a todos os colegas do Núcleo de Educação Científica do Instituto de Ciências Biológicas, onde foram realizados os estágios em docência.*

*A Professora Sonia Maria de Freitas e todos os integrantes do Laboratório de Biofísica da Universidade de Brasília, onde foi realizada parte das caracterizações das nanopartículas por espalhamento de luz dinâmico e potencial Zeta.*

*A Professora Sônia Nair Bão e ao Dr. Cláudio Lopes do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília, pela caracterização das nanopartículas por microscopia eletrônica de transmissão.*

*Ao Professor Ricardo Bentes de Azevedo, a secretária Dona Zélia Ramos Madeira e a todos os colegas do Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, onde foram realizados alguns dos ensaios de toxicidade em modelos de cultivo de células de mamíferos.*

*Aos Pesquisadores Dr. Thales Lima Rocha e Dra. Vera Lucia Perussi Polez, e a colaboradora Carla Soll, do Laboratório de Prospecção de Composto Bioativos (LPCB) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo incentivo, apoio, amizade e auxílio nos ensaios de nematotoxicidade in vitro e in vivo.*

*A Professora Kelly Grace Magalhães e aos seus alunos Dalila, Drielle, Lívia, Rafael, Raquel e Páscoa, do Laboratório de Imunologia e Inflamação (LIM) da Universidade de Brasília, pela disponibilidade e auxílio com os animais para a realização do ensaio in vivo em camundongos.*

*A analista Ana Cristina Gomes, do Laboratório de Bioimagem da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo carinho, amizade e apoio durante o processamento das amostras biológicas para histologia e obtenção das fotomicrografias.*

*A pesquisadora Marlinda Lobo de Souza e ao analista William Sihler, do Laboratório de Virologia de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo apoio e auxílio nos ensaios de toxicidade em modelos de cultivo de células de insetos.*

*Ao Dr. João Batista Teixeira e ao analista André Luís Xavier de Souza da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo auxílio com os ensaios de cultivo de plantas in vitro.*

*A querida Anelise Mendonça pelas conversas e pelo auxílio na obtenção de material biológico o qual possibilitou a realização dos ensaios hemolíticos.*

*Ao técnico e colega de doutorado Diego Dias, do Campus de Ceilândia da Universidade de Brasília, pelo auxílio na caracterização das nanopartículas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.*

*A querida professora e coordenadora do curso de Ciências Biológicas Cynthia Kyaw por toda a sua disponibilidade, apoio incondicional e acreditar em meu potencial durante toda a minha jornada acadêmica na Universidade de Brasília.*

*Ao senhor Juarez Paulino da Silva, proprietário da Fazenda Coqueiro, pelo apoio e auxílio nas coletas e descrição dos nomes populares das plantas utilizadas neste estudo.*

*A secretária Ilenice e as colaboradoras Antônia, Nice e Terezinha da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.*

*As secretárias e a coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, pelo auxílio durante todo o período de realização desse trabalho.*

*A todos os professores dos cursos de graduação em Ciências Biológicas, e Pós-Graduações em Biologia Animal, Nanociência e Nanobiotecnologia, e Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília pelos ensinamentos durante toda a minha trajetória acadêmica.*

*Ao Dr. Carlos Bloch e ao doutorando Marcelo Ramada, e a todos os colegas do Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.*

*A Universidade de Brasília, e a todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa caminhada.*

*A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela possibilidade de realização desse estudo.*

*Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPDF pelo auxílio financeiro, o qual, permitiu a realização desse estudo, por meio da bolsa de estudos e fomento aos projetos de pesquisa.*

## RESUMO

Síntese verde é o nome dado às rotas de síntese relativamente atóxicas, que utilizam reagentes químicos biodegradáveis e de custo baixo para sintetizar nanomateriais, tendo como iniciador da rota, um componente biológico, dentre eles as plantas. O Cerrado possui uma vasta diversidade de plantas compostas por arsenais fitoquímicos que podem ser explorados na síntese verde de nanopartículas metálicas (NPMs). Dentre os metais utilizados para a síntese de NPMs, a prata tem sido amplamente utilizada devido às suas diversas propriedades, dentre elas a atividade antimicrobiana de amplo espectro. O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de rotas exploratórias de síntese verde para produção de micro- e nanopartículas de prata (AgMPs e AgNPs) utilizando 91 extratos aquosos obtidos a partir de fruto (cajuzinho do Cerrado) e/ou folhas de plantas do Cerrado. O monitoramento da formação de AgNPs por espectroscopia de absorção indicou potencial redutor do extrato obtido a partir do fruto/nozes de *Anacardium othonianum* como uma função da temperatura de reação. As AgNPs sintetizadas apresentaram tamanhos variados; índices de polidispersividade (PdI) moderados; potencial Zeta de superfície baixo a moderado; formato esférico; e ausência de efeito citotóxico pronunciado para leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Dos extratos obtidos a partir das folhas de 90 espécies de plantas pertencentes a 41 diferentes famílias, ~77% foram capazes de reduzir expressivamente  $Ag^+$  em  $Ag^0$ , formando partículas. As AgNPs e AgMPs apresentaram diâmetros hidrodinâmicos variados com 61% das suspensões coloidais apresentando estruturas dentro da faixa nanométrica (10 a 100 nm); PdI variado, sendo 40% indicativo de monodispersão (0,1 a 0,3); potencial Zeta negativo variável, sendo que 87% foram coloidalmente portadoras de instabilidade incipiente (-10 a -30 mV). Todas as partículas inibiram *in vitro* o crescimento de bactérias *Escherichia coli* em concentrações micromolares, e apenas 66,67% inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus*, sendo mais efetivas contra bactérias Gram-negativas em relação a bactérias Gram-positivas. A rota de síntese desenvolvida com extrato aquoso das folhas de *Caryocar brasiliense* (CbC - Pequi) foi selecionada com base em critérios racionais para dar continuidade e aprofundamento a estudos confirmatórios. As AgNPs produzidas por essa rota (AgNPs-CbC) se mostraram altamente reprodutíveis (pequena variação entre lotes e época de coleta das folhas), estáveis (pelo menos 1,5 anos), passíveis de escalonamento (5-500 mL) e de serem dissolvidas em condições controladas (peróxido de hidrogênio). Além disso, foi possível identificar alguns dos compostos possivelmente relacionados ao processo de redução e estabilização das AgNPs-CbC, dentre os quais estão flavonoides, taninos e outros compostos orgânicos. Ensaio *in vitro* demonstraram que as AgNPs-CbC inibiram o crescimento de leveduras *Candida albicans*, e foram mais efetivas contra bactérias *Escherichia coli* (Gram-negativa) do que *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva). Ensaio de viabilidade celular indicaram diminuição da viabilidade de células de fibroblastos murino (NIH3T3) (14,6%), células de câncer de mama humano (MCF-7) (24,4%), macrófagos peritoneais murinos (C57Bl/6) (51,5%) e células de insetos (Sf21) (65%); e apresentaram taxa hemolítica baixa (1,5%) quando expostas às AgNPs-CbC na concentração de 100  $\mu$ M. As AgNPs-CbC apresentaram efeito nematocida contra *Caenorhabditis elegans* e *Meloidogyne incognita* em concentrações muito mais baixas do que as observadas para outros organismos; e não indicaram feitos toxicológicos sob os pontos de vista anatômicos e bioquímicos em plantas *Nicotiana tabacum*. Ensaio *in vivo* controlaram em 85% a infestação por *M. incognita* em plantas de tabaco sem alterar os parâmetros anatômicos e bioquímicos (clorofila e peroxidação lipídica). Adicionalmente, as AgNPs-CbC em concentração de 64  $\mu$ M administradas por via intravenosa em camundongos não desencadearam alterações nos perfis hematológicos (hemograma e leucograma), bioquímicos [gama glutamil transpeptidase (GGT), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), bilirrubina total (TBIL) e lipidograma] e morfológicos (fígado, baço, rim e pulmão). Um método racional, comparativo e em etapa única foi desenvolvido para síntese de partículas de prata utilizando extratos obtidos a partir de plantas do Cerrado, sendo que o método e abordagens apresentadas direcionam para um alto potencial biotecnológico dessa plataforma sustentável de para produção de nanomateriais.

Palavras-chave: Síntese verde, Cerrado, nanopartículas de prata, atividade biológica, testes *in vitro*, testes *in vivo*.



## ABSTRACT

Green synthesis is the common name given to the relatively non-toxic synthetic routes, using biodegradable and inexpensive chemicals to synthesize nanomaterials, and with a biological organism as the primary source or initiator of the route, among them plants. The Cerrado has a wide diversity of plants composed by phytochemical arsenals that can be exploited in the green synthesis of metallic nanoparticles (NPMs). Among the metals used for the synthesis of NPMs, silver has been widely used because of its diverse properties, among them a broad spectrum of antimicrobial activity. The aim of the present study was the development of exploratory routes of green synthesis to produce silver micro- and nanoparticles (AgMPs and AgNPs) using 91 aqueous extracts obtained from fruit (Cerrado cashew) and/or leaves of Cerrado plants. The monitoring of the formation of AgNPs by absorption spectroscopy indicated the reducing potential of the extract obtained from the fruit/nuts of *Anacardium othonianum* as a function of the reaction temperature. The AgNPs obtained had varying sizes; moderate polydispersity indexes (PdI); low to moderate surface Zeta potential; spherical shape; and absence of pronounced cytotoxic effect against *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. From the extracts obtained from the leaves of 90 species of plants belonging to 41 different families, ~77% were able to expressively reduce  $\text{Ag}^+$  into  $\text{Ag}^0$ , forming particles. The AgNPs and AgMPs presented varying hydrodynamic diameters, with 61% of the colloidal suspensions presenting structures within the nanometric range (10 to 100 nm); PdI varied, with 40% indicative of monodispersion (0.1 to 0.3); variable negative Zeta potential, with 87% colloiddally carrying incipient instability (-10 to -30 mV). All particles inhibited *in vitro* the growth of *Escherichia coli* bacteria at micromolar concentrations, and only 66.67% inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*, being more effective against Gram-negative bacteria compared to Gram-positive bacteria. The route of synthesis developed with aqueous extract of the leaves from *Caryocar brasiliense* (CbC) was selected based on a rational criteria to give continuity and deepening to confirmatory studies. The AgNPs produced by this route (AgNPs-CbC) showed to be highly reproducible (small variation between lots and time of collection of leaves), stable (at least 1.5 years), scalable (5-500 mL), and being possible to be dissolved under controlled conditions (hydrogen peroxide). In addition, it was possible to identify some of the compounds possibly related to the process of reduction and stabilization of AgNPs-CbC, among which are flavonoids, tannins and other organic compounds. *In vitro* assays demonstrated that AgNPs-CbC inhibited the growth of *Candida albicans* yeasts, and were more effective against *Escherichia coli* (Gram-negative) than *Staphylococcus aureus* (Gram-positive) bacteria. Cell viability assays indicated decreased viability of murine fibroblast cells (NIH3T3) (14%), human breast cancer cells (MCF-7) (24%), murine peritoneal macrophages (C57Bl/6) (51%) and insect cells (Sf21) (65%); and presented a low hemolytic rate (1.5%) when exposed to the AgNPs-CbC in the concentration of 100  $\mu\text{M}$ . AgNPs-CbC showed a nematocidal effect against *Caenorhabditis elegans* and *Meloidogyne incognita* at concentrations much lower than those observed for other organisms; and did not indicate anatomical and biochemical toxicological effects on *Nicotiana tabacum* plants. *In vivo* assays controlled in 85% the infestation in tobacco plants by *M. incognita* without altering the anatomical and biochemical parameters (chlorophyll and lipid peroxidation). In addition, AgNPs-CbC in concentrations of 64  $\mu\text{M}$  administered intravenously in mice did not trigger changes in hematological (hemogram and leukogram), biochemical profiles (gamma glutamyl transpeptidase (GGT), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total bilirubin (TBIL) and lipidogram] and morphological (liver, spleen, kidney and lung) profiles. A rational, comparative and single step method was developed for the synthesis of silver particles using extracts obtained from Cerrado plants, and the method and approaches suggested a high biotechnological potential of this sustainable platform for production of nanomaterials.

Keywords: Green synthesis, Cerrado, silver nanoparticles, biological activity, *in vitro* assays, *in vivo* assays.

**AUTORIZAÇÃO**  
**Conselho de Gestão do Patrimônio Genético - CGEN**



MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE  
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS  
Diretoria de Uso Sustentável da Biodiversidade e Florestas  
Coordenação de Geração de Conhecimento dos Recursos Faunísticos e Pesqueiros  
SCEN Trecho 2 Ed. Sede do Ibama - Cx. Postal nº 09566 Brasília - DF  
CEP: 70818-900 e (61) 3316-1475  
www.ibama.gov.br

OF 02001.001407/2015-64 COCFP/IBAMA

Brasília, 06 de fevereiro de 2015.


Ao Senhor  
Fábio Silva Macedo  
Coordenador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Parque Estação Biológica-PqEB W3 Norte - Ed. Sede - Caixa Postal 08815  
BRASILIA - DISTRITO FEDERAL  
CEP.: 70770901

Assunto: **Acesso ao patrimônio genético**

Senhor Coordenador,

1. Informamos que o projeto de pesquisa "*Síntese e caracterização de micro e nano partículas obtidas a partir de rotas de química verde com uso plantas, fungos, leveduras, bactérias e archaea*", coordenado pelo pesquisador Luciano Paulino da Silva, processo nº 02001.007580/2014-95, foi incluído no portfólio da Autorização Especial de Acesso ao Patrimônio Genético da Embrapa.
2. Conforme o Decreto nº 3.945/2001 a instituição beneficiada pela autorização de acesso ao patrimônio genético deverá enviar relatórios de atividades cuja periodicidade não poderá exceder o prazo de doze meses.

Atenciosamente,

  
**MARIA IZABEL SOARES GOMES DA SILVA**  
Coordenadora da COCFP/IBAMA

# AUTORIZAÇÃO

## Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética no Uso Animal

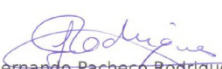
Brasília, 08 de janeiro de 2013.



### DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS IN VITRO, IN SITU E IN VIVO DE COMPOSTOS BIOATIVOS LIVRES OU ENCAPSULADOS EM NANOSSISTEMAS DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA."**, UnBDOC n.º 131758/2012, sob responsabilidade do pesquisador Luciano Paulino da Silva foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



  
Prof. Fernando Pacheco Rodrigues  
Vice-Coordenador da CEUA

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura I 1.** Representação esquemática da síntese verde de nanopartículas metálicas via redução química de íons metálicos ( $M^+$ ) a metais zerovalentes ( $M^0$ ) utilizando organismos biológicos como agentes redutores. Fonte: Própria autora. .... 11
- Figura I 2.** Representação esquemática do resultado da síntese verde de nanopartículas metálicas utilizando extratos aquosos obtidos a partir de diferentes partes (tecidos) de variadas espécies de plantas e culminando com a possibilidade de produção de partículas com diferentes composições, formas e tamanhos. Fonte: Própria autora. .... 12
- Figura I 3.** Número de artigos publicados envolvendo síntese verde de nanopartículas metálicas utilizando diferentes partes de plantas e de acordo com a base de dados do ISI *Web of Science* (16 de novembro de 2016). Os termos para busca foram utilizados em língua inglesa (*green synthesis AND metal nanoparticles* associados a um dos termos seguintes: *leaf/leaves, seed, root, fruit, flower, stem, latex* ou *peel*). .... 13
- Figura I 4.** Extratos de folhas em diferentes estados metabólicos/fisiológicos quando obtidas a partir de uma mesma espécie de planta utilizada para síntese verde de nanopartículas metálicas podem conduzir à formação de nanomateriais com diferentes tamanhos e consequentemente influenciar na reprodutibilidade das sínteses e propriedades finais. Fonte: Silva et al., 2015. .... 15
- Figura I 5.** Ilustração esquemática do uso da modelagem matemática computacional e desenho experimental racional visando à previsibilidade das rotas de síntese de nanopartículas metálicas utilizando plantas em busca de maior homogeneidade e reprodutibilidade das reações. Fonte: Silva et al., 2015. .... 16
- Figura I 6.** Ilustração esquemática dos equipamentos de proteção individual (EPIs) que são normalmente recomendados para os trabalhadores em nanotecnologia para reduzir ou minimizar os riscos de exposição aos nanomateriais com diferentes características físicas e químicas. Além disso, o potencial de segurança dos nanomateriais, incluindo nanopartículas metálicas deve ser avaliado por meio de ensaios *in vitro* e testes *in vivo*. Fonte: Silva et al., 2015 (Modificado). .... 17
- Figura I 7.** Ilustração esquemática representativa das principais etapas desenvolvidas no presente estudo. 1) Estratégias para seleção racional de uma planta a ser empregada de maneira sustentável; 2) Desenvolvimento de um processo tecnológico para produção de nanopartículas metálicas. .... 22

## CAPÍTULO II

- Figura II 1.** Foto de seis exemplares representativos de frutos e pseudofrutos de cajuzinho do Cerrado. Barra = 2 cm. .... 57
- Figura II 2.** Representação esquemática das etapas metodológicas utilizadas no presente capítulo..... 60
- Figura II 3.** Fotografias dos béqueres contendo as soluções de extrato aquoso de castanhas de caju (marcado com selos coloridos) e das soluções contendo extrato aquoso de castanhas de caju na presença de  $\text{AgNO}_3$  a 0 min (painéis da esquerda) e após 150 minutos de reação (painéis da direita) de incubação a  $0^\circ\text{C}$  (A, B), a  $25^\circ\text{C}$  (C, D),  $50^\circ\text{C}$  (E, F) e  $75^\circ\text{C}$  (G, H)..... 61
- Figura II 4.** Cinética de formação das AgNPs-CsC quando incubadas a  $0^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ,  $50^\circ\text{C}$  ou  $75^\circ\text{C}$  (A). Curvas de absorção na região do visível após o processo de síntese a  $0^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ,  $50^\circ\text{C}$  ou  $75^\circ\text{C}$  (B)..... 62
- Figura II 5.** Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico (em número) obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) a partir das análises das suspensões de AgNPs-CsC sintetizadas à  $0^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ,  $50^\circ\text{C}$  e  $75^\circ\text{C}$  durante 2,5 h. 63
- Figura II 6.** Correlações entre diâmetro hidrodinâmico médio e temperaturas de reação (A) e índice de polidispersividade (PdI) (B) das AgNPs sintetizadas por rota de síntese verde utilizando extrato aquoso de castanhas de cajuzinho de árvore do Cerrado. Diferença estatisticamente significativa em relação à temperatura de  $0^\circ\text{C}$  (\*) e  $25^\circ\text{C}$  (#)..... 64
- Figura II 7.** Potencial Zeta de superfície das AgNPs sintetizadas por rota de síntese verde utilizando extrato aquoso de castanhas de cajuzinho do Cerrado. \*Diferença estatisticamente significativa em relação à temperatura de  $0^\circ\text{C}$ ; Diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) em relação às temperaturas de  $0^\circ\text{C}$  (\*) e  $50^\circ\text{C}$  (§)..... 65
- Figura II 8.** Monitoramento da condutividade elétrica (CE) das suspensões AgNPs-CsC (A) e CsC (B) sintetizadas sob diferentes temperaturas em função do tempo, e correlação entre as temperaturas de reação e a CE no ponto final das reações (C). 66
- Figura II 9.** Imagens topográficas, viscoelásticas e histogramas de distribuição de classes referentes aos valores de altura obtidos por microscopia de força atômica das AgNPs sintetizadas a  $0^\circ\text{C}$  (A, B e C),  $25^\circ\text{C}$  (D, E e F),  $50^\circ\text{C}$  (G, H e I) ou  $75^\circ\text{C}$  (J, L e M)..... 68
- Figura II 10.** Espectros de massa MALDI-TOF dos perfis de baixa massa molecular de CsC e AgNPs-CsC expostos a diferentes temperaturas de síntese (A). Dendrograma obtido a partir do agrupamento de espectros de baixa massa molecular de CsC e AgNPs-CsC (B). Espectros de massa MS/MS dos íons  $m/z$  485 e  $m/z$  487, além de outros íons presentes nas amostras (C). .... 70
- Figura II 11.** As razões de intensidade entre os íons de 487/485 correspondente possivelmente às formas oxidada e reduzida de uma molécula presente nas nanopartículas e sendo comparadas nas diferentes temperaturas de reação de 0 a

75°C. Diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) entre CsC e AgNPs-CsC em relação à mesma temperatura, e CsC em comparação temperatura de 0°C (#).. 71

**Figura II 12.** Ensaio de viabilidade celular in vitro por MTT em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* expostas a AgNPs-CsC sintetizadas sob diferentes temperaturas e respectivos controles (AgNO<sub>3</sub> e CsC) em concentrações de 50 µM (A) e 25 µM (B) equivalentes a AgNO<sub>3</sub>. Diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) em relação às células do controle (\*); íons Ag<sup>+</sup> livres (#); e CsC (\$). Valores representados como a média ± erro padrão da média. .... 72

### CAPÍTULO III

**Figura III 1.** Representação esquemática das etapas metodológicas utilizadas no presente capítulo..... 79

**Figura III 2.** Fotografias dos béqueres contendo as suspensões finais de partículas de prata sintetizadas a 75°C por 2,5 h utilizando extratos de folhas a 1 mg/mL de diferentes espécies de plantas do Cerrado em meio reacional aquoso contendo AgNO<sub>3</sub> a 1 mM. .... 82

**Figura III 3.** Representação gráfica de matriz colorida do monitoramento espectrofotométrico a 450 nm a cada 30 min durante o período de síntese (2,5 h) utilizando extrato aquoso obtido a partir das folhas de 90 espécies de plantas do Cerrado. Setas pretas indicam as suspensões que apresentaram maiores intensidades de absorção. .... 83

**Figura III 4.** Taxas de formação obtidas com base na inclinação das curvas de formação ao longo de todo o período de reação de síntese das AgNPs utilizando extratos aquosos de folhas de plantas, nativas (cinza claro) e introduzidas (cinza escuro), do Cerrado. .... 84

**Figura III 5.** Representação gráfica aos espectros de ressonância plasmônica de superfície das nanopartículas de prata sintetizadas utilizando extratos aquosos obtidos a partir das folhas de 90 espécies de plantas do Cerrado. Setas pretas indicam as suspensões que apresentaram maiores sinais de RPS..... 87

**Figura III 6.** Fotografias dos béqueres contendo as suspensões finais de AgNPs por 2,5 h à 75°C utilizando extrato aquoso de folhas coletadas no período de inverno. .... 93

**Figura III 7.** Cinéticas de formação das AgNPs por 2,5 h à 75°C utilizando extrato aquoso de folhas coletadas no período de verão (A) e de inverno (B). Espectros de absorção na região do visível das AgNPs por 2,5 h à 75°C utilizando extrato aquoso de folhas coletadas no período de verão (C) e de inverno (D)..... 94

**Figura III 8.** Taxas de formação de AgNPs sintetizadas utilizando extratos aquosos de folhas de plantas coletadas na época de seca (cinza claro) e chuva (cinza escuro). 94

**Figura III 9.** Características físico-químicas das AgNPs sintetizadas utilizando extratos aquosos obtidos a partir de folhas de plantas do Cerrado coletadas no verão (período de chuva) e no inverno (período de seca). Diâmetro hidrodinâmico (A), Índice de polidispersividade (PdI) (B), Potencial Zeta de superfície (C). Valores referentes às médias e desvios padrão da média de três leituras independentes.

*Diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) em relação à síntese utilizando extrato de verão. ....	96
<b>Figura III 10.</b> Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico (em número) obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) das AgNPs sintetizadas com extratos de folhas de Pequi (A) e Aroeira (B) coletadas em período de chuva e seca. ....	97
<b>Figura III 11.</b> Espectros de massa MALDI-TOF representativos de extratos aquosos de folhas de plantas obtidos em modo refletido positivo na faixa m/z 100-1200 que não formaram AgNPs (Baru) ou que formaram AgNPs (Pequi). Setas indicam íons diferenciais presentes nas espécies.....	99
<b>Figura III 12.</b> Espectros de massa MALDI-TOF representativos de extratos aquosos de folhas de plantas obtidos em modo refletido negativo na faixa m/z 100-1200 que não formaram AgNPs (Baru) ou que formaram AgNPs (Pequi). Setas indicam íons diferenciais presentes nas espécies.....	99
<b>Figura III 13.</b> Representação em forma de gel dos espectros de massa MALDI-TOF dos 90 extratos aquosos obtidos a partir de folhas de plantas do Cerrado em modo refletido positivo na faixa m/z 100-1200. ....	101
<b>Figura III 14.</b> Representação em forma de gel dos espectros de massa MALDI-TOF de extratos aquosos obtidos a partir de folhas de plantas do Cerrado em modo refletido negativo na faixa m/z 100-1200. ....	102
<b>Figura III 15.</b> Dendrograma obtido a partir do agrupamento de espectros de massa adquiridos em modo refletido positivo referentes aos perfis moleculares dos diferentes extratos aquosos de folhas das plantas do Cerrado. ....	104
<b>Figura III 16.</b> Dendrograma obtido a partir do agrupamento de espectros de massa adquiridos em modo refletido negativo referentes aos perfis moleculares dos diferentes extratos aquosos de folhas das plantas do Cerrado. ....	104

#### CAPÍTULO IV

<b>Figura IV 1.</b> Representação esquemática dos critérios utilizados para a escolha racional de uma das plantas, entre as noventa espécies de plantas presentes no Cerrado, para a realização de uma avaliação sistemática e aprofundada.....	115
<b>Figura IV 2.</b> Representação esquemática das etapas metodológicas utilizadas no presente Capítulo IV.....	117
<b>Figura IV 3.</b> Fotografia dos poços de microplaca de poliestireno de fundo chato contendo extrato aquoso das folhas de <i>C. brasiliense</i> (CbC - esquerda) em concentrações variadas e meios reacionais contendo extrato aquoso e $\text{AgNO}_3$ a 1 mM após incubação a 25°C por 24 h (AgNPs-CbC) (A). Fotografia de béqueres contendo extrato aquoso de folhas de <i>C. brasiliense</i> (CbC - esquerda) e meio reacional contendo extrato aquoso a 1 mg/mL e $\text{AgNO}_3$ a 1 mM após incubação por 2,5 h à 75°C (AgNPs-CbC) (B).....	119
<b>Figura IV 4.</b> Cinéticas de formação das AgNPs-CbC por 24 h a 25°C em diferentes concentrações de extrato aquoso (A) e por 2,5 h a 75°C (B). Espectros de absorção	

na região do visível após o processo de síntese por 24 h a 25°C (C) e por 2,5 h a 75°C (D). .....	120
<b>Figura IV 5.</b> Histogramas representando o diâmetro hidrodinâmico médio (A), índice de polidispersividade (PdI) (B) e potencial Zeta de superfície (C) das AgNPs sintetizadas por rota de síntese verde utilizando concentrações variadas de extrato aquoso de folhas de pequi a 25°C.....	122
<b>Figura IV 6.</b> Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico (em número) obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) a partir das análises das suspensões coloidais de AgNPs sintetizadas com 1 mg/mL de CbC a 25 ou 75°C. ....	123
<b>Figura IV 7.</b> Representações visuais dos béqueres contendo as reações de síntese das AgNPs-CbC considerando a possível variação fenotípica (A). Cinéticas de formação das AgNPs-CbC sintetizadas no mesmo dia com extratos aquosos de folhas provenientes de plantas distintas utilizando 1 mg/mL de CbC e 1 mM de AgNO <sub>3</sub> a 75°C por 2,5 h (B). Espectros de absorção na região do visível das AgNPs-CbC sintetizadas no mesmo dia com extratos aquosos de folhas provenientes de plantas distintas (C). Onde $\triangle$ taxa de formação com base na inclinação da curva.....	125
<b>Figura IV 8.</b> Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico (em número) obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) a partir das análises das AgNPs-CbC sintetizadas utilizando folhas oriundas de diferentes plantas de pequi.....	126
<b>Figura IV 9.</b> Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico (em número) obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) a partir das análises de AgNPs-CbC sintetizadas a partir de 1 mM de AgNO <sub>3</sub> utilizando 1 mg/mL de CbCs, provenientes de diferentes direções de uma mesma planta, a 75°C por 2,5 h.....	128
<b>Figura IV 10.</b> Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico (em número) obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) a partir das análises das AgNPs-CbC sintetizadas em 10 dias distintos (lotes) com 1 mM de AgNO <sub>3</sub> e utilizando 1 mg/mL de CbC a 75°C por 2,5 h. ....	130
<b>Figura IV 11.</b> Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico (em número) obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) a partir das análises de monitoramento das AgNPs-CbC sintetizadas à temperatura de 75°C com CbC a 1 mg/mL e armazenadas a 4°C (A) e 25°C (B) durante 0, 7, 14 ou 30 dias.....	131
<b>Figura IV 12.</b> Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico (em número) obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) a partir das análises de monitoramento das AgNPs-CbC após 24 h e 1,5 anos de armazenamento a 4°C.	132
<b>Figura IV 13.</b> Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico (em número) obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) a partir das análises de monitoramento das AgNPs-CbC após processo de liofilização e reconstituição em água ultrapura com o mesmo volume inicial (A) e volume 10× menor para aumento de concentração (B).....	134
<b>Figura IV 14.</b> Escalonamento da rota de síntese de AgNPs-CbC. Fotografias de béqueres após as reações de síntese das AgNPs-CbC em diferentes volumes de	



reação (A). Cinéticas de formação (B) e espectros de absorção (C) das AgNPs-CbC sintetizadas em diferentes volumes reacionais com as demais condições de ensaio sendo mantidas. Onde $\triangle$ indica taxa de formação com base na inclinação da curva.....	135
<b>Figura IV 15.</b> Imagens fotográficas do processo de síntese de AgNPs-CbC utilizando sistema de microfluídica em fluxo contínuo a 25°C por 2,5 h. 0 (A) e 2,5 h (B)..	137
<b>Figura IV 16.</b> Espectro de absorção na região do visível após o processo de síntese utilizando sistema de microfluídica em fluxo contínuo a 25°C por 2,5 h (A). Curva de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico (em número) obtida por espalhamento de luz dinâmico (DLS) a partir das análises das suspensões de AgNPs-CbC sintetizadas utilizando sistema de microfluídica em fluxo contínuo a 25°C por 2,5 h (B). .....	137
<b>Figura IV 17.</b> Avaliação da cinética de dissolução das AgNPs-CbC utilizando diferentes concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> como agente oxidante por 5 min.....	138
<b>Figura IV 18.</b> Cinética de dissolução de AgNPs-CbC utilizando H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> à 0,004% por 1 h. Os valores apresentados na área do gráfico representam as taxas de dissolução observadas. ....	139
<b>Figura IV 19.</b> Fotomicrografias representativas obtidas a partir de análises por microscopia eletrônica de transmissão das AgNPs-CbC sintetizadas utilizando 1 mg/mL de extrato aquoso de folhas e 1 mM de AgNO <sub>3</sub> submetidos à temperatura de 75°C por 2,5 h.....	140
<b>Figura IV 20.</b> Imagens topográficas (A) e histogramas de distribuição de classes com ajuste para distribuição gaussiana (B) referentes aos valores de altura obtidos por microscopia de força atômica das AgNPs-CbC sintetizadas utilizando 1 mg/mL de extrato aquoso e 1 mM de AgNO <sub>3</sub> submetidos a temperatura de 75°C por 2,5 h.	140
<b>Figura IV 21.</b> Ação antioxidante do extrato CbC pelo método DPPH: Branco metanol (A1-2), metanol + água (A3-4), DPPH metanol (B1-2), DPPH metanol + água (B3-4), extrato pequi (C1), DPPH + extrato pequi (C2-4).....	141
<b>Figura IV 22.</b> Espectros obtidos por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) de AgNPs-CbC e CbC a 1 mg/mL. ....	143
<b>Figura IV 23.</b> Espectros obtidos por espectroscopia Raman de AgNPs-CbC e CbC a 1 mg/mL utilizando laser de 532 nm no intervalo de 300 a 2800 cm <sup>-1</sup> (A) e laser de 785 nm (B) no intervalo de 300 a 1700 cm <sup>-1</sup> . ....	146
<b>Figura IV 24.</b> Espectros de massa MALDI-TOF adquiridos em modo refletido positivo dos perfis de baixa massa molecular de AgNPs-CbC e CbC.....	147
<b>Figura IV 25.</b> Representações 2D e 3D dos íons detectados a partir das análises de LC-MS do extrato CbC. Foram excluídos os calibrantes internos, assim como os componentes moleculares detectados antes do início do gradiente de eluição (antes de 0,3 min) e íons contaminantes que foram detectados (após 10 min).....	149
<b>Figura IV 26.</b> Histograma de distribuição em intervalos de classes do número de componentes detectados nos tempos de retenção dos componentes moleculares detectados por LC-MS de CbC (A). Histograma de distribuição em intervalos de	

classes do número de componentes moleculares detectados nas razões m/z de CbC (B).....	150
<b>Figura IV 27.</b> Perfil cromatográfico com base na intensidade dos componentes moleculares detectados com sinais mais intensos (picos base) presentes no extrato aquoso de folhas de <i>C. brasiliense</i> (A) fracionados em coluna C <sub>18</sub> sob fluxo de 0,2 mL/min de ACN + 1% de ácido fórmico. Os números marcam os picos correspondentes às frações contendo os componentes moleculares posteriormente identificados com a massa acurada (exata) obtida por meio de espectrometria de massa em ultra alta resolução.....	151
<b>Figura IV 28.</b> Estruturas químicas dos componentes moleculares identificados no extrato CbC por busca das massas moleculares determinadas por LC-MS em bancos de dados.....	153
<b>Figura IV 29.</b> Fotografia de béqueres contendo CbC e AuCl <sub>3</sub> , CbC e AuCl <sub>3</sub> após incubação por 1,5 h à 75°C (A). Cinéticas de formação das AuNPs-CbC por 1,5 h a 75°C (B). Curvas de absorção na região do visível após o processo de síntese por 1,5 h a 75°C (C). Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico (em número) obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) a partir das análises das suspensões de AuNPs-CbC (D). .....	156
<b>Figura IV 30.</b> Avaliação da viabilidade de fibroblastos murinos (NIH3T3) pelo ensaio de MTT após 24 h de exposição a AgNPs-CbC, CbC e Ag <sup>+</sup> livre <i>in vitro</i> . *Diferença estatisticamente significativa (P < 0,05) em relação ao controle (100% de viabilidade). Valores representados como a média ± erro padrão da média. ...	160
<b>Figura IV 31.</b> Avaliação da viabilidade de macrófagos peritoneais murinos (C57Bl/6) pelo ensaio de MTT após 24 h de exposição a AgNPs-CbC, CbC e Ag <sup>+</sup> livre em diferentes concentrações <i>in vitro</i> . *Diferença estatisticamente significativa (P < 0,05) em relação ao controle (100% de viabilidade). Valores representados como a média ± erro padrão da média, referentes a triplicatas experimentais. ....	161
<b>Figura IV 32.</b> Avaliação da viabilidade de células de câncer de mama murino (4T1) e humano (MCF-7) pelo ensaio de MTT após 24 h de exposição a AgNPs-CbC, CbC (100 µM) e Ag <sup>+</sup> livre (100 µM) em diferentes concentrações <i>in vitro</i> . *Diferença estatisticamente significativa (P < 0,05) em relação ao controle (100% de viabilidade). Valores representados como a média ± erro padrão da média.....	162
<b>Figura IV 33.</b> Avaliação do percentual de hemólise avaliado em ensaio com hemácias de camundongos após exposição à AgNPs-CbC, CbC e Ag <sup>+</sup> livre <i>in vitro</i> . Valores representados como a média ± erro padrão da média de triplicatas.....	163
<b>Figura IV 34.</b> Viabilidade de nematoides <i>Caenorhabditis elegans</i> após exposição por 24 h a AgNPs-CbC, CbC e AgNO <sub>3</sub> . Diferença estatisticamente significativa (P < 0,05) em relação ao controle (*) e CbC (#). Valores representados como a média ± erro padrão da média de triplicatas. ....	164
<b>Figura IV 35.</b> Percentual de indivíduos de <i>Meloidogyne incognita</i> vivos após ensaio de recuperação por 24 h após a exposição às AgNPs-CbC, CbC e AgNO <sub>3</sub> por 24 h em três diferentes concentrações. Diferença estatisticamente significativa (P < 0,05) em	

- relação ao controle (\*) e prata livre (#). Valores representados como a média  $\pm$  erro padrão da média de triplicatas com 60 animais cada. .... 165
- Figura IV 36.** Imagens fotográficas em microscopia de luz de nematoides *Meloidogyne incognita* após exposição a diferentes concentrações de AgNPs-CbC, AgNO<sub>3</sub> e CbC por 24 h *in vitro*. Barra = 25  $\mu$ m. .... 166
- Figura IV 37.** Avaliação da viabilidade de células ovarianas isoladas de *Spodoptera frugiperda* (Sf21) pelo ensaio de MTT após 24 h de exposição à AgNPs-CbC, CbC e Ag<sup>+</sup> livre *in vitro*. \*Diferença estatisticamente significativa (P < 0,05) em relação ao controle (100% de viabilidade); #<sup>s</sup>Diferença estatisticamente significativa em relação às concentrações de 100 e 50  $\mu$ M. Valores representados como a média  $\pm$  erro padrão da média. .... 167
- Figura IV 38.** Taxa de germinação de sementes de *N. tabacum* após exposição às AgNPs-CbC, CbC e AgNO<sub>3</sub> à 100  $\mu$ M. .... 168
- Figura IV 39.** Imagens fotográficas das sementes submetidas à exposição com as AgNPs-CbC (A), AgNO<sub>3</sub> (B), CbC (C) e H<sub>2</sub>O (D) após o processo de germinação. .... 168
- Figura IV 40.** Representação esquemática da síntese verde de nanopartículas metálicas via redução química de íons prata (Ag<sup>+</sup>) a prata zerovalente (Ag<sup>0</sup>) utilizando extrato aquoso de folhas de *C. brasiliense* em microtubos de polipropileno (A). Taxa de inibição de crescimento de leveduras *C. albicans* em microtubos de polipropileno com AgNPs-CbC imobilizadas após 24 h. .... 170
- Figura IV 41.** Parâmetros morfométricos médios de folhas (A-B) e caule (C-D), onde folha inferior, folha média e folha superior são representadas por Fi, Fm e Fs, respectivamente, *in vitro* após exposição à 2 mL de AgNPs-CbC, CbC ou AgNO<sub>3</sub> na concentração de 100  $\mu$ M, por 21 dias. Valores representados como a média  $\pm$  erro padrão da média, n = 4 para folhas e n = 2 para caule. Diferença estatisticamente significativa (P < 0,05) em relação controle (\*). .... 172
- Figura IV 42.** Análises quantitativa do teor de clorofila total, clorofilas a e b (A) e peroxidação lipídica (B) de folhas de plantas *Nicotiana tabacum* *in vitro* após exposição a 2 mL das AgNPs-CbC, CbC e AgNO<sub>3</sub> na concentração de 100  $\mu$ M, por 21 dias, sendo CT (clorofila total), CCa (clorofila a) e CCb (clorofila b). .... 174
- Figura IV 43.** Parâmetros morfométricos médios de folhas (A-B), caule, raiz e planta inteira (C), onde CTP refere-se a comprimento total da planta e V3 e V6 referem-se aos estádios foliares 3 e 6, respectivamente. Imagens fotográficas das plantas após 14 dias de inoculação de 10 mL à 100  $\mu$ M das amostras AgNPs-CbC (a), CbC (b), AgNO<sub>3</sub> (c) e H<sub>2</sub>O (d). Valores representados como a média  $\pm$  erro padrão da média, n = 6 para folhas e n = 3 para caule e raiz. Barra de escala: 6 cm. .... 175
- Figura IV 44.** Análises quantitativas do teor de clorofila total e clorofilas a e b (A) e peroxidação lipídica (B) de plantas *Nicotiana tabacum* *in vivo* após exposição de 10 mL a 100  $\mu$ M das amostras AgNPs-CbC, CbC e AgNO<sub>3</sub> por 14 dias, sendo CT (clorofila total), CCa (clorofila a) e CCb (clorofila b). \*Diferença estatisticamente significativa (P < 0,05) em relação ao controle. .... 176

- Figura IV 45.** Imagens fotográficas das plantas infestadas com *M. incognita* após 45 dias de tratamento com 10 mL na concentração de 100  $\mu$ M de AgNPs-CbC (a), CbC (b), AgNO<sub>3</sub> (c) e H<sub>2</sub>O (d), e plantas controle sem nematoides (E). Parâmetros morfométricos médios de caule, raiz e planta inteira (C), onde CT refere-se a comprimento total da planta. Valores representados como a média  $\pm$  erro padrão da média, n = 5. Diferença estatisticamente significativa (P < 0,05) em relação controle (\*). ..... 177
- Figura IV 46.** Análise quantitativa do teor de clorofila total e clorofilas a e b (A) e peroxidação lipídica (B) de plantas *Nicotiana tabacum* infestadas com nematoide *M. incognita in vivo* após exposição às AgNPs-CbC, CbC, AgNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O por 45 dias, sendo CT (clorofila total), CCa (clorofila a) e CCb (clorofila b), e controle a plantas que não sofreram infestação..... 178
- Figura IV 47.** Análise quantitativa do número de ovos obtidos a partir da extração radicular de plantas *Nicotiana tabacum in vivo* após exposição às AgNPs-CbC, CbC, AgNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O por 45 dias (A). Análise quantitativa do número de juvenis de segundo estágio (J2) obtidos a partir da eclosão dos ovos extraídos de plantas *Nicotiana tabacum in vivo* após exposição às AgNPs-CbC, CbC, AgNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O por 45 dias (B). N = 6 plantas por grupo. Diferença estatisticamente significativa (P < 0,05) em relação controle (\*). ..... 179
- Figura IV 48.** Imagens histológicas dos fígados de camundongos (C57Bl/6) 24 h após a administração intravenosa de 64  $\mu$ M das AgNPs-CbC (A-C), CbC (D-F), AgNO<sub>3</sub> (G-I) e H<sub>2</sub>O (J-L), e do grupo controle sem tratamento (M-N). Nas secções são observadas cápsulas íntegras (cp) e regiões parenquimatosas preservadas (A, D, G, J, M), contendo veias centro lobulares (vc), hepatócitos (seta pequena) e capilares sinusoides (cabeça de seta) (B-C, E-F, H-I, K-L, N-O), e a presença de pequenos infiltrados inflamatórios (setas grandes) nos grupos AgNPs-CbC (C), CbC (F) e AgNO<sub>3</sub> (I). Coloração: H & E. Barra de escala = 50  $\mu$ m. Espessura dos cortes = 5  $\mu$ m. .... 187
- Figura IV 49.** Imagens histológicas dos baços de camundongos (C57Bl/6) 24 h após a administração intravenosa de 64  $\mu$ M das AgNPs-CbC (A-C), CbC (D-F), AgNO<sub>3</sub> (G-I) e H<sub>2</sub>O (J-L), e do grupo controle sem tratamento (M-N). Nas secções são observadas cápsulas íntegras (cp) (A, D, G, J, M), regiões parenquimatosas divididas em polpas brancas (pb) e vermelhas (pv) (B-C, E-F, H-I, K-L, N-O) sem indicativo de alterações morfológicas. Coloração: H&E. Barra de escala = 50  $\mu$ m. Espessura dos cortes = 5  $\mu$ m. .... 189
- Figura IV 50.** Imagens histológicas dos rins de camundongos (C57Bl/6) 24 h após a administração intravenosa de 64  $\mu$ M das AgNPs-CbC (A-C), CbC (D-F), AgNO<sub>3</sub> (G-I) e H<sub>2</sub>O (J-L), e do grupo controle sem tratamento (M-N). Nas secções são observadas cápsulas íntegras (cp) e zonas corticais (zc) preservadas (A, D, G, J, M). Na zona cortical é possível observar corpúsculos renais, túbulos contorcidos distais (seta grande) e túbulo contorcido proximal (seta pequena) com características preservadas (B-C, E-F, H-I, K-L, N-O) sem indicativo de alterações morfológicas. Coloração: H & E. Barra de escala = 50  $\mu$ m. Espessura dos cortes = 5  $\mu$ m. .... 191

**Figura IV 51.** Imagens histológicas dos pulmões de camundongos (C57Bl/6) 24 h após a administração intravenosa de 64  $\mu$ M das AgNPs-CbC (A-C), CbC (D-F), AgNO<sub>3</sub> (G-I) e H<sub>2</sub>O (J-L), e do grupo controle sem tratamento (M-N). Nas secções foram observados sacos alveolares (sa), bronquíolos (bq) e capilares (seta) com características preservadas para todos os grupos (B-C, E-F, H-I, K-L, N-O) Coloração: H & E. Barra de escala = 50  $\mu$ m. Espessura dos cortes = 5  $\mu$ m. .... 193

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

- Tabela I 1.** Relação das plantas do Cerrado coletadas no Estado de Goiás - Brasil e utilizadas para síntese de nanopartículas de prata. .... 29
- Tabela I 2.** Especificações do tipo de metodologia utilizada pelo laboratório de análises clínicas Sabin para avaliar os parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue dos animais. .... 53

### CAPÍTULO III

- Tabela III 1.** Características físico-químicas das AgNPs sintetizadas utilizando 90 extratos aquosos obtidos a partir de folhas de plantas do Cerrado. Índice de polidispersividade (PdI). Valores referentes às médias e desvios padrão da média de três leituras independentes. .... 90
- Tabela III 2.** Concentração inibitória mínima (MIC) das AgNPs contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Valores representados a condição na qual ocorreu a inibição em pelo menos duas réplicas. N/A: Nenhuma Atividade. .... 107

### CAPÍTULO IV

- Tabela IV 1.** Características físico-químicas das AgNPs-CbC sintetizadas utilizando 1 mg/mL de CbC e 1 mM de AgNO<sub>3</sub> à 25°C por 24 h e à 75°C por 2,5 h. Índice de polidispersividade (PdI). Valores referentes às médias e desvios padrão da média de três leituras independentes. .... 123
- Tabela IV 2.** Características físico-químicas das AgNPs-CbC sintetizadas no mesmo dia com extratos aquosos de folhas provenientes de plantas distintas utilizando 1 mg/mL de CbC e 1 mM de AgNO<sub>3</sub> a 75°C por 2,5 h. Índice de polidispersividade (PdI). Valores referentes às médias e desvios padrão da média de três leituras independentes. Diferença estatisticamente significativa em relação à planta 1 (\*), planta 2 (<sup>s</sup>), planta 3 (<sup>&</sup>) e planta 4 (<sup>#</sup>). .... 126
- Tabela IV 3.** Características físico-químicas das AgNPs-CbC sintetizadas com 1 mM de AgNO<sub>3</sub> e utilizando CbC a 1 mg/mL produzido a partir de folhas de pequi coletadas em diferentes direções da planta (norte, sul, leste e oeste). Diferença estatisticamente significativa em relação a norte (\*), sul (<sup>s</sup>) e leste (<sup>&</sup>). .... 128
- Tabela IV 4.** Características físico-químicas das AgNPs-CbC sintetizadas em 10 dias distintos com AgNO<sub>3</sub> a 1 mM e utilizando 1 mg/mL de CbC a 75°C por 2,5 h. Índice de polidispersividade (PdI). .... 130
- Tabela IV 5.** Características físico-químicas das AgNPs-CbC obtidas por meio de processo de escalonamento. Valores referentes às médias e desvios padrão da média de três leituras independentes. Diferença estatisticamente significativa (P < 0,05) em relação à síntese de 5 mL (\*) e 10 mL (<sup>s</sup>). Índice de polidispersividade (PdI). .... 136

<b>Tabela IV 6.</b> Sumarização das bandas de absorção identificadas a partir das análises de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	144
<b>Tabela IV 7.</b> Sumarização das bandas de absorção identificadas a partir das análises de espectroscopia Raman.....	145
<b>Tabela IV 8.</b> Componentes moleculares majoritariamente detectados em extrato aquoso das folhas de pequi (CbC) utilizando cromatografia líquida ultrarrápida em fase reversa acoplada a espectrometria de massa em ultra alta resolução em modo positivo e ranqueados em ordem decrescente de intensidade relativa. m/z = razão massa/carga; TR = Tempo de retenção; $\Delta$ m/z = variação de massa molecular entre a massa acurada (experimental) e a massa exata (calculada).....	152
<b>Tabela IV 9.</b> Concentração inibitória mínima (MIC) das AgNPs-CbC, AgNO <sub>3</sub> e CbC contra <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>C. albicans</i> . Valores representados a condição na qual ocorreu a inibição em pelo menos duas réplicas. N/A: Nenhuma Atividade.....	159
<b>Tabela IV 10.</b> Análise dos parâmetros hematológicos (série vermelha) dos camundongos (C57Bl/6) 24 h após a administração intravenosa das AgNPs-CbC, CbC, AgNO <sub>3</sub> e H <sub>2</sub> O. Valores representados como a média $\pm$ erro padrão da média, n = 5.....	182
<b>Tabela IV 11.</b> Análise dos parâmetros hematológicos (série branca) dos camundongos (C57Bl/6) 24 h após a administração intravenosa das AgNPs-CbC, CbC, AgNO <sub>3</sub> e H <sub>2</sub> O. Valores representados como a média $\pm$ erro padrão da média, n = 5.....	182
<b>Tabela IV 12.</b> Análise dos parâmetros bioquímicos obtidos a partir de soro sanguíneo dos camundongos (C57Bl/6) 24 h após a administração intravenosa das AgNPs-CbC, CbC, AgNO <sub>3</sub> e H <sub>2</sub> O. Valores representados como a média $\pm$ erro padrão da média, n = 5.....	184
<b>Tabela IV 13.</b> Análise dos parâmetros bioquímicos obtidos a partir de soro sanguíneo dos camundongos (C57Bl/6) 24 h após a administração intravenosa das AgNPs-CbC, CbC, AgNO <sub>3</sub> e H <sub>2</sub> O. Valores representados como a média $\pm$ erro padrão da média, n = 5.....	184
<b>Tabela IV 14.</b> Sumarização dos resultados obtidos referentes às diferentes condições de sínteses das AgNPs-CbC com extrato aquoso de folhas de <i>Caryocar brasiliense</i> . .....	195
<b>Tabela IV 15.</b> Sumarização dos resultados obtidos referentes aos ensaios de atividade biológica in vitro com as AgNPs-CbC sintetizadas utilizando extrato aquoso de folhas de <i>Caryocar brasiliense</i> . .....	196
<b>Tabela IV 16.</b> Sumarização dos resultados obtidos referentes aos ensaios de atividade biológica in vivo com as AgNPs-CbC sintetizadas utilizando extrato aquoso de folhas de <i>Caryocar brasiliense</i> .....	197

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 4T1 - Linhagem de células de câncer de mama murino
- AgMP - Micropartícula de prata
- AgNP - Nanopartícula de prata
- AgNPs-CbC - Nanopartículas de prata sintetizadas com extrato aquoso de folhas de *Caryocar brasiliense* (Pequi)
- AgNPs-CsC - Nanopartículas de prata sintetizadas com extrato aquoso de castanhas de *Anacardium othonianum* Rizz (cajuzinho de árvore do Cerrado)
- ALT - Aspartato aminotransferase
- ANOVA - Análise de variância de um fator
- AST - Alanina aminotransferase
- CbC - Extrato aquoso de folhas de *Caryocar brasiliense* (pequi)
- CCa - Concentração de clorofila a
- CCb - Concentração de clorofila b
- CE - Condutividade elétrica
- CF - Comprimento da folha
- CGEN - Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
- CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular média
- CHP - Hidroperóxido cumeno
- CsC - Extrato aquoso de castanhas de *Anacardium othonianum* Rizz (cajuzinho de árvore do cerrado)
- CPA - Comprimento da parte aérea
- CR - Comprimento da raiz
- CT - Concentração total de clorofila
- CTP - Comprimento total da planta
- DBIL - Bilirrubina direta
- DLS - Espalhamento de luz dinâmico
- DMEM - Meio Eagle Modificado por Dulbecco
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DPPH - Radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
- DPM - Desvio padrão da média
- EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético



Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
EPIs - Equipamentos de proteção individual  
EPM - Erro padrão da média  
EROs - Espécies reativas de oxigênio  
EV - Estádios vegetativos  
Fi - Folha inferior  
Fm - Folha média  
FTIR - Infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared*)  
Fs - Folha superior  
GGT - Gama glutamil transpeptidase  
HCM - Hemoglobina corpuscular média  
HDL - Lipoproteínas de alta densidade  
IBIL - Bilirrubina indireta  
IF - Infiltrado no fígado  
KBr - Brometo de potássio  
LB - Luria-Bertani (meio de cultura)  
LDL - Lipoproteínas de baixa densidade  
LF - Largura da folha  
MALDI-TOF - Espectrometria de massa por ionização/dessorção de matriz assistida por laser com separação por tempo de voo  
MCF-7 - Câncer de mama humano  
MET - Microscopia eletrônica de transmissão  
MFA - Microscopia de força atômica  
MIC - Concentração inibitória mínima  
MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio  
m/z - Razão massa/carga  
NIH3T3 - Linhagem de células de fibroblasto murino  
NPM - Nanopartícula metálica  
NSF - *National Science Foundation*  
NST - *Nano Separation Technologies*  
OD - Densidade óptica  
PBS - Tampão fosfato-salina  
PdI - Índice de polidispersividade (*Polydispersity Index*)

pH - Atividade do íon hidroxônio

ppm - Partes por milhão

rpm - Rotação por minuto

RPMI - Meio de cultivo desenvolvido por Moore no Roswell Park Memorial Institute

SA - Sem alteração

Sf21 - Células ovarianas isoladas de *Spodoptera frugiperda*

TBIL - Bilirrubina total

TNM-FH - Meio de cultivo para células de inseto

TR - Tempo de retenção em minutos

tpp - *Techno Plastic Products*

UFC - Unidade formadora de colônia

UFG - Universidade Federal de Goiás

UFLC- Cromatografia ultrarrápida acoplada a espectrometria de massa

UHR MS - Espectrometria de massa de ultra alta resolução

UnB - Universidade de Brasília

UV - Ultravioleta

VCM - Volume corpuscular médio

Vis - Visível

\* As formas pluralizadas de cada um dos termos abreviados são mostradas nessa Tese pela adição de um "s" após a abreviação.

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	5
CAPÍTULO I.....	7
SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS POR PLANTAS: TENDÊNCIAS ATUAIS E DESAFIOS.....	7
RESUMO .....	8
INTRODUÇÃO.....	9
Nanopartículas metálicas .....	9
Nanotecnologia Verde .....	10
Síntese Verde de NPMs utilizando plantas.....	11
Tendência atual na síntese verde de NPMs utilizando plantas .....	12
Principais desafios na síntese verde utilizando plantas .....	14
Nanotoxicologia.....	16
Plantas do bioma Cerrado .....	18
Nanopartículas de Prata (AgNPs).....	19
JUSTIFICATIVA/HIPÓTESE.....	20
OBJETIVOS DA TESE .....	23
Objetivo Geral.....	23
Objetivos Específicos .....	23
MATERIAL E MÉTODOS.....	24
1. Equipamentos, materiais e reagentes utilizados .....	24
Equipamentos .....	24
Materiais.....	25
Reagentes .....	26
2. Material Vegetal .....	27
2.1. Coleta do material .....	27
2.2. Preparação dos extratos aquosos.....	31
3. Síntese de nanopartículas de prata.....	32
3.1. Síntese de nanopartículas de prata .....	32
3.2. Escalonamento da síntese das AgNPs-CbC .....	32
3.4. Avaliação da estabilidade coloidal das AgNPs-CbC .....	33
3.5. Liofilização e reconstituição das AgNPs-CbC.....	33
3.6. Perfil de dissolução das AgNPs-CbC.....	33
4. Caracterização físico-química e estrutural .....	34
4.1. Análise espectrofotométrica - Curvas de formação .....	34
4.3. Análise de condutividade elétrica .....	35
4.4. Análise por espalhamento de luz dinâmico e Potencial Zeta de superfície .	35
4.5. Microscopia de força atômica (MFA).....	36
4.6. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) .....	36
4.8. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)....	37
4.9. Espectroscopia Raman .....	38
4.10. Análise de perfis moleculares por espectrometria de massa MALDI-TOF .	38

4.11. Identificação de componentes moleculares por meio de UFLC-UHR-QqTOF MS (Cromatografia ultrarrápida acoplada a espectrometria de massa de ultra alta resolução) .....	39
5. Avaliação de toxicidade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	41
5.1. Toxicidade <i>in vitro</i> .....	41
5.1.1. Toxicidade em leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	41
5.1.2. Concentração mínima inibitória (MIC) .....	42
5.1.3. Toxicidade em células de mamíferos normais e tumorais .....	43
5.1.4. Toxicidade em células sanguíneas de mamífero - Hemólise .....	44
5.1.5. Viabilidade de <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	44
5.1.6. Toxicidade em <i>Meloidogyne incognita</i> .....	45
5.1.7. Toxicidade em células de inseto.....	46
5.1.8. Toxicidade em sementes de tabaco .....	47
5.1.9. Toxicidade em plantas de tabaco .....	47
5.2. Toxicidade <i>in vivo</i> .....	48
5.2.1. Toxicidade em plantas de tabaco.....	48
5.2.2. Avaliação bioquímica .....	48
5.2.2.1. Quantificação de carotenoides e clorofila .....	48
5.2.2.2. Peroxidação lipídica .....	49
Atividade nematicida em <i>Meloidogyne incognita in vivo</i> .....	50
5.2.3. Controle de nematoides <i>Meloidogyne incognita in vivo</i> .....	50
5.2.4. Toxicidade em camundongos .....	51
5.2.4.1. Avaliação hematológica e bioquímica.....	52
5.2.4.2. Avaliação histológica .....	53
6. Análise dos dados .....	54
CAPÍTULO II.....	55
SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA UTILIZANDO EXTRATO AQUOSO DE CASTANHAS DE <i>ANACARDIUM OTHONIANUM</i> RIZZ (CAJUZINHO DE ÁRVORE DO CERRADO) .....	55
RESUMO .....	56
INTRODUÇÃO.....	57
OBJETIVOS .....	59
Objetivo Geral.....	59
Objetivos específicos .....	59
METODOLOGIA.....	60
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	61
Propriedades ópticas .....	61
Propriedades elétricas .....	64
Propriedades moleculares .....	68
Avaliação nanotoxicológica <i>in vitro</i> .....	71
CONCLUSÃO.....	73
CAPÍTULO III .....	74

SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA UTILIZANDO EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS DE PLANTAS DO BIOMA CERRADO BRASILEIRO ...	74
RESUMO .....	75
INTRODUÇÃO.....	76
OBJETIVOS.....	78
Objetivo Geral.....	78
Objetivos específicos .....	78
METODOLOGIA.....	79
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	80
Propriedades ópticas .....	80
Propriedades estruturais e elétricas.....	88
Plantas coletadas no período de seca .....	92
Avaliação do perfil molecular dos extratos das folhas coletadas no período de chuva .....	97
Avaliação nanotoxicológica.....	105
Perspectivas .....	109
CONCLUSÕES .....	110
CAPÍTULO IV .....	112
SÍNTESE VERDE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA UTILIZANDO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE <i>CARYOCAR BRASILIENSE</i> (PEQUI).....	112
RESUMO .....	113
INTRODUÇÃO.....	114
OBJETIVOS.....	116
Objetivo Geral.....	116
Objetivos Específicos .....	116
METODOLOGIA.....	117
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	118
Propriedades ópticas das AgNPs-CbC.....	118
Propriedades estruturais das AgNPs-CbC .....	120
Reprodutibilidade .....	124
Estabilidade .....	130
Dissolução das AgNPs-CbC .....	137
Propriedades morfológicas das AgNPs-CbC .....	139
Propriedades moleculares das AgNPs-CbC.....	141
Potencial antioxidante do extrato CbC .....	141
Identificação dos grupos funcionais das moléculas do extrato CbC.....	142
Perfis de componentes moleculares presentes nas AgNPs-CbC e CbC .....	146
Identificação dos principais componentes moleculares presentes no CbC.....	147
Síntese de nanopartículas de ouro.....	155
Avaliação nanotoxicológica das AgNPs-CbC .....	157
<i>In vitro</i> .....	157
Inibição de crescimento microbiano - Bactérias e leveduras .....	157

Viabilidade celular de fibroblastos e macrófagos .....	159
Viabilidade de células de câncer de mama murino e humano .....	161
Atividade hemolítica .....	162
Atividade contra nematoides .....	164
Atividade contra células de inseto (Sf21) .....	167
Imobilização de AgNPs-CbC na superfície de microtubos.....	169
Avaliação de toxicidade de AgNPs-CbC em plantas <i>Nicotiana tabacum in vitro</i>	171
Avaliação de toxicidade de AgNPs-CbC em plantas <i>Nicotiana tabacum in vivo</i> .	174
Avaliação da toxicidade de AgNPs-CbC em nematoides <i>in vivo</i> .....	176
Avaliação de toxicidade de AgNPs-CbC em camundongos <i>in vivo</i> .....	180
CONCLUSÃO.....	198
CRONOGRAMA DE ATIVIDADES REALIZADAS.....	201
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	202
ANEXO .....	223
Produção Científica.....	223

## APRESENTAÇÃO

Síntese verde constitui a designação comum dada às rotas de síntese que utilizam produtos químicos relativamente atóxicos, biodegradáveis e de custo baixo para sintetizar nanomateriais, em particular nanopartículas (NPs), tendo como fonte primária ou iniciador da rota algum organismo biológico ou parte dele. As plantas produzem uma grande variedade e abundância de substâncias que podem atuar na redução de íons metálicos e/ou na estabilização das superfícies de NPs, dentre eles aminoácidos, ácido cítrico, flavonoides, compostos fenólicos, terpenoides, compostos heterocíclicos, enzimas, peptídeos, polissacarídeos, saponinas e taninos. Diversas plantas têm sido utilizadas para síntese de nanopartículas metálicas (NPMs), dentre as quais estão as nanopartículas de prata (AgNPs), contudo esses estudos vêm sendo conduzidos de forma empírica e aleatória em todo mundo, não existindo evidências de avaliação sistemática comparativa entre grupos distintos de plantas.

O Cerrado brasileiro é um bioma reconhecido mundialmente por sua diversidade vegetal abundante, abrigando 11.627 espécies de plantas nativas já catalogadas (MMA, 2015). Essa biodiversidade resulta em perfis fitoquímicos potencialmente distintos de acordo com a espécie, e mesmo dentro da mesma espécie em órgãos diferentes e sob condições variadas (ex: estação de seca e chuva), os quais podem ser explorados de forma racional e sistemática na síntese de AgNPs. Sendo assim, o objetivo principal do presente estudo consistiu em avaliar o potencial de extratos aquosos obtidos a partir de diversas plantas do Cerrado brasileiro na síntese de micro- e nanopartículas de prata; e investigar as suas potenciais aplicações biotecnológicas com vistas a usos na agricultura, veterinária e biomedicina.

O presente documento de Tese foi dividido em 4 capítulos: no Capítulo I é apresentado o embasamento teórico e principais desafios encontrados na síntese verde de NPMs utilizando plantas e que resultou na publicação em coautoria de um capítulo de livro pela Editora Springer intitulado “*Green synthesis of metal nanoparticles by plants: current trends and challenges*” como parte do livro “*Green processes for nanotechnology: from inorganic to bioinspired nanomaterials*”, bem como a descrição de toda a metodologia utilizada nos demais capítulos é descrita; no Capítulo II é descrito a otimização de uma rota de síntese de AgNPs mediada pela variação de temperatura utilizando extrato de castanhas de cajuzinho-de-árvore do Cerrado e que

resultou na publicação do artigo intitulado “*Higher temperatures speed up the growth and control the size and optoelectrical properties of silver nanoparticles greenly synthesized by cashew nutshells*”; no Capítulo III é avaliado o potencial de extratos aquosos obtidos a partir das folhas de 90 diferentes espécies plantas endêmicas do Cerrado ou introduzidas nesse bioma, em sintetizar AgNPs; e por fim no Capítulo IV é descrita a síntese, caracterização e avaliação nanotoxicológica de AgNPs sintetizadas utilizando extrato aquoso das folhas de pequi (*Caryocar brasiliense*).



## **CAPÍTULO I**

### **Síntese verde de nanopartículas metálicas por plantas: tendências atuais e desafios**

## RESUMO

Atualmente, as nanopartículas metálicas (NPMs) têm sido amplamente utilizadas nas mais diferentes áreas devido às possibilidades de aplicações desse tipo de nanomaterial. As NPMs podem ser produzidas por sínteses física, química ou biológica (verde), sendo que o interesse na utilização desta última estratégia tem crescido nos últimos anos. A síntese verde é uma abordagem promissora no que diz respeito à síntese de NPMs e consiste na utilização de um organismo vivo e/ou partes dele na redução e estabilização de íons metálicos. As plantas provavelmente representam o grupo de organismos vivos mais utilizados em rotas de síntese verde de NPMs e diversas espécies têm sido utilizadas em todo mundo. Contudo, há carência na elaboração de um desenho racional e sistemático na escolha das plantas que é normalmente conduzida de forma empírica e aleatória para um número bastante restrito de espécies e com variadas condições de síntese e caracterização que inviabilizam comparações diretas. Dentre os diversos metais que podem ser utilizados na síntese de NPMs, a prata tem sido utilizada extensivamente devido ao seu alto potencial redutor e sua característica propriedade antimicrobiana. O presente capítulo tem como objetivo abordar os diversos fatores a serem considerados durante a síntese verde de NPMs, bem como chamar a atenção para os desafios atuais relacionados à síntese verde utilizando plantas, dentre os quais estão reprodutibilidade, escalonamento, nanotoxicologia e escolha da planta.

Palavras-chave: Nanopartículas metálicas, nanopartículas de prata, síntese verde, plantas, Cerrado, desafios e tendências.

# INTRODUÇÃO

## Nanopartículas metálicas

Nanopartículas metálicas (NPMs) são sistemas nanoestruturados que apresentam características físico-químico-biológicas únicas dependentes da sua composição, tamanho e forma. A maioria dessas características está intimamente relacionada com a dimensão diminuta quando comparado ao material na sua forma macroestruturada.

Dentre as aplicações de NPMs podem ser destacadas a entrega e liberação de drogas (fármacos, hormônios) e insumos agropecuários (fertilizantes, vacinas, pesticidas); utilização como agentes de contraste em diagnóstico; desenvolvimento de superfícies funcionais e sensores para diagnóstico e prognóstico de doenças; desenvolvimento de sistemas de transferência de genes; controle de microrganismos e de pragas; desenvolvimento de nanocatalisadores; e desenvolvimento de sistemas de biorremediação (Zhang et al., 2010; Jabir et al., 2012; Rai et al., 2012).

Numerosas técnicas têm sido utilizadas para a síntese de NPMs, incluindo métodos químicos (por exemplo, redução química, redução fotoquímica, coprecipitação, decomposição térmica e hidrólise) e métodos físicos (por exemplo, deposição de vapor, ablação por laser e moagem) a partir de sais metálicos (Iravani et al., 2013).

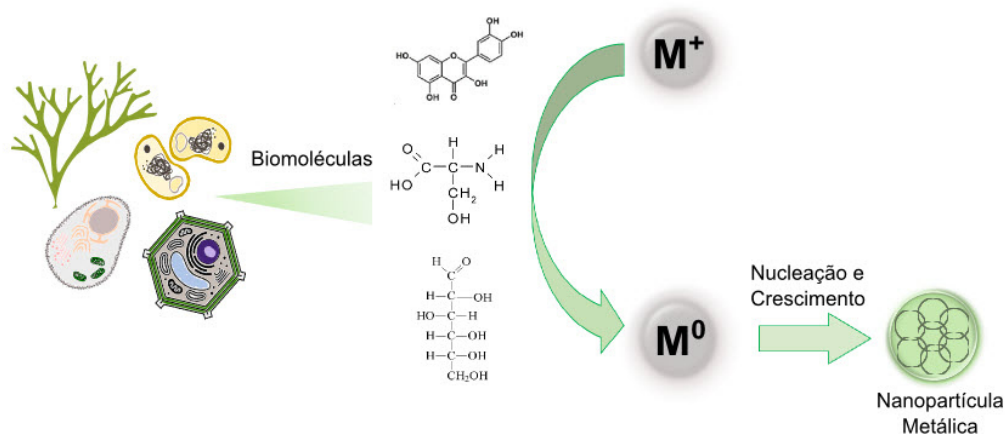
Geralmente, a síntese de NPMs por uma rota química envolve a redução de íons oriundos de um sal metálico em solução, na presença de uma base forte (agente redutor), como por exemplo, o hidróxido de sódio; seguido pela adição de um agente de estabilização, também chamado de agente de cobertura ou estabilizante, como por exemplo, o ácido cítrico (Murphy et al., 2005). Os reagentes utilizados como agentes redutores e os solventes utilizados para dissolver os estabilizantes são geralmente substâncias tóxicas que podem acarretar em efeitos adversos e prejudiciais à saúde e ao meio ambiente. Além disso, essas rotas geralmente são complexas, envolvem múltiplos passos e acarretam em um consumo de energia alto (Bystrzejewska-Piotrowska et al., 2009). Nesse sentido, faz-se necessário o desenvolvimento de procedimentos sustentáveis visando à obtenção de NPMs e uma abordagem promissora para alcançar este objetivo é explorar a vasta gama de recursos biológicos disponíveis em abundância na natureza por meio da utilização da chamada síntese verde ou síntese biológica (Mukherjee et al., 2001; Raveendran et al., 2003; Senapati et al., 2005; Shukla et al., 2008; Lee et al., 2010; Narayanan et al., 2011).

## Nanotecnologia Verde

A denominada tecnologia verde é uma abordagem em consonância com a preocupação recente com questões relacionadas à sustentabilidade e utiliza diferentes métodos e materiais que visam à geração de produtos com impacto ambiental reduzido associado a ganhos econômicos e sociais. Neste contexto, o uso da nanotecnologia verde consiste na utilização de princípios da química verde para aplicações nanotecnológicas, em particular mediante a aplicação de rotas de síntese verde para síntese de nanossistemas com ênfase em sustentabilidade dos processos desenvolvidos, sendo uma importante estratégia, pois utiliza sistemas biológicos sob a forma de biomassa para a síntese de nanodispositivos (Lloyd et al., 2011; Narayanan e Sakthivel, 2011).

Síntese verde constitui a designação comum dada às rotas de síntese que utilizam produtos químicos relativamente atóxicos, biodegradáveis e de custo baixo para sintetizar nanossistemas, como NPMs, e tendo como fonte primária ou iniciador da rota um organismo biológico ou alguma parte dele (Silva et al., 2015).

A síntese verde de NPMs pode ser realizada utilizando organismos procarióticos (Srivastava et al., 2013) ou eucarióticos (Quester et al., 2013) (incluindo plantas, animais e microrganismos) ou partes destes, sendo que a rota de síntese pode ocorrer intra- ou extracelularmente (Senapati et al., 2005; El-Said et al., 2014). Nesta abordagem de síntese, os componentes biológicos (metabólitos primários e secundários) atuam como agentes para promover a redução dos íons metálicos ( $M^+$ ) a metais na forma neutra ( $M^0$ ), resultando na formação de NPMs (Figura I 1). Além disso, as biomoléculas presentes no meio reacional também podem atuar como agentes estabilizantes e de revestimento/cobertura de superfície das NPMs (Figura I 1), impedindo ou pelo menos minimizando os processos de aglomeração e/ou agregação durante e ao término do processo de síntese (Iravani, 2011).



**Figura I 1.** Representação esquemática da síntese verde de nanopartículas metálicas via redução química de íons metálicos ( $M^+$ ) a metais zerovalentes ( $M^0$ ) utilizando organismos biológicos como agentes redutores. Fonte: Própria autora.

### Síntese Verde de NPMs utilizando plantas

Em geral, organismos vivos representantes de todos os reinos biológicos apresentam potencial para serem utilizados na síntese verde de NPMs, desde que apresentem composição bioquímica constituída por agentes biorredutores em potencial. As plantas são geralmente a primeira opção da maioria dos pesquisadores visando à síntese verde de NPMs devido à sua abundância de biomassa, diversidade de espécies e de seus repertórios moleculares (Jha et al., 2009; Kumar et al., 2009; Iravani, 2011).

As plantas utilizam metabólitos primários (nucleotídeos, aminoácidos, proteínas, carboidratos e lipídeos) e secundários (terpenoides, compostos fenólicos e nitrogenados) para vários aspectos relacionados às suas estratégias de sobrevivência (por exemplo, comportamento reprodutivo) e respostas fisiológicas a agentes estressores (por exemplo, resposta a herbívoros, patógenos e mudanças climáticas) (Taiz e Zeiger, 2010). Essas mesmas moléculas são geralmente as responsáveis por fazer das plantas alguns dos principais biorreatores e fornecedores de moléculas para as abordagens em síntese verde (Jha et al., 2009).

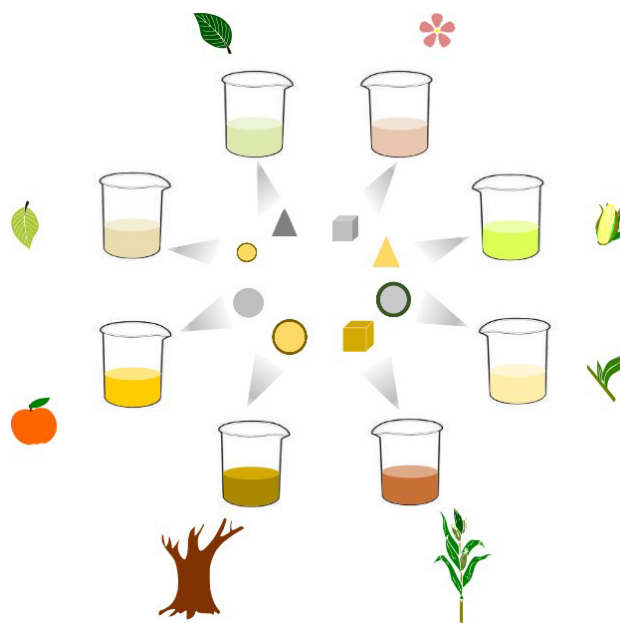
As plantas produzem uma grande variedade de metabólitos que podem atuar em sinergia na redução de íons metálicos e/ou na estabilização das superfícies de NPMs (Iravani, 2011). Acredita-se que os principais compostos responsáveis pela redução de íons metálicos pelas plantas são aminoácidos (Shao et al., 2004), ácido cítrico (Yehia et al., 2014), flavonoides (Shankar et al., 2003), compostos fenólicos (Sivaraman et al., 2009), terpenoides (Thakkar et al., 2010), compostos heterocíclicos (Huang et al.,

2011), enzimas (Narayanan et al., 2011), peptídeos (Tan et al., 2010), polissacarídeos (Park et al., 2011a), saponinas (Arunachalam et al., 2013) e taninos (Huang et al., 2011).

Durante a síntese verde de NPMs mediada por plantas são utilizados extratos de órgãos/tecidos ou organismos inteiros (Kumar et al., 2009; Marchiol, 2012). Um aspecto importante relativo à síntese verde de NPMs por plantas é o fato de que diferentes partes das plantas como folhas, sementes, cascas, raízes, frutos e outros, podem ser empregadas (Figura I 2). Além disso, a utilização de diferentes partes das plantas podem produzir NPMs com características distintas (Rai et al., 2008) (Kharissova et al., 2013), devido a seus perfis fitoquímicos específicos resultantes de diferentes composições e/ou concentrações associados às necessidades de cada tecido.

### **Tendência atual na síntese verde de NPMs utilizando plantas**

As rotas de síntese verde de NPMs são geralmente baseadas na utilização de extratos de plantas selecionadas empiricamente a partir da biodiversidade local, regional, nacional e/ou global. As partículas geralmente são sintetizadas utilizando extratos provenientes de diferentes espécies e/ou partes das plantas na presença de sais metálicos, resultando na produção de micro- e/ou nanoestruturas com diferentes composições, formas e tamanhos (Figura I 2).

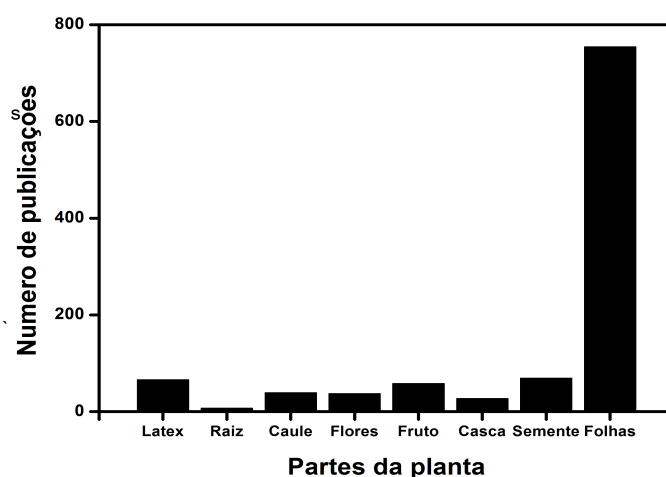


**Figura I 2.** Representação esquemática do resultado da síntese verde de nanopartículas metálicas utilizando extratos aquosos obtidos a partir de diferentes partes (tecidos) de variadas espécies de plantas e culminando com a possibilidade de produção de partículas com diferentes composições, formas e tamanhos. Fonte: Própria autora.

A maior parte das rotas de síntese de NPMs é baseada na redução de íons de metais nobres (Kumar et al., 2009; Song et al., 2009; Irvani, 2011; Vinod et al., 2011; Bonatto et al., 2014), incluindo prata (Ag), ouro (Au), platina (Pt) e cobre (Cu) (Zhang et al., 2011). Geralmente as NPMs formadas apresentam formato esférico (Bar et al., 2009; Smitha et al., 2009; Philip, 2010b; Bonatto et al., 2014) ou triangular (Chandran et al., 2006; Smitha et al., 2009), com tamanhos variando de 15 a 50 nm de diâmetro hidrodinâmico (Veeraputhiran, 2013).

Extratos de folhas tem sido a escolha mais comum para a realização de síntese verde dentre todas as partes vegetais (Irvani, 2011) (Figura I 3). Isso ocorre porque as folhas são abundantes, sua coleta comedida não é destrutiva e por serem compostas em grande parte por metabólitos que podem ser responsáveis pela síntese das NPMs.

Adicionalmente, a parte da planta, em associação com fatores como a época do ano ou o lugar da coleta da parte vegetal, bem como a presença de fatores estressores sejam eles abióticos (frio ou calor; oferta de água; presença de metais; ou pesticidas) ou bióticos (presença de pragas ou agentes patogênicos) podem influenciar na eficiência da síntese e consequentemente nas características finais das NPMs (Albernaz, 2014; Silva 2014). Contudo, a maioria desses fatores é negligenciada durante as etapas de síntese de NPMs dificultando a reprodutibilidade e o escalonamento de produção.



**Figura I 3.** Número de artigos publicados envolvendo síntese verde de nanopartículas metálicas utilizando diferentes partes de plantas e de acordo com a base de dados do *ISI Web of Science* (16 de novembro de 2016). Os termos para busca foram utilizados em língua inglesa (*green synthesis AND metal nanoparticles* associados a um dos termos seguintes: *leaf/leaves, seed, root, fruit, flower, stem, latex* ou *peel*).

Variações nas condições de síntese também podem resultar em diferentes características das NPMs. Tempo de reação, concentração de extrato e/ou íons

metálicos, temperatura e pH são apenas alguns dos parâmetros que podem ser variados visando ao aperfeiçoamento da eficiência, rendimento e taxa de formação de NPMs durante rotas de síntese (Armendariz et al., 2004; Song et al., 2009; Dubey et al., 2010a; Dubey et al., 2010b; Dwivedi et al., 2010; Philip, 2010a.; Albernaz, 2014; Bonatto et al., 2014). Sendo assim, deve-se ressaltar a importância da variação dos parâmetros de síntese para a obtenção de NPMs com as características almejadas.

### **Principais desafios na síntese verde utilizando plantas**

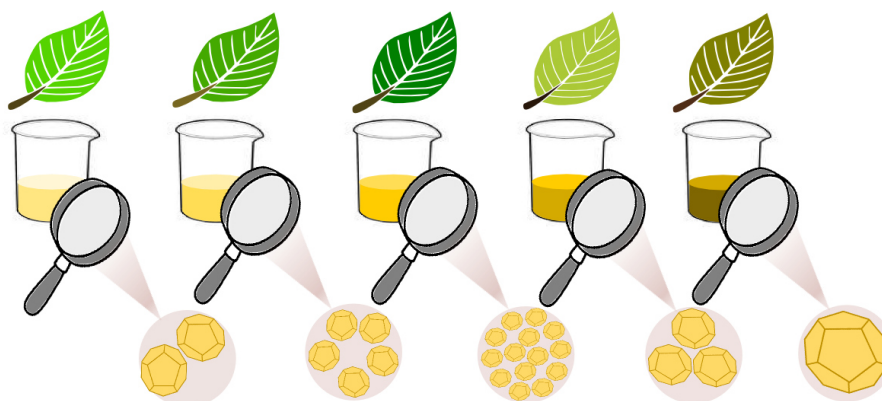
Um dos principais desafios encontrados na síntese verde de NPMs utilizando plantas está relacionado à reprodutibilidade das rotas de síntese. Os metabólitos primários e secundários são os principais agentes de redução e estabilizantes utilizados para a síntese verde de NPMs utilizando plantas (Kumar et al., 2009; Narayanan et al., 2011; Mittal et al., 2013). Sendo assim, caso a composição e/ou as concentrações dos metabólitos em um extrato vegetal sejam diferentes, podem ser formadas NPMs com características físicas, químicas e até mesmo biológicas distintas.

Diversos fatores podem acarretar em alteração do metabolismo das plantas, dentre eles a pressão ambiental constante, incluindo o estresse hídrico (Jha et al., 2009); a falta ou excesso de nutrientes essenciais (Jha et al., 2009); alterações no pH do solo (Wang et al., 2003); ataques de herbívoros, patógenos e parasitas (Shankar et al., 2003); competição entre espécies (Wardle et al., 1998); o excesso ou a falta de exposição à luz solar (Demming-Adams et al., 1992; Ruban, 2009); e a pressão antrópica acidental (por exemplo, poluição) e intencional (por exemplo, o uso de herbicidas e pesticidas) (Schwitzguébel, 2001). Em resposta a estes estímulos, alterações no metabolismo das plantas podem propiciar condições melhores para a sobrevivência (Wang et al., 2003). Sendo assim, a produção de metabólitos primários e secundários pode ser modulada de acordo com o estímulo ao qual a planta é submetida (Cheong et al., 2002).

Além disso, a idade de um órgão da planta (por exemplo, folhas jovens ou senescentes) também pode influenciar na concentração e na presença de metabólitos (Figura I 4). A variabilidade genética do material vegetal é outro fator que deve ser considerado durante a seleção de uma espécie, mas tem sido absolutamente negligenciado pela maioria dos pesquisadores durante o desenvolvimento das rotas de síntese verde de NPMs. Todo esse cenário, da fisiologia vegetal, pode acarretar na produção de extratos com uma composição de metabólitos final distinta e



consequentemente acarretando em propriedades distintas das NPMs as quais podem ser, em teoria, controladas.

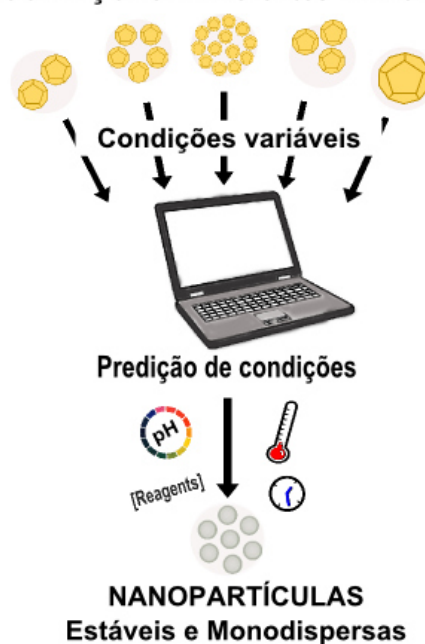


**Figura I 4.** Extratos de folhas em diferentes estados metabólicos/fisiológicos quando obtidas a partir de uma mesma espécie de planta utilizada para síntese verde de nanopartículas metálicas podem conduzir à formação de nanomateriais com diferentes tamanhos e consequentemente influenciar na reprodutibilidade das sínteses e propriedades finais. Fonte: Silva et al., 2015.

Outro aspecto também relacionado diz respeito aos cuidados e atenção com a estação do ano e indicadores climáticos da época em que o material biológico é coletado como condições essenciais visando à reprodutibilidade das rotas de síntese (Albernaz, 2014; Silva 2014). A maioria dos estudos não relata em que período do ano o material vegetal foi coletado, nem descrevem as condições de crescimento e cultivo das plantas, ou até mesmo sequer qualificam ou quantificam os principais metabólitos ou ao menos classes de metabólitos presentes nos extratos utilizados na síntese das NPMs. Todas essas informações devem ser consideradas essenciais para a reprodutibilidade do processo e para compreender os mecanismos que resultam na formação das NPMs.

Previsibilidade na formação e atividade biológica de nanoestruturas são outro desafio atual e uma tendência recente em nanotecnologia verde (Viswanath et al., 2008). Uma opção é a realização de uma avaliação sistemática de diferentes espécies visando identificar aquelas que apresentam alto potencial para serem utilizadas na síntese verde de NPMs, por meio da caracterização física, química e biológica das nanoestruturas sintetizadas, bem como do extrato utilizado (determinação qualitativa e quantitativa da composição química), e compilar essas informações em bases de dados. Estes dados seriam utilizáveis para o desenvolvimento de simuladores baseados em modelagem matemática visando à predição de fatores críticos que influenciam o processo de síntese verde de NPMs utilizando plantas e também a sua aplicabilidade (Figura I 5).

**Diferentes CONDIÇÕES = Diferentes NANOPARTÍCULAS**

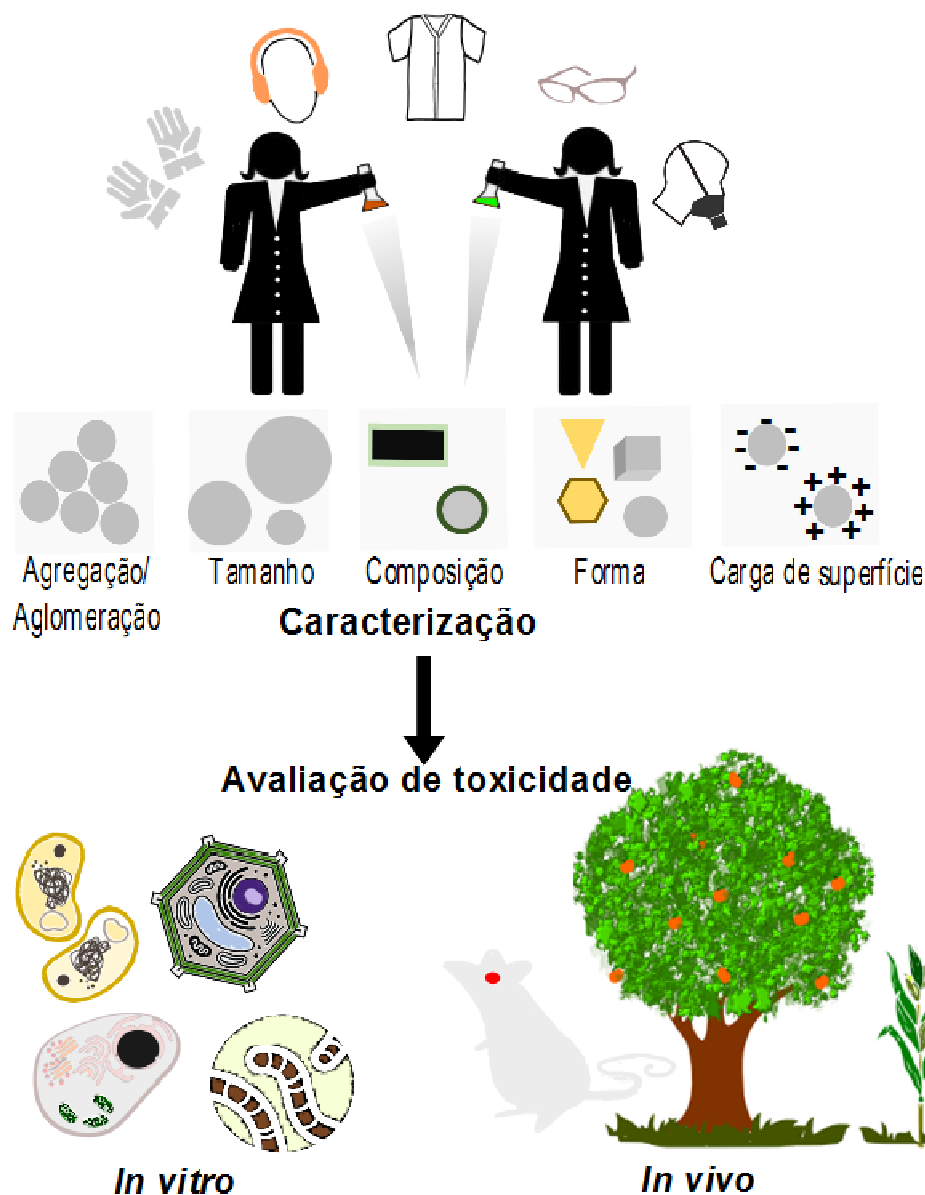


**Figura I 5.** Ilustração esquemática do uso da modelagem matemática computacional e desenho experimental racional visando à previsibilidade das rotas de síntese de nanopartículas metálicas utilizando plantas em busca de maior homogeneidade e reprodutibilidade das reações. Fonte: Silva et al., 2015.

Nos últimos anos, levando-se em conta o crescente aumento do interesse no desenvolvimento de nanomateriais, surge um novo campo de pesquisa em nanotecnologia, denominado nanotoxicologia, cujo foco principal é o de avaliar as interações entre os nanomateriais com os três domínios de seres vivos e o meio ambiente (Oberdorster et al., 2005; Oberdorster, 2010). Assim, há necessidade de criação de políticas públicas para regular o uso seguro e sustentável de nanomateriais, dentre eles as NPMs sintetizadas por abordagens de síntese verde. Essa necessidade está relacionada com a minimização da exposição dos pesquisadores, trabalhadores e consumidores, bem como do meio ambiente, frente aos nanossistemas que podem ser potencialmente promotores de algum risco à saúde ou ao meio ambiente (Figura I 6).

Algumas etapas podem ser consideradas como essenciais no processo de compreensão dessas questões. Em primeiro lugar, é necessário conhecer as propriedades físico-químicas do nanomaterial (por exemplo, tamanho e distribuição de tamanho, forma, potencial Zeta, composição química, potencial para a aglomeração/agregação, cristalinidade, mecanismos de solubilidade/dissolução, densidade, estabilidade, porosidade e área de superfície). Em segundo, é necessário definir a aplicabilidade do

nanomaterial e discernir entre as NPMs voltadas para aplicações biológicas e biomédicas daquelas utilizadas em aplicações voltadas para ciências de materiais. Em terceiro, é necessário determinar o(s) mecanismo(s) de interação entre os nanomateriais e sistemas vivos a nível molecular, celular, tecidual, sistêmico, e nos níveis de ecossistemas (nanoecotoxicidade) por meio de ensaios *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.



**Figura I 6.** Ilustração esquemática dos equipamentos de proteção individual (EPIs) que são normalmente recomendados para os trabalhadores em nanotecnologia para reduzir ou minimizar os riscos de exposição aos nanomateriais com diferentes características físicas e químicas. Além disso, o potencial de segurança dos nanomateriais, incluindo nanopartículas metálicas deve ser avaliado por meio de ensaios *in vitro* e testes *in vivo*. Fonte: Silva et al., 2015 (Modificado).

## **Plantas do bioma Cerrado**

A escolha da planta a ser utilizada na síntese verde de NPMs tem sido realizada a partir da biodiversidade local, regional, nacional e/ou global de forma empírica e aleatória (Das et al. 2013). Contudo, a biodiversidade vegetal brasileira tem sido pouco explorada.

O Cerrado brasileiro é reconhecido mundialmente por sua rica diversidade vegetal, abrangendo 11627 espécies de plantas nativas já catalogadas (MMA, 2015), sendo constituído por um conjunto de vegetações que vai de campo limpo a Cerradão (Ribeiro, 2007). Estas nuances de fitofisionomias presentes no bioma Cerrado estão intrinsecamente relacionadas com a sazonalidade do clima caracterizado por um verão chuvoso e inverno seco; nível dos lençóis freáticos; drenagem e fertilidade do solo (Ribeiro, 2007).

A grande diversidade de espécies encontradas no Cerrado resulta em perfis fitoquímicos distintos entre as plantas, os quais estão intimamente relacionados aos fatores abióticos e/ou bióticos locais e são resultantes dos processos vitais de biossíntese que são os responsáveis pela formação, acúmulo e degradação de inúmeras substâncias orgânicas no interior das células que formam os diversos tecidos vegetais (Silva, et al. 2010).

As plantas do Cerrado são formadas por inúmeros compostos dentre os quais estão metabólitos primários como proteínas (incluindo proteases), lipídeos e carboidratos, além de uma infinidade de metabólitos secundários como cumarinas, antraquinonas, saponinas, taninos, catequinas, flavonoides, alcaloides, fenóis, carotenoides e terpenoides (Bessa et al., 2013). Dentre estes, os compostos fenólicos, terpenoides, flavonoides, proteases e carboidratos têm sido apontados como os principais responsáveis pela redução dos íons metálicos pelas plantas (Shankar et al., 2003; Sivaraman et al., 2009; Thakkar et al., 2010; Park et al., 2011). Além disso, tem sido relatado o potencial fitorremediador das plantas do Cerrado quando submetidas a altas concentrações de metais (Haridasan, 2008), indicando um potencial de neutralização dos íons metálicos, possivelmente pela formação de NPMs e outros complexos. Esses fatos tornam as plantas do Cerrado candidatas especialmente promissoras para a utilização na síntese verde de NPMs.

Atualmente, tem sido discutida a importância de uma escolha racional das plantas para a síntese verde de NPMs (Das et al., 2013). Contudo, não existem

evidências de uma avaliação sistemática comparativa e exploratória de grupos distintos de plantas de um mesmo Bioma na síntese das NPMs, tão pouco estudos avaliando sistematicamente a eficácia da síntese correlacionando a uma avaliação quantitativa e/ou qualitativa dos perfis fitoquímicos das plantas (Das et al., 2013). Sendo assim, a grande diversidade de espécies das plantas da biodiversidade brasileira pode ser explorada de forma racional, comparativa e sustentável na síntese de NPMs.

### **Nanopartículas de Prata (AgNPs)**

Dentre os diversos metais utilizados na síntese verde de NPMs a prata tem sido extensivamente utilizada. Esse fato é devido a algumas propriedades únicas da prata, tais como potencial redutor alto, estabilidade química, condutividade elétrica relativamente boa, potencial catalítico e diversas propriedades biológicas para o controle de bactérias, fungos e outros microrganismos (Ahmed et al., 2016).

Outra característica relacionada à prata diz respeito ao fenômeno da ressonância plasmônica de superfície (RPS), característica manifestada apenas quando o metal se encontra na forma nanoestruturada, e que é ausente nas formas macroestruturada e iônica (Mogensen and Kneipp, 2014). A RPS consiste na oscilação coletiva de elétrons livres da NPMs criando uma densidade de carga em sua superfície quando sofrem influência de radiação eletromagnética. No caso da prata, esse fenômeno provoca uma absorção acentuada na região visível do espectro que varia de 400-500 (Albernaz 2014). Devido a esse fato, observa-se uma variação de cor característica em uma dispersão de AgNPs, de marrom avermelhado a marrom escuro, de acordo com o tamanho, forma e rendimento das NPs produzidas e com a composição do meio em que estão dispersas (Albernaz 2014).

As AgNPs apresentam potencial de serem utilizadas para diversas aplicações como incorporação em fibras óticas, materiais supercondutores, produtos cosméticos, indústrias de alimentos, componentes eletrônicos, dentre outros (Ahmed et al., 2016). Além disso, AgNPs podem ser utilizadas principalmente na área biomédica, sendo adicionadas a curativos, cremes, *sprays* antissépticos e tecidos, devido ao efeito biocida de amplo espectro contra microrganismos (Ahmed et al., 2016).

## JUSTIFICATIVA/HIPÓTESE

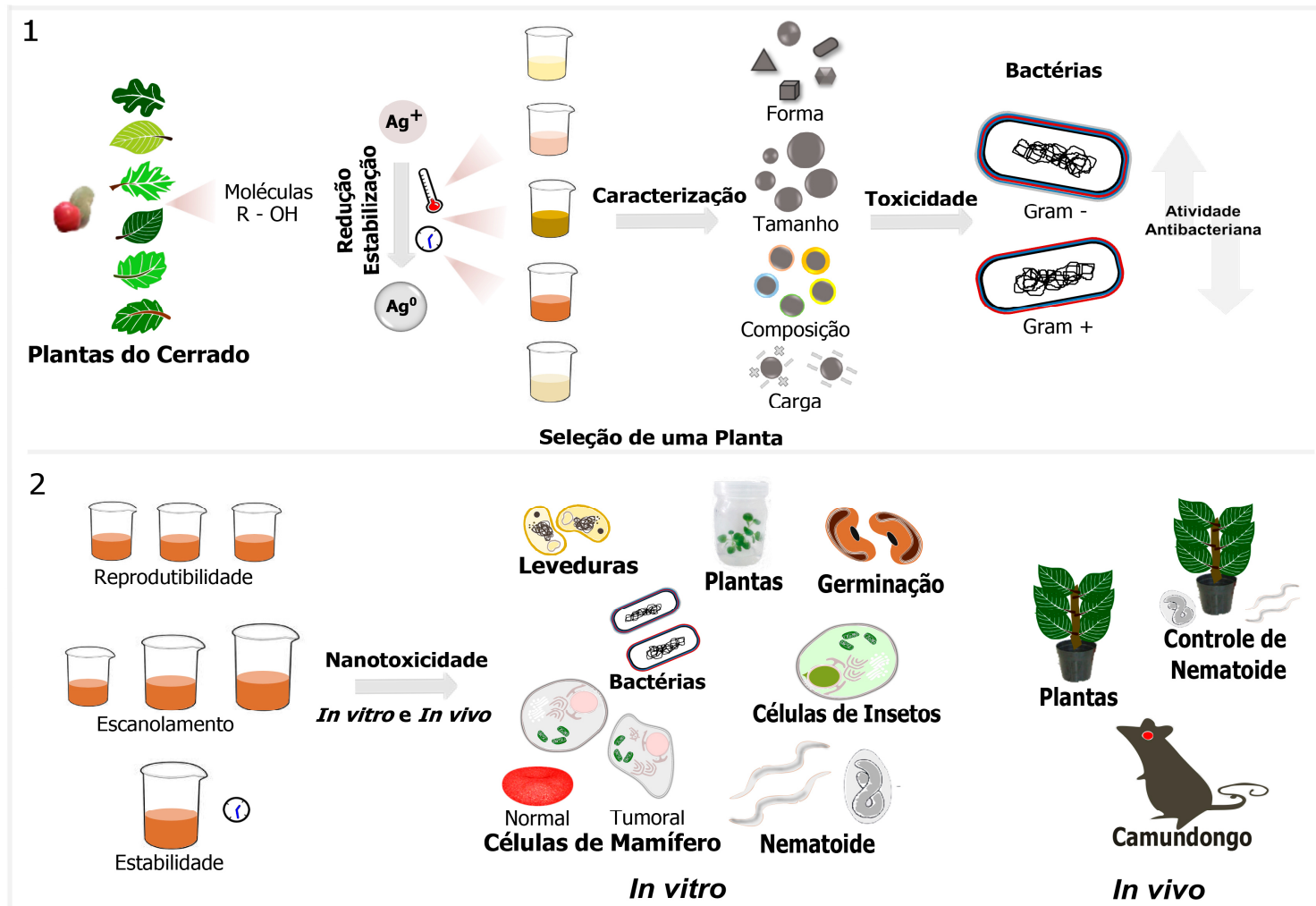
Uma abordagem inovadora na formulação de NPMs envolve rotas de síntese que utilizam componentes relativamente atóxicos, biodegradáveis e de custo baixo para sintetizar nanomateriais, em particular tendo como fonte primária ou iniciador da rota algum organismo biológico ou parte dele, como as biomoléculas, e é comumente denominada de síntese verde. Nesse sentido, componentes biológicos oriundos de plantas podem exercer uma influência direta sobre as interações específicas entre as biomoléculas e os íons metálicos, controlando as características físicas, químicas e biológicas de micro- e nanopartículas sintetizadas.

Diversas plantas têm sido utilizadas na síntese verde de partículas, contudo a escolha das plantas tem sido realizada de forma aleatória, não existindo evidências de avaliação sistemática comparativa de grupos distintos de plantas na síntese das NPMs, tão pouco estudos correlacionando sistematicamente a eficácia da síntese com o perfil fitoquímico de diferentes plantas (Das, et al. 2013). Dentre os metais utilizados para a síntese de nanopartículas, a prata tem sido extensivamente estudada, devido às suas propriedades únicas, tais como alto potencial redutor, estabilidade química, condutividade elétrica relativamente boa, potencial catalítico e diversas propriedades biológicas para o controle de bactérias e fungos.

O Cerrado brasileiro é reconhecido mundialmente por sua diversidade vegetal rica, a qual está intimamente relacionada aos diversos fatores abióticos e/ou bióticos locais. As plantas do Cerrado são formadas por inúmeros compostos fitoquímicos (cumarinas, antraquinonas, saponinas, taninos, catequinas, flavonoides, carboidratos, alcaloides, oligossacarídeos, fenóis, proteases, carotenoides e terpenoides), dentre os quais diversos têm sido relatados como sendo os responsáveis pela redução de íons metálicos na síntese de NPMs, além de apresentarem potencial para a estabilização da superfície das NPMs. Sendo assim, a grande diversidade fitoquímica das plantas do Cerrado pode ser explorada de forma racional, comparativa e sustentável na síntese de NPMs, incluindo AgNPs.

Sendo assim, extratos aquosos obtidos a partir de diversas plantas do Cerrado poderiam atuar na síntese e estabilização de micro- e nanopartículas de prata (AgMPs e AgNPs) de forma racional e sustentável. Para tal, foram desenvolvidos estudos visando ao avanço do conhecimento relacionado à seleção e otimização das rotas de síntese

utilizando diferentes espécies de plantas e por meio de abordagens confirmatórias em uma mesma espécie; variações nas rotas de síntese; caracterização físico-química/estrutural; investigação de reprodutibilidade, escalonamento e estabilidade coloidal; avaliação de mecanismos de solubilização; investigação dos constituintes moleculares dos extratos; e avaliação de possíveis atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* das AgMPs e AgNPs obtidas por meio de rotas de síntese verde em diferentes organismos modelo (Figura I 7).



**Figura I 7.** Ilustração esquemática representativa das principais etapas desenvolvidas no presente estudo. 1) Estratégias para seleção racional de uma planta a ser empregada de maneira sustentável; 2) Desenvolvimento de um processo tecnológico para produção de nanopartículas metálicas.



## OBJETIVOS DA TESE

### Objetivo Geral da Tese

→ Sintetizar, caracterizar e investigar a atividade biológica de micro- e nanopartículas de prata produzidas utilizando extratos oriundos de plantas do Cerrado Brasileiro.

### Objetivos Específicos da Tese

→ Desenvolver e aperfeiçoar rotas de síntese de micro- e nanopartículas de prata utilizando extratos aquosos de folhas e um fruto de plantas do Cerrado como agentes biorredutores e estabilizantes;

→ Caracterizar as partículas obtidas por meio de técnicas de investigação físico-química e estrutural;

→ Caracterizar os extratos obtidos por meio da obtenção de perfis moleculares;

→ Identificar algumas das moléculas envolvidas no processo de síntese de nanopartículas;

→ Avaliar a estabilidade, reprodutibilidade, escalabilidade, e os mecanismos de dissolução de nanopartículas produzidas com extrato de uma planta selecionada;

→ Testar potenciais atividades biológicas *in vitro* das partículas obtidas por meio de ensaios de inibição de crescimento e viabilidade de células procarióticas e eucarióticas;

→ Avaliar potenciais nanotoxicidades em modelos animais e vegetais *in vitro* e *in vivo*;

→ Avaliar o potencial de uma das nanopartículas para o controle de fitonematoides *Meloidogyne incognita* em modelos de infestação em planta;

→ Avaliar a eventual resposta aguda após a exposição a uma das nanopartículas obtidas em modelo de mamífero.

## MATERIAL E MÉTODOS

Tendo em vista que diversos materiais e metodologias utilizados no decorrer da presente Tese se repetem ao longo dos Capítulos; e no intuito de evitar a redundância e repetição ao longo do documento, os materiais e métodos descritos a seguir foram utilizados no decorrer dos Capítulos II, III e IV. Alguns experimentos foram conduzidos em colaboração com diversos grupos de pesquisas, estabelecidos em diferentes instituições, e serão citados individualmente ao longo da metodologia. Todos os demais experimentos foram conduzidos no Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO), da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

### 1. Equipamentos, materiais e reagentes utilizados

#### *Equipamentos*

Agitador magnético com aquecimento (modelo Q261, Quimis, Brasil); Agitador magnético com aquecimento (modelo LUCA-01/09-E, Lucadema, Brasil); Agitador de Tubos tipo Vortex (modelo Genie 2, Genie, EUA); Agitador orbital *Shaker* (modelo MA830, Marconi, Brasil); Ar condicionado; Autoclave horizontal (Cristófoli, Brasil); Balança eletrônica de precisão (modelo Q520-3, Quimis, Brasil); Balança Analítica (modelo Ax200, Shimadzu, Japão); Banho-maria de 4 bocas microprocessado (modelo Q334M, Quimis, Brasil); Bomba peristáltica Cole Parmer (modelo Master Flex L/S); Câmara fria; Centrífuga refrigerada (modelo Micro22R, Hettich, Alemanha); Câmera digital (modelo Ultrascan, Gatan Pleasanton CA, EUA); Centrífuga de bancada para microtubos (modelo MiniSpin<sup>®</sup>, Eppendorf, Alemanha); Centrífuga de bancada (Quimis, Brasil); Centrífuga refrigerada (modelo Q222RM, Quimis, Brasil); Condutímetro microprocessado de bancada (modelo Q795M, Quimis, Brasil); Cromatógrafo líquido ultrarrápido (modelo Prominence UFLC, Shimadzu, Japão); Espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier - FTIR (modelo IR Prestige 21, Shimadzu, Japão); Espectrofotômetro UV/Vis (modelo mini-1240, Shimadzu, Japão); Espectrofotômetro ultravioleta digital microprocessado (modelo Q798U, Quimis, Brasil); Estufa de CO<sub>2</sub> (modelo series 8000WJ, Thermo Scientific - EUA); Estufa de secagem e esterilização (Lucadema, Brasil); Estufa de secagem a vácuo (modelo Q819V, Quimis, Brasil); Fluxo laminar unidirecional (modelo CFLV12,

Brasil); Fluxo unidirecional (modelo CFLV12, Veco, Brasil); Freezer (modelo CVU26EBBNA, Consul, Brasil); Freezer -40°C (Liotop, Brasil); Geladeira (modelo DC499A, Electrolux, Brasil); Incubadora de bancada com agitação orbital (modelo Q816M20, Quimis, Brasil); Leitora de microplacas (modelo ELx808 IU, Biotek, EUA); Leitora de microplacas (modelo SpectraMax M2, Molecular Devices, EUA); Liofilizador (modelo Enterprise I, Terroni Equipamentos Científicos, Brasil); MALDI-TOF/MS (modelo AutoFlex Speed, Bruker Daltonics); Micropipetas monocanais - capacidade máxima de 2 µL, 10 µL, 200 µL e 1000 µL (modelo LabMate Soft, HTL, Polônia); Micropipeta multicanal - com capacidade máxima de 20 a 200 µL (modelo DV8-200, modelo LabMate Soft, HTL); Microscópio Confocal Raman (modelo Alpha 300RA, WITec, Alemanha); Microscópio de luz (modelo Axiophot, Zeiss, Alemanha); Microscópio de luz invertido (Único, EUA); Microscópio de força atômica (modelo SPM-9600, Shimadzu, Japão); Microscópio eletrônico de transmissão (modelo JEM-1011, Jeol, Japão); Micrótomo (modelo 1512, Leitz, Alemanha); Nano ZetaSizer (modelo Nano ZS, Malvern, Reino Unido); Paquímetro digital *High Speed* 0-150 × 0,01 mm (modelo 1108, Insize, Brasil); Sistema de microfluídica (Senai, Brasil); Sistema Milli-Q (modelo Advantage A10, Millipore Corporation, EUA); Smartphone (modelo SIII, Samsung, Coreia do Sul); Termo higrômetro digital; Timer digital (Cronobio); Ultrabook (modelo S46CA, Asus, Taiwan); UHR-QqTOF/MS (modelo Impact II, Bruker Daltonics); Ultrafreezer Vertical (modelo Q315U, Quimis, Brasil); Ultrafreezer - 80°C (Série VIP, Sanyo, Japão).

### *Materials*

Bisturi (ABC instrumentos cirúrgicos, Brasil); Caixa de polipropileno para microtubos criogênicos; Caixa de polipropileno para microtubos; Câmara de Neubauer (modelo espelhada, C. A. Hausser & Son, EUA); Canetas permanentes coloridas (Sharpie, EUA); Célula capilar descartável de policarbonato (modelo DTS1070, Malvern, Reino Unido); Cuba de vidro com tampa para coloração (100 × 80 × 85 mm) (Única científica, Brasil); Cubeta de poliestireno descartável de 1,5 mL (modelo 1948, Kartell, Itália); Cubeta de poliestireno descartável de 4,5 mL (modelo 1937, Kartell, Itália); Cubeta de vidro 12 mm (modelo PCS1115, Malvern, Reino Unido); Estantes para tubos de 1,5, 15 e 50 mL; Estilete (DSC, Brasil); Filme de laboratório (Parafilm M<sup>®</sup>, American National

Can, EUA); Fita adesiva durex (3M, EUA); Fita adesiva crepe (3M, EUA); Filtro para seringa 0,22 e 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore, Alemanha); Frascos de cultura (tpp, Alemanha); Frasco de vidro tipo Béquer com capacidade para 5, 50 e 200 mL; Frascos do tipo Erlenmeyer com capacidade de 100, 200 e 500 mL; Funil de vidro; Garrafas de cultura 25  $\text{cm}^2$  e 75  $\text{cm}^2$  (TPP, Alemanha); Grades de cobre com 150 malhas vazadas (Electron Microscopy Sciences, Hatfield PA, EUA); Lâmina de bisturi; Lâmina de vidro ponta fosca 26  $\times$  76 mm espessura 1-1,2 mm (Carvalhoes, Brasil); Lâmina de Peters; Lamínula de vidro retangular 24  $\times$  60 mm (Galvani, Brasil); Microplacas de 96 poços de fundo chato (TPP, Alemanha); Microplacas de 96 poços de fundo em U; Placas de Petri 90  $\times$  15 mm descartável (tpp, Alemanha); Mangueiras de silicone; Membranas de poros de 0,22  $\mu\text{m}$  (tpp, Alemanha); Mica muscovita; Papel branco (Chamex, Brasil); Papel alumínio; Papel de germinação de sementes; Papel filtro (11  $\mu\text{m}$ , Whatman<sup>®</sup>, EUA); Papel universal indicador de pH (Qualividros, Brasil); Placa de MALDI do tipo MSP polidas (Bruker Daltonics, Alemanha); Seringas 1 e 5 mL; Microtubos de polipropileno do tipo *ependorf* de 0,2, 0,6, 1,5 e 2,0 mL (Axygen, EUA); Navalha de aço (MC818, Leica, Alemanha); Papel pardo; Pinça clínica; Pinça anatômica dente de rato 12 cm; Pinça de dissecação de 12 e 15 cm; Pinça invertida; Ponteiras de polipropileno brancas (0,1-10  $\mu\text{L}$ ), amarelas (20-200  $\mu\text{L}$ ) e azuis (100-1000  $\mu\text{L}$ ); Ponteiras de nitreto de silício para microscópio de força atômica (Nanosensors, AdvancedTEC); Provetas de vidro com capacidade de 10, 100, 200 e 1000 mL (Pyrex, EUA); Tesoura cirúrgica 12 cm Reta Fina/Fina; Tesoura cirúrgica 12 cm Reta Romba/Fina; Tubos tipo Falcon de 15 e 50 mL (tpp, Alemanha).

### *Reagentes*

Acetona PA (CRK, Brasil); Acetonitrila (Sigma-Aldrich Co., EUA); Ácido acético (Merck); Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (Bruker Daltonics, Alemanha); Ácido nicotínico; Ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich Co., EUA); Ácido sulfúrico; Ágar Luria Bertani - LB (Sigma-Aldrich Co., EUA); Água destilada (Millipore Corporation); Água ultrapura tipo I (Millipore Corporation); Álcool etílico absoluto PA (Dinâmica, Brasil); Álcool etílico absoluto PA (Cinética, Brasil); Álcool etílico hidratado 92,8° (Itajá, Brasil); Ágar-Ágar; Álcool metílico (JTBarker, EUA); Antibiótico Penicilina e Estreptomicina (Gibco, EUA); Antibiótico sulfato de gentamicina (Gibco, EUA); Azul

de Tripan (Sigma-Aldrich Co., EUA); Brometo de potássio; Cacodilato de sódio (Sigma-Aldrich Co., EUA); Cetamina (Syntec); Cloreto áurico (Sigma-Aldrich Co., EUA); Cloreto de ferro II (Vetec, Brasil); Cloridrato de xilazina 2% (Syntec); Clorofórmio (CRQ, Brasil); Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich Co., EUA); Eosina amarelada (Dinâmica, Brasil); Etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Proquímios); Extrato de levedura (Kasvi, Brasil); Fitagel (Sigma-Aldrich Co., EUA); Glicose anidra PA (Vetec, Brasil); Hematoxilina (Dinâmica, Brasil); Hidróxido de Cumeno (Sigma-Aldrich Co., EUA); Hipoclorito de sódio (Biocloro, Brasil); Inositol; Lactoalbumina; Meio de cultura ágar Casoy (Sigma-Aldrich Co., EUA); Meio de cultura básico LB (Sigma, Alemanha); Meio de cultura DMEM (Meio Eagle Modificado por Dulbecco, Sigma-Aldrich Co., EUA); Meio de cultura Grace (Gibco, EUA); Meio de cultura MS (Sigma-Aldrich Co., EUA); Meio de cultura TNMFH (Gibco, EUA); Meio de cultura RPMI (Sigma-Aldrich Co., EUA) MTT (3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Invitrogen, EUA); Nitrato de prata (Sigma-Aldrich Co., EUA); Óxido de mercúrio II (Êxodo Científica, Brasil); Paraplast (Sigma-Aldrich Co, EUA); Peróxido de hidrogênio 35% PA (Ref: 01984, Neon); Sacarose (Impex, Brasil); Soro fetal bovino (Gibco, EUA); Sulfato de alumínio (Êxodo Científica, Brasil); Sulfato de ferro (Sigma-Aldrich Co, EUA); Sulfato de potássio (Êxodo Científica, Brasil); Tampão fosfato-salina (PBS) (Laborclin, Brasil); Tiamina; Tripsina-EDTA (0,25 e 0,02%) (Gibco, EUA); Triton X100 (Sigma-Aldrich Co, EUA); Verniz vitral incolor (Acrilex, Brasil); Xilenol Orange; Xilol (Sigma-Aldrich Co, EUA).

## **2. Material Vegetal**

### *2.1. Coleta do material*

Folhas e/ou frutos de diversas plantas nativas do Cerrado Brasileiro (80), bem como plantas introduzidas no Cerrado (10) foram coletados em propriedade particular - Fazenda Coqueiro - localizada no município de Colinas do Sul, Estado de Goiás, Brasil (Tabela I 1) nos períodos de janeiro (período de chuva) e julho (período de seca); e uma delas no Campus Universitário Darcy Ribeiro da Universidade de Brasília (UnB) nos período de novembro (período de chuva); todas com autorização para acesso a patrimônio genético do CGEN número 02001.007580/2014-95. Os materiais vegetais foram coletados e inseridos em tubos de polipropileno de 15 ou 50 mL, e

aconicionados por até um ano em tubos de polipropileno de 15 e/ou 50 mL e mantidos à -20°C até o momento de uso. Para padronização de coleta todos os materiais biológicos foram coletados nos períodos de final da tarde (16:00-18:00), em altura ao alcance das mãos (0,5 a 2,0 m), com o apoio e descrição do nome popular pelo senhor Juarez Paulino da Silva, a quem agradeço imensamente pela colaboração e auxílio.

**Tabela I 1.** Relação das plantas do Cerrado coletadas no Estado de Goiás - Brasil e utilizadas para síntese de nanopartículas de prata.

	<b>Família</b>	<b>Nome popular</b>	<b>Nome científico</b>	<b>Parte vegetal</b>
1	Anacardiaceae	Aroeira	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Folha
2	Anacardiaceae	Cajuzinho de árvore	<i>Anacardium othonianum</i> Rizz	Folha e Fruto
3	Anacardiaceae	Gonçalo	<i>Astronium fraxinifolium</i>	Folha
4	Annonaceae	Pimenta de macaco	<i>Xylopia aromatica</i> Lam.	Folha
5	Annonaceae	Pinha do Cerrado	<i>Annona</i> sp.	Folha
6	Apiaceae	Angélica	<i>Angelica archangelica</i>	Folha
7	Apocynaceae	Mangaba	<i>Hancornia speciosa</i> Gomez	Folha
8	Apocynaceae	Pereiro	<i>Aspidosperma pyrifolium</i> Mart.	Folha
9	Apocynaceae	Pereiro do Campo	<i>Aspidosperma tomentosum</i>	Folha
10	Arecaceae	Babaçu	<i>Orbignya phalerata</i> Mart.	Folha
11	Arecaceae	Buritirana	<i>Mauritiella armata</i>	Folha
12	Arecaceae	Macaúba	<i>Acrocomia aculeata</i> Mart	Folha
13	Asteraceae	Assa-Peixe	<i>Vernonia polyanthes</i>	Folha
14	Asteraceae	Coração de Negro	<i>Piptocarpha rotundifolia</i>	Folha
15	Asteraceae	Picão	<i>Bidens</i> sp.	Folha*
16	Asteraceae	Vassourinha	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Folha
17	Bignoniaceae	Caraíba	<i>Tabebuia áurea</i> (Mart.) Bur	Folha
18	Bignoniaceae	Jacarandá	<i>Jacaranda cuspidifolia</i> Mart	Folha
19	Bignoniaceae	Verga Tesa	<i>Anemopaegma arvense</i>	Folha
20	Burseraceae	Almesegueira	<i>Protium heptaphyllum</i>	Folha
21	Caryocaraceae	Pequi	<i>Caryocar brasiliense</i>	Folha
22	Cecropiaceae	Embaúba	<i>Cecropia pachystachya</i> Trec.	Folha
23	Clethraceae	Carne de Vaca	<i>Clethra scabra</i> Pers.	Folha
24	Clusiaceae	Pau-Santo	<i>Kielmeyera coriácea</i>	Folha
25	Combretaceae	Capitão	<i>Terminalia argentea</i> Mart & Zucc	Folha
26	Combretaceae	Mirindiba	<i>Buchenavia tomentosa</i> Eichl.	Folha
27	Cyperaceae	Navalha	<i>Hypolytrum pungens</i>	Folha*
28	Dilleniaceae	Sambaíba	<i>Curatella americana</i> L.	Folha
29	Dilleniaceae	Sambaibinha	<i>Davilla</i> sp.	Folha
30	Euphorbiaceae	Cansação	<i>Cnidoculus urens</i>	Folha
31	Fabaceae	Angiquinho com espinho	<i>Aeschynomene sensitiva</i>	Folha
32	Fabaceae	Barbatimão	<i>Stryphnodendron adstringens</i>	Folha
33	Fabaceae	Baru	<i>Dipteryx alata</i> Vog.	Folha
34	Fabaceae	Ferreirinha Pau Ferro	<i>Caesalpinia ferrea</i> Mart	Folha

\*Espécies de plantas introduzidas no Cerrado.

**Tabela I 1 (Continuação).** Relação das plantas do Cerrado coletadas no Estado de Goiás - Brasil e utilizadas para síntese de nanopartículas de prata.

	<b>Família</b>	<b>Nome popular</b>	<b>Nome científico</b>	<b>Parte vegetal</b>
35	Fabaceae	Jacaré	<i>Piptadenia</i> sp.	Folha
36	Fabaceae	Mata Pasto	<i>Senna occidentalis</i> (L.)	Folha*
37	Fabaceae	Miroró	<i>Bauhinia acuruana</i> Moric.	Folha
38	Fabaceae	Mulungu	<i>Erythrina verna</i>	Folha
39	Fabaceae	Pata de Vaca	<i>Bauhinia forficata</i>	Folha
40	Fabaceae	Rabo de Bugio Preto	<i>Lonchocarpus muehlbergianus</i>	Folha
41	Fabaceae	Sucupira Branca	<i>Pterodon emarginatus</i> Vogel	Folha
42	Fabaceae	Tatarena	<i>Tachigali aurea</i> Tul.	Folha
43	Gramíneas	Amargoso	<i>Elionurus candidus</i>	Folha
44	Heliconiaceae	Caeté	<i>Heliconia velloziana</i>	Folha
45	Leguminosae	Jatobá do Mato	<i>Hymenaea courbaril</i>	Folha
46	Leguminosae	Angelim Pedra	<i>Hymenolobium petraeum</i> Ducke	Folha
47	Leguminosae	Canzileiro	<i>Platypodium elegans</i>	Folha
48	Leguminosae	Carvoeiro	<i>Sclerolobium paniculatum</i> Vog.	Folha
49	Leguminosae	Copaíba	<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf	Folha
50	Leguminosae	Jatobá	<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	Folha
51	Leguminosae	Jatobá do Cerrado	<i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart	Folha
52	Leguminosae	Sucupira Preta	<i>Bowdichia virgilioides</i> Kunth	Folha
53	Loganiaceae	Rabo de Bugio	<i>Strychnos pseudoquina</i> A.	Folha
54	Lythraceae	Sega Machado	<i>Physocallimma scaberrimum</i> Pohl	Folha
55	Lythraceae	Pacari	<i>Lafoensia pacari</i>	Folha
56	Malpighiaceae	Murici	<i>Byrsonima verbascifolia</i> Rich.	Folha
57	Malpighiaceae	Murici do grande	<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.)	Folha
58	Malvaceae	Malva Amarela	<i>Sida cordifolia</i> (L.)	Folha*
59	Malvaceae	Mutamba	<i>Guazuma ulmifolia</i> Lamarck	Folha
60	Marcgraviaceae	Rabo de Arara	<i>Norantea guianensis</i>	Folha
61	Meliaceae	Cedro	<i>Cedrela fissilis</i> Vell.	Folha
62	Meliaceae	Cedro Branco (Marinheiro)	<i>Guarea guidonia</i>	Folha
63	Mimosaceae	Angico	<i>Anadenanthera</i> sp.	Folha
64	Moraceae	Bureré	<i>Brosimum gaudichaudii</i> Tréc	Folha
65	Moraceae	Gameleira	<i>Ficus adhatodifolia</i>	Folha
66	Myrtaceae	Araçá	<i>Psidium araca</i> Raddi	Folha
67	Myrtaceae	Cagaita	<i>Eugenia dysenterica</i>	Folha
68	Palmae	Buriti	<i>Mauritia flexuosa</i>	Folha
69	Poaceae	Braquiarão	<i>Brachiaria brizantha</i> cv.	Folha*
70	Poaceae	Colônão	<i>Panicum maximum</i> Jacq cv.	Folha*

\*Espécies de plantas introduzidas no Cerrado.



**Tabela I 1 (Continuação).** Relação das plantas do Cerrado coletadas no Estado de Goiás - Brasil e utilizadas para síntese de nanopartículas de prata.

	<b>Família</b>	<b>Nome popular</b>	<b>Nome científico</b>	<b>Parte vegetal</b>
71	Poaceae	Coloninho	<i>Panicum maximum</i>	Folha*
72	Poaceae	Gordura Meloso	<i>Melinis minutiflora</i>	Folha*
73	Poaceae	Jaraguá	<i>Hyparrhenia rufa</i>	Folha*
74	Poaceae	Napiê	<i>Pennisetum purpureum</i> cv.	Folha*
75	Rubiaceae	Jenipapo do Mato	<i>Genipa americana</i>	Folha
76	Rubiaceae	Marmelada	<i>Alibertia</i> sp.	Folha
77	Rubiaceae	Marmelada de cachorro	<i>Alibertia sessilis</i>	Folha
78	Rubiaceae	Quina do Mato	<i>Cinchona calisaya</i>	Folha
79	Rutaceae	Mamoninha	<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam.	Folha
80	Sapindaceae	Mandioquinha	<i>Dilodendron bipinnatum</i>	Folha
81	Sapindaceae	Tingui	<i>Magonia pubescens</i> St.	Folha
82	Simaroubaceae	Mata Cachorro	<i>Simarouba versicolor</i>	Folha
83	Siparunaceae	Negramina	<i>Siparuna guianensis</i>	Folha
84	Tiliaceae	Açoita cavalo	<i>Luehea</i> sp.	Folha
85	Verbenaceae	Malva Preta	<i>Lantana cf. salzmann</i> Schaver	Folha
86	Verbenaceae	Mama de Porca	<i>Zanthoxylum gardneri</i> Engl	Folha
87	Viscaceae	Enxerto de Passarinho	<i>Phoradendron piperoides</i> (Kunt.)	Folha
88	Vochysiaceae	Bananeira	<i>Salvertia convallariodora</i>	Folha
89	Vochysiaceae	Pau Terra	<i>Qualea grandiflora</i>	Folha
90	Vochysiaceae	Pau Terrinha	<i>Qualea</i> sp.	Folha

\*Espécies de plantas introduzidas no Cerrado.

## 2.2. Preparação dos extratos aquosos

As amostras vegetais (frutos ou folhas conforme será explicitado em cada Capítulo da Tese) foram descongeladas e lavadas uma vez com detergente neutro Extran<sup>®</sup> diluído 2000× em água bidestilada durante 3 min em agitação suave e em seguida enxaguados três vezes com água bidestilada para remover partículas de poeira indesejáveis e deixou-se secar ao ar sob proteção para remover a umidade residual. Em seguida, foram cortadas em pequenos fragmentos (~ 5 mm de largura) com auxílio de uma lâmina de bisturi ou tesoura cirúrgica e adicionados a um béquer de vidro contendo água ultrapura (tipo I) em ebulição, para uma concentração final (estoque) de 100 mg/mL, e deixou-se ferver durante 2 ou 3 min para folhas e frutos, respectivamente. Depois de ferver, cada extrato aquoso foi separado dos restos teciduais utilizando filtração por gravidade com papel de filtro Whatman N<sup>o</sup>1 sem qualquer interferência ou

pressão adicional e ao abrigo da luz. Os extratos aquosos foram separados em três alíquotas, sendo que uma foi imediatamente utilizada para a síntese de AgNPs, e as outras duas acondicionadas e armazenadas em freezer -20°C e -80°C para posterior identificação dos componentes moleculares.

### **3. Síntese de nanopartículas de prata**

#### *3.1. Síntese de nanopartículas de prata*

A síntese das AgNPs foi realizada adicionando 50 µL do extrato vegetal aquoso filtrado (100 mg/mL) à 4950 mL de solução de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) para concentração final de 1 mM à 75°C por 2,5 h. Sendo assim, as concentrações finais foram de 1 mg/mL (considerando peso seco de matéria vegetal) e 1 mM para os extratos vegetais e AgNO<sub>3</sub>, respectivamente. As reações entre os extratos e o sal metálico foram realizadas em béqueres de vidro e protegidas da luz. A formação das AgNPs foi monitorada por mudança de coloração do meio reacional por espectroscopia de absorção à 450 nm (rota de síntese padrão otimizada).

Para algumas situações, diversas condições de síntese das AgNPs foram avaliadas visando à possível obtenção de uma rota de síntese otimizada com base nas características físico-químicas almejadas: variação da temperatura do meio reacional (0°C, 25°C, 50°C ou 75°C), variação na concentração de extrato (1 a 0,1 mg/mL após diluição) e tempo de reação (2,5 ou 24 h), as quais serão detalhadas no decorrer desta Tese.

#### *3.2. Escalonamento da síntese das AgNPs-CbC*

Para o escalonamento, uma rota de síntese com um dos extratos aquosos (folhas de *Caryocar brasiliense*) foi realizada seguindo as mesmas condições descritas acima em relação à temperatura (75°C) e tempo de reação (2,5 h), mas aumentando-se apenas os volumes dos meios reacionais em 2× (10 mL), 10× (50 mL) ou 100× (500 mL). As concentrações finais de extrato vegetal aquoso e AgNO<sub>3</sub> foram proporcionalmente mantidas.

### 3.3. *Síntese em sistema de Microfluídica*

Para a síntese das AgNPs em sistema de microfluídica, foram utilizados 500 µL do extrato aquoso vegetal (*Caryocar brasiliense*) filtrado (100 mg/mL) e 49,5 mL de AgNO<sub>3</sub> (1 mM). A reação entre o extrato e o sal metálico ocorreu sob fluxo contínuo (inúmeros ciclos) em sistema de microfluídica, acoplado a bomba peristáltica, à 25°C por 2,5 h, protegido da luz. O sistema de microfluídica foi produzido por sinterização seletiva a laser com pó de titânio em parceria com o instituto Senai de Inovação em Laser, pelo Dr. Edson Cota Santos.

### 3.4. *Avaliação da estabilidade coloidal das AgNPs-CbC*

Suspensões coloidais de uma das rotas de síntese de AgNPs-CbC (folhas de *Caryocar brasiliense*) foram separadas em alíquotas de 200 µL e armazenadas em duas condições distintas de temperatura: 4°C e 25°C. As suspensões de AgNPs tiveram suas estabilidades coloidais monitoradas por até 1 mês por meio de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta de superfície de acordo com a metodologia a qual será descrita em detalhes posteriormente. Adicionalmente, uma das amostras armazenadas em 4°C foi monitorada após 1,5 anos de preparo.

### 3.5. *Liofilização e reconstituição das AgNPs-CbC*

Vinte e cinco mL das suspensões coloidais de uma das rotas de síntese de AgNPs-CbC (folhas de *Caryocar brasiliense*) foram adicionados a um tubo de polipropileno de 50 mL e armazenados em freezer -80°C por 4 h. Em seguida, a amostra foi submetida a processo de liofilização. Após completa secagem do material, as amostras foram reconstituídas adicionando-se 25 mL de água ultrapura, seguida da análise por espalhamento de luz dinâmico de acordo com a metodologia a qual será descrita em detalhes posteriormente.

### 3.6. *Perfil de dissolução das AgNPs-CbC*

Considerando o compromisso da equipe do LNANO em desenvolver rotas de dissolução para os nanossistemas desenvolvidos com vistas à prevenção de possíveis impactos ambientais, o perfil de dissolução das AgNPs-CbC foi avaliado utilizando solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em diferentes concentrações. Primeiramente,

em uma microplaca de poliestireno de 96 poços de fundo chato foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de soluções de peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações (35 a 0,001%) e 100  $\mu\text{L}$  de AgNPs-CbC a 1 mM. A reação foi monitorada em leitora de microplacas por 5 min no comprimento de onda de 450 nm. A menor concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , capaz de diminuir a absorção característica das AgNPs-CbC, foi selecionada e utilizada para avaliação da cinética de dissolução.

A cinética de dissolução foi realizada adicionando 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 0,008% em uma microplaca de poliestireno de fundo chato seguida da adição de 100  $\mu\text{L}$  de AgNPs-CbC a 1 mM. A reação foi monitorada em leitora de microplacas por 1 h no comprimento de onda de 450 nm. O experimento foi realizado em triplicatas experimentais.

#### **4. Caracterização físico-química e estrutural**

##### *4.1. Análise espectrofotométrica - Curvas de formação*

As reações de síntese das AgNPs foram monitoradas por espectrofotometria de absorção utilizando um espectrofotômetro de UV-Vis (Quimis). A cada 30 min, a partir do tempo zero, 1 mL de cada solução de AgNPs, controle de extrato e  $\text{AgNO}_3$ , era coletado e adicionado a uma cubeta de plástico de poliestireno de 1,5 mL e realizada a leitura no comprimento de onda de 450 nm seguida de imediata devolução à reação. Os valores de absorbância obtidos foram utilizados para a elaboração de curvas de formação das AgNPs. Adicionalmente, foram calculadas também a taxa de formação das AgNPs com base na inclinação das curvas de formação ao longo de todo o período de reação, como mostrado na equação abaixo, onde **t** e **a** corresponde ao tempo de monitoramento (2,5 h) e valores de absorbância, respectivamente:

$$\text{Taxa de formação} = \frac{\sum(t - \bar{t})(a - \bar{a})}{\sum(t - \bar{t})^2}$$

##### *4.2. Análise espectrofotométrica - Ressonância Plasmônica de Superfície*

Após a finalização das reações, as suspensões de AgNPs foram avaliadas quanto à ressonância plasmônica de superfície (RPS) por meio da obtenção de curvas de absorção na região do visível. Um mL de cada suspensão, diluída 5 $\times$  em água ultrapura, foi adicionado a uma cubeta de plástico de poliestireno de 1,5 mL e as medidas de

absorbância foram monitorados na faixa de comprimentos de onda de 350-500 nm, em intervalos de 10 em 10 nm, utilizando um espectrofotômetro microprocessado UV-Vis.

#### 4.3. *Análise de condutividade elétrica*

A condutividade elétrica de algumas amostras (AgNPs-CsC produzidas em diferentes temperaturas) foi avaliada em condutivímetro microprocessado (Quimis, Brasil) em cubetas de poliestireno de 4,5 mL. Todas as medições foram realizadas utilizando 1 mL de cada suspensão de AgNPs; assim como seus respectivos controles com apenas AgNO<sub>3</sub> ou extrato aquoso em água, sendo que todas as leituras foram obtidas à temperatura ambiente (22°C) a cada 30 min ou ao término das reações.

#### 4.4. *Análise por espalhamento de luz dinâmico e Potencial Zeta de superfície*

As avaliações do diâmetro hidrodinâmico e potencial Zeta de superfície das suspensões de AgNPs foram realizadas no Laboratório de Biofísica da Universidade de Brasília (UnB) ou no Laboratório Nanobiotecnologia, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa Cenargen).

O diâmetro hidrodinâmico das AgNPs foi determinado pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) em equipamento ZetaSizer Nano ZS utilizando laser He-Ne (4 mW) operando a 633 nm e detecção de dispersão de luz em um ângulo de 173°. O potencial Zeta de superfície foi medido utilizando o mesmo equipamento em modo que permite avaliar a mobilidade eletroforética e aplicando-se tensão determinada em modo automático. O tamanho das partículas (diâmetro hidrodinâmico), a polidispersividade (PdI), bem como o potencial Zeta de superfície e condutividade elétrica das AgNPs foram obtidos a partir de três medições independentes para cada parâmetro, à temperatura de 25°C, pH 6,5, em meio reacional aquoso utilizando célula capilar de policarbonato com eletrodos revestidos a ouro. Para as análises, as amostras foram diluídas 5× em água ultrapura. Sempre foram determinados primeiramente o diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersividade por se tratarem de abordagens não destrutivas, e posteriormente foram avaliados o potencial Zeta e condutividade elétrica das amostras. As análises foram realizadas utilizando o software de análise ZetaSizer versão 7.04 que acompanha o equipamento.

#### 4.5. *Microscopia de força atômica (MFA)*

Um  $\mu\text{L}$  de cada suspensão coloidal de AgNPs [AgNPs-CsC (nanopartículas sintetizadas com extrato aquoso de castanha de caju) e AgNPs-CbC (nanopartículas sintetizadas com extrato aquoso de folhas de *Caryocar brasiliense*)], diluída 10 $\times$  em água ultrapura, foi depositado sobre a superfície de mica moscovita clivada imediatamente antes de cada análise, e deixou-se secar ao ar em ambiente protegido da deposição de partículas atmosféricas utilizando uma placa de Petri. Posteriormente, as amostras foram individualmente montadas em porta-amostra metálico em formato de moeda utilizando fita dupla-face e acondicionadas na base do equipamento. As análises foram realizadas ao ar em temperatura condicionada em  $\sim 22 \pm 1^\circ\text{C}$  utilizando um microscópio de força atômica SPM-9600 (Shimadzu), equipado com um escâner com área máxima de varredura de  $125 \times 125 \mu\text{m}^2$  em modo dinâmico (fase-viscoelasticidade) utilizando um *cantilever* (haste) retangular integrado com ponteira cônica de silício com constante mola de 10-130 N/m (tipicamente em torno de 42 N/m) e frequência de ressonância de 204-497 kHz (tipicamente em torno de 250 kHz), e utilizando frequência de varredura de 1 Hz. Áreas de  $100 \mu\text{m}^2$  foram avaliadas, e as imagens obtidas com uma resolução de  $512 \times 512$  linhas foram processadas para correções de plano de varredura e eixo X com o módulo off-line do software que acompanha o instrumento. Para cada amostra, as estruturas foram medidas por meio de segmentação individual utilizando o software de análise de partículas SPM 9600 em modo off-line, os quais possibilitaram a obtenção de diversos parâmetros, dentre eles a altura. As medidas de altura foram submetidas à avaliação quantitativa por meio de distribuição em classes de diâmetro seco determinado pela altura.

#### 4.6. *Microscopia eletrônica de transmissão (MET)*

As AgNPs-CbC também foram analisadas quanto à forma por MET no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB. Para a preparação das amostras,  $5 \mu\text{L}$  de cada suspensão de nanopartículas, diluídas 10 $\times$ , foram depositados sobre grades de cobre com 150 malhas vazadas previamente recobertas com uma película de Formvar revestida com carbono. O material foi então mantido sob proteção em ambiente seco a  $25^\circ\text{C}$ , por no mínimo, 24 h para completa secagem. A morfologia das AgNPs sintetizadas foi analisada em um microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011

(Joel) operado a 100 kV. As micrografias eletrônicas foram obtidas com uma câmera digital (Gatan) integrada ao microscópio.

#### 4.7. *Atividade antioxidante dos extratos*

A atividade antioxidante foi analisada pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) de acordo com modificação do método descrita por Brand-Williams e colaboradores (1995). Extrato aquoso (pequi) foi preparado utilizando-se folhas na concentração 100 mg/mL. A uma microplaca de 96 poços de fundo chato foram adicionados 75 µL de extrato aquoso das folhas a 100 mg/mL, seguido da adição de 225 µL de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DHPP) a 0,1 mM em metanol. A reação foi incubada protegida da luz a 25°C por 30 min. Em seguida, a absorbância foi avaliada utilizando leitora de microplacas (SpectraMax) no comprimento de onda de 575 nm. Para o branco e controle foram utilizados 225 µL de metanol e 75 µL de água, e 225 µL de DPPH e 75 µL de água, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os percentuais da atividade antioxidante foram determinados de acordo com a fórmula abaixo, onde  $Abs_{am}$  corresponde à absorbância da amostra;  $Abs_{br}$  corresponde à absorbância do branco de reação (metanol); e  $Abs_{cn}$  corresponde à absorbância do controle negativo (DPPH em metanol):

$$AA (\%) = 100 - \frac{(Abs_{am} - Abs_{br} \times 100)}{Abs_{cn}}$$

#### 4.8. *Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)*

As análises de FTIR foram realizadas no Laboratório de Instrumentação Analítica da UnB (*Campus Ceilândia*) no intuito de identificar a presença de possíveis grupamentos químicos de moléculas responsáveis pelos processos de biorredução e/ou estabilização das AgNPs-CbC. As amostras de AgNPs-CbC, controle de extrato vegetal (CbC) e AgNO<sub>3</sub> foram submetidas a processo de liofilização em sistema de *speed vacuum* (CentriVap). Para a análise, foram utilizadas pastilhas de brometo de potássio (KBr) com massa média de 30,0 mg preparadas com aproximadamente 5% de amostra liofilizada, prensadas a 80 kN durante 3 minutos. Os espectros foram obtidos a partir de 45 registros, com resolução de 4 cm<sup>-1</sup> na região compreendida entre 4000 e 400 cm<sup>-1</sup> no

modo de porcentagem de transmitância. Os dados adquiridos foram submetidos à análise com o software IR Solution 1.50.

#### 4.9. *Espectroscopia Raman*

As análises de espectroscopia Raman foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e no Laboratório de Espectroscopia Óptica da Universidade de Brasília (UnB) visando identificar a presença de possíveis grupamentos químicos de moléculas responsáveis pelos processos de biorredução e/ou estabilização das AgNPs-CbC.

As amostras de AgNPs-CbC, controle de extrato vegetal (CbC) e AgNO<sub>3</sub> foram adicionadas em meio aquoso a uma lâmina de vidro e analisadas em espectrômetro Raman triplo T640000. Os espectros foram adquiridos na configuração micro-Raman com lente objetiva com aumento de 50× utilizando laser de  $\lambda = 532$  nm e tempo de integração de 30 s, três vezes de repetição, na região compreendida entre 4000 e 150 cm<sup>-1</sup>. Os dados adquiridos foram submetidos à análise com o software LabSpec5 versão 5.78.24.

As amostras de AgNPs-CbC, controle de extrato vegetal (CbC) e AgNO<sub>3</sub> também foram submetidas a processo de liofilização para completa secagem das amostras. As amostras secas foram adicionadas a superfície de uma lamínula de vidro e analisadas imediatamente em Microscópio Confocal Raman Alpha 300 RA (Witec). Os espectros foram adquiridos utilizando laser de  $\lambda = 785$  nm, objetiva com aumento de 20×, com tempo de integração de 0,2 s e acumulação de 100 registros, com resolução espectral de 2 cm<sup>-1</sup> na região compreendida entre 1800 e 100 cm<sup>-1</sup>. Os dados adquiridos foram submetidos à análise com o software IR Project Four 4, versão 4.0.

#### 4.10. *Análise de perfis moleculares por espectrometria de massa MALDI-TOF*

Um  $\mu$ L de cada extrato aquoso e/ou suspensão de AgNPs foi aplicado sobre placas de MALDI dos tipos AnchorChip var/384 ou MTP 384 *ground steel* (Bruker Daltonics) e esperou-se secar à temperatura ambiente. Em seguida foi depositado 1  $\mu$ L de uma solução saturada de matriz  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/mL). Amostras cristalizadas foram analisadas em um espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF AutoFlex Speed (Bruker Daltonics) operado em modo refletido/positivo na faixa de m/z 100-1200, utilizando calibração externa realizada com íons típicos da matriz. Os



espectros foram adquiridos automaticamente utilizando um procedimento padrão com acumulação de 10000 disparos de laser a 200 Hz. Experimentos de MS/MS na tentativa de verificar a identidade molecular foram realizados em modo LIFT™ positivo.

O processamento dos dados foi realizado de forma distinta para os extratos aquosos e as suspensões de AgNPs. Para as amostras de AgNPs (sintetizadas utilizando extratos de castanha de caju e folhas de pequi), os espectros de massa adquiridos (12 repetições) foram inspecionados visualmente para a seleção de um espectro representativo de cada amostra utilizando o software FlexAnalysis, versão 3.3. Além disso, para as amostras AgNPs-CsC (castanhas de caju) calculou-se a razão entre dois íons representativos que ocorreram em todas as amostras. Para as amostras de extratos das diversas espécies de plantas (90), os espectros de massa adquiridos (4 repetições) foram inspecionados visualmente e em seguida utilizados para a geração de espectros médios representativos, os quais foram utilizados para geração de representações gráficas na forma de gel utilizando o software mMass versão 5.5.0. Além disso, os espectros obtidos para a mesma amostra (AgNPs e/ou extratos) foram utilizadas para gerar um espectro padrão (MSP). A partir dos MSP de cada amostra, foram gerados dendrogramas utilizando software MALDI Biotyper versão 3.0 seguindo métodos padrão de avaliação comparativa entre amostras pela distância Euclideana medida entre os MSPs (Bruker Daltonics).

#### *4.11. Identificação de componentes moleculares por meio de UFLC-UHR-QqTOF MS (Cromatografia ultrarrápida acoplada a espectrometria de massa de ultra alta resolução)*

As análises por espectrometria de massa de ultra alta resolução em tempo de vôo (UHR-QqTOF MS) para determinação da massa molecular exata de metabólitos presentes no extrato de pequi (CbC) foram realizadas em um equipamento Impact II (Bruker Daltonics) acoplado a um sistema de fracionamento por cromatografia líquida ultrarrápida Prominence UFLC (Shimadzu). Para as análises de cromatografia líquida foi utilizada uma coluna Accucore™ C<sub>18</sub> (Thermo Scientific™) com partículas de 2,6 µm de diâmetro e dimensões de 100 × 2 cm, mediante eluição dos componentes presentes no CbC em fase móvel constituída por acetonitrila em ácido fórmico a 0,1% por meio de um processo de separação com duração de 15,02 min e com fluxo de 0,2 mL/min sendo monitorada a aquisição a 254 nm e com detecção de massa associada. As

frações eluídas foram detectadas diretamente (on-line) no espectrômetro de massa operado em modo positivo, com varredura de massas na faixa de massa de  $m/z$  50 a 1200 utilizando calibração interna com  $\text{Na}(\text{NaCOOH})_n$ , onde  $n$  variou de 1 a 15. O erro instrumental observado entre a massa molecular exata (calculada) e a massa molecular acurada (experimental) para os íons do calibrante foi em média de 6,5 ppm (com variação de 4,99 a 7,35 ppm). A tensão capilar da fonte de íons (MultiMode) foi ajustada para 2500 V, com o fluxo de gás nebulizador de 2,0 bar e o fluxo de gás nitrogênio seco de 6 L/min.

A fim de assegurar uma comparação imparcial das intensidades dos íons com vistas à tentativa de identificação dos compostos pela comparação com a massa exata calculada, foram realizadas etapas de pré-processamento dos dados que incluíram: a remoção dos calibrantes internos, eliminação dos isótopos correspondentes à uma mesma molécula e eliminação de contaminantes conhecidos que tipicamente são detectados. O software MZmine (versão 2.21) foi utilizado para a geração de gráficos bidimensionais e tridimensionais representando o tempo de retenção, razão  $m/z$  e intensidade dos componentes moleculares detectados na faixa compreendida entre 0,3 a 10 min de eluição. Também foram gerados histogramas de distribuição em intervalos de classes de tempo retenção e de razão  $m/z$  dos componentes eluídos. Finalmente, os íons foram ranqueados por ordem decrescente de intensidade e submetidos a comparações contra os bancos de dados PlantCyc (<http://www.plantcyc.org/databases>), Keeg (<http://www.kegg.jp/kegg/atlas/?01100>) e PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) considerando vários tipos de adutos carregados positivamente ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $[\text{M}+\text{K}]^+$  e  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ). Para fins de visualização final das tentativas de identificações as frações correspondentes às moléculas identificadas foram indicadas em um cromatograma de pico base (principal) e foi confeccionada uma lista contendo o ranqueamento por ordem de intensidade (ID), massa molecular acurada experimentalmente determinada ( $m/z$ ), tempo de retenção em minutos (TR), variação de  $m/z$  em relação aos valores esperados para a massa exata (calculada) com base no composto previsto ( $\Delta m/z$ ), erro associado à possível identificação em partes por milhão (ppm), fórmula provável do composto, identidade provável indicada e classe a qual pertence os compostos. Todas essas informações foram posteriormente inspecionadas manualmente para confirmação das tentativas de identificações.

## 5. Avaliação de toxicidade *in vitro* e *in vivo*

As AgNPs sintetizadas utilizando folhas de plantas do Cerrado Brasileiro foram aplicadas em ensaios de toxicidade *in vitro* e *in vivo*. Os ensaios *in vitro* foram realizados em bactéria Gram-negativa (*Escherichia coli*) e Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*); leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*); células de mamíferos normais (macrófagos, hemácias e fibroblastos murinos (NIH3T3) e tumorais [câncer de mama murino (4T1) e humano (MCF-7)]; nematoides (*Caenorhabditis elegans* e *Meloidogyne incognita*); células de insetos (Sf21); sementes e plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Os ensaios *in vivo* foram realizados em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) em casa de vegetação; e em camundongos (C57Bl/6).

### 5.1. Toxicidade *in vitro*

#### 5.1.1. Toxicidade em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*

A atividade das AgNPs-CsC, sintetizadas com extrato de fruto de caju de árvore do Cerrado, foi avaliada contra a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em concentrações micromolares. Dez mg de liofilizado de *S. cerevisiae* Fermipan<sup>®</sup> foram cultivados em meio YEPD (4% de peptona, extrato de levedura a 2% e glicose a 4%) durante 24 h em frascos do tipo Erlenmeyer com agitação de 60 rpm a 28°C. Então, a densidade celular foi ajustada de acordo com a medida de absorbância realizada a 600 nm para uma OD de 0,500.

Posteriormente, 190 µL do meio de cultura contendo as células foram adicionados em microtubos de polipropileno de 1,5 mL. A cada microtubo, foram adicionados 10 µL (a partir da máxima concentração) das AgNPs-CsC, extrato vegetal aquoso e AgNO<sub>3</sub> para uma concentração final equivalente a 25 µM de AgNO<sub>3</sub> livre. As misturas foram incubadas a 28°C sob agitação orbital horizontal durante 3 h. Subsequentemente, as amostras foram centrifugadas a 604 g durante 3 min. O meio de cultura foi retirado e 150 µL de solução de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (15 µL de solução a 5 mg/mL de MTT diluído em 135 µL de meio YEPD) foram adicionados a cada microtubo e incubou-se durante 2 h a 28°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 604 g durante 3 min, e a solução de MTT foi removida e 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados para solubilizar o formazan formado nas células metabolicamente ativas. O sobrenadante foi recolhido e transferido para uma microplaca de poliestireno de 96 poços de fundo chato. A

quantificação do formazan liberado foi realizada por medição da absorvância da solução a partir de poços em um comprimento de onda de 630 nm utilizando uma leitora de microplacas (BioTek). A viabilidade celular foi determinada, em porcentagem, de acordo com a equação abaixo, onde A é a absorvância da amostra, B é a absorvância do branco e C é a absorvância do grupo controle.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{(A - B) \times 100}{(C - B)}$$

### 5.1.2. Concentração mínima inibitória (MIC)

As possíveis atividades antimicrobianas de todas as AgNPs e AgMPs (sintetizadas utilizando extrato aquoso de folhas), os extratos aquosos de folhas e AgNO<sub>3</sub> foram determinadas por meio de testes de microdiluição estabelecidos pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) para bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 25922 e Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e também para levedura *Candida albicans* ATCC 90028, sendo que esses ensaios foram realizados no Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia-GO.

Uma unidade formadora de colônia (UFC) foi espalhada em cada tubo de ensaio contendo meio de cultura ágar Casoy (p/v), e incubada em estufa a 35 ± 2°C por 2 h. Após esse período de crescimento, uma suspensão de UFCs de cada um dos microrganismos foi preparada em solução salina estéril (0,9%, p/v). Cada uma das suspensões foi ajustada para uma turbidez equivalente a uma solução padrão de McFarland com OD de 0,500. Esse valor de absorvância indicativo de turbidez equivale a aproximadamente 1 × 10<sup>8</sup> UFC/mL e a uma faixa de transmitância de 79-83% a 625 nm, a qual foi ajustada com o auxílio de um espectrofotômetro. Cada uma das suspensões foi diluída 100× em meio de cultura Mueller-Hinton (21 g/L) para obtenção dos inóculos em uma concentração final de 1 × 10<sup>6</sup> UFC/mL para bactérias e 1 × 10<sup>5</sup> UFC/mL para levedura. As AgNPs e seus respectivos controles, extratos aquosos e AgNO<sub>3</sub>, em diferentes concentrações variando de 256 a 4 µM, foram adicionadas a microplacas de poliestireno de fundo em “U e incubadas em estufa bacteriológica por 24 h a 37 ± 2°C para bactérias e 48 h a 37 ± 2°C para levedura. A concentração inibitória mínima (MIC) e a concentração bactericida e antifúngica mínima (CBM)

foram determinadas como a concentração na qual não há crescimento celular visível após 24 h e 72 h de incubação a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ , respectivamente. Todos os testes foram realizados em triplicatas experimentais, sendo que o MIC foi considerado a condição na qual ocorreu a inibição em pelo menos duas das três réplicas avaliadas.

### 5.1.3. Toxicidade em células de mamíferos normais e tumorais

Os ensaios de toxicidade em células de mamíferos foram realizados no Laboratório de Nanobiotecnologia e no Laboratório de Imunologia da Universidade de Brasília (UnB).

Linhagens de células tumorais [câncer de mama murino (4T1) e humano (MCF-7)] e normais [fibroblasto murino - NIH3T3 e macrófagos peritoneais (C57Bl/6)] foram cultivadas em meio de cultura (89% de DMEM, 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina, Invitrogen (Fibroblasto e MCF-7) ou 89% RPMI, 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina, Invitrogen (macrófagos e 4T1)] por 24 h em microplaca de 96 poços na proporção  $1 \times 10^4$  células/poço em estufa a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Em cada poço, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  (a partir da máxima concentração de 1 mM) das AgNPs-CbC, e os respectivos controles extrato de folhas de *C. brasiliense* (CbC),  $\text{Ag}^+$  ( $\text{AgNO}_3$ ) e  $\text{H}_2\text{O}$ , sendo o volume final de ensaio de 200  $\mu\text{L}$ . Após 24 h de incubação, o meio de cultura foi retirado e foram adicionados, a cada poço, 150  $\mu\text{L}$  de solução de MTT (15  $\mu\text{L}$  de MTT a 5 mg/mL diluídos em 135  $\mu\text{L}$  de meio de cultura), e deixado em estufa a  $37^\circ\text{C}$  por 2 h. Em seguida, a solução de MTT foi retirada e 100  $\mu\text{L}$  de DMSO foram adicionados para solubilizar o formazan. A quantificação do formazan liberado foi realizada pela medida da absorbância da solução presente nos poços das microplacas no comprimento de onda de 595 nm, em um espectrofotômetro conjugado a uma leitora de microplacas (SpectraMax).

A viabilidade celular foi determinada, em porcentagem, de acordo com a equação abaixo, onde A é a absorbância da amostra, B é a absorbância do branco e C é a absorbância do grupo controle.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{(A - B) \times 100}{(C - B)}$$

#### 5.1.4. Toxicidade em células sanguíneas de mamífero - Hemólise

Sangue de camundongo (C57Bl/6) foi coletado pelo seio orbital em microtubos de polipropileno contendo 10 µL de EDTA 10% e armazenado a 4°C até a realização do ensaio de atividade hemolítica. Setenta µL de sangue total foram adicionados a microtubos de polipropileno de 1,5 mL seguida da adição de 10 µL da suspensão de AgNPs-CbC, e seus respectivos controles de extrato (CbC) e Ag<sup>+</sup> livre (AgNO<sub>3</sub>), em diferentes concentrações (128, 64, 32, 16 e 8 µM) e deixado incubando à 37°C sob agitação lenta por 30 minutos. Como controle positivo foi utilizado Triton X-100 0,2% e como controle negativo, tampão fosfato salina (PBS) 100 mM e o ensaio foi realizado em triplicata. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 900 g por 5 min, e 1 µL do sobrenadante foi coletado e adicionado ao poço, de uma microplaca de poliestireno de 96 poços, contendo 199 µL de água ultrapura. As amostras foram homogeneizadas e foi realizada leitura espectrofotométrica em leitora de microplacas no comprimento de onda de 405 nm. A taxa de hemólise foi calculada em percentual comparativamente ao controle positivo (100% de hemólise).

#### 5.1.5. Viabilidade de *Caenorhabditis elegans*

Nematoides *C. elegans* foram adicionados a microplacas de 24 poços, na proporção de 200 organismos/poço e mantidos a 20°C. Primeiramente, as amostras AgNPs-CbC, CbC e AgNO<sub>3</sub> foram diluídas 10× em água ultrapura (concentração final de 100 µM). Posteriormente, para cada poço, foram adicionados 70 ou 140 µL das diluições de AgNPs-CbC, de extrato vegetal aquoso e AgNO<sub>3</sub>, em um volume final de ensaio de 1 mL. Após 24 h de incubação, a placa foi centrifugada a 800 g e 800 µL de sobrenadante foram removidos e 150 µL da solução contendo os nematoides foram adicionados a uma microplaca de poliestireno de 96 poços. Posteriormente, 150 µL de solução de MTT (5 mg/mL) foram adicionados a cada poço, e incubou-se durante 3 h a 20°C protegido da luz. Em seguida, a solução de MTT foi removida e 150 µL de DMSO foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada durante 1 h a 20°C para solubilizar o formazan. A quantificação do formazan liberado foi realizada pela medida da absorbância da solução dos poços em comprimento de onda de 595 nm utilizando um espectrofotômetro conjugado a uma leitora de microplacas (SpectraMax).

A viabilidade celular foi determinada, em porcentagem, de acordo com a equação abaixo, onde A é a absorbância da amostra, B é a absorbância do branco (DMSO puro) e C é a absorbância do grupo controle.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{(A - B) \times 100}{(C - B)}$$

#### 5.1.6. Toxicidade em *Meloidogyne incognita*

Ovos do nematoide *M. incognita* foram obtidos a partir de raízes de *Lycopersicon esculentum* (tomateiro) após três meses de infestação, mantidos em casa de vegetação. Para a obtenção dos ovos, as raízes das plantas foram seccionadas e trituradas em liquidificador contendo solução de hipoclorito de sódio 0,5%. Os ovos foram mantidos em câmara de eclosão a 26°C por 48 h para obtenção de juvenis de segundo estágio (J2). Decorrido esse período a suspensão contendo os nematoides juvenis foi vertida em peneira de 0,025 mm de malha (500 malhas) e transferidos para um frasco tipo béquer de 500 mL contendo água destilada com auxílio de pisseta.

O ensaio foi realizado em microtubos de polipropileno de 1,5 mL, onde a cada microtubo foram adicionados 500 µL de suspensão contendo os nematoides juvenis de segundo estágio de *M. incognita* e 100 µL das amostras de AgNPs-CbC, extrato vegetal aquoso (CbC) ou Ag<sup>+</sup> livre (AgNO<sub>3</sub>) já diluídas para uma concentração final de ensaio 100 µM, 10 µM ou 1 µM, referente e equivalente à concentração de AgNO<sub>3</sub> livre. Os tubos foram fechados e incubados por 24 h à temperatura de ~26°C. Decorrido o período de incubação, o conteúdo dos tubos foi transferido para uma lâmina de Peters e examinados ao microscópio de luz para determinação da porcentagem de nematoides juvenis inativos. Em seguida, os tubos contendo os animais inativos foram submetidos a processo de centrifugação a 608 g por 3 min. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e adicionado 1 mL de água destilada, sendo esse procedimento repetido por três vezes. Na última etapa os *M. incognita* juvenis foram deixados em repouso em água destilada por mais 24 h. Após esse procedimento, os exemplares foram avaliados novamente por microscopia de luz para a determinação da atividade nematocida ou nematostática. Adicionalmente, registros fotográficos foram realizados utilizando microscópio de luz Axiophot (Zeiss), acoplado a câmera digital em aumento de 10×.

A porcentagem de animais vivos foi determinada, em porcentagem, de acordo com a equação abaixo, onde A é o número de organismos vivos e B é a média aritmética do total de organismos vivos de cada triplicata.

$$\text{Animais vivos(\%)} = \frac{A \times 100}{B}$$

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Prospecção de Compostos Bioativos e no Laboratório de Bioimagem da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Brasília-DF.

#### 5.1.7. Toxicidade em células de inseto

Os ensaios de toxicidade em células de insetos foram realizados no Laboratório de Virologia de Insetos (LVI) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Células da linhagem celular Sf21 (American Type Culture Collection, MD) (*Spodoptera frugiperda*) foram cultivadas em meio de cultura (TNMFH suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico sulfato de gentamicina) por 6 h em placa de 96 poços na proporção de  $2 \times 10^4$  células/poço em estufa a 28°C. A cada poço foram adicionados 10 µL (a partir da máxima concentração) das AgNPs-CbC, extrato aquoso de folhas de *C. brasiliense* (CbC) ou Ag<sup>+</sup> livre (AgNO<sub>3</sub>). Após 24 h de incubação, o meio de cultura foi retirado e foram adicionados, a cada poço, 100 µL de solução de MTT (10 µL de MTT 5 mg/mL diluídos em 90 µL de meio de cultura), e deixado em estufa a 28°C por 1,5 h. Em seguida, a solução de MTT foi retirada e 100 µL de DMSO foram adicionados para solubilizar o formazan. A quantificação do formazan liberado foi realizada pela medida da absorbância da solução presente nos poços das microplacas no comprimento de onda de 630 nm em leitora de microplacas (Quimis).

A viabilidade celular foi determinada, em porcentagem, de acordo com a equação abaixo, onde A é a absorbância da amostra, B é a absorbância do branco e C é a absorbância do grupo controle.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{(A - B) \times 100}{(C - B)}$$



#### 5.1.8. Toxicidade em sementes de tabaco

Sementes de *Nicotiana tabacum* L. foram submetidas a processo de desinfestação, em câmara de fluxo laminar, por meio da imersão em etanol 70% durante 2 min, hipoclorito de sódio 2,5% durante 20 min, seguida de múltiplas lavagens com água destilada esterilizada em autoclave. Após o processo de desinfestação, as sementes foram imersas na suspensão de AgNPs, de extrato de folhas de *C. brasiliense* (CbC) ou Ag<sup>+</sup> livre (AgNO<sub>3</sub>), e colocadas em placa de Petri forrada com papel filtro. As sementes foram mantidas em sala de crescimento, a 25°C com fotoperíodo de 16 h/claro e 8 h/escuro por 15 dias, e tiveram suas características anatômicas avaliadas.

#### 5.1.9. Toxicidade em plantas de tabaco

Sementes de *N. tabacum* foram submetidas a processo de desinfestação por imersão em hipoclorito de sódio 1%. As sementes foram inoculadas em frascos de vidro de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultura Murashige & Skoog (MS) (tiamina (0,1 mg/L), piridoxina (0,5 mg/L), ácido nicotínico (0,5 mg/L), glicina (2 mg/L) e mio-inositol (100 mg/L)), suplementado com sacarose (30 g/L) e gelificado com fitagel (2,5 g/L), pH 5,8. Duas sementes foram inoculadas por frasco e a germinação ocorreu em sala de crescimento, a 25°C com fotoperíodo de 16 h/claro e 8 h/escuro.

As AgNPs-CbC, e seus respectivos controles CbC e Ag<sup>+</sup> livre (AgNO<sub>3</sub>), foram diluídos em água ultrapura para uma concentração final de 100 µM e submetidas a filtros Millipore com poros de 0,22 µm. Em seguida, 2 mL das amostras foram adicionadas ao meio de cultura após 31 dias de crescimento das plantas. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar.

Ao final do período de 21 dias, as plantas foram coletadas, retiradas do meio de cultura, e tiveram alguns parâmetros anatômicos avaliados: comprimento total da planta (CTP), comprimento e largura das folhas (CF e LF) e estádios vegetativos (EV) com auxílio de paquímetro digital (InSize), inspeção visual e fotografia digital. Fragmentos de folhas para quantificação de clorofila e folhas inteiras foram congelados em nitrogênio líquido e posteriormente em freezer -80°C para realização de ensaios bioquímicos.

## 5.2. Toxicidade *in vivo*

### 5.2.1. Toxicidade em plantas de tabaco

Sementes de *N. tabacum* foram submetidas a processo de desinfestação por imersão em hipoclorito de sódio 1%. Em seguida, as sementes foram transferidas para placas de Petri (60 × 15 cm) contendo meio de cultura MS (Murashige & Skoog). As placas foram acondicionadas em sala de cultura de tecido vegetal, a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 21 dias, para o desenvolvimento das plântulas.

Plântulas com ~ 2 cm de altura foram transplantadas individualmente, com auxílio de pinça, para copos plásticos de 500 mL contendo 500 g de terra e foram mantidas em casa de vegetação por 10 dias a  $28 \pm 4^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $65 \pm 10\%$ , para período de adaptação.

Após esse período, 10 mL de AgNPs-CbC e seus respectivos controles CbC e  $\text{Ag}^+$  livre ( $\text{AgNO}_3$ ), à 100  $\mu\text{M}$  referente à concentração de  $\text{AgNO}_3$  livre, foram distribuídos individualmente na base da planta com auxílio de micropipeta. Após 15 dias, as plantas foram cautelosamente retiradas dos copos e tiveram suas raízes lavadas em água corrente e secas em papel de filtro. Em seguida, as plantas tiveram alguns parâmetros anatômicos avaliados: comprimento total da planta (CTP), comprimento da parte aérea (CPA) e comprimento da raiz (CR), comprimento e largura das folhas (CF e LF) e estágios vegetativos (EV) com auxílio de paquímetro digital (InSize), inspeção visual e fotografia digital. Raízes e folhas (inferior (Fi), folha média (Fm) e folha superior (Fs) inteiras foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em freezer  $-40^\circ\text{C}$ , para realização de ensaios bioquímicos.

Os experimentos foram realizados na área experimental (casa de vegetação) e nos laboratórios de Cultura de Tecidos e de Prospecção de Compostos Bioativos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Brasília-DF.

### 5.2.2. Avaliação bioquímica

#### 5.2.2.1. Quantificação de carotenoides e clorofila

Fragmentos circulares de folhas de tabaco com 0,5 cm de diâmetro foram cortados com auxílio de perfurador de couro. Dois fragmentos foram colocados em tubo de ensaio de vidro contendo 5 mL de acetona 80%, protegidos da luz e as amostras foram incubadas por 24 h à  $4^\circ\text{C}$ . Após esse período alíquotas de 1 mL foram

adicionadas a cubetas de vidro e foram realizadas leituras espectrofotométricas nos comprimentos de onda de 470, 645, 652 e 663 para determinação de conteúdo de clorofilas a e b.

As quantificações de clorofila a, clorofila b, clorofila total e carotenoides foram determinadas de acordo com as equações abaixo, onde A é a absorvância no comprimento de onda utilizado, conforme metodologia de Arnon (1949). A quantificação de carotenoides totais também foi determinada de acordo a equação abaixo, conforme metodologia de Lichtenthaler (1987), onde CCa e CCb correspondem à concentração de clorofilas a e b, respectivamente. Os resultados obtidos foram expressos em miligramas por mililitros.

$$\begin{aligned} \text{CCa} &= 12,7 (A_{663\text{nm}}) - 2,64 (A_{645\text{nm}}) \\ \text{CCb} &= 22,9 (A_{645\text{nm}}) - 4,68 (A_{663\text{nm}}) \\ \text{CT} &= \text{CCa} + \text{CCb} \\ \text{Carotenoides} &= 1000 (A_{470\text{nm}}) - 1,82 \text{ Cca} - 104,96 \left( \frac{\text{CCb}}{198} \right) \end{aligned}$$

#### 5.2.2.2. *Peroxidação lipídica*

As folhas de tabaco congeladas foram adicionadas em um almofariz de porcelana resfriado em nitrogênio líquido e maceradas com o auxílio de um pistilo até a obtenção de um pó fino. O pó, ~50 mg, foi então adicionado a um microtubo de polipropileno de 1,5 mL com auxílio de uma espátula. Em seguida, foram adicionados 250 µL de metanol e a amostra foi transferida para um homogeneizador manual de vidro e o material foi homogeneizado por 25 ciclos de maceração. O homogeneizado foi então coletado e adicionado a um microtubo de polipropileno de 1,5 mL, o qual foi submetido a processo de centrifugação por 15 minutos a 16467 g à 4°C. Todas as etapas foram realizadas em banho de gelo.

Ao outro microtubo de polipropileno de 1,5 mL foram adicionados 25 µL de sulfato ferroso a 10 mM, 100 µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 250 mM, 25µL de sal tetrassódico xilenol laranja a 4 mM, 850 µL de água ultrapura e 60 µL do sobrenadante metanólico, e deixados incubando por 24 h à temperatura ambiente (25°C). Para o branco, o volume de sobrenadante metanólico foi substituído por água ultrapura. Após 24 h de incubação, foram realizadas medidas das amostras utilizando espectrofotômetro

a 580 nm. Em seguida, foram adicionados 5  $\mu$ L de solução etanólica de hidróxido de cumeno a 1 mM e após 5 minutos foram realizadas novas leituras utilizando espectrofotômetro a 580 nm.

Os níveis de peroxidação lipídica foram determinados, em porcentagem, de acordo com a equação abaixo, onde CHP corresponde a 5 nmol de hidróxido de cumeno, V1 ao volume de amostras de extrato utilizado e o fator de "6" pressupõe um 1:5 massa/volume de extrato metanólico, conforme Hermes-Lima e colaboradores (1995).

$$\text{Peroxidação lipídica} = \frac{\text{CHPE}}{\text{g peso molhado}}$$
$$\text{g peso molhado} = \left( \frac{A_{580_i}}{A_{580_{\text{CHP}}}} \right) \times 5 \times \frac{1000}{V_1} \times 6$$

### **Atividade nematicida em *Meloidogyne incognita in vivo***

#### *5.2.3. Controle de nematoides Meloidogyne incognita in vivo*

Sementes de *N. tabacum* foram submetidas a processo de desinfestação, plantadas em sementeira contendo terra e mantidas em casa de vegetação por 10 dias a  $28 \pm 4^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $65 \pm 10\%$ . Após o processo de germinação as plântulas com ~2 cm foram transplantadas individualmente, com auxílio de pinça, para copos plásticos de 500 mL contendo 500 g de terra estéril e foram mantidas em casa de vegetação por 15 dias a  $28 \pm 4^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $65 \pm 10\%$ , para período de adaptação.

Após esse período, 10 mL de AgNPs-CbC e seus respectivos controles, à 100  $\mu\text{M}$  referente à concentração de  $\text{AgNO}_3$  livre, foram distribuídos individualmente na base da planta com auxílio de micropipeta. Em seguida, 6 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  contendo ~1000 nematoides *M. incognita* foram distribuídos com auxílio de micropipeta, na base da planta, e passados 10 dias as plantas foram cuidadosamente retiradas dos copos plásticos e transferidas para sacos plásticos próprios para cultivo.

Após 40 dias, as plantas foram cautelosamente retiradas dos sacos e tiveram alguns parâmetros anatômicos avaliados: comprimento total da planta (CTP), comprimento da parte aérea (CPA) e comprimento da raiz (CR), comprimento e largura das folhas (CF e LF) e estágios vegetativos (EV) com auxílio de paquímetro digital (InSize) e inspeção visual. Raízes foram coletadas para a obtenção e quantificação dos

ovos visando avaliar o potencial nematicida, e as folhas inteiras foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente em freezer -40°C, para realização de ensaios bioquímicos (quantificação de clorofila e peroxidação lipídica, conforme relatado anteriormente).

Para obtenção dos ovos, as raízes das plantas foram seccionadas e adicionadas a um liquidificador contendo 500 mL de hipoclorito de sódio 0,5% para trituração durante 1 min. A suspensão foi cuidadosamente filtrada utilizando peneiras granulométricas, números 20, 50 e 500, sendo que a cada etapa o material retido foi lavado abundantemente com água corrente. O material retido na peneira de número 500, contendo os ovos, foi recuperado em um frasco de vidro contendo água destilada, sendo o volume final de 100 mL. Em seguida, 2 mL da suspensão contendo os ovos foram transferidos para uma lâmina de Peters e examinadas em microscópio de luz para determinação da porcentagem ovos extraídos de cada planta.

Os ovos foram mantidos em câmara de eclosão a 26°C por 48 h para obtenção de juvenis de segundo estágio (J2). Decorrido esse período, a suspensão contendo os nematoides juvenis foi homogeneizada e 2 mL também foram transferidos para uma lâmina de Peters e examinados em microscópio de luz para avaliação da taxa de eclosão. A porcentagem de animais vivos foi determinada, em porcentagem, de acordo com a equação abaixo, onde A é a número de organismo vivo, B é a média aritmética do total de organismos vivos de cada triplicata.

$$\text{Animais vivos(\%)} = \frac{A \times 100}{B}$$

#### 5.2.4. Toxicidade em camundongos

Camundongos (C57Bl/6 - Black) adultos com ~8 semanas de idade, foram acondicionados em gaiolas e mantidos em condições controladas de luz (ciclo de 12 h de claro/escuro), temperatura (23°C) e umidade (55%), no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Os animais receberam água e ração *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos. Em seguida, foram pesados e receberam uma única injeção intravenosa (veia caudal) contendo 20 µL de AgNPs-CbC, extrato aquoso de folhas de *C. brasiliense* (CbC), Ag<sup>+</sup> livre (AgNO<sub>3</sub>)

ou H<sub>2</sub>O. Para definição desse volume aplicado, foi considerado o volume aproximado de sangue dos animais (cerca de 2,5 mL) e que corresponderia a cerca de 64 µM de AgNPs-CbC equivalente em prata que haviam sido previamente liofilizadas. Transcorridas 24 h após o tratamento, os animais foram novamente pesados e anestesiados utilizando 10 µL de injeção intramuscular da combinação de dois agentes com ação anestésica e relaxante muscular, cetamina e xilazina 10%. Após a eutanásia, procedeu-se a necropsia sendo coletados os seguintes órgãos: sangue, baço, fígado, rins e pulmões. O projeto foi desenvolvido com a aprovação pelo comitê de ética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB), nº 131758/2012.

#### *5.2.4.1. Avaliação hematológica e bioquímica*

Sangue periférico dos camundongos foi coletado pelo seio orbital em microtubos de polipropileno, sendo que 200 µL foram imediatamente transferidos para outro microtubo de polipropileno contendo 10 µL de anticoagulante constituído por ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10%, e armazenado a 4°C até a realização dos testes.

O sangue contendo EDTA foi utilizado para avaliação hematológica, sendo obtidos hemograma e leucograma completos dos animais. O sangue coletado sem solução anticoagulante foi utilizado para separação do soro e posterior análise bioquímica dos parâmetros: Bilirrubina total e frações, Gama glutamil transferase (Gama GT), Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT), Glicose e Lipidograma (Tabela I 2). A realização das avaliações hematológicas e dosagens bioquímicas foram realizadas, em colaboração científica, pelo Instituto Sabin por meio do Núcleo de Apoio à Pesquisa, ao qual agradeço imensamente. Os ensaios foram conduzidos utilizando calibrações específicas para pequenos mamíferos (roedores)

**Tabela I 2.** Especificações do tipo de metodologia utilizada pelo laboratório de análises clínicas Sabin para avaliar os parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue dos animais.

<b>Parâmetro analisado</b>	<b>Metodologia utilizada</b>
Hemograma	Citometria de fluxo fluorescente e impedância
Leucograma	Citometria de fluxo fluorescente e impedância
Bilirrubina total e frações	Oxidação com vanadato
Gama glutamiltransferase	Cinético Colorimétrico
Aspartato aminotransferase	Cinético Otimizado U.V.
Alanina aminotrasferase	Cinético Otimizado U.V.
Glicose	Colorimétrico enzimático
Lipidograma	Colorimétrico enzimático

#### 5.2.4.2. Avaliação histológica

Os órgãos (fígado, baço, rim e pulmão) de todos os animais foram coletados e um fragmento de cada órgão foi rapidamente fixado com fixador Metil-Carnoy [álcool metílico PA 60% (Proquimis), clorofórmio 30% (CRQ) e ácido acético 10% (Merck)] durante 6 h à temperatura de ~22°C. Após a fixação, as amostras passaram por processo de hidratação preliminar em concentrações decrescentes de álcool etílico (90, 80 e 70%), e permaneceram 48 h em álcool etílico 70% à temperatura ambiente. As amostras passaram por processo de desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico [80, 90 e 100% (2×)], foram submetidas à diafanização por 40 min (etanol/xileno 1:1, xileno 1, xileno 2 e xileno 3) e infiltradas com Paraplast® (Sigma por meio de dois banhos de 1,5 h (paraplast 1 e paraplast 2). Então, o material foi incluído em blocos de Paraplast® utilizando moldes plásticos e após a solidificação, as amostras foram retiradas dos moldes e mantidas a 4°C até a realização da microtomia para obtenção de seções micrométricas.

Os blocos foram seccionados em micrótomo em cortes com 5 µm de espessura, os quais foram depositados em uma lâmina de vidro e levados a estufa à 37°C durante 48 h. Em seguida, realizou-se a coloração pelo método de hematoxilina e eosina (H&E). As lâminas foram submetidas a processo de remoção do meio de inclusão (Paraplast) em banhos sucessivos em xileno por 3 minutos (xileno 1, xileno 2, xileno/etanol 1:1), hidratação em concentrações decrescentes de álcool etílico por 2 minutos (100%, 90%, 80% e 70%) e um banho de 2 minutos em água destilada. As lâminas foram colocadas no corante hematoxilina por 1 minuto, lavadas com água corrente, e adicionadas ao

corante eosina por 30 segundos. O material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90%, 100%) e xileno (xileno 1 e xileno 2) por 20 segundos. Após o último banho em xileno as lâminas foram cobertas com lamínula utilizando verniz vitral incolor (Acrilex) como meio de montagem, e deixadas secando em estufa por 12 h à 37°C.

As lâminas histológicas foram analisadas em microscópio de luz Axiophot (Zeiss) acoplado a câmera fotográfica (Zeiss) e documentadas digitalmente utilizando o software AxioVision versão 4.8 disponível no Laboratório de Bioimagem da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## **6. Análise dos dados**

As análises de dados os quais não foram descritos independentemente em cada subtópico anterior foram realizadas utilizando o programa Microsoft Excel (2016) para cálculo das médias, desvio padrão da média (DPM) e erro padrão da média (EPM). Os resultados obtidos foram representados como média aritmética  $\pm$  desvio (D.P.M.) e/ou erro padrão da média (E.P.M.) utilizando programa Origin Pro 8.0 para obtenção de gráficos.

O programa PAST (versão 2.17b) foi utilizado para obtenção das representações em forma de matriz colorida (Hammer et al., 2001), e o programa mMass (versão 5.5.0) para obtenção das representações dos espectros de massa em forma de gel (Strohalm et al., 2010). A determinação das diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foi realizada utilizando o programa PAST (Hammer et al., 2001) por análise de variância (ANOVA) com teste estatístico de Tukey, com um nível de significância fixado em  $P < 0,05$ . Os fluxogramas ou imagens ilustrativas foram feitos utilizando o software Inkscape (versão 0.48).



## **CAPÍTULO II**

**Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extrato  
aquoso de castanhas de *Anacardium othonianum* Rizz  
(cajuzinho de árvore do cerrado)**

## RESUMO

Atualmente, há um crescente interesse mundial na utilização de produtos e subprodutos (resíduos) da agroindústria do caju como matéria-prima para a síntese verde de nanoestruturas. Contudo, a maioria dessas abordagens envolve a utilização de *Anacardium occidentale*, a espécie mais explorada comercialmente, ainda que existam diversas outras espécies ainda negligenciadas sob o ponto de vista econômico, científico e tecnológico. *Anacardium othonianum* é uma espécie de caju endêmica do Cerrado Brasileiro de valor agregado baixo, devido à sua pequena produção de frutos e pseudofrutos e, principalmente, pela produção de pequenas nozes não comerciais. Sendo assim, o objetivo do presente Capítulo foi sintetizar e caracterizar algumas propriedades ópticas, estruturais, elétricas, moleculares e biológicas de nanopartículas de prata (AgNPs) produzidas a partir das cascas de frutos/nozes de *A. othonianum* como uma função da temperatura de reação. A mudança de coloração dos meios reacionais, a RPS e análise molecular indicaram que os constituintes moleculares de extratos aquosos de castanhas de caju *A. othonianum* exibiram efeitos na nucleação, crescimento e estabilização das AgNPs-CsC em suspensões coloidais aquosas. As AgNPs sintetizadas apresentaram diâmetros hidrodinâmicos variados ( $353,83 \pm 52,68$  nm a  $133,63 \pm 3,47$  nm), polidispersividade moderada ( $0,378 \pm 0,039$  a  $0,509 \pm 0,038$ ) e potencial Zeta de superfície ( $-15,0 \pm 2,5$  mV a  $-29,6 \pm 0,9$  mV), e formatos esféricos. Adicionalmente, os diâmetros hidrodinâmicos e condutividade elétrica foram inversamente e diretamente proporcionais ao aumento da temperatura de síntese, respectivamente. Os constituintes moleculares de extratos aquosos exibiram efeitos na nucleação, crescimento e estabilização das AgNPs-CsC em suspensões coloidais aquosas. As AgNPs apresentaram baixa atividade antifúngica para células de *S. cerevisiae* reduzindo a viabilidade celular em no máximo 39%. Uma rota de síntese, eco-amigável e de custo baixo, de AgNPs à base de extrato aquoso de castanhas de caju (*A. othonianum*) com base em variação de temperatura foi otimizada.

Palavras-chave: Síntese verde, nanopartículas de prata, castanha de caju, *Anacardium othonianum*, variação de temperatura.

## INTRODUÇÃO

Há um crescente interesse mundial pela utilização de produtos e subprodutos (também denominados resíduos ou co-produtos) agrícolas, incluindo os provenientes de microrganismos, animais e plantas envolvidos no processamento de alimentos ou aqueles oriundos de atividades extrativistas, como matérias-primas para a síntese de nanoestruturas por meio de química verde (Joanitti et al., 2013). Entre os materiais agrícolas disponíveis para utilização, o caju tem mostrado por inúmeros autores ser útil no campo da nanotecnologia verde (Maciel et al., 2007; Mubofu et al., 2011; Mukunthan et al., 2012; Araruna et al., 2013; Quelemes et al., 2013; Ribeiro et al., 2013).

Suco e goma de caju foram capazes de sintetizar eficientemente nanopartículas de prata (AgNPs) utilizando métodos eco-amigáveis e sustentáveis (Mukunthan et al., 2012; Quelemes et al., 2013). No entanto, esses estudos foram baseados em um número limitado de produtos ou subprodutos de caju e utilizando apenas a espécie *Anacardium occidentale* L. Sendo assim, surge o interesse na exploração de outras partes do cajueiro, bem como a biodiversidade de espécies de caju visando ao desenvolvimento de rotas alternativas sustentáveis para a síntese de AgNPs.

*A. othonianum* Rizz, conhecido popularmente como cajuzinho de árvore do Cerrado, é uma espécie de caju nativa do Cerrado Brasileiro e suas plantas diferem de outros membros comuns do gênero no bioma em função de ser uma árvore de estatura alta, variando de 3 a 4 metros (Bessa et al., 2013a). Os pequenos pseudofrutos variam em cor do amarelo ao vermelho (Figura II 1), normalmente exibem uma forma semelhante à pera e a espécie é regionalmente importante como um produto alimentar sazonal baseado em atividades extrativistas (Bessa et al., 2013a).



**Figura II 1.** Foto de seis exemplares representativos de frutos e pseudofrutos de cajuzinho do Cerrado. Barra = 2 cm.

A espécie de cajueiro *A. othonianum* tem valor agregado baixo, devido à sua baixa produção de frutos e pseudofrutos e, principalmente, pela produção de nozes pequenas e não comerciais. No entanto, sob o ponto de vista biotecnológico e visando ao uso sustentável da biodiversidade, há um grande interesse em espécies economicamente negligenciadas como *A. othonianum* (Thimmappaiah et al., 2009), inclusive como componentes para o desenvolvimento de rotas de síntese verde de nanopartículas, incluindo AgNPs.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

→ Sintetizar, caracterizar e investigar a atividade biológica de AgNPs produzidas utilizando extrato aquoso obtido a partir de castanhas de cajuzinho de árvore do Cerrado (*Anacardium othonianum*).

### **Objetivos específicos**

→ Desenvolver e aperfeiçoar uma rota de síntese de AgNPs variando temperatura;

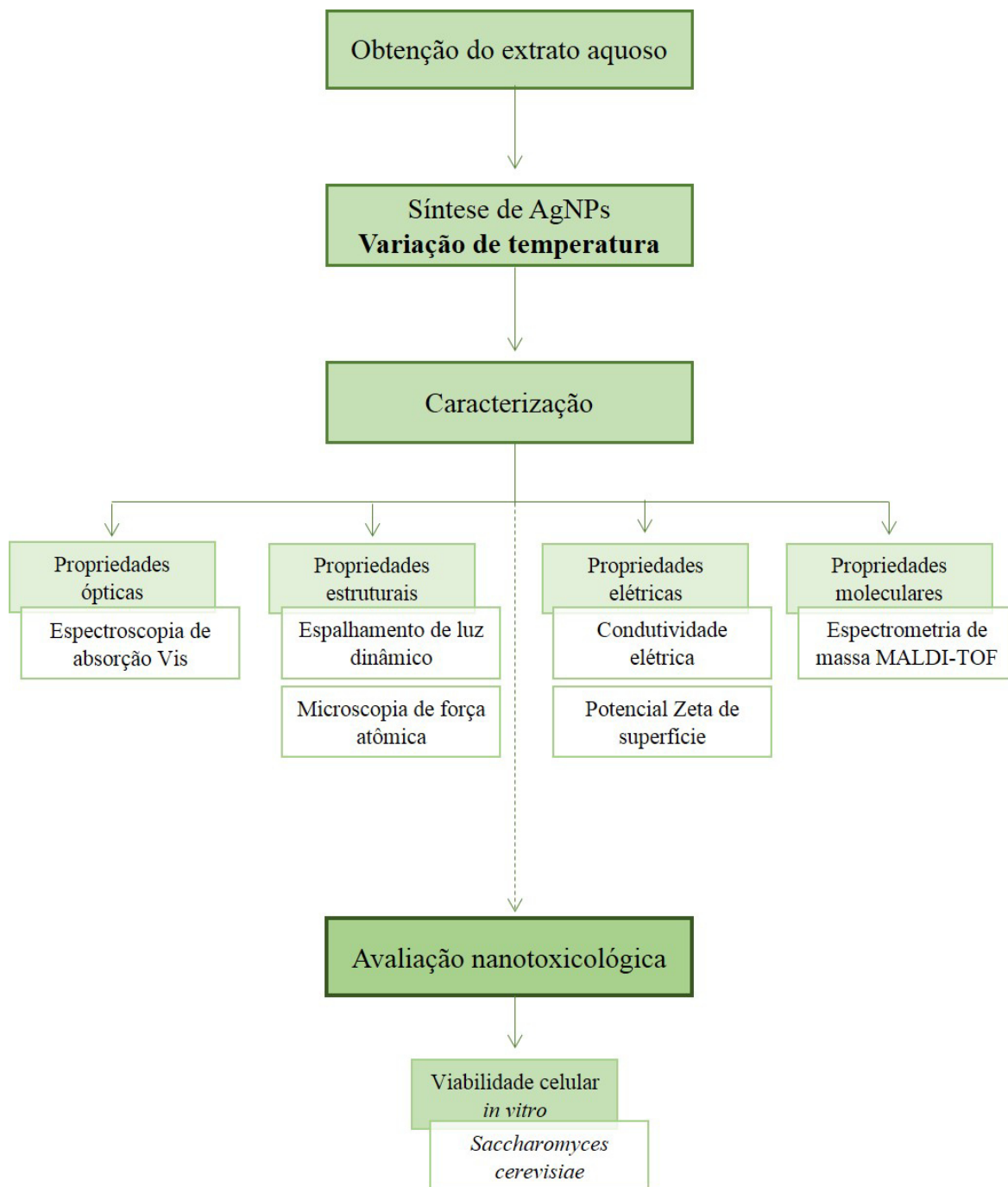
→ Caracterizar as AgNPs obtidas quanto às suas propriedades ópticas, estruturais, elétricas e moleculares por meio de técnicas de investigações químicas e físicas;

→ Investigar as características moleculares das AgNPs e extrato aquoso por espectrometria de massa MALDI TOF;

→ Investigar a possível atividade biológica das AgNPs em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

## METODOLOGIA

Visando a atingir os objetivos propostos, a metodologia utilizada no presente capítulo seguiu as etapas representadas no esquema abaixo (Figura II 2). Cada etapa metodológica foi descrita previamente no Capítulo I.



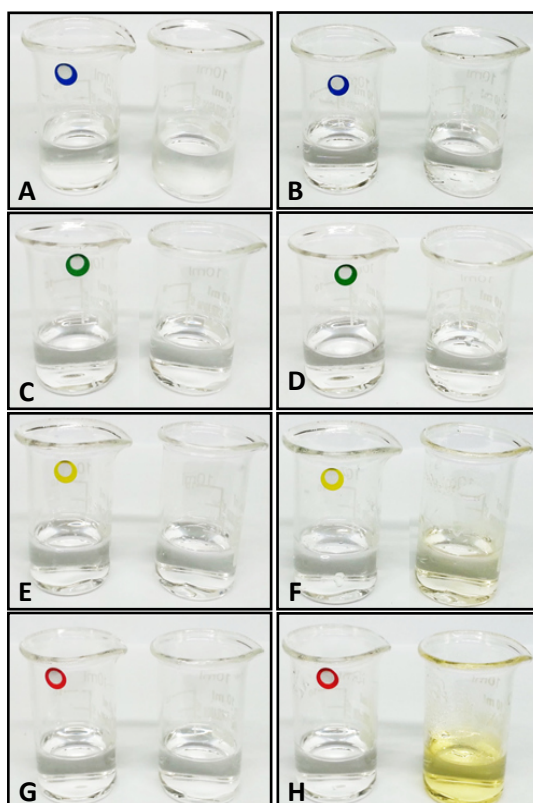
**Figura II 2.** Representação esquemática das etapas metodológicas utilizadas no presente capítulo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Propriedades ópticas

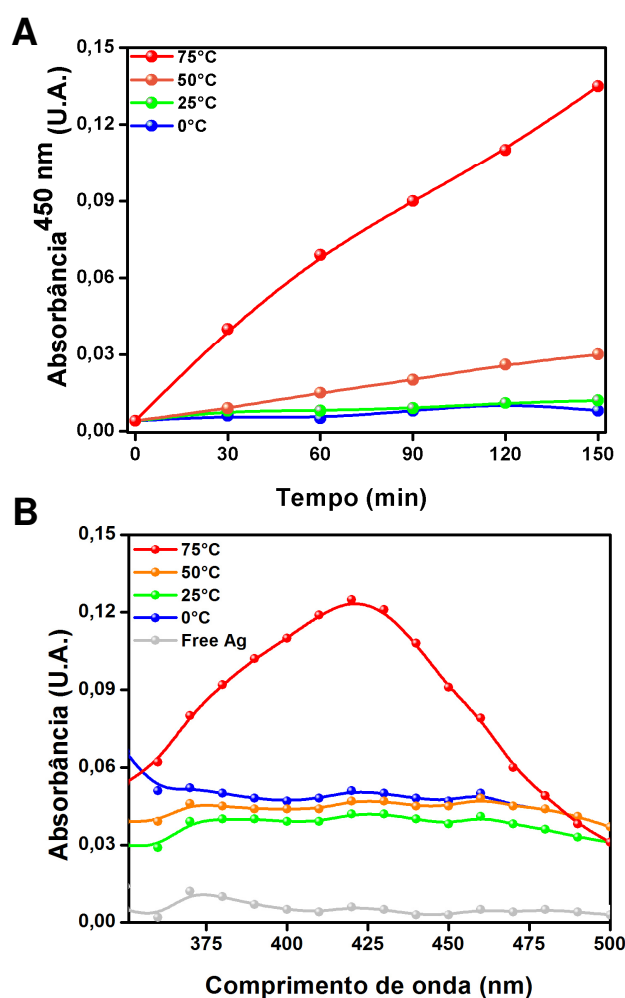
As AgNPs foram obtidas por síntese verde em única etapa utilizando extrato aquoso obtido a partir de castanhas de *A. othonianum*. Soluções de  $\text{AgNO}_3$  a 1 mM e extrato aquoso à 1 mg/mL foram incubadas por 150 min em diferentes temperaturas 0°, 25°, 50°, e 75°C e foram monitoradas visualmente e por espectroscopia de absorção (450 nm).

Propriedades ópticas, como alteração de cor das suspensões coloidais detectadas visualmente e/ou por espectrofotometria de absorção, estão entre as abordagens mais utilizadas para monitorar o sucesso da formação de AgNPs. Ambos os monitoramentos indicaram sucesso na formação das AgNPs devido à mudança de coloração do meio reacional (Figura II 3) e do aumento de absorção das suspensões ao fim do período de monitoramento, sendo que em ambos os casos se mostrou mais acentuada para a temperatura de 75°C (Figura II 3 e Figura II 4A).



**Figura II 3.** Fotografias dos béqueres contendo as soluções de extrato aquoso de castanhas de caju (marcado com selos coloridos) e das soluções contendo extrato aquoso de castanhas de caju na presença de  $\text{AgNO}_3$  a 0 min (painéis da esquerda) e após 150 minutos de reação (painéis da direita) de incubação a 0°C (A, B), a 25°C (C, D), 50°C (E, F) e 75°C (G, H).

As AgNPs sintetizadas utilizando extrato aquoso de castanhas de caju (AgNPs-CsC) foram submetidas a análise por espectroscopia de absorção na região do visível (350 a 550 nm) e tiveram seu pico de absorção máxima no comprimento de onda de 415 nm correspondendo à ressonância plasmônica de superfície (RPS) das AgNPs produzidas, sendo que a intensidade de absorção foi significativamente maior para as AgNPs sintetizadas a 75°C (Figura II 4B). Variações em agentes físicos como temperatura e tempo de reação são alguns exemplos de condições de síntese que podem afetar o fenômeno de RPS durante a síntese de AgNPs (Dubey et al., 2010a). Sendo assim, a variação na temperatura do meio reacional durante a síntese tem o potencial de modular, ainda que em muitos casos discretamente, tais propriedades físico-químico-estruturais.



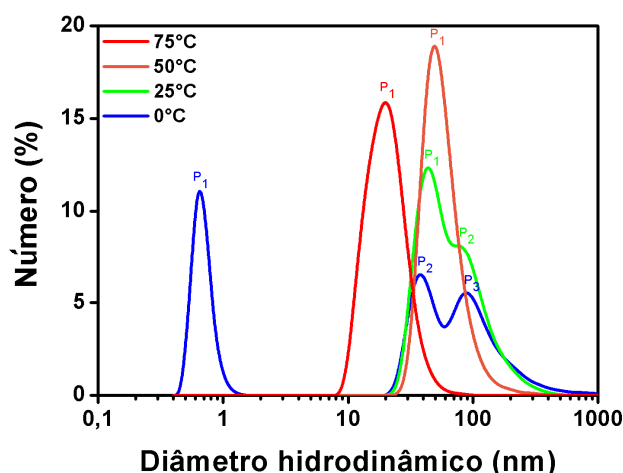
**Figura II 4.** Cinética de formação das AgNPs-CsC quando incubadas a 0°C, 25°C, 50°C ou 75°C (A). Curvas de absorção na região do visível após o processo de síntese a 0°C, 25°C, 50°C ou 75°C (B).



## Propriedades estruturais

Tendo em vista que o efeito de RPS de AgNPs é dependente da forma e do tamanho das nanopartículas (Amendola et al., 2010), e as suspensões apresentaram efeitos de RPS distintos, levantou-se a hipótese de que os diâmetros hidrodinâmicos seriam diferentes para as suspensões submetidas à diferentes temperaturas de síntese.

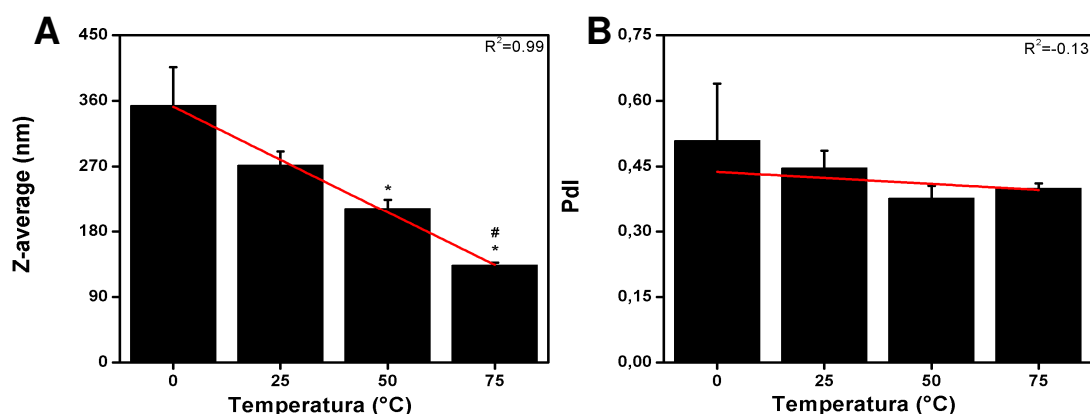
A avaliação por espalhamento de luz dinâmico revelou diferenças no diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersividade (PdI), assim como também foram observadas diferenças de potencial Zeta de superfície das AgNPs-CsC sintetizadas sob diferentes temperaturas. A suspensão que foi incubada a 0°C apresentou três subpopulações de AgNPs, uma em  $0,7 \pm 0,1$  nm, e as outras duas em  $38,6 \pm 7,1$  nm e  $99,0 \pm 35,3$  nm (Figura II 5). A suspensão que foi incubada a 25°C apresentou ausência do primeiro pico indicativo de subpopulação e compartilhou com a temperatura anterior apenas as duas últimas subpopulações em  $44,0 \pm 9,1$  nm e  $89,5 \pm 30,2$  nm (Figura II 5). Já as suspensões incubadas em temperaturas mais altas, 50°C e 75°C, apresentaram populações uniformes (únicas) de  $54,1 \pm 13,7$  nm e de  $21,1 \pm 6,4$  nm, respectivamente (Figura II 5). A avaliação dos controles contendo extrato aquoso de castanhas não apresentaram sinal de leitura detectável, e o controle de AgNO<sub>3</sub> apesar de evidenciar a presença de estruturas detectáveis, não evidenciou a presença do efeito RPS não sendo então correlacionado com a produção de AgNPs-CsC (Figura II 4B). Esses resultados corroboram os descritos na literatura onde diversos autores relatam a síntese de AgNPs utilizando extratos de plantas com diâmetros hidrodinâmicos que variam de 20 a 100 nm (Gardea-Torresdey et al., 2003; Krishnaraj et al., 2010; Rajathi et al., 2012; Mendoza-Reséndez et al., 2013; Thwala et al., 2013).



**Figura II 5.** Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico (em número) obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) a partir das análises das suspensões de AgNPs-CsC sintetizadas à 0°C, 25°C, 50°C e 75°C durante 2,5 h.

Uma vez que a os resultados referentes às análises de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número das amostras revelou populações distintas de partículas, a utilização da média em Z (*Z-Average*) é aceita como uma estimativa do tamanho médio das nanopartículas do meio, sendo baseada na intensidade de luz que é dispersa durante a leitura da amostra. Nesse sentido, a avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio das amostras revelou uma tendência de diminuição do diâmetro hidrodinâmico médio das AgNPs em função do aumento da temperatura (Figura II 6A), consequentemente revelando uma correlação negativa entre o tamanho das AgNPs-CsC e o aumento da temperatura de reação (Figura II 6A).

As AgNPs-CsC sintetizadas apresentaram um valor médio de PDI acima de 0,3 e abaixo de 0,5, sendo que este apresentou uma pequena tendência de diminuição para as temperaturas mais altas, mas sem correlação direta significativa (Figura II 6B). Esses achados não foram diferentes aos relatados na literatura que reportam que AgNPs obtidas a partir de rotas de síntese verde utilizando outras espécies e outras partes vegetais apresentam alta heterogeneidade e consequentemente PDI alto (Murdock et al., 2008). Adicionalmente, diversos estudos têm proposto a influência da variação da temperatura, durante a etapa de síntese, no tamanho das NPs (Amin et al., 2012; Ghaseminezhad et al., 2012), mostrando que é de grande importância considerar tal efeito durante as etapas de otimização de rotas síntese verde das AgNPs.

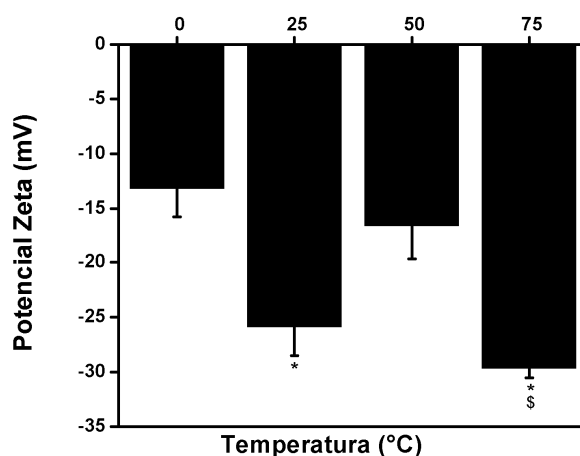


**Figura II 6.** Correlações entre diâmetro hidrodinâmico médio e temperaturas de reação (A) e índice de polidispersividade (PDI) (B) das AgNPs sintetizadas por rota de síntese verde utilizando extrato aquoso de castanhas de cajuzinho de árvore do Cerrado. Diferença estatisticamente significativa em relação à temperatura de 0°C (\*) e 25°C (#).

### Propriedades elétricas

O potencial Zeta tem sido utilizado como parâmetro indicativo de estabilidade de suspensões de nanopartículas por repulsão eletrostática (ASTM, 1985). O potencial

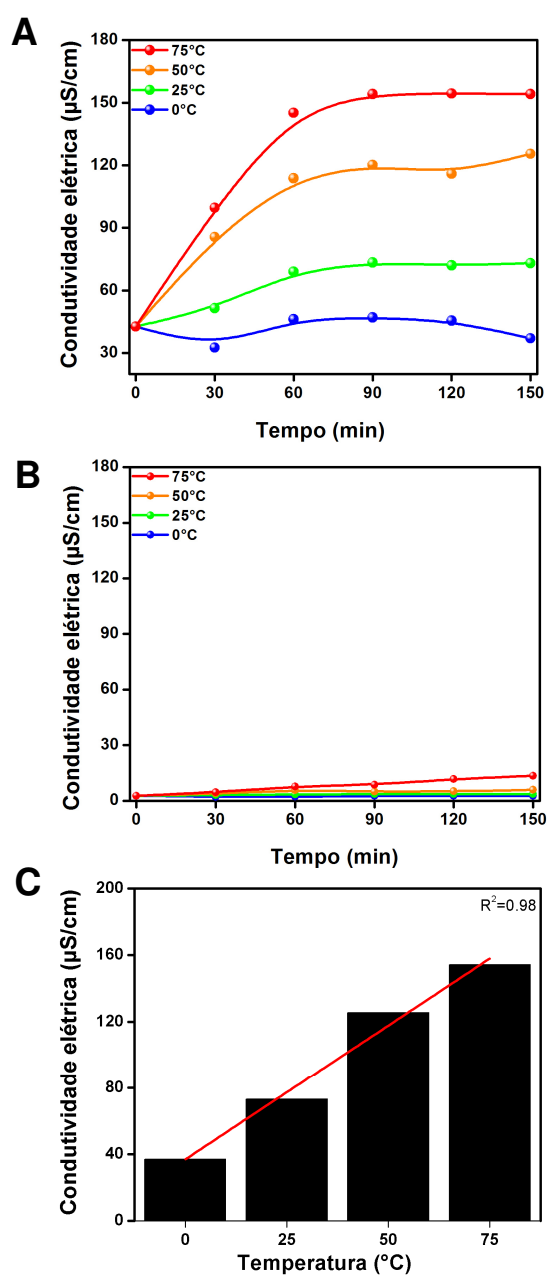
Zeta das AgNPs-CsC sintetizadas em diferentes temperaturas de reação com extrato aquoso de castanha de caju variou de -15 mV (estabilidade incipiente) a -29,6 mV (estabilidade moderada) (Figura II 7). As AgNPs-CsC sintetizadas a 25°C e 75° apresentaram potencial Zeta mais negativo que as AgNPs-CsC sintetizadas a 0°C e 50°C, não sendo observada correlação linear entre o aumento da temperatura e diminuição ou aumento do potencial Zeta de superfície das partículas. As superfícies negativamente carregadas de AgNPs, obtidas por rotas químicas, têm sido obtidas com a utilização de agentes aniônicos estabilizantes e de revestimentos (Xu et al., 2009). As cargas negativas das AgNPs-CsC observadas neste estudo sugerem que as moléculas oriundas do extrato das castanhas de caju (CsC) tenham atuado tanto como agente redutor na formação das nanopartículas como também como agente estabilizante e de revestimento.



**Figura II 7.** Potencial Zeta de superfície das AgNPs sintetizadas por rota de síntese verde utilizando extrato aquoso de castanhas de cajuzinho do Cerrado. \*Diferença estatisticamente significativa em relação à temperatura de 0°C; Diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) em relação às temperaturas de 0°C (\*) e 50°C (§).

A condutividade elétrica (CE) foi monitorada ao longo do período reacional (2,5 h) para todas AgNPs-CsC, CsC e  $Ag^+$  submetidas às diferentes temperaturas de reação (Figura II 8). O monitoramento revelou um aumento na CE das suspensões coloidais no decorrer do tempo para todas as AgNPs-CbC avaliadas, exceto para as sintetizadas à temperatura de 0°C (Figura II 8). Vale ressaltar que o aumento observado ocorreu de forma linear temperatura-dependente (Figura II 9C). Um aumento inferior e discreto da CE, quando comparado às AgNPs-CsC, também foi observado para CsC submetido a temperatura mais elevada (Figura II 8B). Alguns autores têm correlacionado a CE com a forma das AgNPs, sendo que a caracterização morfológica das AgNPs torna-se um

aspecto importante a ser considerado (Wiley et al., 2005). Adicionalmente, os resultados aqui obtidos contrastam com os encontrados por Albernaz (2014) onde não foram observadas alterações na condutividade elétrica das AgNPs sintetizadas utilizando extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii* quando comparadas a seus controles de extrato e AgNO<sub>3</sub>. Desse modo, as diferenças de CE encontradas em ambos os estudos podem estar relacionadas à composição molecular específica de cada extrato utilizado, no caso do presente estudo a eventuais propriedades elétricas intrínsecas ao extrato de castanhas de caju.

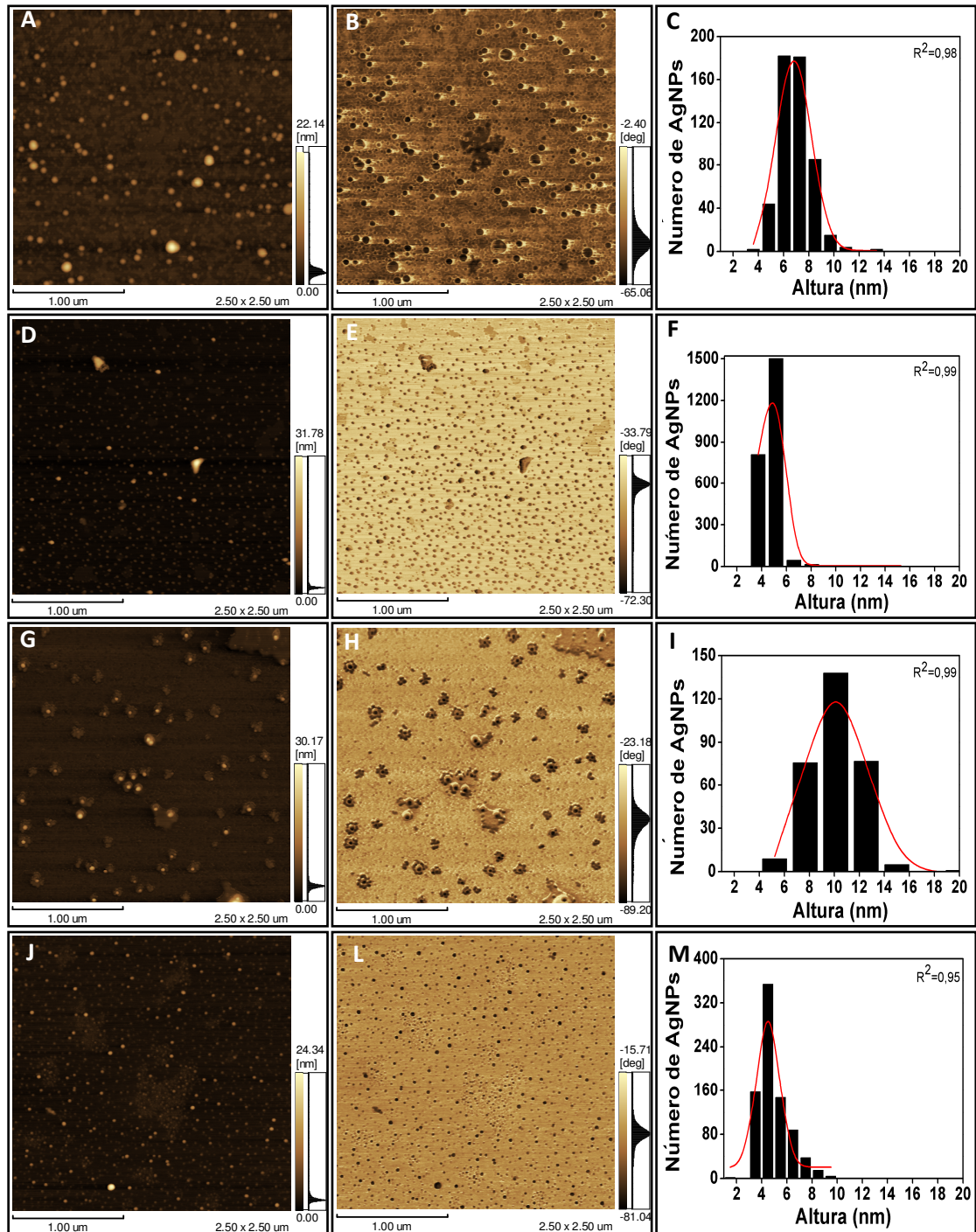


**Figura II 8.** Monitoramento da condutividade elétrica (CE) das suspensões AgNPs-CsC (A) e CsC (B) sintetizadas sob diferentes temperaturas em função do tempo, e correlação entre as temperaturas de reação e a CE no ponto final das reações (C).

### **Propriedades morfológicas**

O DLS é uma técnica bastante aceita para a determinação do tamanho de NPs dispersas em suspensões coloidais. Contudo, é imprescindível também a utilização de metodologias microscópicas que possibilitem a determinação da forma dessas nanoestruturas. Nesse sentido, a microscopia de força atômica (MFA) tem se mostrado como uma ferramenta poderosa para investigação de características estruturais, como forma e tamanho (diâmetro seco), detalhadas das AgNPs-CsC (Figura II 9).

Imagens obtidas por MFA a partir das AgNPs-CsC sintetizadas a 0°C e 50°C apresentaram estruturas esféricas, com alturas de  $6,8 \pm 1,2$  nm e de  $10,1 \pm 2,2$  nm, respectivamente (Figura II 9A-C e G-I). Adicionalmente, as imagens de fase (viscoelasticidade) indicaram que as AgNPs-CsC apresentaram uma cobertura/revestimento amorfo o qual pode ser responsável pela menor estabilidade coloidal quando comparadas as partículas sintetizadas a 25 e 75°C (Figura II 9D-F e J-M). AgNPs-CsC sintetizadas a 25°C e 75°C, apresentaram formatos esféricos e uniformes com alturas de  $4,7 \pm 0,7$  nm e  $4,5 \pm 0,8$  nm, respectivamente (Figura II 9D-F e J-M). Os diâmetros obtidos por MFA foram menores quando comparados aos obtidos pelas análises de DLS e esses dados corroboram aos encontrados por Hoo e colaboradores (Hoo et al., 2008). Este fato pode estar relacionado aos tipos de preparações das amostras para cada metodologia, uma vez que as análises de AgNPs por DLS são realizadas em meio líquido enquanto as análises por MFA são realizadas a seco sobre suporte de mica muscovita.



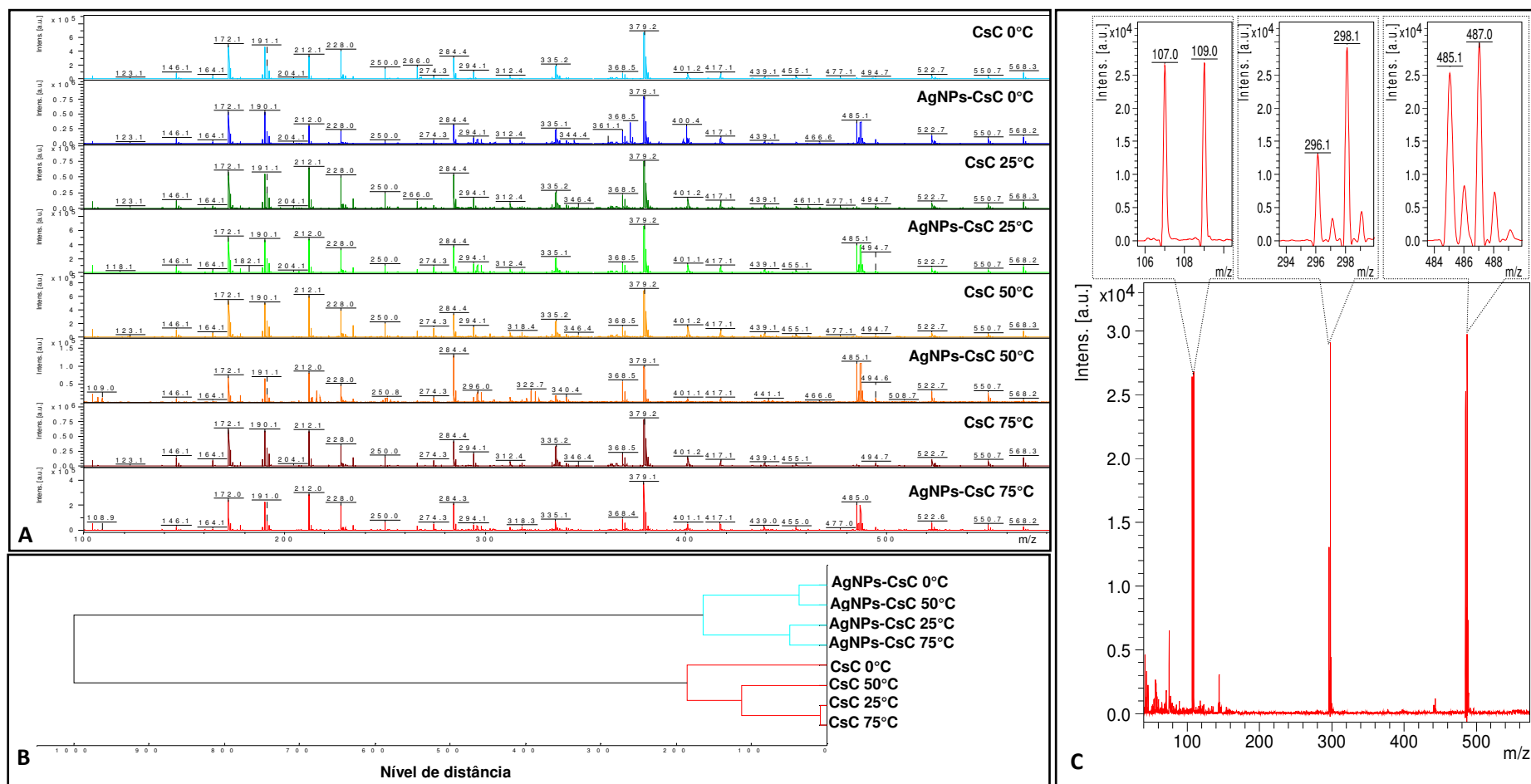
**Figura II 9.** Imagens topográficas, viscoelásticas e histogramas de distribuição de classes referentes aos valores de altura obtidos por microscopia de força atômica das AgNPs sintetizadas a 0°C (A, B e C), 25°C (D, E e F), 50°C (G, H e I) ou 75°C (J, L e M).

### Propriedades moleculares

O CsC se mostrou eficiente na formação e estabilização de AgNPs por meio da biorredução dos íons  $\text{Ag}^+$  em  $\text{Ag}^0$  por seus componentes moleculares como foi

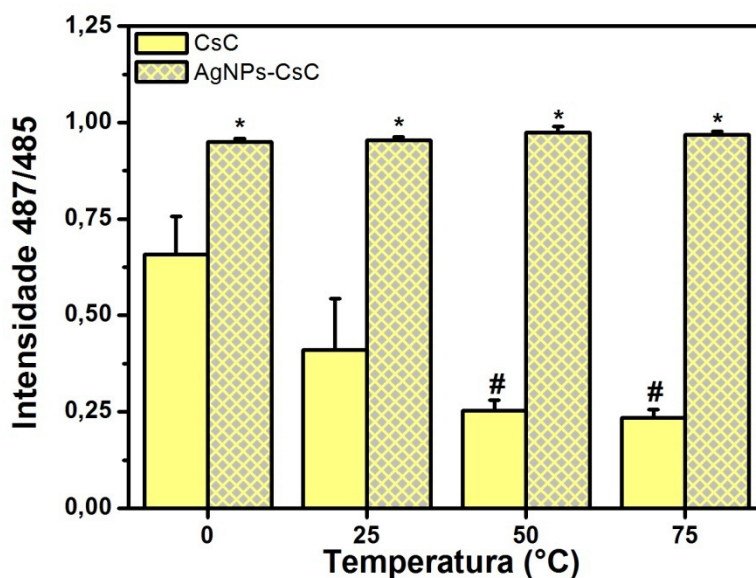
confirmado por abordagens espectrofotométricas, medidas elétricas, estruturais e microscópicas. Os principais componentes moleculares presentes no extrato aquoso de castanhas de caju são os ácidos anacárdicos (> 75%), seguidos por componentes fenólicos como cardanois, cardois e tocoferóis (Amorati et al., 2011). Todos estes compostos podem reagir com  $\text{AgNO}_3$  e formar AgNPs devido às suas características antioxidantes. Sendo assim, as AgNPs e seus respectivos controles foram avaliados por espectrometria de massa MALDI-TOF visando a uma possível determinação da massa molecular de alguns dos componentes moleculares responsáveis pela biorredução dos íons  $\text{Ag}^+$  ou estabilização das AgNPs-CsC (Figura II 10).

Não foi possível a identificação inequívoca dos componentes moleculares presentes em CsC (Figura II 10). Contudo, diferentes temperaturas e/ou a adição de  $\text{AgNO}_3$  alterou o perfil dos componentes moleculares de baixa massa molecular e permitiu o agrupamento, com base nas semelhanças moleculares, em dois grupos distintos (Figura II 10B). Foram identificados dois íons de intensidade alta separados por duas unidades de razão  $m/z$ , sendo eles  $m/z$  485 e  $m/z$  487, os quais são possíveis resultados de modificações em uma mesma molécula ou classe de moléculas (Figura II 10C). Além disso, o aumento da intensidade desses íons ocorreu proporcionalmente e de maneira dependente da temperatura de síntese das AgNPs-CsC quando comparados ao extrato aquoso (Figura II 11), indicando que o aumento da forma reduzida desse componente, ou conjunto de componentes, pode estar diretamente relacionado ao processo de biorredução.



**Figura II 10.** Espectros de massa MALDI-TOF dos perfis de baixa massa molecular de CsC e AgNPs-CsC expostos a diferentes temperaturas de síntese (A). Dendrograma obtido a partir do agrupamento de espectros de baixa massa molecular de CsC e AgNPs-CsC (B). Espectros de massa MS/MS dos íons  $m/z$  485 e  $m/z$  487, além de outros íons presentes nas amostras (C).





**Figura II 11.** As razões de intensidade entre os íons de 487/485 correspondente possivelmente às formas oxidada e reduzida de uma molécula presente nas nanopartículas e sendo comparadas nas diferentes temperaturas de reação de 0 a 75°C. Diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) entre CsC e AgNPs-CsC em relação à mesma temperatura, e CsC em comparação temperatura de 0°C (#).

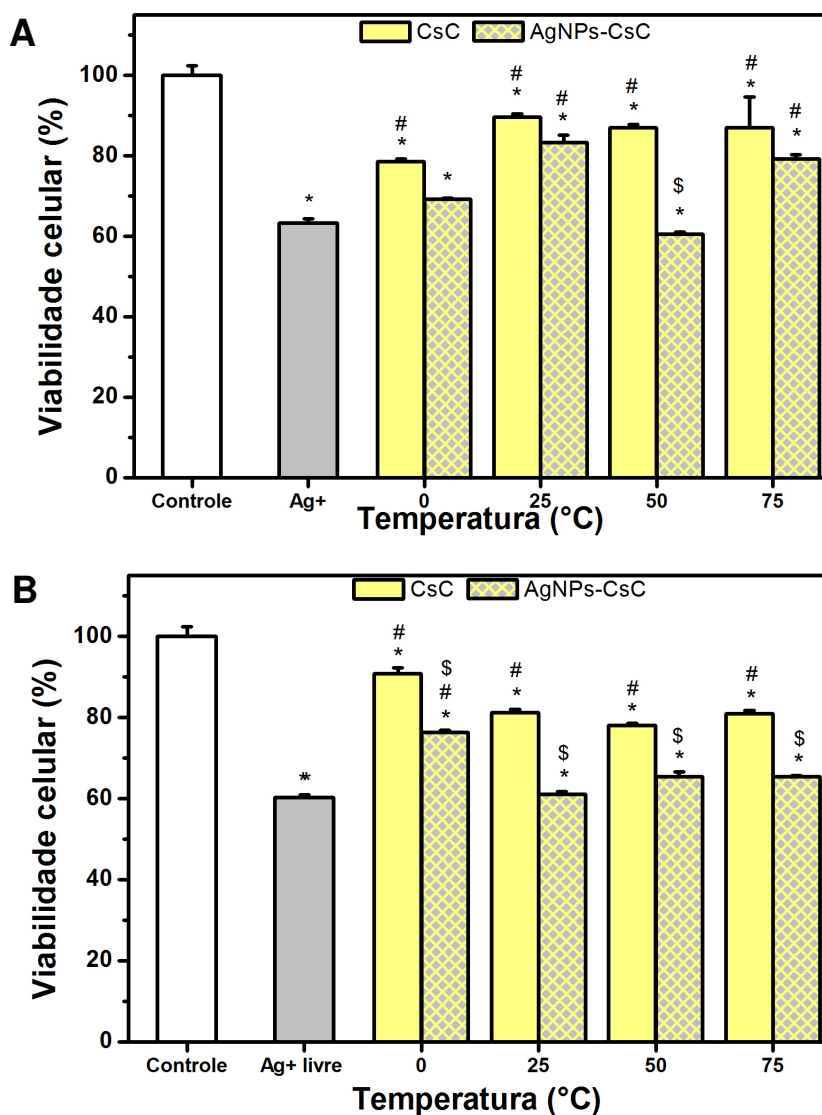
### Avaliação nanotoxicológica *in vitro*

Nos últimos anos tem crescido a preocupação com possíveis efeitos deletérios de nanopartículas quando em contato com sistemas biológicos. Nesse sentido, ensaios de viabilidade *in vitro* tem tido importância fundamental em estudos de nanotoxicologia, os quais têm contribuído para o entendimento de possíveis respostas celulares a um potencial agente tóxico nanoestruturado (Yildirimer et al., 2011).

Visando à avaliação do potencial citotóxico, as AgNPs-CsC foram utilizadas em ensaios de viabilidade em células eucarióticas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, um modelo unicelular comumente utilizado para os ensaios de citotoxicidade *in vitro*, incluindo a susceptibilidade a AgNPs (Kim et al., 2009). As AgNPs-CsC foram testadas em concentrações micromolares equivalentes à prata livre de 50 e 25  $\mu\text{M}$ , as quais diminuiram significativamente a viabilidade *in vitro* de *S. cerevisiae* ( $P < 0,05$ ), em no máximo 39% para as duas concentrações testadas (Figura II 12). Adicionalmente, para as duas concentrações testadas, os íons de  $\text{Ag}^+$  livres ( $\text{AgNO}_3$ ) mostraram-se mais tóxicos para as células do que a prata metálica nanoestruturada sob a forma de AgNPs (Figura II 12).

As AgNPs-CsC apresentaram uma atividade antimicrobiana relativamente baixa para *S. cerevisiae* quando comparada à atividade observada para outras AgNPs descritas

em outros estudos. Este fato, pode estar relacionado a diferenças entre as metodologias utilizadas nos ensaios experimentais ou à carga superficial negativa das células de *S. cerevisiae* que pode ter impedido uma atração eletrostática eficaz entre as AgNPs-CsC (potencial Zeta negativo) e a superfície celular (Amory et al., 1988).



**Figura II 12.** Ensaio de viabilidade celular *in vitro* por MTT em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* expostas a AgNPs-CsC sintetizadas sob diferentes temperaturas e respectivos controles (AgNO<sub>3</sub> e CsC) em concentrações de 50 μM (A) e 25 μM (B) equivalentes a AgNO<sub>3</sub>. Diferença estatisticamente significativa (P < 0,05) em relação às células do controle (\*); íons Ag<sup>+</sup> livres (#); e CsC (§). Valores representados como a média ± erro padrão da média.

## CONCLUSÃO

Foi otimizada uma rota sustentável, rápida e simples para síntese de AgNPs utilizando extrato aquoso de castanha de caju de árvore do cerrado *A. othonianum*.

Temperaturas altas (50°C e 75°C) aceleraram a síntese e também modularam (aumentando) a condutividade elétrica das AgNPs-CsC;

Os diâmetros hidrodinâmicos médios das AgNPs-CsC foram inversamente proporcionais ao aumento da temperatura do meio reacional durante a síntese;

As AgNPs-CsC apresentaram formato esférico, tamanho nanométrico, estabilidade coloidal moderada e foram polidispersas.

Os constituintes moleculares de extratos aquosos de castanhas de caju *A. othonianum* exibiram efeitos na nucleação, crescimento e estabilização das AgNPs-CsC em suspensões coloidais aquosas, ainda que não tenham sido identificados nesse estudo.

As AgNPs-CsC não apresentaram efeito citotóxico pronunciado para leveduras *S. cerevisiae*.

## **CAPÍTULO III**

### **Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extratos aquosos de folhas de plantas do bioma Cerrado Brasileiro**

## RESUMO

O Cerrado é constituído por uma grande variedade ambiental que proporciona o desenvolvimento de uma ampla diversidade de espécies de plantas compostas por um arsenal fitoquímico único que pode ser explorado de maneira racional, comparativa e sustentável na síntese de nanopartículas (AgNPs), assim como micropartículas (AgMPs) de prata. Sendo assim, o objetivo do estudo apresentado no Capítulo III foi avaliar comparativamente o potencial de extratos aquosos obtidos a partir de folhas de noventa (90) espécies de plantas do Cerrado, oitenta nativas (80) e dez (10) introduzidas, na síntese de AgNPs e AgMPs e investigar suas potenciais aplicações biotecnológicas na agricultura e biomedicina. Setenta dos noventa extratos avaliados foram capazes de reduzir íons  $\text{Ag}^+$  em  $\text{Ag}^0$  com base no critério de seleção utilizado, sendo que a maior taxa de síntese ocorreu para os extratos das espécies nativas do Cerrado Aroeira, Pereiro do Campo, Pequi, Sambaibinha e Murici. As partículas de prata obtidas apresentaram diâmetros hidrodinâmicos variados entre as faixas micrométricas e nanométricas ( $33,01 \pm 0,09$  nm a  $2653,33 \pm 868,99$  nm), polidispersividade de baixa a alta (0,1 e 0,8) e estabilidade coloidal indicativa de rápida floculação a moderada (-1 a -32 mV). Avaliação da influência da sazonalidade no perfil de síntese indicou que as AgNPs sintetizadas com extrato de folhas (Aroeira, Pereiro do Campo, Sambaibinha e Murici) coletadas em período de chuva apresentaram maior taxa de formação e estabilização. As AgNPs e AgMPs sintetizadas, em concentrações micromolares, apresentaram efeito citotóxico mais expressivo contra bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* do que contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Um método de síntese racional e em uma única etapa foi avaliado comparativamente utilizando recursos naturais obtidos a partir da biodiversidade vegetal brasileira, representando um dos estudos mais amplos já realizados envolvendo a síntese verde de AgNPs. Estudos adicionais precisam ser realizados futuramente visando à identificação dos componentes moleculares de muitos extratos e suas contribuições durante a formação das partículas, mas essa estratégia se mostrou adequada como *screening* inicial visando à seleção de plantas candidatas ao desenvolvimento de rotas de síntese de AgNPs com características almeçadas.

Palavras-chave: Síntese verde, nanopartículas de prata, micropartículas de prata, múltiplas espécies, Cerrado, atividade antimicrobiana.

## INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, abrangendo cerca de 22% do território nacional Brasileiro, sendo reconhecido mundialmente por sua rica diversidade vegetal, a qual abriga 11627 espécies de plantas nativas já catalogadas (MMA, 2015). O Cerrado é constituído por um conjunto de vegetações que vai de Campo Limpo a Mata Ciliar (Ribeiro et al., 2007). Estas nuances de fitofisionomias do bioma estão intrinsecamente relacionadas ao nível de água dos lençóis freáticos, à fertilidade e drenagem do solo (Ribeiro et al., 2007).

Essa grande diversidade de espécies resulta em perfis fitoquímicos distintos entre as espécies, os quais estão intimamente relacionados aos fatores abióticos e/ou bióticos locais e são resultantes dos processos vitais de biossíntese que são os responsáveis pela formação, acúmulo e degradação de inúmeras substâncias no interior das células que formam os diversos tecidos dos organismos vegetais (Silva et al., 2010).

A diversidade vegetal do Cerrado tem sido amplamente utilizada para fins econômicos, destacando-se espécies de interesse medicinal, alimentício, madeiral, tintorial, oleaginoso, ornamental, entre outros (Franzon, 2009), tendo sido pouco explorada para a síntese de AgNPs. Estudos recentes mostraram o potencial de extratos de duas plantas do Cerrado, *Anacardium othonianum* (cajuzinho do Cerrado), *Brosimum gaudichaudii* (Bureré) e *Hancornia speciosa* (Mangaba), na síntese de AgNPs (Bonatto e Silva, 2013; Albernaz 2014; Silva 2014).

Como demonstrado no Capítulo II, o extrato aquoso de castanha de cajuzinho do cerrado (*A. othonianum*) mostrou-se efetivo na síntese de AgNPs, indicando o potencial das plantas do Cerrado na síntese de AgNPs. Contudo, *A. othonianum* assim como outras espécies de plantas do Cerrado apresentam períodos de frutificação curtos, restritos e temporalmente distintos (Borges, 2012) o que dificultaria a realização de um estudo racional e comparativo entre diferentes espécies utilizando frutos.

De fato, apesar de diversas partes das plantas poderem ser utilizadas para síntese e influenciar nas características de AgNPs, algumas partes vegetais podem não ser muito indicadas sob o ponto de vista técnico e prático. Assim, as folhas têm sido a escolha mais comum devido ao fato de serem abundantes em biomassa, sua coleta não ser destrutiva e serem compostas por grande parte dos metabólitos reconhecidamente responsáveis pela redução dos íons metálicos, como abordado no Capítulo I. Desse

modo, a grande diversidade fitoquímica das folhas das plantas do Cerrado pode ser explorada de forma racional, comparativa e sustentável na síntese de AgNPs.

Dessa forma, o presente Capítulo III consiste em avaliar o potencial de extratos aquosos obtidos a partir de folhas de 90 espécies de plantas do Cerrado na síntese de micropartículas (AgMPs) e nanopartículas (AgNPs) de prata e investigar uma potencial aplicação biotecnológica no controle de microrganismos.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

→ Sintetizar, caracterizar e investigar a atividade biológica *in vitro* de micropartículas (AgMPs) e nanopartículas de prata (AgNPs) produzidas utilizando 90 extratos aquosos obtidos a partir de folhas de plantas nativas (80) ou introduzidas (10) no Cerrado.

### **Objetivos específicos**

→ Obter extratos aquosos a partir das folhas de 90 plantas encontradas no Cerrado;

→ Sintetizar AgMPs e AgNPs utilizando os extratos aquosos de folhas coletadas em estações de chuva e em alguns casos na seca;

→ Caracterizar as partículas obtidas por meio de técnicas de investigações físico-químicas que possibilitem a determinação da formação (espectrofotometria), do tamanho (espalhamento de luz dinâmico) e carga (potencial Zeta de superfície);

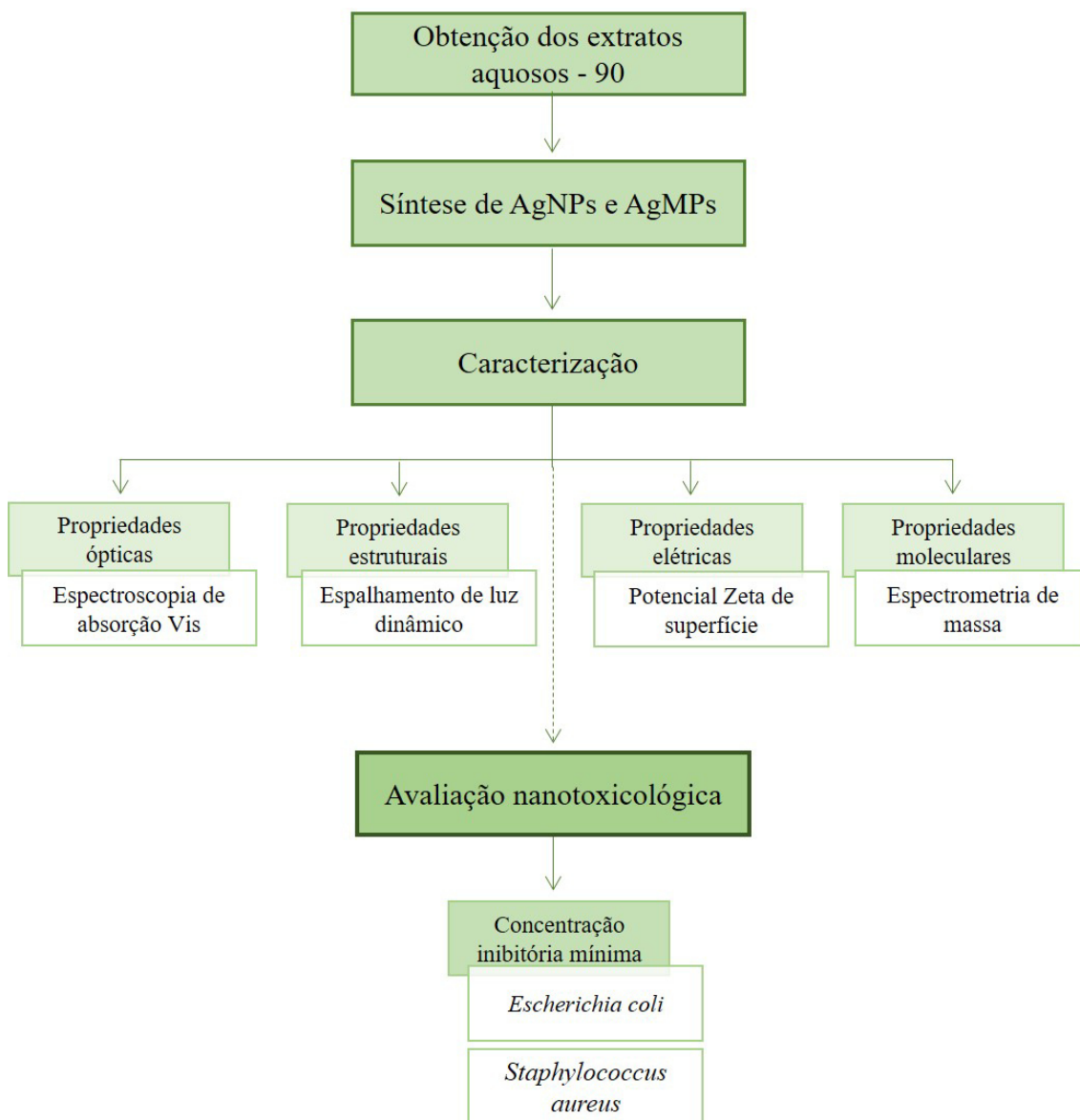
→ Caracterizar comparativamente os extratos das folhas quanto aos perfis moleculares (espectrometria de massa);

→ Investigar a possível atividade biológica *in vitro* dos extratos vegetais e das partículas de prata em células bacterianas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.



## METODOLOGIA

Visando a atingir os objetivos propostos, a metodologia utilizada no presente Capítulo III seguiu as etapas representadas no esquema abaixo (Figura III 1). Cada etapa metodológica foi descrita previamente no Capítulo I.



**Figura III 1.** Representação esquemática das etapas metodológicas utilizadas no presente capítulo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Propriedades ópticas

Extratos oriundos de folhas de diversas plantas da biodiversidade mundial têm sido utilizados em rotas de síntese de NPMs (Gardea-Torresdey et al., 2003; Krishnaraj et al., 2010; Mendoza-Reséndez et al., 2013; Albernaz 2014; Silva 2014). Contudo, as escolhas das plantas têm sido realizadas de forma empírica e aleatória sem nenhum tipo de estratégia que apresente um desenho racional ou mesmo sem realizar uma investigação sistemática de múltiplas espécies (por exemplo, algumas dezenas) de um determinado Bioma (Das et al., 2013).

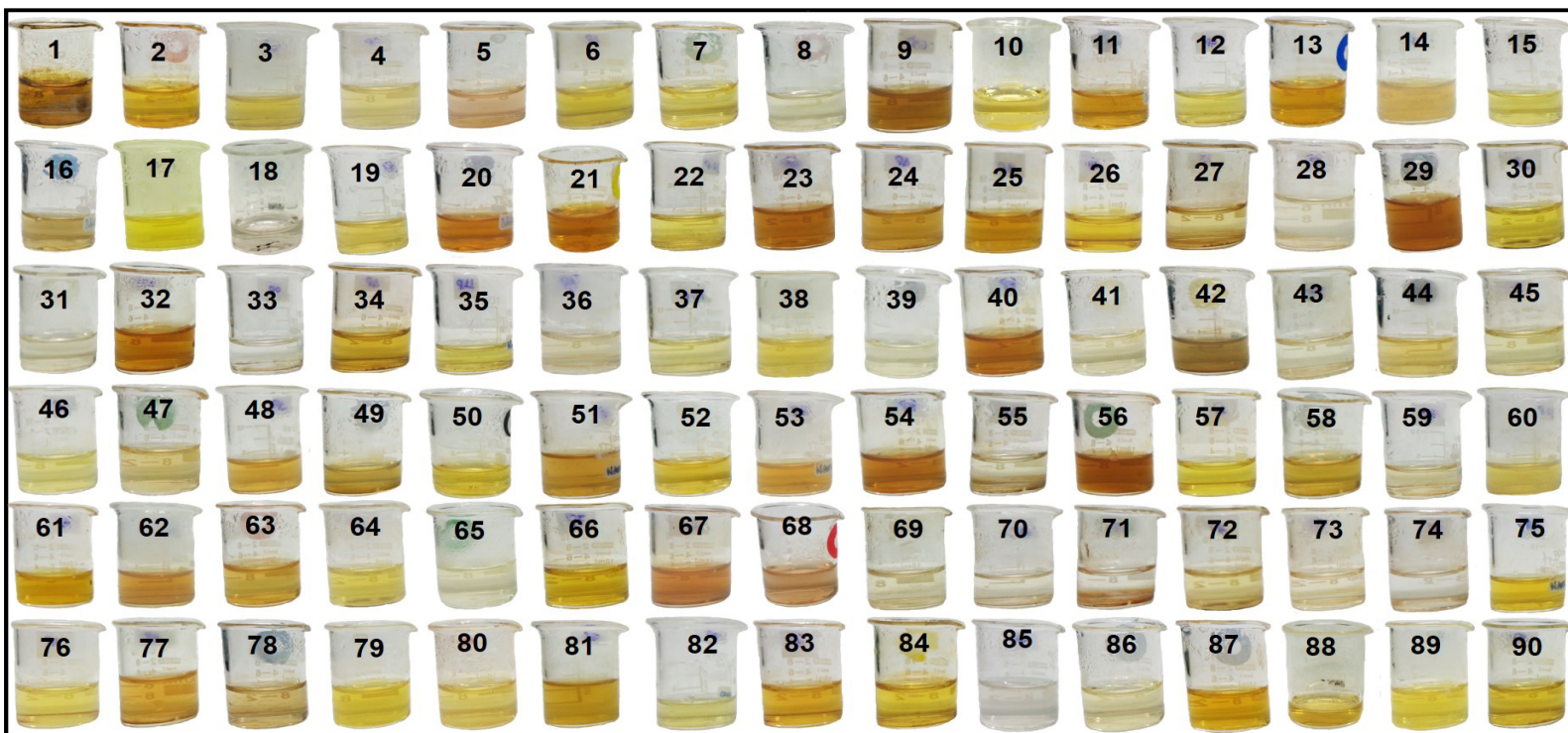
No presente Capítulo III, noventa espécies de plantas presentes no bioma Cerrado, nativas (80) ou introduzidas (10), foram utilizadas na síntese de AgNPs e AgMPs (Tabela I 1, pág. 29). Essa abordagem representa provavelmente a mais ampla e sistemática investigação realizada até o momento acerca do potencial de um Bioma mundial para síntese de NPMs, mas ainda assim nem sequer representa 1% das espécies que ocorrem no Bioma Cerrado (MMA, 2015), ainda que representando 40 famílias de plantas.

Para fins de comparações diretas, todas as sínteses foram realizadas à 75°C por 2,5 h utilizando  $\text{AgNO}_3$  a 1 mM de concentração final e extratos aquosos dos diferentes extratos a 1 mg/mL de concentração final (referente ao tecido originalmente extraído) conforme otimizado nos estudos com caju de árvore do Cerrado (Capítulo II). As reações entre os extratos aquosos e  $\text{AgNO}_3$  acarretaram em mudanças de coloração dos meios reacionais para 77% de todos os extratos utilizados, variando de translúcidos a marrons dependendo do extrato utilizado, indicando a ocorrência de formação das partículas com rendimentos variáveis (Figura III 2).

O monitoramento espectrofotométrico das reações indicou diferenças nos perfis de incremento das intensidades de absorção das suspensões durante e ao término do período de monitoramento de síntese, sendo que os aumentos mais pronunciados (valores de absorbância acima de 1,0) ocorreram para os meios reacionais contendo os extratos de folhas de Aroeira, Pereiro do Campo, Pequi, Sambaibinha e Murici (Figura III 3). Todas as espécies citadas são espécies nativas do Cerrado e nenhuma delas são representantes de uma mesma família, sugerindo que a diversidade biológica das plantas pode influenciar de maneira distinta na potencialidade de formação das AgNPs.

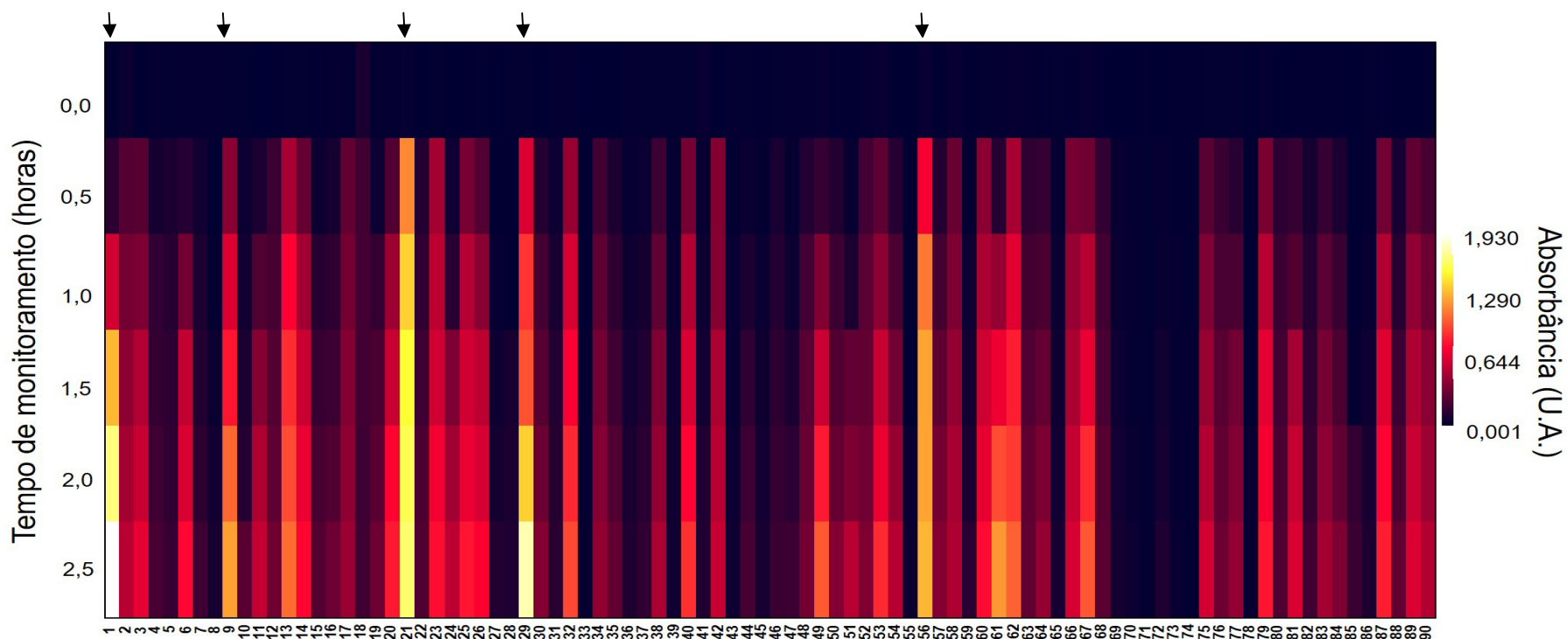
Adicionalmente, com base na taxa de formação 70 espécies das 90 avaliadas acarretaram na síntese de AgNPs (linha de corte fixada em 5% do valor máximo atingido com a espécie com maior rendimento de síntese), sendo que 30% e 71,25% correspondem as plantas introduzidas e nativas, respectivamente (Figura III 4). Esses resultados indicam um maior potencial biorredutor das plantas nativas do Cerrado. Entretanto, vale ressaltar que a diversidade de famílias das plantas introduzidas (em sua maioria gramas e capins) foi bem menor quando comparado à das plantas nativas.

Tendo em vista que foi mantido um procedimento padrão na coleta do material vegetal (folhas), bem como do protocolo de preparação dos extratos aquosos e caracterização das estruturas formadas, os resultados distintos estão possivelmente relacionados a diferenças na composição fitoquímica e à concentração dos componentes moleculares presentes nos extratos, os quais podem ser reflexo das diferenças metabólicas e fisiológicas existentes entre as espécies vegetais. Cabe destacar que variações dos agentes físicos e químicos podem afetar as rotas de síntese dentre eles temperatura, tempo de reação, concentração de extrato, concentração dos íons metálicos, dentre outros (Albernaz 2014; Silva 2014). Esses fatores podem ser controlados no intuito de modular o potencial redutor dos extratos na formação de AgNPs (Silva 2014).



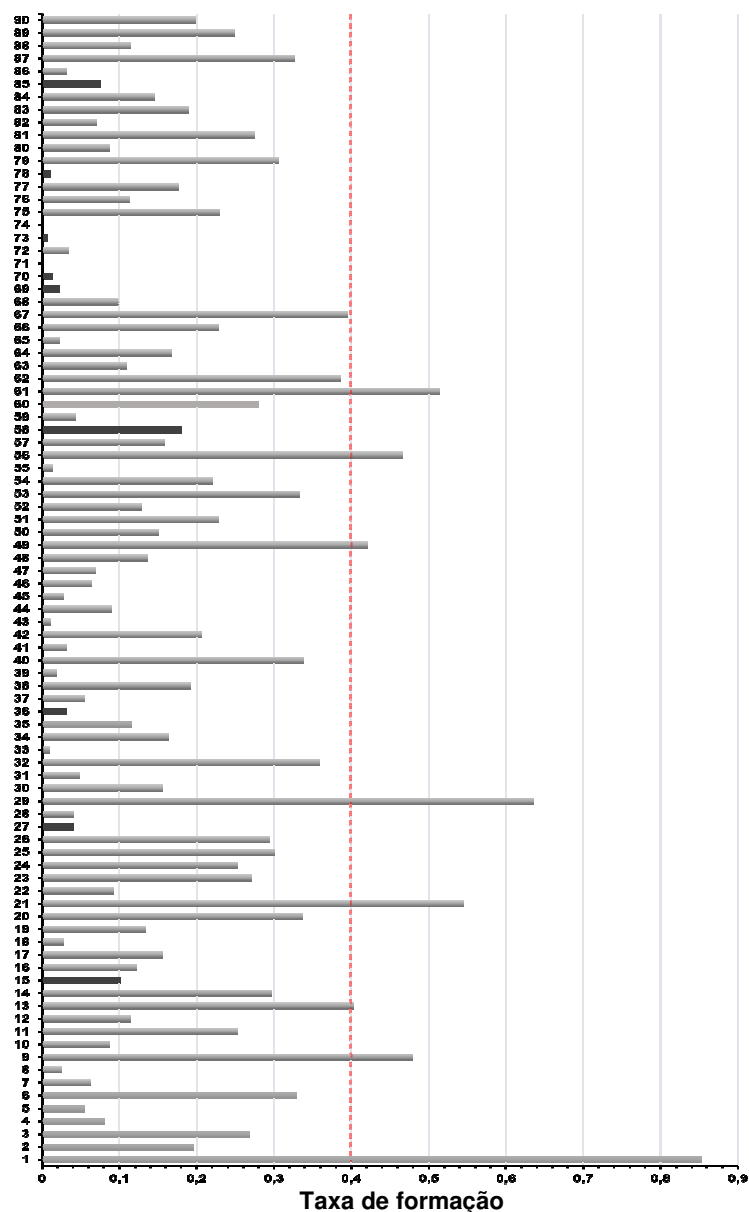
**Figura III 2.** Fotografias dos béqueres contendo as suspensões finais de partículas de prata sintetizadas a 75°C por 2,5 h utilizando extratos de folhas a 1 mg/mL de diferentes espécies de plantas do Cerrado em meio reacional aquoso contendo  $\text{AgNO}_3$  a 1 mM.

1 (Aroeira); 2 (Cajuzinho); 3 (Gonçalo); 4 (Pimenta de macaco); 5 (Pinha do Cerrado); 6 (Angélica); 7 (Mangaba); 8 (Pereiro); 9 (Pereiro do Campo); 10 (Babaçu); 11 (Buritirana); 12 (Macaúba); 13 (Assa-Peixe); 14 (Coração de negro); 15 (Picão); 16 (Vassourinha); 17 (Caraíba); 18 (Jacarandá); 19 (Verga Tesa); 20 (Almesegueira); 21 (Pequi); 22 (Embaúba); 23 (Carne de Vaca); 24 (Pau-Santo); 25 (Capitão); 26 (Mirindiba); 27 (Navalha); 28 (Sambaíba); 29 (Sambaibinha); 30 (Cansação); 31 (Angiquinho com espinho); 32 (Barbatimão); 33 (Baru); 34 (Ferreirinha Pau ferro); 35 (Jacaré); 36 (Mata Pasto); 37 (Miroró); 38 (Mulungu); 39 (Pata de Vaca); 40 (Rabo de Bugio Preto); 41 (Sucupira Branca); 42 (Tatarena); 43 (Amargoso); 44 (Caeté); 45 (Jatobá do Mato); 46 (Angelim Pedra); 47 (Canzileiro); 48 (Carvoeiro); 49 (Copaíba); 50 (Jatobá); 51 (Jatobá do Cerrado); 52 (Sucupira Preta); 53 (Rabo de Bugio); 54 (Cega Machado); 55 (Pacari); 56 (Murici); 57 (Murici do Grande); 58 (Malva Amarela); 59 (Mutamba); 60 (Rabo de arara); 61 (Cedro); 62 (Cedro branco); 63 (Angico); 64 (Bureré); 65 (Gameleira); 66 (Araçá); 67 (Cagaíta); 68 (Buriti); 69 (Braquiário); 70 (Colônã); 71 (Colônã); 72 (Gordura Meloso); 73 (Jaraguá); 74 (Napiê); 75 (Jenipapo do Mato); 76 (Marmelada); 77 (Marmelada de Cachorro); 78 (Quina de Mato); 79 (Mamoninha); 80 (Mandioquinha); 81 (Tingui); 82 (Mata Cachorro); 83 (Negramina); 84 (Açoita Cavallo); 85 (Malva Preta); 86 (Mama de Porca); 87 (Enxerto de Passarinho); 88 (Bananeira); 89 (Pau Terra); 90 (Pau Terrinha).



**Figura III 3.** Representação gráfica de matriz colorida do monitoramento espectrofotométrico a 450 nm a cada 30 min durante o período de síntese (2,5 h) utilizando extrato aquoso obtido a partir das folhas de 90 espécies de plantas do Cerrado. Setas pretas indicam as suspensões que apresentaram maiores intensidades de absorção.

1 (Aroeira); 2 (Cajuzinho); 3 (Gonçalo); 4 (Pimenta de macaco); 5 (Pinha do Cerrado); 6 (Angélica); 7 (Mangaba); 8 (Pereiro); 9 (Pereiro do Campo); 10 (Babaçu); 11 (Buritirana); 12 (Macaúba); 13 (Assa-Peixe); 14 (Coração de negro); 15 (Picão); 16 (Vassourinha); 17 (Caraíba); 18 (Jacarandá); 19 (Verga Tesa); 20 (Almesegueira); 21 (Pequi); 22 (Embaúba); 23 (Carne de Vaca); 24 (Pau-Santo); 25 (Capitão); 26 (Mirindiba); 27 (Navalha); 28 (Sambaíba); 29 (Sambaibinha); 30 (Cansação); 31 (Angiquinho com espinho); 32 (Barbatimão); 33 (Baru); 34 (Ferreirinha Pau ferro); 35 (Jacaré); 36 (Mata Pasto); 37 (Miroró); 38 (Mulungu); 39 (Pata de Vaca); 40 (Rabo de Bugio Preto); 41 (Sucupira Branca); 42 (Tatarena); 43 (Amargoso); 44 (Caeté); 45 (Jatobá do Mato); 46 (Angelim Pedra); 47 (Canzileiro); 48 (Carvoeiro); 49 (Copaíba); 50 (Jatobá); 51 (Jatobá do Cerrado); 52 (Sucupira Preta); 53 (Rabo de Bugio); 54 (Cega Machado); 55 (Pacari); 56 (Murici); 57 (Murici do Grande); 58 (Malva Amarela); 59 (Mutamba); 60 (Rabo de arara); 61 (Cedro); 62 (Cedro branco); 63 (Angico); 64 (Bureré); 65 (Gameleira); 66 (Araçá); 67 (Cagaita); 68 (Buriti); 69 (Braquiarião); 70 (Colônho); 71 (Coloninho); 72 (Gordura Meloso); 73 (Jaraguá); 74 (Napiê); 75 (Jenipapo do Mato); 76 (Marmelada); 77 (Marmelada de Cachorro); 78 (Quina de Mato); 79 (Mamoninha); 80 (Mandioquinha); 81 (Tingui); 82 (Mata Cachorro); 83 (Negramina); 84 (Açoita Cavallo); 85 (Malva Preta); 86 (Mama de Porca); 87 (Enxerto de Passarinho); 88 (Bananeira); 89 (Pau Terra); 90 (Pau Terrinha).



**Figura III 4.** Taxas de formação obtidas com base na inclinação das curvas de formação ao longo de todo o período de reação de síntese das AgNPs utilizando extratos aquosos de folhas de plantas, nativas (cinza claro) e introduzidas (cinza escuro), do Cerrado.

1 (Aroeira); 2 (Cajuzinho); 3 (Gonçalo); 4 (Pimenta de macaco); 5 (Pinha do Cerrado); 6 (Angélica); 7 (Mangaba); 8 (Pereiro); 9 (Pereiro do Campo); 10 (Babaçu); 11 (Buritirana); 12 (Macaúba); 13 (Assa-Peixe); 14 (Coração de negro); 15 (Picão); 16 (Vassourinha); 17 (Caraíba); 18 (Jacarandá); 19 (Verga Tesa); 20 (Almesegueira); 21 (Pequi); 22 (Embaúba); 23 (Carne de Vaca); 24 (Pau-Santo); 25 (Capitão); 26 (Mirindiba); 27 (Navalha); 28 (Sambaíba); 29 (Sambaibinha); 30 (Cansação); 31 (Angiquinho com espinho); 32 (Barbatimão); 33 (Baru); 34 (Ferreirinha Pau ferro); 35 (Jacaré); 36 (Mata Pasto); 37 (Miroró); 38 (Mulungu); 39 (Pata de Vaca); 40 (Rabo de Bugio Preto); 41 (Sucupira Branca); 42 (Tatarena); 43 (Amargoso); 44 (Caeté); 45 (Jatobá do Mato); 46 (Angelim Pedra); 47 (Canzileiro); 48 (Carvoeiro); 49 (Copaíba); 50 (Jatobá); 51 (Jatobá do Cerrado); 52 (Sucupira Preta); 53 (Rabo de Bugio); 54 (Cega Machado); 55 (Pacari); 56 (Murici); 57 (Murici do Grande); 58 (Malva Amarela); 59 (Mutamba); 60 (Rabo de arara); 61 (Cedro); 62 (Cedro branco); 63 (Angico); 64 (Bureré); 65 (Gameleira); 66 (Araçá); 67 (Cagaita); 68 (Buriti); 69 (Braquiarão); 70 (Colônã); 71 (Colônã); 72 (Gordura Meloso); 73 (Jaraguá); 74 (Napiê); 75 (Jenipapo do Mato); 76 (Marmelada); 77 (Marmelada de Cachorro); 78 (Quina de Mato); 79 (Mamoninha); 80 (Mandioquinha); 81 (Tingui); 82 (Mata Cachorro); 83 (Negramina); 84 (Açoita Cavalos); 85 (Malva Preta); 86 (Mama de Porca); 87 (Enxerto de Passarinho); 88 (Bananeira); 89 (Pau Terra); 90 (Pau Terrinha).

O efeito de RPS envolve a excitação coletiva dos elétrons de um metal quando este se encontra estruturado sob a forma metálica, sendo representado por um pico de absorção característico. Sendo assim, a RPS tem sido utilizada como um parâmetro indicativo de formação de partículas de prata (Chen e Jesen, 2016). As AgNPs e AgMPs sintetizadas utilizando extratos aquosos de folhas de plantas do Cerrado foram submetidas a análise por espectroscopia de absorção na região do visível (350 a 550 nm) visando a avaliar se ocorreu o evento de RPS e verificar a possível ocorrência das sínteses na presença dos diferentes extratos.

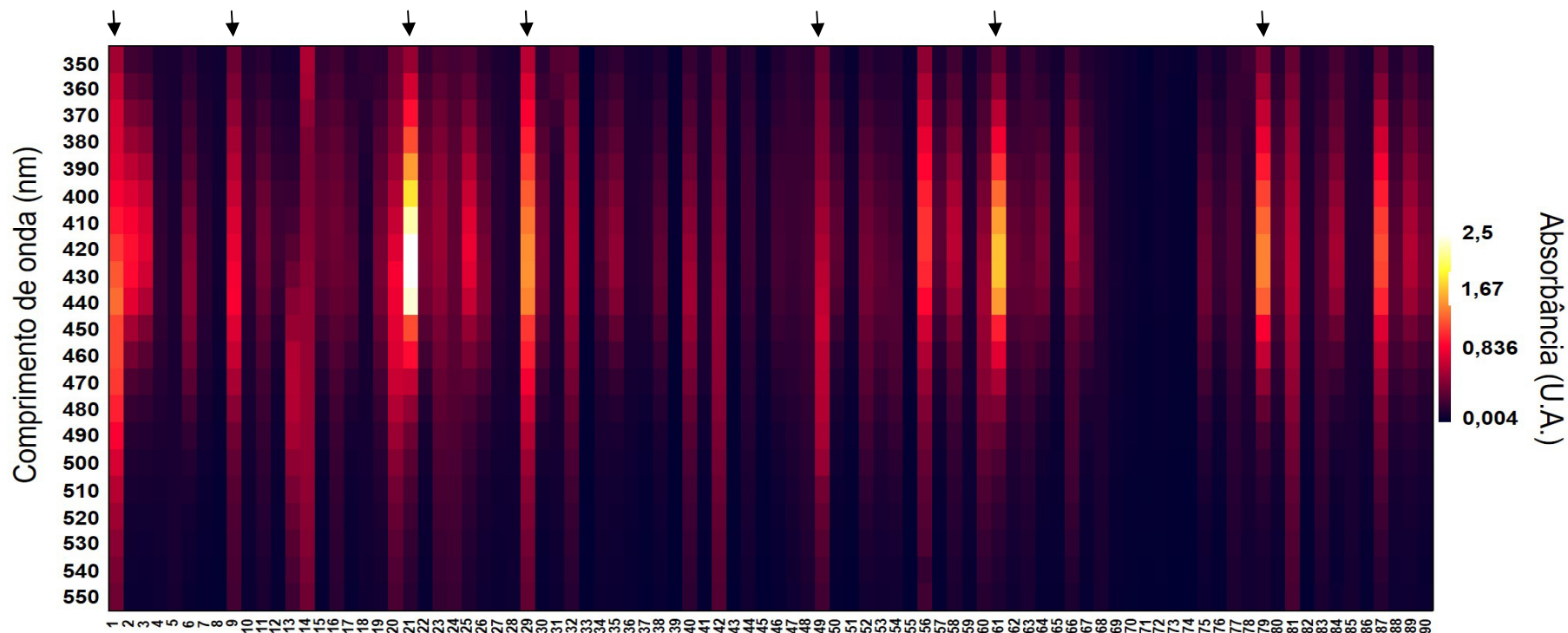
Foram identificados picos de absorção (valor máximo acima de 0,1 U.A.) referentes à RPS de prata metálica estruturada em 71% de todos os meios reacionais analisados (Figura III 5). Adicionalmente, ocorreu sinal referente à RPS em 80% e 27% das plantas nativas e introduzidas no Cerrado, respectivamente. Vale ressaltar que as plantas que apresentaram maior sinal de RPS foram Aroeira, Pereiro do Campo, Pequi, Sambaibinha e Murici, corroborando os resultados obtidos pela taxa de formação (Figura III 4 e Figura III 5). Os sinais de RPS das partículas de prata tiveram seus picos de absorção máxima variando de 410 a 470 nm (Figura III 5). Diversos estudos demonstraram que o efeito de RPS está diretamente relacionado à forma e ao tamanho das NPMs (Heath, 1989; Noguez, 2007), sugerindo que as partículas obtidas apresentaram tamanhos e/ou formas variadas.

Dentre todas as espécies de plantas exploradas no presente Capítulo III quanto ao potencial de síntese de AgNPs e AgMPs, apenas os extratos aquosos das folhas de três espécies já tinham sido utilizadas em estudos anteriores, dentre os quais dois também foram realizados pelo Grupo de Pesquisa em Nanobiotecnologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Albernaz, 2014; Silva, 2014).

O extrato aquoso de *B. gaudichaudii* (Bureré) se mostrou eficaz para a síntese de AgNPs e esses dados obtidos na presente prospecção corroboram os obtidos por Albernaz (2014) que em sua Dissertação de Mestrado relatou a eficiência do extrato aquoso, em concentrações 10 vezes maiores quando comparado ao presente estudo, na biorredução dos íons prata. Silva (2014), também em sua Dissertação de Mestrado, avaliou o potencial do extrato aquoso de folhas, frutos, cascas e sementes da *H. speciosa* (mangabeira) na formação de AgNPs. Contudo, os resultados obtidos no presente estudo indicaram baixo potencial redutor de extrato das folhas dessa planta para a formação de AgNPs. Essa discrepância pode estar relacionada com a

concentração do extrato utilizada que foi de 3 e 50 vezes maiores quando comparada ao presente estudo, bem como a temperatura e o tempo de síntese empregado por Silva (2014). Recentemente, o extrato aquoso de folhas de *Sida cordifolia* (Malva amarela) foi utilizado para a síntese de AgNPs e acarretou na formação e estabilização de AgNPs, as quais apresentaram formatos esféricos com ~30 nm de diâmetro. Adicionalmente, o extrato aquoso do fruto de *Genipa americana* (Jenipapo do mato) mostrou alto potencial redutor e estabilizante de nanopartículas de ouro (AuNPs) (Kumar et al., 2016). De qualquer modo, as outras 86 espécies de plantas do Cerrado ainda não haviam sido investigadas quanto ao potencial de síntese de AgNPs conforme levantamento realizado em novembro de 2016.





**Figura III 5.** Representação gráfica aos espectros de ressonância plasmônica de superfície das nanopartículas de prata sintetizadas utilizando extratos aquosos obtidos a partir das folhas de 90 espécies de plantas do Cerrado. Setas pretas indicam as suspensões que apresentaram maiores sinais de RPS.

1 (Aroeira); 2 (Cajuzinho); 3 (Gonçalo); 4 (Pimenta de macaco); 5 (Pinha do Cerrado); 6 (Angélica); 7 (Mangaba); 8 (Pereiro); 9 (Pereiro do Campo); 10 (Babaçu); 11 (Buritirana); 12 (Macaúba); 13 (Assa-Peixe); 14 (Coração de negro); 15 (Picão); 16 (Vassourinha); 17 (Caraíba); 18 (Jacarandá); 19 (Verga Tesa); 20 (Almesegueira); 21 (Pequi); 22 (Embaúba); 23 (Carne de Vaca); 24 (Pau-Santo); 25 (Capitão); 26 (Mirindiba); 27 (Navalha); 28 (Sambaíba); 29 (Sambaibinha); 30 (Cansação); 31 (Angiquinho com espinho); 32 (Barbatimão); 33 (Baru); 34 (Ferreirinha Pau ferro); 35 (Jacaré); 36 (Mata Pasto); 37 (Miroró); 38 (Mulungu); 39 (Pata de Vaca); 40 (Rabo de Bugio Preto); 41 (Sucupira Branca); 42 (Tatarena); 43 (Amargoso); 44 (Caeté); 45 (Jatobá do Mato); 46 (Angelim Pedra); 47 (Canzileiro); 48 (Carvoeiro); 49 (Copaíba); 50 (Jatobá); 51 (Jatobá do Cerrado); 52 (Sucupira Preta); 53 (Rabo de Bugio); 54 (Cega Machado); 55 (Pacari); 56 (Murici); 57 (Murici do Grande); 58 (Malva Amarela); 59 (Mutamba); 60 (Rabo de arara); 61 (Cedro); 62 (Cedro branco); 63 (Angico); 64 (Bureré); 65 (Gameleira); 66 (Araçá); 67 (Cagaita); 68 (Buriti); 69 (Braquiarião); 70 (Colônã); 71 (Coloninho); 72 (Gordura Meloso); 73 (Jaraguá); 74 (Napiê); 75 (Jenipapo do Mato); 76 (Marmelada); 77 (Marmelada de Cachorro); 78 (Quina de Mato); 79 (Mamoninha); 80 (Mandioquinha); 81 (Tingui); 82 (Mata Cachorro); 83 (Negramina); 84 (Açoita Cavallo); 85 (Malva Preta); 86 (Mama de Porca); 87 (Enxerto de Passarinho); 88 (Bananeira); 89 (Pau Terra); 90 (Pau Terrinha).

## Propriedades estruturais e elétricas

Tendo em vista que o efeito de RPS de AgNPs é dependente da forma e do tamanho das partículas produzidas (Amendola et al., 2010), e considerando que as suspensões de AgNPs do presente estudo apresentaram efeitos de RPS distintos, levantou-se a hipótese de que os diâmetros hidrodinâmicos também poderiam ser diferentes para as AgNPs sintetizadas utilizando os diferentes extratos e até mesmo em relação à possível ocorrência de AgMPs. De fato, apesar da literatura relatar sistematicamente a síntese de AgNPs, poucos estudos reportam a síntese de AgMPs.

A avaliação por espalhamento de luz dinâmico revelou variação no diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersividade (PdI); assim como foram determinadas variações dos potenciais Zeta das AgNPs (e também algumas AgMPs) sintetizadas com extratos aquosos de folhas de plantas do Cerrado (Tabela III 1). Os diâmetros médios das suspensões ao fim dos processos de síntese com cada espécie de planta variaram de  $33,01 \pm 0,09$  nm a  $2653,33 \pm 868,99$  nm dependendo do extrato utilizado, sendo que 61% das suspensões apresentaram estruturas dentro da faixa nanométrica de 10 e 100 nm, 36% apresentaram diâmetros médios entre 100 e 500 nm (tipicamente considerada sub-micrométrica), nenhuma apresentou diâmetro médio entre 500 e 1  $\mu$ m, e apenas 3% apresentaram diâmetros médios dentro da faixa micrométrica entre 1 e 3  $\mu$ m. Esses resultados corroboram os descritos na literatura utilizando espécies encontradas em outros Biomas mundiais nos quais diversos autores relatam a síntese de AgNPs utilizando extratos das folhas com diâmetros hidrodinâmicos que variam principalmente de 20 a 100 nm (Gardea-Torresdey et al., 2003; Krishnaraj et al., 2010; Mendoza-Reséndez et al., 2013; Rejeeth et al., 2014). Vale ressaltar que das cinco suspensões que apresentaram maiores taxas de formação e intensidades de RPS, quatro apresentaram diâmetros hidrodinâmicos médios (Z-Average) dentro da faixa nanométrica de 10 a 100 nm, sendo elas as AgNPs produzidas com extratos aquosos das folhas de Aroeira ( $77,58 \pm 0,35$ ), Pereiro do Campo ( $64,19 \pm 0,12$ ), Pequi ( $51,11 \pm 1,62$ ) e Murici ( $92,65 \pm 2,92$ ).

As suspensões de AgNPs apresentaram valores médios de PdI variando de monodispersas a polidispersas (0,1 e 0,8) (Tabela III 1), sendo que 40% apresentaram PdI entre 0,1 a 0,3 (baixo), 52% entre 0,3 a 0,6 (moderado), e 8% entre 0,6 a 0,9 (alto). Esses achados corroboram os diversos relatos da literatura os quais mostram que as AgNPs sintetizadas por rotas de síntese verde comumente apresentam alta

heterogeneidade e conseqüentemente PDI tendendo de moderado a alto (Murdock et al., 2008; Albernaz, 2014), mas ainda sinaliza para o fato da possibilidade de seleção de um número expressivo de plantas candidatas à síntese de AgNPs monodispersas caracterizadas por valores de PDI baixos (0,1-0,3), desde que investigado empiricamente um grupo considerável de espécies como aquelas investigadas no presente estudo ou que sejam desenvolvidas estratégias de modelagem matemática que permitam a seleção de espécies com base em alguns parâmetros preditivos. Adicionalmente, das cinco que apresentaram potencial redutor mais pronunciado, três apresentaram PDI baixo, sendo elas as AgNPs produzidas com extratos aquosos das folhas de Aroeira ( $0,225 \pm 0,020$ ), Pereiro do Campo ( $0,293 \pm 0,007$ ) e Pequi ( $0,278 \pm 0,011$ ).

A estabilidade coloidal, baseada na determinação do potencial Zeta de superfície das AgNPs, também variou de acordo com os diferentes extratos utilizados, sendo obtidas estabilidades em condição de potencial rápida coagulação/floculação ( $0 \pm 10$  mV) para 3%, instabilidade incipiente ( $\pm 10$  a  $\pm 30$  mV) para 87% e estabilidade moderada para apenas 10,0% ( $\pm 30$  a  $\pm 40$  mV) das AgNPs sintetizadas (ASTM, 1985); sendo que os valores de potencial Zeta das AgNPs sintetizadas a partir de extratos aquosos das folhas de plantas do Cerrado variaram de -1 a -32 mV (Tabela III 1). Esses achados corroboram diversos relatos da literatura que demonstraram que AgNPs sintetizadas com extratos de plantas possuem carga negativa (Albernaz 2014, Silva 2014). As plantas com maior potencial redutor apresentaram potencial Zeta de  $-26,5 \pm 0,8$  mV (Aroeira),  $-27,2 \pm 1,0$  mV (Pereiro do Campo) e  $-25,9 \pm 0,3$  mV (Pequi).

Os potenciais Zeta negativos das AgNPs sintetizadas no presente Capítulo III sugerem que as moléculas oriundas dos extratos aquosos das folhas tenham atuado tanto como agentes redutores na formação das nanopartículas, e também como agentes estabilizantes e de revestimento, aja visto que os potenciais Zeta dos extratos também foram negativos e com valores em geral muito semelhantes aos das AgNPs sintetizadas com os respectivos extratos (dados não mostrados).

**Tabela III 1.** Características físico-químicas das AgNPs sintetizadas utilizando 90 extratos aquosos obtidos a partir de folhas de plantas do Cerrado. Índice de polidispersividade (PdI). Valores referentes às médias e desvios padrão da média de três leituras independentes.

AgNPs	Diâmetro hidrodinâmico médio (d.nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
Aroeira	77,58 ± 0,35	0,225 ± 0,020	-26,5 ± 0,8
Caju	51,49 ± 2,50	0,326 ± 0,025	-24,6 ± 0,9
Gonçalo	68,00 ± 2,36	0,391 ± 0,014	-25,9 ± 1,3
Pimenta de macaco	81,22 ± 5,71	0,481 ± 0,025	-18,1 ± 1,5
Pinha do Cerrado	154,50 ± 4,95	0,196 ± 0,009	-23,6 ± 0,9
Angélica	53,90 ± 1,57	0,220 ± 0,003	-16,6 ± 0,8
Mangaba	1867,67 ± 149,39	0,368 ± 0,029	-1,5 ± 0,1
Pereiro	70,06 ± 2,69	0,744 ± 0,062	-18,9 ± 2,2
Pereiro do Campo	64,19 ± 0,12	0,293 ± 0,007	-27,2 ± 1,0
Babaçu	202,20 ± 9,08	0,318 ± 0,042	-26,6 ± 1,5
Buritirana	126,60 ± 0,92	0,448 ± 0,011	-27,3 ± 1,9
Macaúba	52,29 ± 1,73	0,426 ± 0,002	-21,0 ± 1,0
Assa-Peixe	44,97 ± 0,77	0,292 ± 0,047	-28,5 ± 2,8
Coração de Negro	97,50 ± 0,92	0,217 ± 0,012	-16,4 ± 0,6
Picão*	145,13 ± 9,23	0,494 ± 0,039	-24,3 ± 0,4
Vassourinha	128,30 ± 2,52	0,268 ± 0,005	-17,0 ± 1,0
Caraíba	46,81 ± 2,37	0,424 ± 0,021	-27,5 ± 1,8
Jacarandá	2653,33 ± 869,00	0,708 ± 0,253	-1,0 ± 0,0
Verga Tesa	76,21 ± 8,91	0,401 ± 0,031	-26,5 ± 1,2
Almesegueira	90,71 ± 1,75	0,240 ± 0,009	-26,7 ± 0,5
Pequi	51,11 ± 1,62	0,278 ± 0,011	-25,9 ± 0,3
Embaúba	44,05 ± 2,32	0,384 ± 0,026	-19,2 ± 2,9
Carne de Vaca	156,63 ± 6,05	0,256 ± 0,006	-25,0 ± 0,1
Pau-Santo	488,33 ± 5,95	0,396 ± 0,016	-15,0 ± 0,6
Capitão	49,38 ± 0,52	0,273 ± 0,002	-31,3 ± 1,0
Mirindiba	52,79 ± 0,84	0,287 ± 0,007	-21,3 ± 0,1
Navalha*	197,63 ± 5,66	0,250 ± 0,007	-25,5 ± 0,9
Sambaíba	119,70 ± 3,90	0,441 ± 0,009	-26,6 ± 0,9
Sambaibinha	464,03 ± 36,02	0,352 ± 0,027	-15,9 ± 0,8
Cansação	43,60 ± 0,31	0,293 ± 0,027	-26,0 ± 0,8
Angiquinho com espinho	231,03 ± 5,11	0,208 ± 0,009	-19,5 ± 2,0
Barbatimão	96,76 ± 6,93	0,389 ± 0,021	-24,8 ± 0,6
Baru	90,15 ± 2,16	0,161 ± 0,040	-18,3 ± 1,1
Ferreirinha Pau Ferro	48,43 ± 2,87	0,451 ± 0,031	-27,5 ± 1,4
Jacaré	44,99 ± 1,03	0,297 ± 0,033	-24,7 ± 1,6
Mata Pasto*	299,33 ± 8,86	0,505 ± 0,141	-11,8 ± 2,6
Miroró	84,66 ± 9,40	0,825 ± 0,086	-29,8 ± 2,9

**Tabela III 1 (Continuação).** Características físico-químicas das AgNPs sintetizadas utilizando 90 extratos aquosos obtidos a partir de folhas de plantas do Cerrado. Índice de polidispersividade (PDI). Valores referentes às médias e desvios padrão da média de três leituras independentes.

AgNPs	Diâmetro hidrodinâmico médio (d.nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
Mulungu	73,88 ± 2,08	0,465 ± 0,042	-21,9 ± 1,3
Pata de Vaca	241,97 ± 30,65	0,633 ± 0,219	-30,9 ± 2,8
Rabo de Bugio Preto	85,45 ± 2,01	0,263 ± 0,008	-26,2 ± 1,7
Sucupira Branca	87,62 ± 5,56	0,509 ± 0,013	-21,6 ± 1,4
Tatarena	120,70 ± 1,68	0,244 ± 0,005	-15,7 ± 0,3
Amargoso	186,13 ± 9,85	0,703 ± 0,047	-23,1 ± 1,7
Caeté	124,97 ± 3,31	0,289 ± 0,015	-18,2 ± 0,3
Jatobá do Mato	81,50 ± 5,46	0,449 ± 0,019	-25,7 ± 4,0
Angelim Pedra	91,04 ± 1,53	0,310 ± 0,015	-26,5 ± 1,5
Canzileiro	211,23 ± 13,64	0,350 ± 0,044	-29,3 ± 0,6
Copaíba	105,37 ± 2,42	0,194 ± 0,007	-11,4 ± 0,1
Jatobá	53,09 ± 1,99	0,353 ± 0,003	-26,1 ± 0,1
Jatobá do Cerrado	1659,67 ± 290,68	0,455 ± 0,032	-1,7 ± 0,0
Sucupira Preta	99,39 ± 4,43	0,296 ± 0,034	-28,2 ± 1,9
Rabo de Bugio	89,27 ± 2,18	0,269 ± 0,006	-30,0 ± 0,2
Sega Machado	76,06 ± 2,50	0,261 ± 0,009	-21,5 ± 2,3
Pacari	89,61 ± 0,93	0,399 ± 0,016	-21,5 ± 0,2
Murici	92,65 ± 2,92	0,458 ± 0,009	-21,6 ± 0,3
Murici do grande	51,55 ± 1,59	0,605 ± 0,011	-27,7 ± 1,4
Malva Amarela*	94,99 ± 1,06	0,497 ± 0,006	-31,8 ± 2,2
Mutamba	-	-	-
Rabo de Arara	82,33 ± 1,21	0,249 ± 0,003	-32,8 ± 0,9
Cedro	66,83 ± 6,67	0,397 ± 0,045	-27,9 ± 0,5
Cedro Branco	61,75 ± 1,40	0,322 ± 0,053	-29,3 ± 1,5
Angico	77,20 ± 1,75	0,432 ± 0,015	-29,4 ± 5,9
Bureré	60,51 ± 4,89	0,442 ± 0,053	-32,2 ± 2,2
Gameleira	196,80 ± 3,58	0,192 ± 0,008	-26,2 ± 1,1
Araçá	33,03 ± 0,10	0,282 ± 0,006	-31,9 ± 0,6
Cagaita	104,57 ± 1,05	0,220 ± 0,008	-21,1 ± 0,8
Buriti	184,30 ± 1,32	0,284 ± 0,005	-28,3 ± 1,6
Braquiarão*	150,50 ± 3,57	0,271 ± 0,004	-24,7 ± 0,2
Colônão*	179,73 ± 23,07	0,508 ± 0,055	-23,8 ± 3,0
Coloninho*	174,30 ± 7,10	0,252 ± 0,022	-21,2 ± 1,2
Gordura Meloso*	85,41 ± 2,71	0,654 ± 0,024	-25,1 ± 1,0
Jaraguá*	254,40 ± 15,76	0,586 ± 0,030	-31,1 ± 1,9

**Tabela III 1 (Continuação).** Características físico-químicas das AgNPs sintetizadas utilizando 90 extratos aquosos obtidos a partir de folhas de plantas do Cerrado. Índice de polidispersividade (PdI). Valores referentes às médias e desvios padrão da média de três leituras independentes.

AgNPs	Diâmetro hidrodinâmico médio (d.nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
Napiê*	200,90 ± 3,22	0,338 ± 0,039	-20,3 ± 2,7
Jenipapo do Mato	52,55 ± 1,44	0,406 ± 0,014	-20,6 ± 0,1
Marmelada	51,77 ± 1,48	0,431 ± 0,010	-25,0 ± 1,1
Marmelada de cachorro	101,70 ± 4,68	0,553 ± 0,023	-26,3 ± 1,1
Quina do Mato	153,30 ± 1,40	0,242 ± 0,003	-16,8 ± 4,4
Mamoninha	48,87 ± 1,25	0,299 ± 0,030	-27,3 ± 0,2
Mandioquinha	46,49 ± 0,02	0,292 ± 0,022	-29,6 ± 2,6
Tingui	213,00 ± 11,31	0,423 ± 0,033	-14,0 ± 0,5
Mata Cachorro	47,49 ± 4,22	0,426 ± 0,071	-21,0 ± 3,3
Negramima	104,87 ± 3,01	0,224 ± 0,009	-22,8 ± 0,2
Açoita cavalo	49,64 ± 0,67	0,308 ± 0,028	-26,4 ± 1,4
Malva Preta	153,57 ± 5,18	0,213 ± 0,023	-20,3 ± 0,4
Mama de Porca	175,00 ± 6,58	0,288 ± 0,005	-20,7 ± 0,8
Enxerto de passarinho	63,84 ± 1,46	0,412 ± 0,025	-30,2 ± 2,7
Bananeira	58,63 ± 3,72	0,438 ± 0,022	-28,3 ± 1,1
Pau Terra	76,49 ± 2,36	0,446 ± 0,014	-24,8 ± 0,8
Pau Terrinha	54,73 ± 2,20	0,406 ± 0,005	-29,3 ± 2,4

\* Espécies de plantas introduzidas no Cerrado. -Análise não realizada

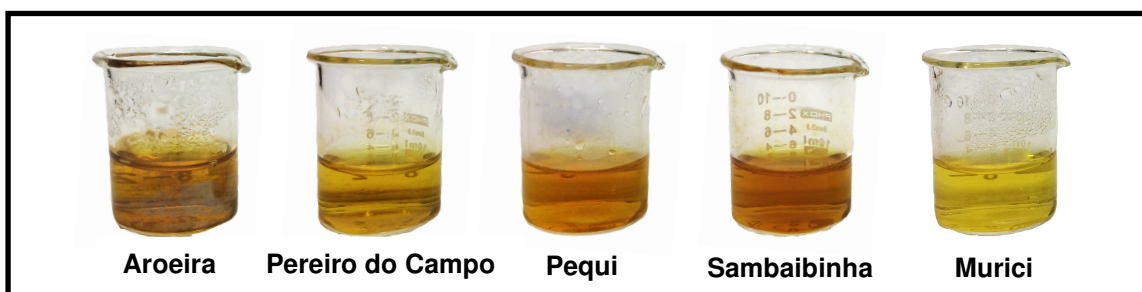
### Plantas coletadas no período de seca

Diversos fatores podem acarretar em alteração do metabolismo das plantas, dentre eles a pressão ambiental constante, como por exemplo, as variações climáticas. O clima predominante do Cerrado é o tropical sazonal, sendo caracterizado principalmente pela ocorrência de duas estações muito bem definidas, sendo estas um inverno seco (abril a setembro) e um verão chuvoso (outubro a março) (Walter 2006).

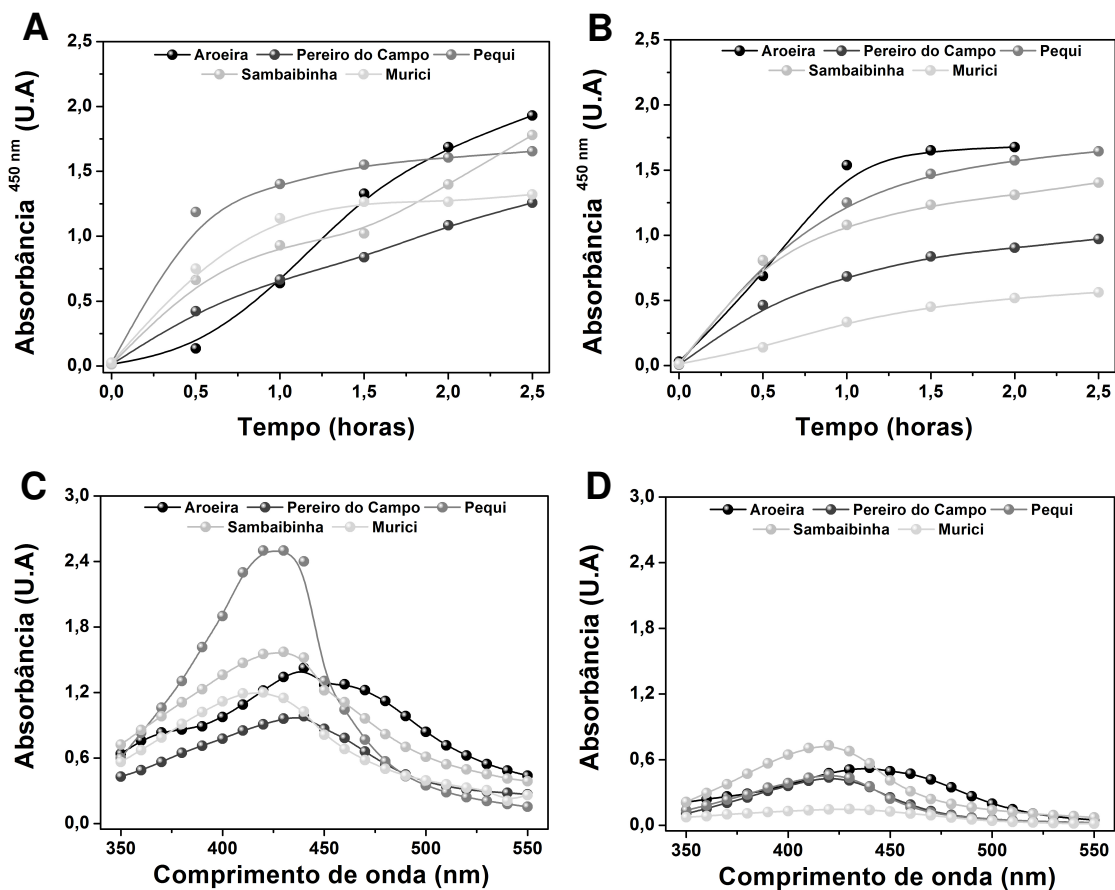
A possível influência de fatores ambientais aos quais as plantas são expostas na síntese de AgNPs tem sido recentemente discutida em trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Nanobiotecnologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, uma vez que eles poderiam acarretar em alterações no perfil de metabólitos e conseqüentemente alterar o padrão de formação e características das partículas

(Albernaz 2014; Silva 2014; Silva et al., 2015). Com base nisso, levantou-se a hipótese de que os potenciais agentes redutores presentes nos extratos poderiam ser alterados em virtude da época de coleta das folhas. Sendo assim, folhas das plantas que apresentaram maior potencial redutor (Aroeira, Pereiro do Campo, Pequi, Sambaibinha e Murici) foram coletadas em dois períodos distintos: período de chuva - resultados anteriormente apresentados nessa Tese e período de seca; e os extratos aquosos foram utilizados na síntese de AgNPs.

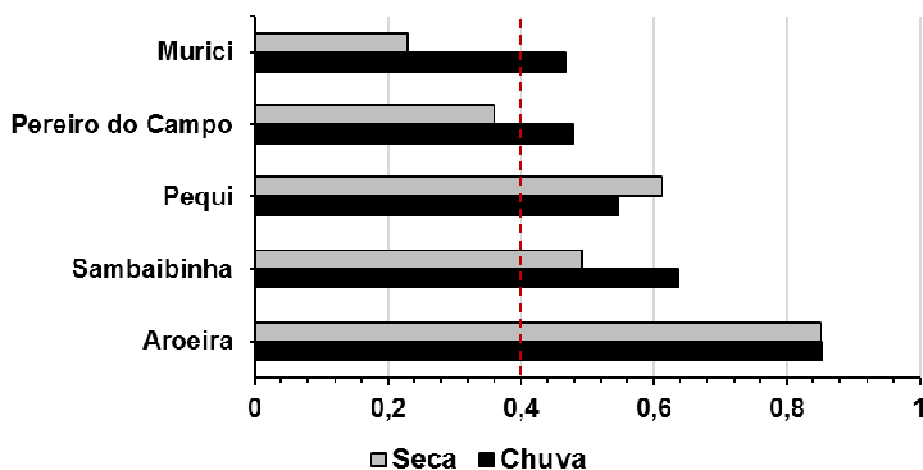
Para todos os extratos utilizados independente do período de coleta ocorreu mudança de coloração de translúcida a amarronzada, indicando a formação de AgNPs (Figura III 6). Esse fato foi confirmado pelo aumento de absorção durante o monitoramento de síntese. Contudo, as curvas absorção, a taxa de formação, bem como as curvas de RPS (Figura III 7 e Figura III 8) indicaram maior potencial redutor para os extratos de folhas das plantas coletadas no período de chuva para quatro das cinco espécies investigadas, indicando que os metabólitos responsáveis pelas sínteses são possivelmente produzidos em menor quantidade na época de seca ou que outros tipos de metabólitos possam influenciar negativamente na produção de AgNPs. Esses dados corroboram os encontrados por Albernaz (2014) que ao avaliar o potencial redutor de extratos de verão (chuva) e inverno (seca), obtidos a partir de folhas de *B. gaudichaudii*, também observou um maior potencial de formação para as folhas de verão. Contudo, vale ressaltar que as AgNPs sintetizadas utilizando extratos de folhas de Pequi coletadas no período de seca foram as únicas dentre as cinco espécies a apresentar maior taxa de formação nesse período, mas que apresentaram um menor efeito de RPS, indicando menor formação de AgNPs (Figura III 7 e Figura III 8).



**Figura III 6.** Fotografias dos béqueres contendo as suspensões finais de AgNPs por 2,5 h à 75°C utilizando extrato aquoso de folhas coletadas no período de inverno.



**Figura III 7.** Cinéticas de formação das AgNPs por 2,5 h à 75°C utilizando extrato aquoso de folhas coletadas no período de verão (A) e de inverno (B). Espectros de absorção na região do visível das AgNPs por 2,5 h à 75°C utilizando extrato aquoso de folhas coletadas no período de verão (C) e de inverno (D).



**Figura III 8.** Taxas de formação de AgNPs sintetizadas utilizando extratos aquosos de folhas de plantas coletadas na época de seca (cinza claro) e chuva (cinza escuro).



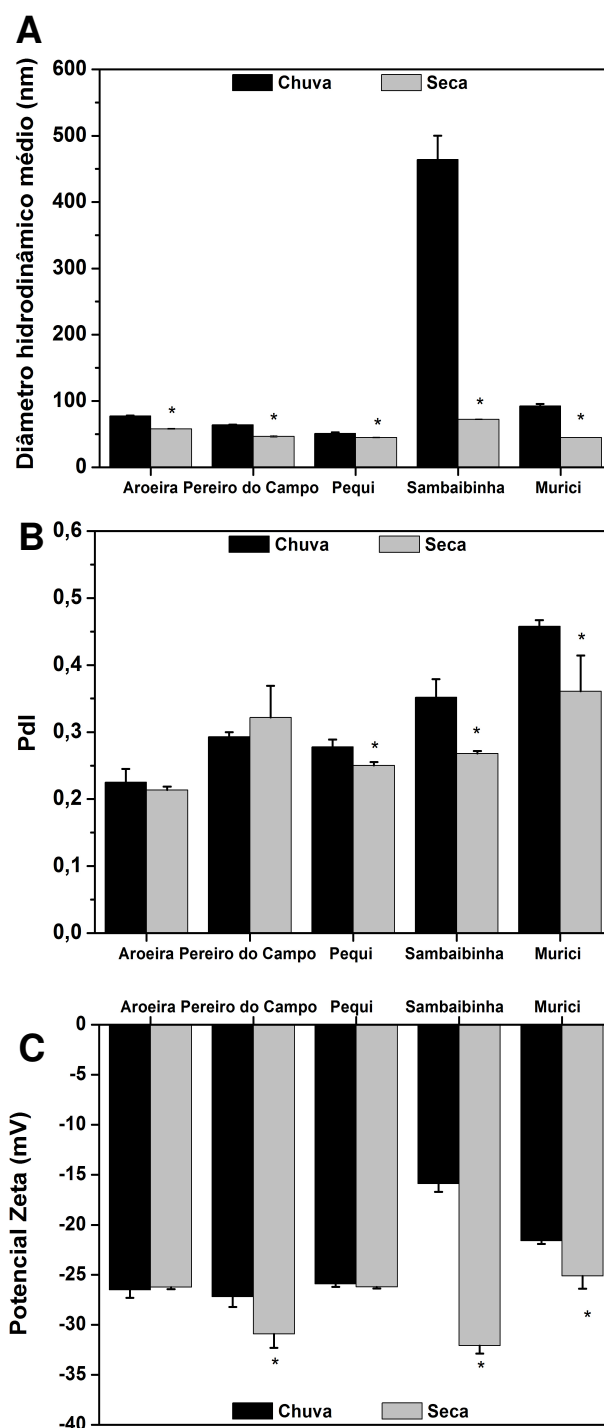
Tendo em vista as variações observadas nas análises de absorção e RPS, entre as plantas coletadas durante o período de chuva e de seca, as amostras foram analisadas por espalhamento de luz dinâmico e potencial Zeta de superfície no intuito de avaliar potenciais diferenças nas características físico-químicas das AgNPs (Figura III 9). Após a análise foi observada variação no diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial Zeta de superfície das AgNPs entre os extratos de folhas coletadas no período de chuva ou seca.

As AgNPs sintetizadas utilizando extratos de folhas coletadas no período de seca apresentaram diâmetros hidrodinâmicos médios significativamente menores para todas as plantas utilizadas quando comparados às AgNPs sintetizadas com os extratos de folhas coletadas no período de chuva (Figura III 9A) ( $P < 0,05$ ). Adicionalmente, ocorreu diminuição significativa do PDI das AgNPs sintetizadas utilizando extratos aquosos de folhas de Pereiro, Sambaibinha e Murici, sendo que não houve variação para Aroeira e Pequi ( $P < 0,05$ ) (Figura III 9B). Esses dados corroboram os encontrados para AgNPs sintetizadas com folhas de *B. gaudichaudii* coletadas durante período de chuva e seca (Albernaz 2014), onde os extratos produzidos a partir de folhas de inverno (seca) apresentaram diâmetros hidrodinâmicos menores e PDI moderado.

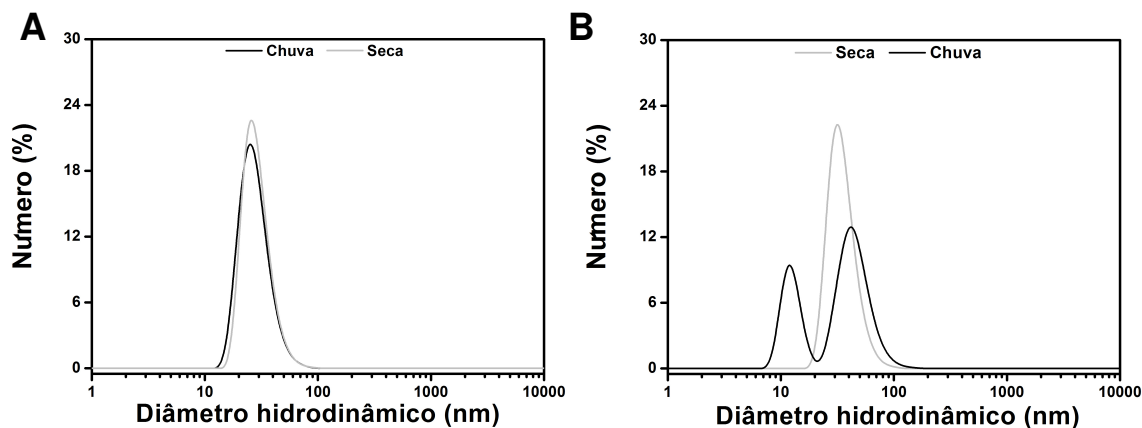
As AgNPs sintetizadas com Aroeira e Pequi foram as que apresentaram maiores taxas de formação, RPS e menores variações nos diâmetros hidrodinâmicos, polidispersividades e potenciais Zeta de superfície quando comparados os extratos de folhas coletadas nos períodos de chuva e seca. Contudo, quando as curvas de distribuição em classes de diâmetros hidrodinâmicos em número são observadas, as suspensões sintetizadas com extrato de Pequi não apresentaram diferenças nos diâmetros, sendo que a de Aroeira apresentou distribuição bimodal e unimodal para os extratos obtidos de folhas coletadas em período de chuva e seca, respectivamente (Figura III 10).

O perfil molecular das plantas pode variar de acordo com o estresse sofrido, como por exemplo, a sazonalidade ambiental (Taiz e Zeiger, 2010). Nesse sentido, o perfil molecular das folhas poderia variar em composição e/ou concentração como resposta às variações ambientais, as quais são caracterizadas predominantemente pelos períodos chuvosos e de seca. Sendo assim, as diferenças nas características das AgNPs sintetizadas, com extratos de folhas coletadas nos períodos de chuva e seca podem estar relacionadas às diferenças na composição e/ou concentração das moléculas responsáveis

pelo processo de biorredução. Essas questões precisam ser consideradas em estudos futuros no intuito de avaliar quais as possíveis diferenças na composição molecular dos extratos em virtude do estresse sofrido pela planta.



**Figura III 9.** Características físico-químicas das AgNPs sintetizadas utilizando extratos aquosos obtidos a partir de folhas de plantas do Cerrado coletadas no verão (período de chuva) e no inverno (período de seca). Diâmetro hidrodinâmico (A), Índice de polidispersividade (PDI) (B), Potencial Zeta de superfície (C). Valores referentes às médias e desvios padrão da média de três leituras independentes. \*Diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) em relação à síntese utilizando extrato de verão.



**Figura III 10.** Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico (em número) obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) das AgNPs sintetizadas com extratos de folhas de Pequi (A) e Aroeira (B) coletadas em período de chuva e seca.

### **Avaliação do perfil molecular dos extratos das folhas coletadas no período de chuva**

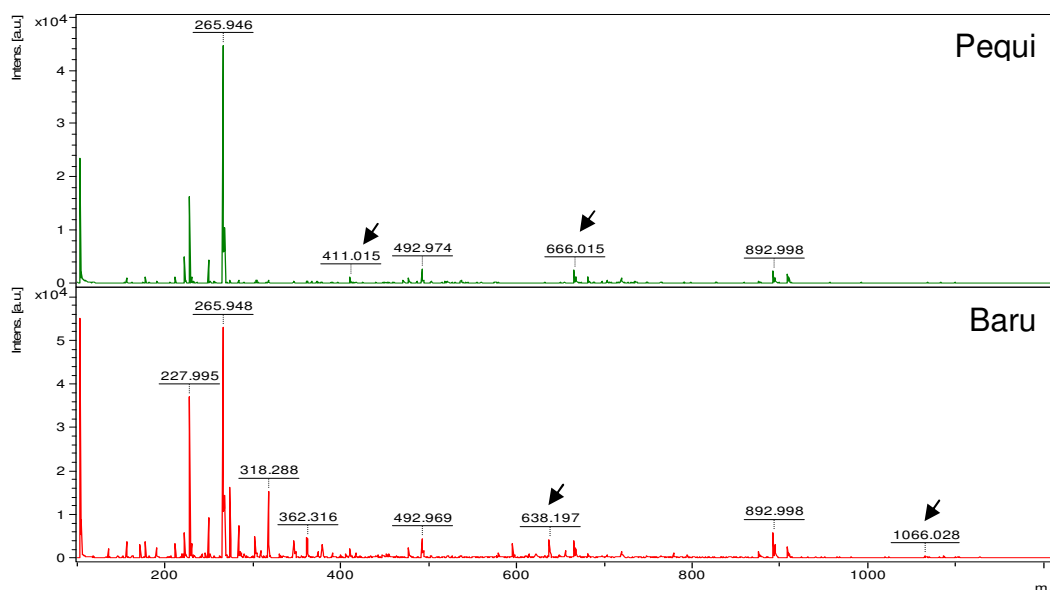
Tem sido descrito na literatura científica que a composição molecular das plantas é um fator crucial para o sucesso das rotas de síntese verde de nanopartículas (Chung et al., 2016). Entretanto, poucos estudos investigam os perfis fitoquímicos das espécies utilizadas para síntese de AgNPs. Esse fato está relacionado aos custos dos processos de identificação inequívoca utilizando ferramentas moleculares e também aos desafios metodológicos relacionados à complexidade dos extratos vegetais. A espectrometria de massa tem sido utilizada como ferramenta na elucidação de perfis metabólitos e proteínas de plantas (Lee et al., 2010). Entretanto, sem que aja um pré-fractionamento de misturas complexas como os extratos aquosos de folhas de plantas utilizando alguma metodologia cromatográfica, não é possível elucidar os componentes moleculares presentes. Nesse contexto, o uso da espectrometria de massa por ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF) como uma abordagem que pode ser utilizada visando à obtenção não necessariamente da identidade molecular dos compostos presentes, mas de perfis moleculares com base na ionização das moléculas presentes em extratos de plantas que representam assinaturas moleculares de uma espécie (Mehta e Silva, 2015).

Dessa forma, os extratos aquosos das folhas de plantas coletadas no período de chuva foram avaliados por espectrometria de massa MALDI-TOF na tentativa de identificar similaridades e dissimilaridades entre os perfis moleculares dos extratos, e quais poderiam apresentar maior influência no processo de síntese e, se possível,

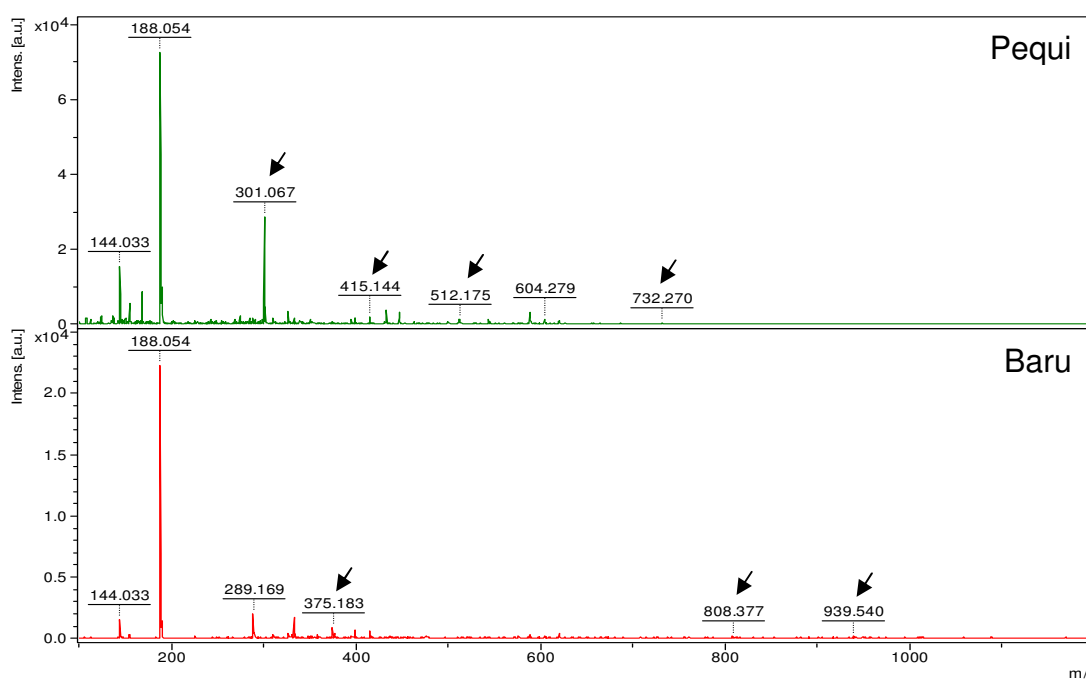
determinar as massas moleculares de quais biomarcadores seriam os responsáveis pela biorredução de íons prata e/ou estabilização de AgNPs.

Os extratos aquosos obtidos a partir das folhas das plantas coletadas no período de chuva foram aplicados em placa metálica e posteriormente analisados por espectrometria de massa MALDI-TOF nos modos refletido positivo e refletivo negativo na faixa de  $m/z$  entre 100 e 1200 para a obtenção de perfis moleculares representativos de cada espécie de planta. A partir dos espectros obtidos foi possível observar a presença de íons comuns de maior intensidade entre todos os espectros adquiridos que estão relacionados aos íons típicos de matriz, substância necessária durante a aquisição dos espectros nessa modalidade de espectrometria de massa (e.g.  $m/z$  188). Quando comparados dois espectros obtidos a partir dos extratos aquosos que acarretaram (Pequi) e que não acarretaram (Baru) na formação de AgNPs é possível observar a presença de íons comuns e distintos (Figura III 11 e Figura III 12).

Tem sido relatada que uma das dificuldades na utilização da metodologia de espectrometria de massa MALDI-TOF para a detecção de metabólitos é a seleção da matriz mais adequada para a ionização dos compostos (Hadacek e Bachman, 2015). Dentre as matrizes mais utilizadas são o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico ( $\alpha$ -CHCA) e o ácido 2,5-dihidroxibenzóico (2,5-DHB) as que apresentam como desvantagem o grande número de íons detectáveis no intervalo de baixo peso molecular (Hadacek e Bachman, 2015). Os metabólitos das plantas, como flavonoides, taninos, açúcares, lipídeos, ácidos graxos, compostos fenólicos e alcaloides possuem baixa massa molecular, semelhantemente às moléculas presentes na matriz necessária durante a análise. Sendo assim, no presente estudo os íons da matriz, tipicamente em maior abundância relativa devido à sua alta taxa de ionização, podem estar suprimindo o sinal dos metabólitos presentes nos extratos, haja visto que seriam detectados na mesma faixa de  $m/z$ .



**Figura III 11.** Espectros de massa MALDI-TOF representativos de extratos aquosos de folhas de plantas obtidos em modo refletido positivo na faixa  $m/z$  100-1200 que não formaram AgNPs (Baru) ou que formaram AgNPs (Pequi). Setas indicam íons diferenciais presentes nas espécies.



**Figura III 12.** Espectros de massa MALDI-TOF representativos de extratos aquosos de folhas de plantas obtidos em modo refletido negativo na faixa  $m/z$  100-1200 que não formaram AgNPs (Baru) ou que formaram AgNPs (Pequi). Setas indicam íons diferenciais presentes nas espécies.

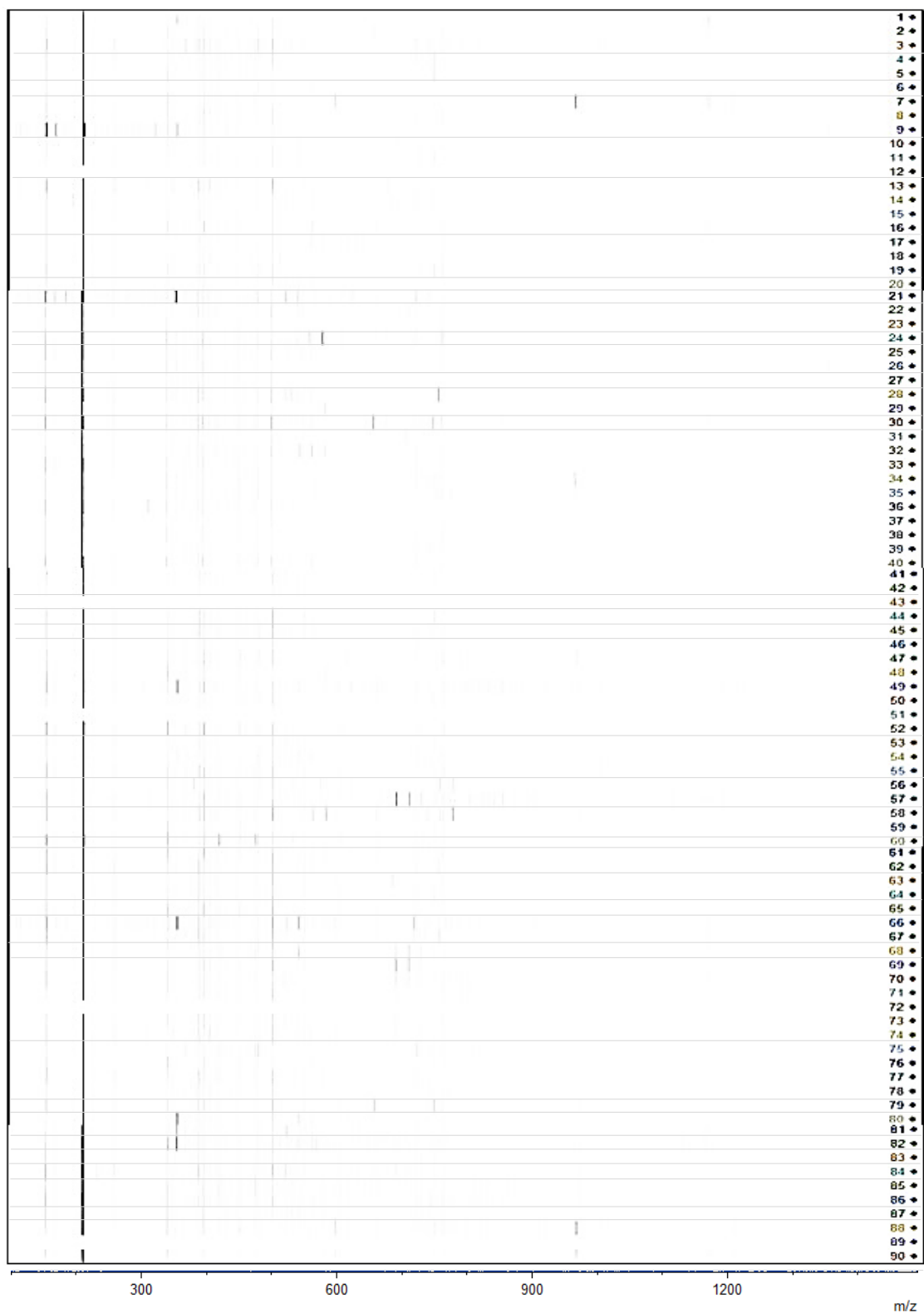
Devido à quantidade de espectros obtidos ( $90 \times 4$ , para cada modo) e a inviabilidade de compará-los individualmente, como mostrado anteriormente, optou-se por representá-los na forma de representação semelhante a gel (Strohalm et al., 2010;

Uhlik et al., 2011) (Figura III 13 e Figura III 14). Assim, foi possível observar a presença de íons distintos, entre os extratos, para os dois modos de aquisição, e os quais foram característicos para diferentes espécies de plantas, no entanto não sendo observadas correlações entre espécies de uma mesma família botânica (Figura III 13 e Figura III 14).

As plantas do Cerrado são constituídas por um complexo arsenal fitoquímico, o qual é composto por diversas classes de moléculas, dentre elas flavonoides, alcaloides, terpenos, taninos, saponinas, proteínas (Silva et al., 2010). Diversos trabalhos têm relatado até mesmo a diferença do perfil fitoquímico de plantas do Cerrado encontradas em uma mesma região (Bessa, et al., 2013; Silva et al., 2010), sendo assim essas diferenças podem ter influenciado diretamente a formação bem como o processo de estabilização das nanopartículas. Essas diferenças corroboram os resultados obtidos por Silva (2014), que ao avaliar o potencial de extratos aquosos de duas partes vegetais distintas (fruto e folha) da mangabeira observou diferença no perfil de formação, RPS e características físico-químicas distintas entre as partículas produzidas, evidenciando a influência dos extratos no perfil de formação das AgNPs.



**Figura III 13.** Representação em forma de gel dos espectros de massa MALDI-TOF dos 90 extratos aquosos obtidos a partir de folhas de plantas do Cerrado em modo refletido positivo na faixa  $m/z$  100-1200.



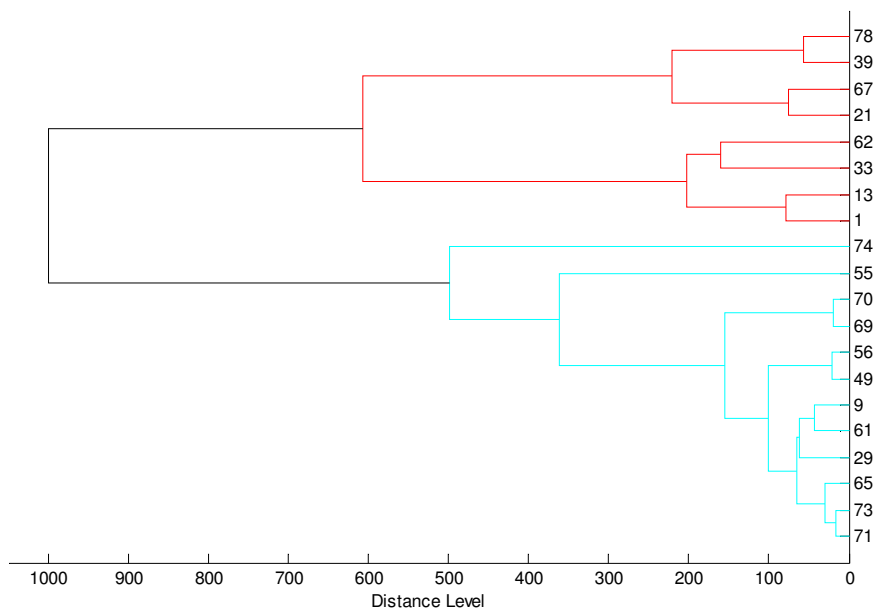
**Figura III 14.** Representação em forma de gel dos espectros de massa MALDI-TOF de extratos aquosos obtidos a partir de folhas de plantas do Cerrado em modo refletido negativo na faixa m/z 100-1200.



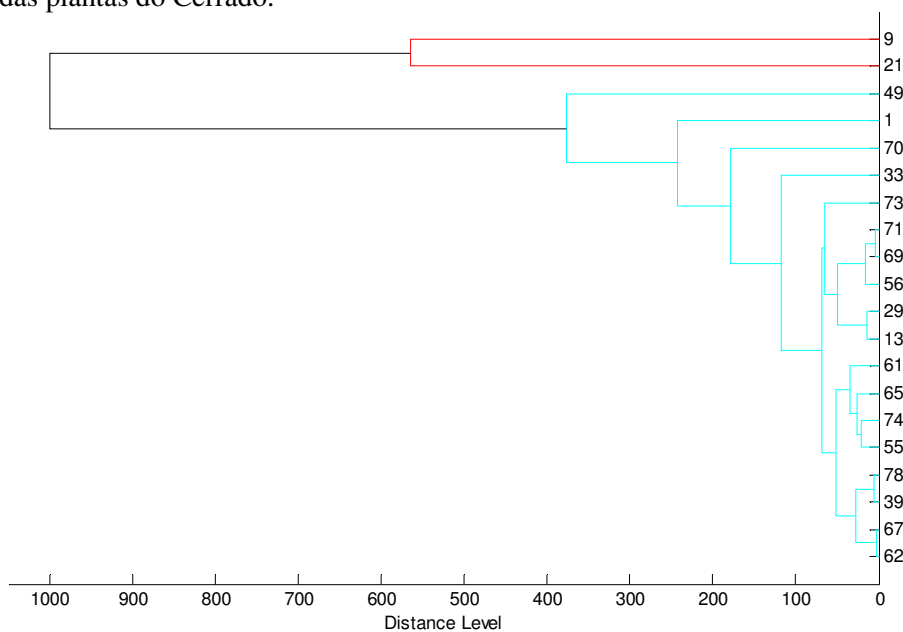
Tendo em vista que alguns extratos acarretaram em uma formação mais pronunciada de AgNPs, levantou-se a hipótese de que eles poderiam eventualmente apresentar características semelhantes em composição molecular. Neste intuito, os dados obtidos por espectrometria de massa a partir dos componentes moleculares dos extratos foram avaliados, comparados e agrupados utilizando o método Biotyper. Por meio dessa metodologia estatística é possível identificar padrões de similaridade ou dissimilaridade entre os dados os quais podem ser úteis para agrupamento de espécies. Os espectros de massa adquiridos foram utilizados para a criação de um espectro de massa padrão (MSP). Em seguida, os mesmos foram utilizados para a obtenção de dendrogramas visando identificar possíveis agrupamentos das espécies estritamente relacionadas entre si sob o ponto de vista molecular.

Os dendrogramas formados utilizando os extratos formadores e não formadores de AgNPs em uma comparação simultânea indicaram a presença de dois grupos principais em modos positivo e negativo. No caso dos dendrogramas obtidos a partir de espectros de massa obtidos em modo positivo, as plantas formadoras e não formadoras não foram agrupadas em clados distintos (Figura III 15). Ao contrário, há uma mescla de agrupamento entre plantas com propriedades formadoras de AgNPs distintas e até mesmo de espécies taxonomicamente distantes as quais compartilham de mesmos clados nos agrupamentos. Esses fatos podem estar relacionados às composições fitoquímicas distintas entre as espécies, indicando até mesmo que moléculas diferentes podem atuar nos processos de biorredução e/ou estabilização das AgNPs. Estudos adicionais precisam ser realizados futuramente visando à identificação dos componentes moleculares de muitos extratos e suas contribuições durante a formação das partículas, mas no capítulo IV essa investigação foi conduzida para uma das espécies investigadas.

Entretanto, no caso de dendrogramas obtidos a partir de espectros de massa adquiridos em modo negativo, o qual favorece a detecção de íons negativamente carregados comuns em extratos de plantas e confirmados pelos potenciais Zeta negativos das partículas, houve uma clara e inequívoca separação de duas espécies que foram diretamente correlacionadas com a síntese de AgNPs (Pequi - 21 e Pereiro do campo - 9) (Figura III 16). Esse modo de ionização pode ter favorecido a detecção de componentes majoritários nessas duas espécies os quais por sua vez podem estar envolvidos com a formação e estabilização das AgNPs.



**Figura III 15.** Dendrograma obtido a partir do agrupamento de espectros de massa adquiridos em modo refletido positivo referentes aos perfis moleculares dos diferentes extratos aquosos de folhas das plantas do Cerrado.



**Figura III 16.** Dendrograma obtido a partir do agrupamento de espectros de massa adquiridos em modo refletido negativo referentes aos perfis moleculares dos diferentes extratos aquosos de folhas das plantas do Cerrado.

1 (Aroeira); 9 (Pereiro do Campo); 13 (Assa-Peixe); 21 (Pequi); 29 (Sambaibinha); 33 (Baru); 39 (Pata de Vaca); 49 (Copaíba); 55 (Pacari); 56 (Murici); 61 (Cedro); 62 (Cedro branco); 65 (Gameleira); 67 (Cagaita); 69 (Braquiaraão); 70 (Colonhão); 71 (Coloninho); 73 (Jaraguá); 74 (Napiê); 78 (Quina de Mato).

## **Avaliação nanotoxicológica**

A busca por novos agentes antimicrobianos tem crescido nos últimos anos devido ao aparecimento de estirpes microbianas resistentes à maioria dos antibióticos utilizados convencionalmente. Uma das iniciativas na busca por novos agentes antimicrobianos tem sido a exploração de extratos vegetais obtidos a partir de plantas da biodiversidade brasileira (Alvarenga et al., 2007; Suffredini et al., 2007). Outra abordagem recente envolve uma das principais propriedades conhecidas e exploradas das AgNPs e íons  $\text{Ag}^+$  que são seus efeitos biocidas contra uma grande diversidade desses microrganismos (Kim et al., 2009; Krishnaraj et al., 2010; Lee et al., 2010).

Nesse contexto, as partículas de prata sintetizadas utilizando extratos aquosos das folhas de plantas do Cerrado, e seus respectivos controles, foram utilizadas em ensaios de concentração inibitória mínima (MIC) contra bactérias *E. coli* (Gram-negativa) e *S. aureus* (Gram-positiva) a fim de avaliar e comparar a toxicidade de diferentes concentrações (256, 128, 64, 32, 16 e 8  $\mu\text{M}$ , equivalentes a prata livre) das suspensões.

As AgNPs sintetizadas com extratos aquosos das folhas de plantas do Cerrado inibiram o crescimento da bactéria Gram-negativa *E. coli* em concentrações que variaram de 16 a 256  $\mu\text{M}$ , sendo que 2% inibiram o crescimento apenas em 256  $\mu\text{M}$ , 7% acima de 128  $\mu\text{M}$ , 73% acima de 64  $\mu\text{M}$ , 17% acima de 32  $\mu\text{M}$  e 1,0% acima de 16  $\mu\text{M}$  (Tabela III 2). Já para bactéria Gram-positiva *S. aureus*, a única concentração que inibiu o crescimento bacteriano foi a de 256  $\mu\text{M}$  para 88% das suspensões, sendo que para 12% das AgNPs sintetizadas com extratos aquosos de folhas de plantas do Cerrado não ocorreu inibição do crescimento desse microrganismo. A atividade antibacteriana de AgNPs pode estar relacionada ao tamanho e morfologia das partículas, assim como com propriedades intrínsecas aos componentes moleculares dos extratos utilizados para as sínteses (Singh et al., 2010).

Além disso, a inibição do crescimento foi notoriamente mais pronunciada contra a bactéria Gram-negativa avaliada em relação à Gram-positiva. Diversos estudos têm sido realizados visando à compressão dos mecanismos moleculares e conseqüentemente da ação antimicrobiana de AgNPs (Prabhu et al., 2012; Rai et al., 2012). Em geral, AgNPs apresentam efeito inibitório mais pronunciado sobre estirpes de bactérias Gram-negativas, independentemente do fato de as estirpes serem resistentes ou não a

antibióticos convencionais, do que sobre estirpes de bactérias Gram-positivas. Em alguns estudos, a diferença na atividade antimicrobiana foi relacionada com a modulação do perfil de fosfotirosinas em proteínas relacionadas ao crescimento microbiano (Suffredini et al., 2007). Tem sido relatado que as AgNPs desfosforilam os substratos peptídicos nos resíduos de tirosina, o que conduz à inibição da transdução de sinal e, deste modo, interrompem o crescimento bacteriano (Prabhu e Poulouse 2012). Foi demonstrado que *S. aureus* após tratamento com AgNPs não apresentaram desfosforilação dos resíduos de tirosina, a qual levaria à inativação de vários outros fatores importantes no mecanismo de inibição do crescimento bacteriano, sendo que esse perfil não foi observado em bactérias Gram-negativas (Suffredini et al., 2007).

No presente estudo não foram identificadas ações antimicrobianas dos extratos vegetais aquosos nas concentrações testadas. Esses achados corroboram os encontrados por Suffredini e colaboradores (2007) que identificaram atividade antibacteriana contra as bactérias *S. aureus*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* para apenas três espécies da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica brasileiras dentre as 700 espécies investigadas e mesmo assim em concentrações da ordem em mg/mL, pelo menos 1000× acima daquelas utilizadas no presente estudo para síntese de AgNPs. Contudo, diversos outros estudos têm relatado a ação antimicrobiana de extratos oriundos de plantas contra diversas bactérias (Alvarenga et al., 2007; Batista, 2008). As divergências entre os resultados relatados na literatura podem estar relacionadas ao modo de preparação dos extratos, concentrações utilizadas, parte vegetal e composição fitoquímica, assim como ao tipo de ensaio de atividade empregado. De todo modo, as concentrações de extratos com potencial para síntese de AgNPs tendem a ser bastante mais baixas do que as concentrações tipicamente ativas contra microrganismos não sendo provável a ação sinérgica nas atividades investigadas no presente Capítulo III.

Adicionalmente, a atividade antimicrobiana das AgNPs pode estar diretamente relacionada com a capacidade dessas estruturas em liberar íons  $\text{Ag}^+$ . Conseqüentemente, essa atividade é dependente do perfil de dissolução das AgNPs ou permanência de íons metálicos não reduzidos na suspensão. Sendo assim, a diferença no perfil citotóxico das AgNPs pode estar relacionada à redução incompleta dos íons  $\text{Ag}^+$  como indicado pelas baixas absortividades das curvas de formação e da RPS de algumas suspensões, sendo consequência direta do poder de biorredução dos extratos utilizados.

**Tabela III 2.** Concentração inibitória mínima (MIC) das AgNPs contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Valores representados a condição na qual ocorreu a inibição em pelo menos duas réplicas. N/A: Nenhuma Atividade.

	<b>AgNPs</b>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
1	Aroeira	32,0 µM	256,0 µM
2	Caju	64,0 µM	256,0 µM
3	Gonçalo	64,0 µM	256,0 µM
4	Pimenta de macaco	64,0 µM	256,0 µM
5	Pinha	64,0 µM	256,0 µM
6	Angélica	64,0 µM	256,0 µM
7	Mangaba	32,0 µM	N/A
8	Pereiro	64,0 µM	256,0 µM
9	Pereiro do Campo	64,0 µM	256,0 µM
10	Babaçu	64,0 µM	N/A
11	Buritirana	64,0 µM	256,0 µM
12	Macaúba	64,0 µM	256,0 µM
13	Assa-Peixe	64,0 µM	256,0 µM
14	Coração de Negro	64,0 µM	256,0 µM
15	Picão*	64,0 µM	256,0 µM
16	Vassourinha	64,0 µM	256,0 µM
17	Caraíba	64,0 µM	256,0 µM
18	Jacarandá	64,0 µM	N/A
19	Verga Tesa	128,0 µM	256,0 µM
20	Almesegueira	64,0 µM	256,0 µM
21	Pequi	64,0 µM	256,0 µM
22	Embaúba	64,0 µM	256,0 µM
23	Carne de Vaca	128,0 µM	N/A
24	Pau-Santo	64,0 µM	256,0 µM
25	Capitão	64,0 µM	256,0 µM
26	Mirindiba	64,0 µM	256,0 µM
27	Navalha	64,0 µM	256,0 µM
28	Sambaíba	64,0 µM	256,0 µM
29	Sambaibinha	256,0 µM	N/A
30	Cansanção	64,0 µM	256,0 µM
31	Angiquinho com espinho	64,0 µM	256,0 µM
32	Barbatimão	128,0 µM	256,0 µM
33	Baru	32,0 µM	256,0 µM
34	Ferreirinha Pau Ferro	64,0 µM	256,0 µM
35	Jacaré	64,0 µM	256,0 µM
36	Mata Pasto*	64,0 µM	256,0 µM
37	Miroró	64,0 µM	256,0 µM
38	Mulungu	64,0 µM	256,0 µM

\* Espécies de plantas introduzidas no Cerrado. N/A: Nenhuma atividade.

**Continuação da Tabela III 2.** Concentração inibitória mínima (MIC) das AgNPs contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus* Valores representados a condição na qual ocorreu a inibição em pelo menos duas réplicas. N/A: Nenhuma Atividade.

<b>AgNPs</b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>S. aureus</i></b>	
39	Pata de Vaca	32,0 µM	256,0 µM
40	Rabo de Bugio Preto	64,0 µM	256,0 µM
41	Sucupira Branca	64,0 µM	256,0 µM
42	Tatarena	64,0 µM	256,0 µM
43	Amargoso	32,0 µM	256,0 µM
44	Caeté	64,0 µM	256,0 µM
45	Jatobá do Mato	64,0 µM	256,0 µM
46	Angelim Pedra	64,0 µM	256,0 µM
47	Canzileiro	64,0 µM	256,0 µM
48	Carvoeiro	64,0 µM	256,0 µM
49	Copaíba	64,0 µM	256,0 µM
50	Jatobá	32,0 µM	256,0 µM
51	Jatobá do Cerrado	32,0 µM	256,0 µM
52	Sucupira Preta	64,0 µM	256,0 µM
53	Rabo de Bugio	64,0 µM	256,0 µM
54	Cega Machado	64,0 µM	256,0 µM
55	Pacari	64,0 µM	256,0 µM
56	Murici	128,0 µM	N/A
57	Murici do grande	64,0 µM	256,0 µM
58	Malva Amarela*	32,0 µM	256,0 µM
59	Mutamba	32,0 µM	256,0 µM
60	Rabo de Arara	64,0 µM	256,0 µM
61	Cedro	64,0 µM	256,0 µM
62	Cedro Branco	64,0 µM	256,0 µM
63	Angico	64,0 µM	256,0 µM
64	Bureré	64,0 µM	256,0 µM
65	Gameleira	32,0 µM	256,0 µM
66	Araçá	64,0 µM	256,0 µM
67	Cagaita	64,0 µM	256,0 µM
68	Buriti	32,0 µM	256,0 µM
69	Braquiarião*	32,0 µM	256,0 µM
70	Colonhão*	64,0 µM	256,0 µM
71	Coloninho*	16,0 µM	256,0 µM
72	Gordura Meloso*	64,0 µM	256,0 µM
73	Jaraguá*	32,0 µM	256,0 µM
74	Napiê*	32,0 µM	256,0 µM
75	Jenipapo do Mato	64,0 µM	256,0 µM

\* Espécies de plantas introduzidas no Cerrado. N/A: Nenhuma atividade.

**Continuação da Tabela III 2.** Concentração inibitória mínima (MIC) das AgNPs contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus* Valores representados a condição na qual ocorreu a inibição em pelo menos duas réplicas. N/A: Nenhuma Atividade.

<b>AgNPs</b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>S. aureus</i></b>
76 Marmelada	64,0 µM	256,0 µM
77 Marmelada de cachorro	64,0 µM	N/A
78 Mamoninha	64,0 µM	256,0 µM
79 Quina de Mato	64,0 µM	256,0 µM
80 Mandioquinha	32,0 µM	256,0 µM
81 Tingui	128,0 µM	N/A
82 Mata Cachorro	64,0 µM	256,0 µM
83 Negramima	64,0 µM	256,0 µM
84 Açoita cavalo	64,0 µM	256,0 µM
85 Malva Preta*	64,0 µM	256,0 µM
86 Mama de Porca	32,0 µM	256,0 µM
87 Enxerto de passarinho	32,0 µM	256,0 µM
88 Bananeira	128,0 µM	N/A
89 Pau Terra	64,0 µM	256,0 µM
90 Pau Terrinha	64,0 µM	256,0 µM
AgNO <sub>3</sub>	32,0 µM	256,0 µM

\* Espécies de plantas introduzidas no Cerrado. N/A: Nenhuma atividade.

## Perspectivas

Os dados obtidos no presente Capítulo III poderão auxiliar no entendimento dos mecanismos de formação de AgNPs por extratos de plantas, bem como contribuir para o entendimento das diferenças de propriedades físico-químicas e atividades observadas, além de auxiliar estudos futuros na escolha racional das plantas para utilização na síntese verde de AgNPs e outros metais, diminuindo o empirismo que predomina atualmente nos processos de síntese verde. Adicionalmente, essas informações auxiliarão no desenvolvimento de simulador preditivo baseado em modelagem matemática o qual poderá ser empregado para formação de NPMs por meio de rotas de síntese verde.

## CONCLUSÕES

Dos 90 extratos aquosos obtidos a partir das folhas de espécies de plantas oriundas do Cerrado (nativas e introduzidas), 77% exibiram potencial biorredutor expressivo para a formação de AgNPs com base nos critérios estabelecidos.

Extratos aquosos obtidos a partir de folhas de espécies nativas apresentaram potencial redutor mais pronunciado que extratos obtidos a partir de espécies introduzidas no Cerrado, apesar da variabilidade de famílias de plantas ser maior para as espécies nativas.

O máximo de intensidade obtida para o sinal de ressonância plasmônica de superfície das AgNPs sintetizadas com extratos aquosos de folhas das plantas do Cerrado variou de 410 a 480 nm, indicando propriedades estruturais ou físico-químicas variadas das AgNPs.

Extratos aquosos de folhas de Aroeira, Pereiro do Campo, Pequi, Sambaibinha e Murici acarretaram em maior taxa de formação de AgNPs com pico de RPS mais intensos dentre as 90 espécies avaliadas.

As AgMPs e AgNPs sintetizadas com os diferentes extratos obtidos a partir de folhas de diferentes espécies de plantas do Cerrado apresentaram diâmetros hidrodinâmicos variados ( $33,01 \pm 0,09$  nm a  $2653,33 \pm 868,99$  nm) sendo que 61% das suspensões apresentaram estruturas dentro da faixa nanométrica (10-100 nm).

As AgMPs e AgNPs sintetizadas apresentaram índice de polidispersividade (PdI) variado (0,1 e 0,8), sendo que 40% apresentaram PdI baixo entre 0,1 a 0,2 e indicando monodispersão.

As AgMPs e AgNPs sintetizadas apresentaram potencial Zeta de superfície negativo que variou de -1 a -32 mV, sendo que 87% foram coloidalmente portadoras de instabilidade incipiente.

A época de coleta de folhas (chuva e seca) influencia o potencial de formação de AgNPs, sendo que os extratos aquosos das folhas de chuva apresentaram maior potencial redutor para a maioria das plantas analisadas.

As folhas de Pequi coletadas, nas épocas de chuva e seca, apresentaram potencial de formação de AgNPs com pouca variação nas características físico-químicas das AgNPs.



As AgNPs, em concentrações micromolares, apresentaram efeito citotóxico mais efetivo contra bactéria Gram-negativa (*E. coli*) em relação a bactéria Gram-positiva (*S. aureus*) testada.

## **CAPÍTULO IV**

**Síntese verde, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata utilizando extrato aquoso de folhas de *Caryocar brasiliense* (Pequi)**

## RESUMO

*Caryocar brasiliense* (pequi ou pequi) é uma espécie nativa do bioma Cerrado com importância econômica sazonal considerável. A utilização de extrato aquoso das folhas de *C. brasiliense* como agente redutor e estabilizante para síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) surge como uma alternativa promissora visto que no Capítulo III foi uma das espécies com alto potencial para esse processo. Assim, o objetivo do presente Capítulo IV foi sintetizar, caracterizar e avaliar potenciais atividades biológicas de AgNPs produzidas utilizando extratos das folhas de *C. brasiliense* (AgNPs-CbC). As AgNPs-CbC apresentaram formato esférico, tamanho nanométrico ( $43,12 \pm 3,30$  nm), índice de polidispersividade moderado ( $0,363 \pm 0,017$ ) e estabilidade coloidal moderada ( $-29,7 \pm 1,10$  mV). A rota de síntese utilizada apresentou alta reprodutibilidade, escalabilidade de 5 a 500 mL e as suspensões se mantiveram coloidalmente estáveis por pelo menos 1,5 anos quando armazenadas a 4°C. O processo de liofilização e ressuspensão não alterou as características físico-químicas das AgNPs-CbC, e as partículas foram passíveis de serem dissolvidas utilizando baixas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Investigação das características moleculares do extrato aquoso permitiu a identificação de alguns dos possíveis compostos que estão relacionados ao processo de redução e estabilização das AgNPs-CbC, dentre os quais estão flavonoides, taninos e compostos fenólicos. Ensaio *in vitro* demonstraram que as AgNPs-CbC inibiram o crescimento de leveduras *Candida albicans*, e foram mais efetivas contra bactérias *Escherichia coli* (Gram-negativa) do que *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva). Ensaio de viabilidade celular indicaram diminuição da viabilidade de células de fibroblastos murino (NIH3T3) (14,6%) e células de câncer de mama humano (MCF-7) (24,4%), macrófagos peritoneais murinos (C57Bl/6) (51,5%) e células de inseto (Sf21) (65%), e apresentaram baixa taxa hemolítica (1,5%) quando expostas as AgNPs-CbC na concentração de 100 µM. As AgNPs-CbC apresentaram efeito nematocida contra *Caenorhabditis elegans* e *Meloidogyne incognita* em concentrações muito mais baixas do que as observadas em outros organismos; e não indicaram efeitos toxicológicos sob os pontos de vista anatômicos e bioquímicos em plantas *Nicotiana tabacum*. Nos ensaios *in vivo*, as AgNPs-CbC controlaram em 85% a infestação por *M. incognita* em plantas de tabaco sem alterar os parâmetros anatômicos e bioquímicos (clorofila e peroxidação lipídica). Adicionalmente, as AgNPs-CbC em concentração de 64 µM administradas por via intravenosa em camundongos não desencadearam alterações nos perfis hematológicos (hemograma e leucograma), bioquímicos [gama glutamil transpeptidase (GGT), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), bilirrubina total (TBIL) e lipidograma] e morfológicos (fígado, baço, rim e pulmão). Um método de síntese verde em única etapa e reprodutível foi desenvolvido utilizando plantas extrato aquoso de *C. brasiliense* para a produção de AgNPs, as quais possuem potencial de diversas aplicações biotecnológica.

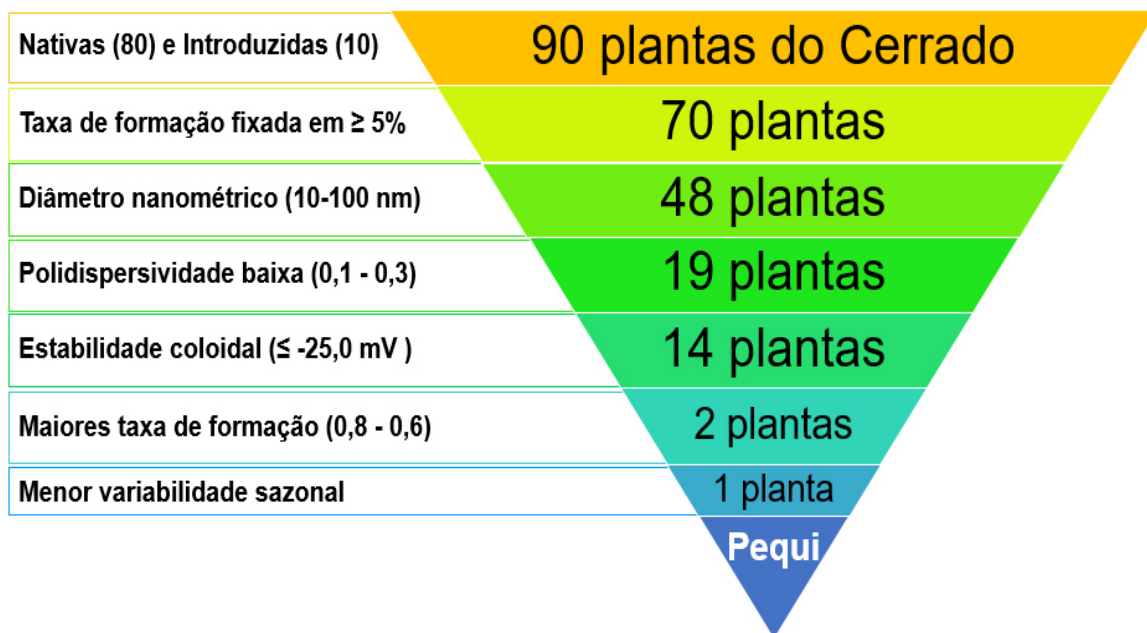
Palavras-chave: Nanopartículas de prata, Pequi, reprodutibilidade, estabilidade, atividade biológica.

## INTRODUÇÃO

Pequizeiro ou simplesmente pequi, nome popular de *Caryocar brasiliense* Camb, é uma árvore arbórea pertencente à família Caryocaraceae e sua região de ocorrência abrange todo o Cerrado brasileiro (Carvalho, 2008). O pequi possui importância econômica sazonal de relevância devido à exploração na culinária para alimentação humana do fruto associado à semente "*in natura*" e desenvolvimento de condimentos; na medicina popular e farmácia, para exploração terapêutica do óleo; na indústria de cosméticos para produção de sabonetes e cremes; e na indústria têxtil para produção de corantes (Santos et al., 2013).

Apesar da sua ampla utilização, o uso regional e tradicional de *C. brasiliense* é baseado na fruta e semente (Carvalho, 2008), enquanto a grande maioria da biomassa dessa espécie, como as folhas, constitui um subproduto extrativista negligenciado. As folhas são do tipo compostas, trifoliadas, de coloração verde, margens irregulares e de superfícies pilosas (Carvalho, 2008). Adicionalmente, tem sido demonstrado que as folhas de *C. brasiliense* são constituídas por um rico complexo de biomoléculas dentre as quais estão flavonoides, saponinas, xantonas, catequinas, esteroides, fenois, polifenois e outros compostos orgânicos (Porto, 2008; Dias et al., 2011).

No Capítulo III dessa Tese foi observado o potencial de noventa extratos de folhas de plantas presentes no Cerrado em sintetizar AgNPs e dentre eles o extrato aquoso obtido a partir de folhas de pequi apresentou alto potencial biorredutor na nucleação, crescimento, estabilização e consequentemente formação de AgNPs (Figura III 2 (Pág. 82), Figura III 3 (Pág. 83), Figura III 4 (Pág. 84), Figura III 5 (Pág. 87); Figura III 10 (Pág. 97) e Tabela III 1 (Pág. 90). Além disso, foi demonstrado um perfil fitoquímico distinto da maioria das outras espécies com base em avaliações moleculares Figura III 16 (Pág. 104). Sendo assim, uma investigação sistemática e aprofundada visando à utilização do extrato aquoso de folhas de pequi na síntese verde de AgNPs, de forma sustentável, torna-se bastante promissora do ponto de vista nanobiotecnológico. A escolha racional dessa espécie foi possível com base em critérios objetivos de relevância na área da nanotecnologia verde os quais foram propostos nessa Tese como alternativa para seleção de espécies candidatas para utilização na síntese de AgNPs (Figura IV 1).



**Figura IV 1.** Representação esquemática dos critérios utilizados para a escolha racional de uma das plantas, entre as noventa espécies de plantas presentes no Cerrado, para a realização de uma avaliação sistemática e aprofundada.

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

→ Sintetizar, caracterizar e avaliar potenciais atividades biológicas de nanopartículas de prata produzidas utilizando extratos das folhas de *Caryocar brasiliense* (pequi).

### Objetivos Específicos

→ Desenvolver e aperfeiçoar rotas de síntese de AgNPs utilizando extratos aquosos de folhas de *Caryocar brasiliense* como agente biorredutor e estabilizante;

→ Caracterizar as partículas obtidas por meio de técnicas de investigações físico-químicas que possibilitem a determinação da formação (espectrofotometria), do tamanho (espalhamento de luz dinâmico) e carga (potencial Zeta de superfície);

→ Avaliar a taxa de dissolução das AgNPs na presença de agente oxidante;

→ Investigar as características moleculares do extrato aquoso por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS);

→ Investigar a possível atividade biológica *in vitro* das AgNPs obtidas por meio de ensaios de inibição de crescimento em bactérias (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) e leveduras (*Candida albicans*).

→ Investigar a possível atividade biológica *in vitro* das AgNPs obtidas por meio de ensaios de viabilidade celular em fibroblastos (NIH3T3), macrófagos peritoneais (C57Bl/6), câncer de mama murino (4T1) e humano (MCF-7), e em células de inseto da linhagem ovariana de *Spodoptera frugiperda* (Sf21).

→ Investigar a possível atividade biológica *in vitro* em nematoide modelo (*Caenorhabditis elegans*) e fitonematoide (*Meloidogyne incognita*).

→ Avaliar a potencial toxicidade *in vitro* em sementes e plantas modelo (*Nicotiana tabacum*) por meio de ensaio de germinação, anatômicos e bioquímicos;

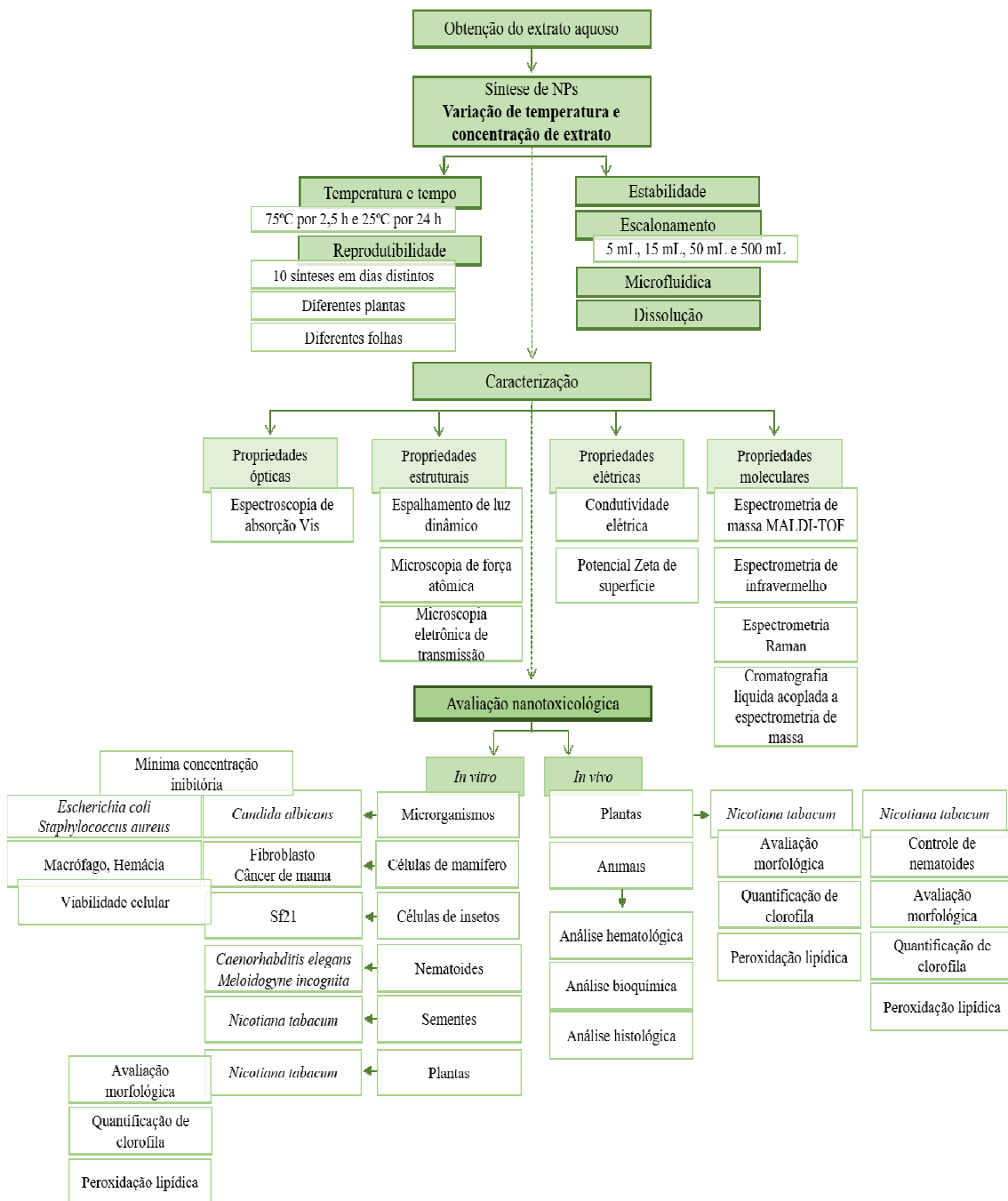
→ Avaliar a potencial toxicidade das AgNPs *in vivo* em plantas modelo (*Nicotiana tabacum*) por meio de parâmetros anatômicos e bioquímicos;

→ Avaliar o potencial das AgNPs no controle da infestação de nematoides em plantas *in vivo*.

→ Avaliar possível toxicidade aguda por meio de parâmetros hematológicos, bioquímicos e histológicos em camundongos (C57Bl/6) *in vivo*.

## METODOLOGIA

Visando a atingir os objetivos propostos, a metodologia utilizada no presente Capítulo IV seguiu as etapas representadas no esquema abaixo (Figura IV 2). Cada etapa metodológica foi descrita previamente no Capítulo I.



**Figura IV 2.** Representação esquemática das etapas metodológicas utilizadas no presente Capítulo IV.

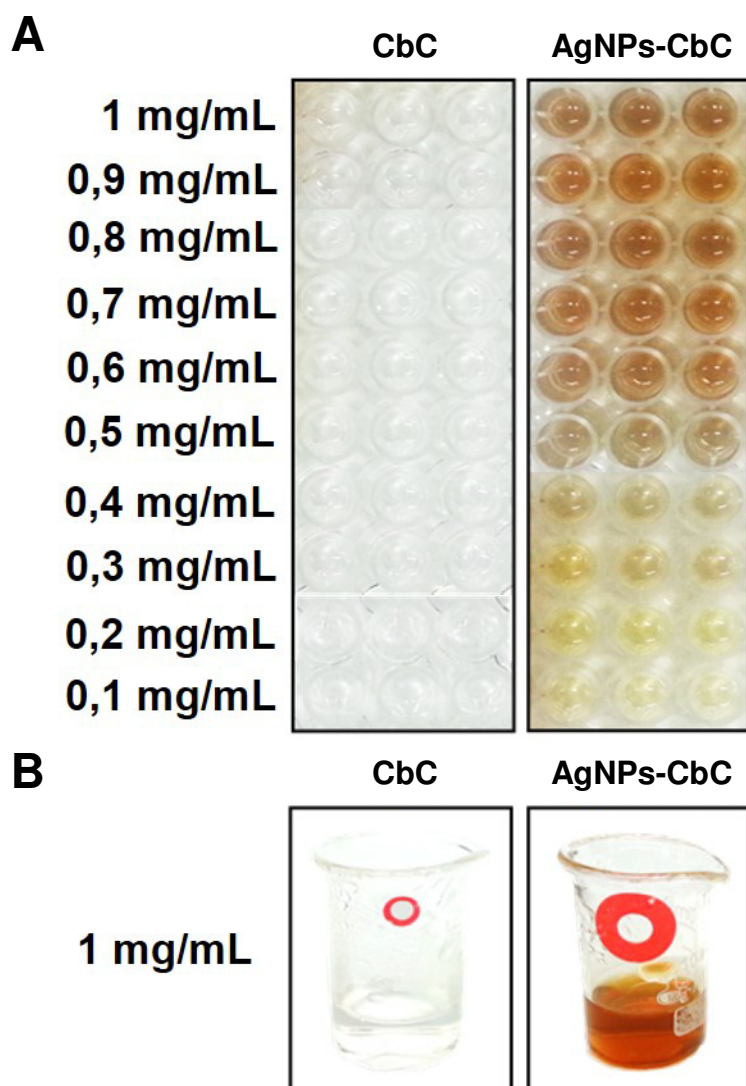
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Propriedades ópticas das AgNPs-CbC

As AgNPs-CbC foram obtidas por síntese verde em única etapa utilizando extrato aquoso das folhas de *C. brasiliense* (CbC) em duas condições distintas. As primeiras condições de síntese foram realizadas a 25°C por 24 h utilizando solução de AgNO<sub>3</sub> a 1 mM e CbC que variou em concentração equivalente ao peso de folhas de 1 mg/mL a 0,1 mg/mL ao final da reação. As condições seguintes foram realizadas a 75°C por 2,5 h utilizando AgNO<sub>3</sub> a 1 mM e CbC a 1 mg/mL. A reação entre CbC e AgNO<sub>3</sub> acarretou em mudança da coloração translúcida do início da reação para amarelo claro a marrom avermelhado dependendo do tempo transcorrido, concentração do extrato e variação de temperatura (Figura IV 3). Uma maior taxa de formação de AgNPs ocorreu utilizando a maior concentração de extrato (1 mg/mL), na temperatura mais alta (75°C) e essa síntese transcorreu em um menor tempo (2,5 h), como observado por espectroscopia de absorção (Figura IV 4A e 4B).

Diversos estudos têm relatado que o aumento da concentração do extrato no meio reacional tem relação direta na formação mais pronunciada de AgNPs (Cruz et al., 2010; Khalil, et al., 2014). Em contrapartida, vários outros trabalhos demonstram uma relação indireta entre o aumento da concentração do extrato e a taxa de formação de AgNPs (Krishnaraj et al., 2010; Albernaz, 2014). Os resultados discrepantes podem estar relacionados à falta de padronização das concentrações na preparação dos extratos aquosos, bem como concentrações distintas dos componentes moleculares responsáveis pela redução do íon metálico, variáveis entre diferentes espécies de plantas e até mesmo com variações intra-específicas relacionadas às sazonalidades e eventuais alterações por fatores bióticos ou abióticos como presença de patógenos e disponibilidade hídrica, respectivamente.

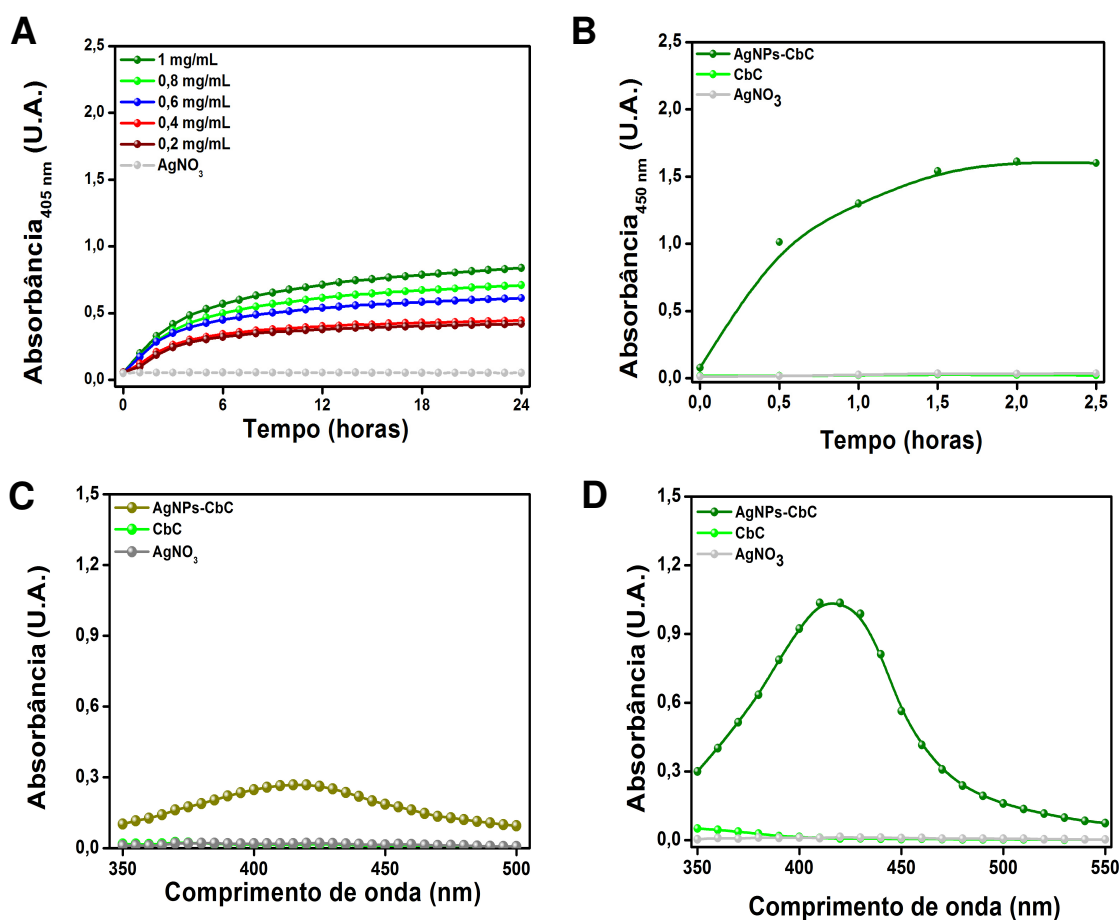




**Figura IV 3.** Fotografia dos poços de microplaca de poliestireno de fundo chato contendo extrato aquoso das folhas de *C. brasiliense* (CbC - esquerda) em concentrações variadas e meios reacionais contendo extrato aquoso e AgNO<sub>3</sub> a 1 mM após incubação a 25°C por 24 h (AgNPs-CbC) (A). Fotografia de béqueres contendo extrato aquoso de folhas de *C. brasiliense* (CbC - esquerda) e meio reacional contendo extrato aquoso a 1 mg/mL e AgNO<sub>3</sub> a 1 mM após incubação por 2,5 h à 75°C (AgNPs-CbC) (B).

As AgNPs-CbC foram submetidas a análise por espectroscopia de absorção na região do visível (350 a 550 nm) e tiveram seu pico de absorção máxima nos comprimentos de onda de 415 nm e 420 nm correspondendo à RPS das AgNPs-CbC sintetizadas a 25°C ou 75°C, respectivamente (Figura IV 4C e D). Agentes físicos como temperatura e tempo de reação podem afetar o fenômeno de RPS durante a síntese de

AgNPs (Dubey et al., 2010). O aumento da temperatura causou aumento na intensidade de absorção e leve deslocamento no pico de máxima de RPS, sugerindo uma relação de dependência entre a redução dos íons  $\text{Ag}^+$  e a temperatura. Resultados semelhantes relacionando taxa de formação e variações de temperatura têm sido relatados por diversos autores, incluindo aqueles obtidos no Capítulo II dessa Tese (Amin et al., 2012; Bonatto et al., 2014).



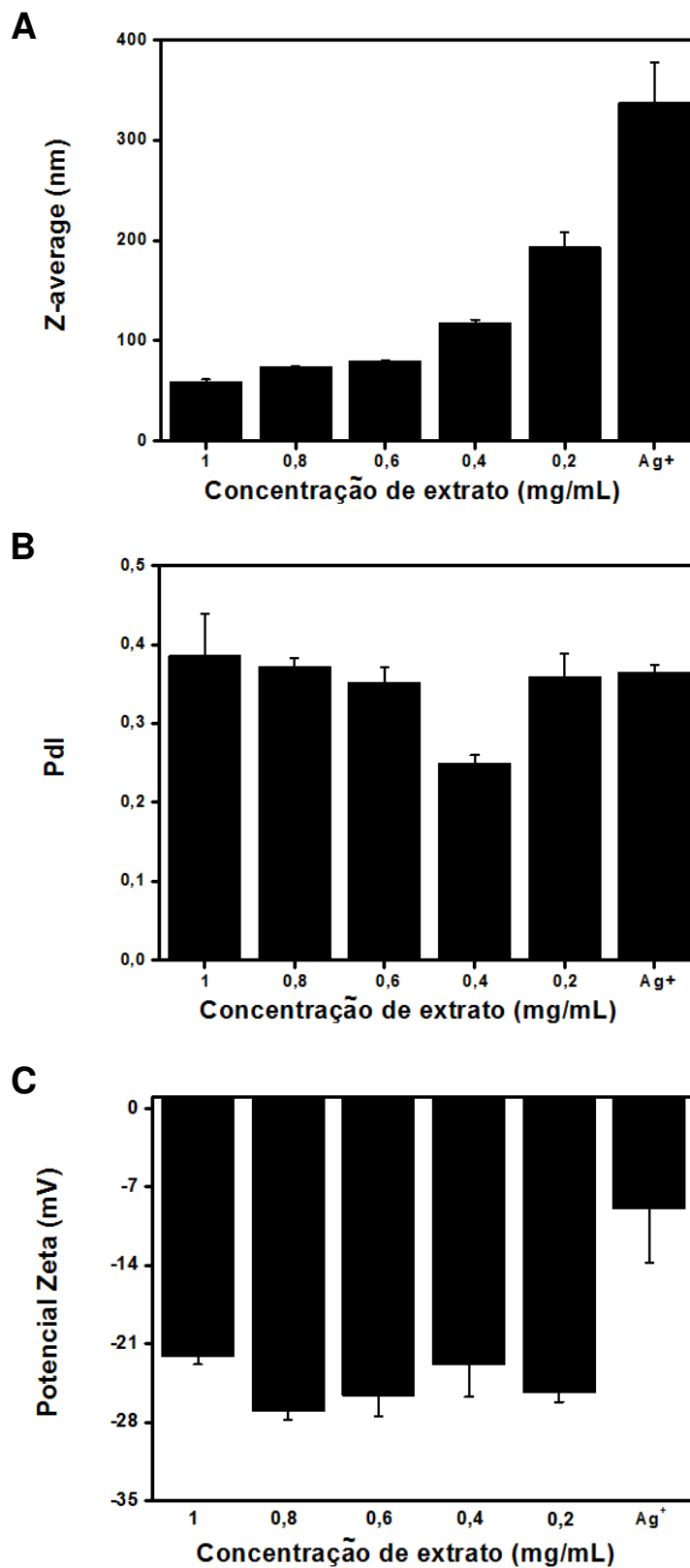
**Figura IV 4.** Cinéticas de formação das AgNPs-CbC por 24 h a 25°C em diferentes concentrações de extrato aquoso (A) e por 2,5 h a 75°C (B). Espectros de absorção na região do visível após o processo de síntese por 24 h a 25°C (C) e por 2,5 h a 75°C (D).

### Propriedades estruturais das AgNPs-CbC

O efeito de RPS apresenta relação direta com o tamanho e a forma das nanopartículas (Heath, 1989). Sendo assim, diferenças nos espectros de absorção, como intensidade, amplitude e deslocamento dos picos podem indicar diferenças nos tamanhos e formas de AgNPs produzidas. Tendo em vista que ocorreu deslocamento no

valor do pico de absorção máxima entre as duas condições de temperatura de síntese (25°C ou 75°C), levantou-se a hipótese de que os diâmetros hidrodinâmicos das partículas poderiam ser distintos.

A avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio das amostras sintetizadas a 25°C sob diferentes concentrações de extrato aquoso das folhas de pequi indicou uma tendência de aumento do diâmetro hidrodinâmico médio das AgNPs em função da diminuição da concentração de CbC. As concentrações de 1000 e 200 µg/mL acarretaram na formação de partículas com 59,0 e 193,3 nm de diâmetro hidrodinâmico, respectivamente (Figura IV 5), sugerindo uma correlação negativa entre o tamanho das AgNPs-CbC e o aumento da concentração de CbC no meio reacional. As AgNPs-CsC sintetizadas nessas condições apresentaram um valor médio de PDI acima de 0,2 e abaixo de 0,4, sendo que esses valores não foram correlacionados linearmente com as diferentes concentrações de extrato, ainda que todos sejam considerados baixos e sugestivos de suspensões coloidais homogêneas e tendendo à monodispersão (Figura IV 5). Esses resultados diferem dos encontrados por Judy e colaboradores (2012) que demonstraram que nanopartículas de ouro apresentaram aumento no PDI com o aumento da concentração em 2,5%, 5,0%, e 10% (m/v) de extrato de folhas de *Quercus palustris* e dessa forma podem ser relacionados às peculiaridades fitoquímicas específicas do extrato das folhas de *C. brasiliense* e que foram posteriormente investigadas.

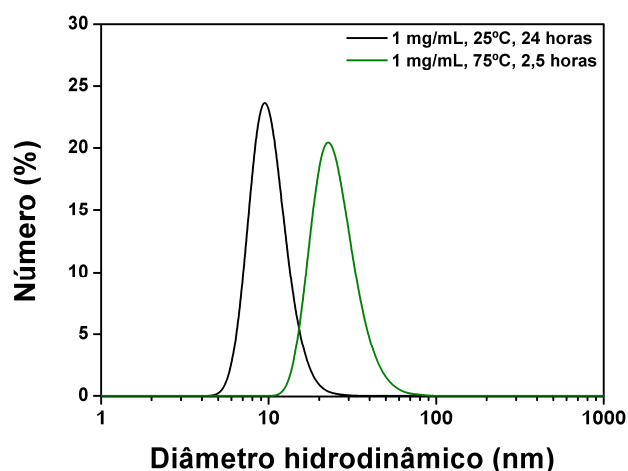


**Figura IV 5.** Histogramas representando o diâmetro hidrodinâmico médio (A), índice de polidispersividade (PDI) (B) e potencial Zeta de superfície (C) das AgNPs sintetizadas por rota de síntese verde utilizando concentrações variadas de extrato aquoso de folhas de pequi a 25°C.

Avaliação por espalhamento de luz dinâmico das AgNPs-CbC sintetizadas com 1 mg/mL de CbC a 75°C por 2,5 h não apresentou diferenças no diâmetro hidrodinâmico médio (Z-average), PDI e potencial Zeta de superfície quando comparadas às AgNPs-CbC sintetizadas com a mesma concentração de extrato aquoso a 25°C por 24 h ( $P < 0,05$ ) (Tabela IV 1). Contudo, os diâmetros hidrodinâmicos apresentaram distribuição unimodal pela avaliação de intervalos de classes de diâmetro hidrodinâmico das AgNPs-CbC em número com picos máximos de 23 e 9,4 nm para as temperaturas de reação de 75°C e 25°C, respectivamente (Figura IV 6).

**Tabela IV 1.** Características físico-químicas das AgNPs-CbC sintetizadas utilizando 1 mg/mL de CbC e 1 mM de  $\text{AgNO}_3$  à 25°C por 24 h e à 75°C por 2,5 h. Índice de polidispersividade (PDI). Valores referentes às médias e desvios padrão da média de três leituras independentes.

	Diâmetro hidrodinâmico médio (d.nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Condutividade elétrica ( $\mu\text{s}/\text{cm}$ )
25°C	59,10 $\pm$ 2,10	0,386 $\pm$ 0,053	-22,1 $\pm$ 0,8	0,017 $\pm$ 0,003
75°C	59,25 $\pm$ 2,00	0,462 $\pm$ 0,013	-24,3 $\pm$ 3,4	0,016 $\pm$ 0,000



**Figura IV 6.** Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico (em número) obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) a partir das análises das suspensões coloidais de AgNPs sintetizadas com 1 mg/mL de CbC a 25 ou 75°C.

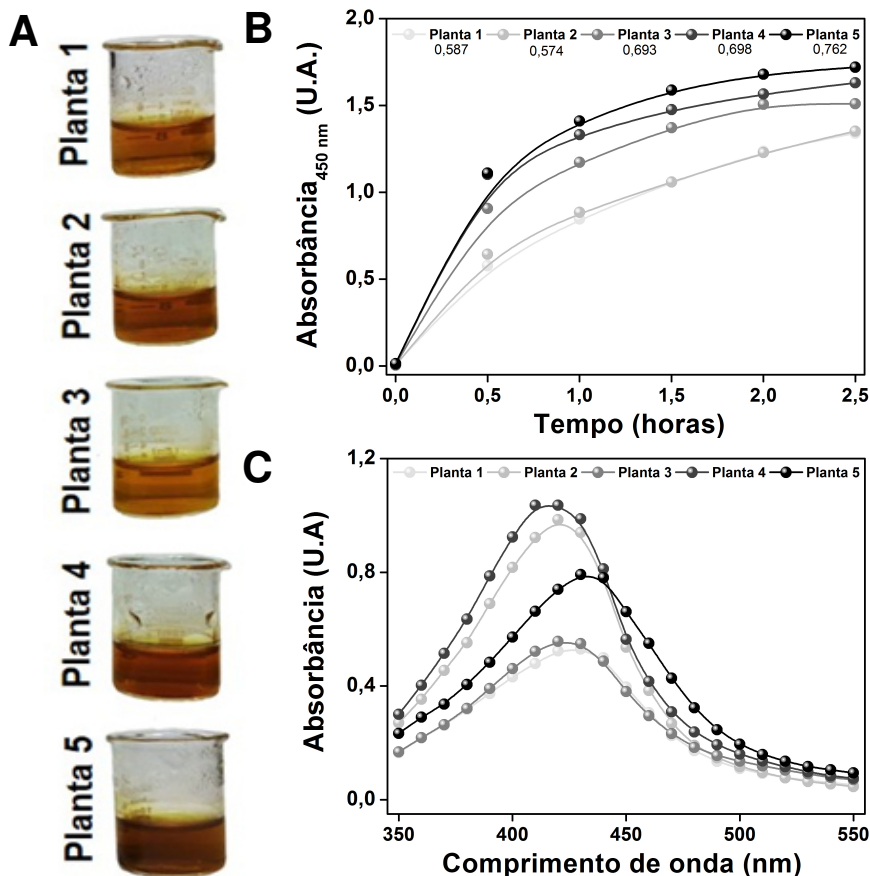
Tendo em vista que não ocorreram diferenças no diâmetro hidrodinâmico médio, PDI e potencial Zeta de superfície das AgNPs sintetizadas pelas rotas descritas, e considerando que o aumento de temperatura acelera o desenvolvimento da reação, todas as demais sínteses foram realizadas utilizando 1 mg/mL de CbC a 75°C por 2,5 h.

### *Reprodutibilidade*

Um dos grandes desafios encontrados na maioria das rotas de síntese verde de AgNPs utilizando plantas diz respeito à reprodutibilidade das reações. No caso da utilização de plantas, os principais desafios são relacionados com a dificuldade em controlar a composição molecular, a heterogeneidade dos estágios vegetativos, falha humana ou instrumental, bem como o fato desse tema ser ainda pouco abordado na literatura dificultando assim o entendimento dos processos e mecanismos envolvidos com a formação das AgNPs.

Com o intuito de avaliar a reprodutibilidade nas características físico-químicas das AgNPs-CbC produzidas com base na eventual variabilidade genética ou fisiológica entre plantas da mesma espécie (variação intraespecífica), foram realizadas reações de síntese no mesmo dia e exatamente nas mesmas condições utilizando folhas oriundas de coletas a partir de cinco plantas diferentes. As suspensões provenientes das sínteses foram submetidas à inspeção visual, espectroscopia de absorção para monitoramento da síntese e avaliação da RPS, e análise por espalhamento de luz dinâmico e potencial Zeta de superfície.

A reação entre CbC e  $\text{AgNO}_3$  acarretou em mudança de coloração translúcida para marrom avermelhado para os cinco extratos utilizados independentemente da planta (indivíduo) de escolha (Figura IV 7A). Contudo, apesar das semelhanças, ocorreu pequena variação na taxa de formação de AgNPs em virtude da planta utilizada, sendo que a maior e menor taxa ocorreram para as plantas 5 (0,762) e 2 (0,574) (numeradas aleatoriamente), respectivamente (Figura IV 7B). Adicionalmente, ocorreu discreto deslocamento na intensidade da RPS onde o pico de máxima variou de 420 (Plantas 3 e 4) a 430 nm (Plantas 1, 2 e 5) (Figura IV 7C).



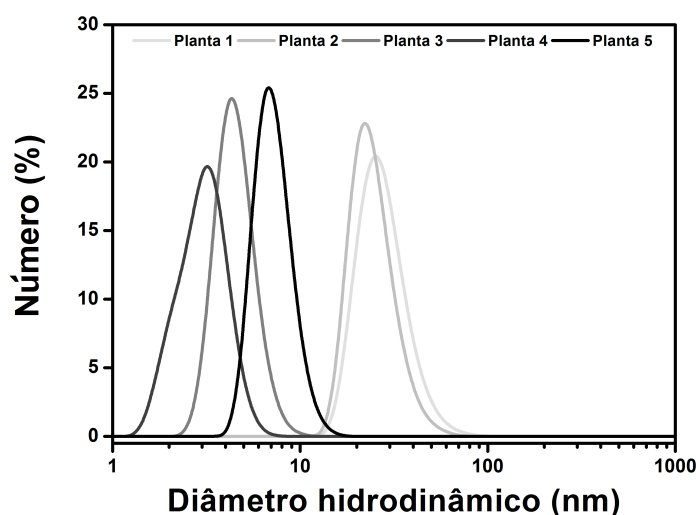
**Figura IV 7.** Representações visuais dos béqueres contendo as reações de síntese das AgNPs-CbC considerando a possível variação fenotípica (A). Cinéticas de formação das AgNPs-CbC sintetizadas no mesmo dia com extratos aquosos de folhas provenientes de plantas distintas utilizando 1 mg/mL de CbC e 1 mM de  $\text{AgNO}_3$  a  $75^\circ\text{C}$  por 2,5 h (B). Espectros de absorção na região do visível das AgNPs-CbC sintetizadas no mesmo dia com extratos aquosos de folhas provenientes de plantas distintas (C). Onde  $\triangle$  taxa de formação com base na inclinação da curva.

As análises por espalhamento de luz dinâmico indicaram que todas as AgNPs sintetizadas com diferentes plantas (indivíduos) apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio na faixa nanométrica, polidispersividade baixa a moderada, e carga de superfície indicativa de boa estabilidade coloidal (Tabela IV 2). Contudo, quando os diâmetros hidrodinâmicos foram avaliados a partir das curvas de distribuição em número de AgNPs, pode-se observar uma grande variação nos diâmetros (Figura IV 8). Essa variação pode estar relacionada à composição molecular dos extratos provenientes de plantas diferentes, que podem variar de acordo com os fatores ambientais aos quais as

plantas estão expostas, como exemplo, a fertilidade do solo, o qual pode influenciar na composição metabólica e no desenvolvimento da planta (Paulilo et al., 2010). De acordo com revisão extensiva, essa é uma das primeiras vezes na literatura científica na qual tais aspectos são considerados durante o desenvolvimento de rotas de síntese de AgNPs ou qualquer outra NPM. Adicionalmente, essa variação poderia estar relacionada à direção de exposição de luz em diferentes partes da planta e por esse motivo posteriormente foram investigadas folhas provenientes de uma mesma planta as quais fossem expostas a diferentes condições de luminosidade natural (e.g. coletadas com auxílio de bússola direcionando para cada um dos pontos cardeais).

**Tabela IV 2.** Características físico-químicas das AgNPs-CbC sintetizadas no mesmo dia com extratos aquosos de folhas provenientes de plantas distintas utilizando 1 mg/mL de CbC e 1 mM de AgNO<sub>3</sub> a 75°C por 2,5 h. Índice de polidispersividade (PdI). Valores referentes às médias e desvios padrão da média de três leituras independentes. Diferença estatisticamente significativa em relação à planta 1 (\*), planta 2 (<sup>S</sup>), planta 3 (<sup>&</sup>) e planta 4 (<sup>#</sup>).

	<b>Diâmetro hidrodinâmico médio (d.nm)</b>	<b>PdI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Condutividade elétrica (µs/cm)</b>
<b>Planta 1</b>	55,69 ± 0,11	0,384 ± 0,018	-29,0 ± 1,6	0,0330 ± 0,0001
<b>Planta 2</b>	41,39 ± 2,73*	0,312 ± 0,054	-31,1 ± 0,7	0,0413 ± 0,0013
<b>Planta 3</b>	52,28 ± 1,67 <sup>S</sup>	0,327 ± 0,049	-30,5 ± 0,5	0,0355 ± 0,0004
<b>Planta 4</b>	39,09 ± 0,85* <sup>S</sup>	0,329 ± 0,060	-30,6 ± 0,7	0,0357 ± 0,0001
<b>Planta 5</b>	51,82 ± 0,50 <sup>S&amp;</sup>	0,286 ± 0,001	-33,2 ± 0,5* <sup>&amp;#</sup>	0,0337 ± 0,0010



**Figura IV 8.** Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico (em número) obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) a partir das análises das AgNPs-CbC sintetizadas utilizando folhas oriundas de diferentes plantas de pequi.

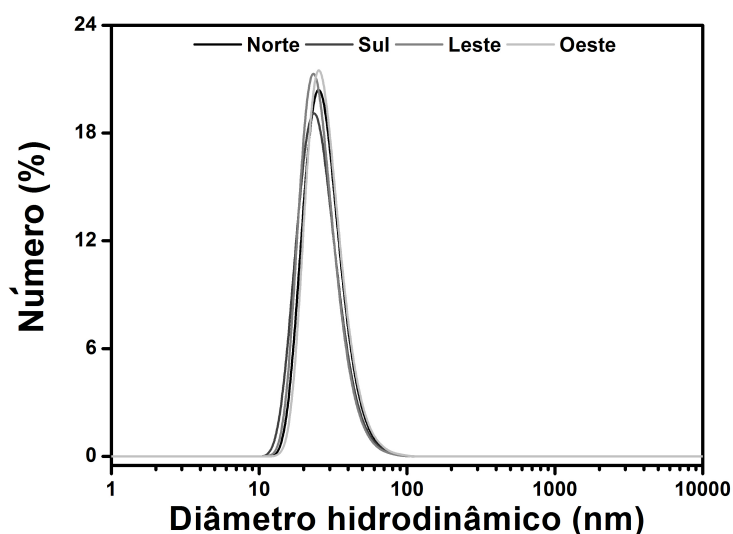


Conforme citado anteriormente, outro fator que pode influenciar no metabolismo vegetal e conseqüentemente no perfil fitoquímico de plantas diferentes da mesma espécie é a intensidade luminosa, a qual pode atuar na síntese de metabólitos e no desenvolvimento da biomassa vegetal (Paulilo et al., 2010). Neste contexto, levantou-se a hipótese de que a luz solar poderia incidir de forma diferente em folhas de uma mesma planta localizadas em direções distintas, e isso poderia influenciar na síntese das AgNPs-CbC. De acordo com o nosso conhecimento a partir de revisões de literatura essa é a primeira vez que tais aspectos são considerados durante o desenvolvimento de rotas de síntese de AgNPs, já que a maioria dos artigos científicos negligenciam aspectos fundamentais da biologia vegetal. Sendo assim, além da avaliação da influência do espécime (indivíduo), também foi avaliada a reprodutibilidade utilizando extratos obtidos a partir de folhas coletadas em diferentes direções (norte, sul, leste e oeste) de uma mesma planta.

A análise por espalhamento de luz dinâmico indicou que todas as AgNPs sintetizadas levando em consideração a direção de origem das folhas apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio na faixa nanométrica, polidispersividade baixa a moderada, e carga de superfície indicativa de boa estabilidade coloidal. Nesse sentido, as variações máximas foram de 5,69 nm, 0,1 e -2,2 mV para o diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial Zeta, respectivamente (Tabela IV 3). Contudo, quando os diâmetros hidrodinâmicos foram avaliados a partir das curvas de distribuição (em número), pode-se observar que todas as suspensões coloidais apresentaram diâmetro hidrodinâmico de ~22 nm (Figura IV 9), indicando reprodutibilidade das reações de síntese de AgNPs-CbC para as folhas coletadas de diferentes direções de uma mesma planta. Esse achado constitui uma observação importante no que diz respeito à possibilidade de investigar uma determinada parte vegetal de uma mesma planta e sugere que há uniformidade dos perfis fitoquímicos dentro de um mesmo indivíduo desde que coletados materiais biológicos com aspectos morfológicos semelhantes. Dessa forma, o estado fisiológico de uma determinada parte vegetal parece ser homogêneo independentemente do trânsito solar e da incidência de luz à qual a planta é submetida. Esse fato pode ser muito importante inclusive para validar alguns dos estudos anteriores os quais não consideraram esses aspectos durante a realização dos experimentos já que as variações são mínimas.

**Tabela IV 3.** Características físico-químicas das AgNPs-CbC sintetizadas com 1 mM de AgNO<sub>3</sub> e utilizando CbC a 1 mg/mL produzido a partir de folhas de pequi coletadas em diferentes direções da planta (norte, sul, leste e oeste). Diferença estatisticamente significativa em relação a norte (\*), sul (<sup>§</sup>) e leste (&).

	<b>Diâmetro hidrodinâmico médio (d.nm)</b>	<b>PdI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Condutividade elétrica (µs/cm)</b>
<b>Norte</b>	51,98 ± 0,75	0,384 ± 0,018	-29,0 ± 1,6	0,0330 ± 0,0001
<b>Sul</b>	50,00 ± 0,55* <sup>&amp;</sup>	0,292 ± 0,006*	-27,2 ± 1,6	0,0374 ± 0,0018
<b>Leste</b>	55,69 ± 0,11* <sup>§</sup>	0,283 ± 0,004*	-29,5 ± 0,7	0,0352 ± 0,0001
<b>Oeste</b>	52,64 ± 0,27 <sup>§</sup> &	0,280 ± 0,003*	-27,3 ± 0,9	0,0393 ± 0,0001



**Figura IV 9.** Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico (em número) obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) a partir das análises de AgNPs-CbC sintetizadas a partir de 1 mM de AgNO<sub>3</sub> utilizando 1 mg/mL de CbCs, provenientes de diferentes direções de uma mesma planta, a 75°C por 2,5 h.

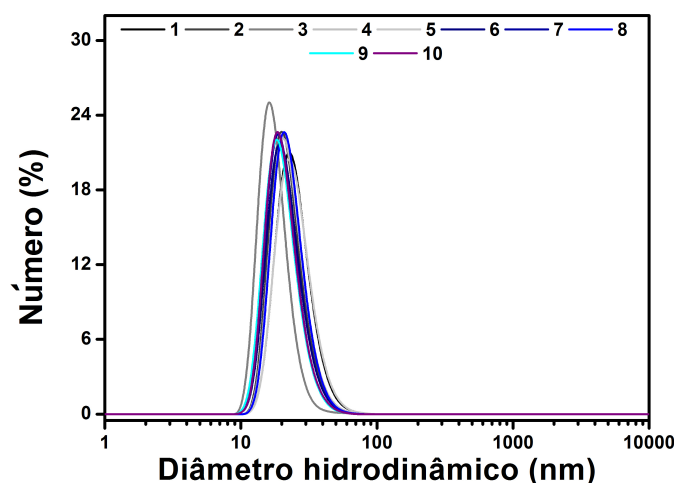
Visando avaliar a reprodutibilidade da rota de síntese de AgNPs-CbC, dez rotas de sínteses independentes sob condições idênticas foram realizadas em dias distintos. Análise do diâmetro hidrodinâmico médio revelou uma variação máxima de ~20 nm de diferença no diâmetro médio das AgNPs entre as dez sínteses (lotes) realizadas a 75°C, sendo que o maior e o menor diâmetro médio observados foram de 66,02 nm e 32,7 nm, respectivamente. Apesar das variações observadas para o diâmetro médio vale ressaltar que a distribuição de classes de diâmetro (em número) revelou a presença majoritária de AgNPs-CbC com ~22 nm indicando reprodutibilidade na rota de síntese (Figura IV 10). Pequena variação no PdI também foi observada, sendo está de apenas 0,155 entre o

maior e menor PDI, observados (Tabela IV 4). As AgNPs apresentaram variação no potencial Zeta de superfície de -24,2 mV a -34,5 mV para os diferentes lotes de sínteses desenvolvidos (Tabela IV 4). Variações observadas no potencial Zeta podem estar relacionadas a variações na composição ou abundância dos metabólitos oriundos dos extratos que atuam como agentes de cobertura das AgNPs, aja visto que as análises dos extratos também indicaram cargas negativas variadas (dados não mostrados).

As diferenças em algumas características físico-químicas observadas para os diferentes lotes de sínteses podem estar relacionadas a diferenças na composição dos extratos produzidos, aja visto que as folhas diferentes ainda que da mesma planta podem ser compostas por diferentes biomoléculas devido aos seus estádios de desenvolvimento (e.g. folhas novas *vs* senescentes) e as quais podem estar presentes em concentrações distintas nas folhas em investigação. Em trabalho recente desenvolvido no LNANO, folhas de uma planta modelo com diferentes estágios de desenvolvimento foram empregadas separadamente na síntese de AgNPs e foi observado que apenas as folhas das extremidades apicais seriam efetivas para as rotas de síntese, ainda que utilizando folhas de uma mesma planta (comunicação pessoal). Não por acaso, as folhas utilizadas na primeira etapa desse presente estudo (Capítulo III) são oriundas de porções terminais de galhos das plantas estudadas. Adicionalmente, as AgNPs produzidas a partir de diferentes lotes de sínteses utilizando extrato aquoso das folhas de *Brosimum gaudichaudii* também apresentaram pequenas variações no diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial Zeta de superfície (Albernaz, 2014). Além disso, por mais que as sínteses tenham sido realizadas em condições gerais controladas (ex: concentrações, volumes, condições de temperatura de reação, etc), alguns fatores podem acabar influenciando na reprodutibilidade das sínteses, como por exemplo, pequenas variações na temperatura ambiental, calibração de pipetas e balanças, vidrarias, entre outros. Futuramente esses parâmetros precisam ser considerados durante a elaboração de planejamentos experimentais visando ao escalonamento da produção de AgNPs-CbC para aplicações nanobiotecnológicas.

**Tabela IV 4.** Características físico-químicas das AgNPs-CbC sintetizadas em 10 dias distintos com AgNO<sub>3</sub> a 1 mM e utilizando 1 mg/mL de CbC a 75°C por 2,5 h. Índice de polidispersividade (PdI).

	<b>Diâmetro hidrodinâmico médio (d.nm)</b>	<b>PdI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Condutividade elétrica (µs/cm)</b>
<b>Lote 1</b>	48,00 ± 1,82	0,429 ± 0,009	-29,0 ± 0,5	0,0444 ± 0,0025
<b>Lote 2</b>	42,52 ± 2,22	0,403 ± 0,007	-32,3 ± 2,2	0,0413 ± 0,0027
<b>Lote 3</b>	66,02 ± 1,49	0,448 ± 0,016	-24,2 ± 0,8	0,0340 ± 0,0015
<b>Lote 4</b>	48,57 ± 1,07	0,369 ± 0,027	-25,9 ± 0,6	0,0330 ± 0,0028
<b>Lote 5</b>	50,51 ± 2,34	0,395 ± 0,022	-30,6 ± 3,7	0,0240 ± 0,0001
<b>Lote 6</b>	36,25 ± 1,02	0,313 ± 0,035	-26,2 ± 1,8	0,0279 ± 0,0007
<b>Lote 7</b>	34,71 ± 4,48	0,304 ± 0,048	-29,1 ± 2,3	0,0328 ± 0,0003
<b>Lote 8</b>	32,80 ± 1,11	0,293 ± 0,030	-31,9 ± 1,0	0,0381 ± 0,0016
<b>Lote 9</b>	32,70 ± 1,55	0,337 ± 0,068	-33,7 ± 5,4	0,0376 ± 0,0013
<b>Lote 10</b>	39,12 ± 1,66	0,352 ± 0,008	-34,5 ± 2,2	0,0462 ± 0,0015



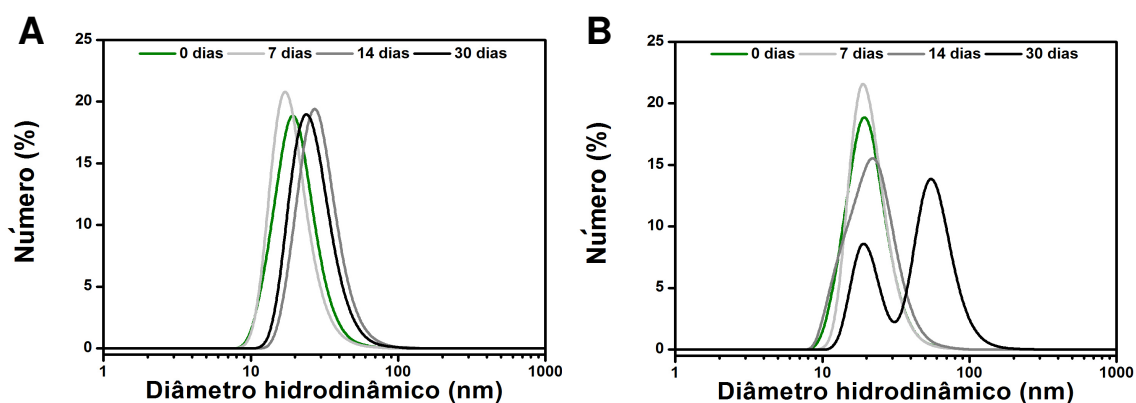
**Figura IV 10.** Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico (em número) obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) a partir das análises das AgNPs-CbC sintetizadas em 10 dias distintos (lotes) com 1 mM de AgNO<sub>3</sub> e utilizando 1 mg/mL de CbC a 75°C por 2,5 h.

### *Estabilidade*

A avaliação e compreensão da estabilidade coloidal de NPs têm sido apontadas como tendo papel fundamental na interpretação do comportamento dessas nanoestruturas durante armazenamento e no entendimento de sua interação com sistemas biológicos (MacCuspie, 2011). Inicialmente, a estabilidade coloidal das AgNPs foi avaliada ao longo do tempo (0 a 30 dias) e variação da temperatura de armazenamento (4°C e 25°C).

As AgNPs armazenadas a 4°C apresentaram diminuição significativa no potencial Zeta de superfície apenas no trigésimo dia de monitoramento, sendo que os potenciais Zeta foram de  $-28,5 \pm 0,2$  mV,  $-28,2 \pm 0,4$  mV,  $-27,9 \pm 0,1$  mV e  $-24,1 \pm 0,6$  mV, para as análises realizadas nos dias 0, 7, 14 e 30, respectivamente ( $P < 0,05$ ). Para o armazenamento a 25°C, os valores de potencial Zeta foram de  $-28,5 \pm 0,2$  mV,  $-24,4 \pm 0,9$  mV,  $-27,0 \pm 0,4$  e  $-20,0 \pm 1,6$  mV, para os dias 0, 7, 14 e 30, respectivamente, não havendo diferenças significativas apenas entre os dias 0 e 14 ( $P < 0,05$ ) (Figura IV 11B). Adicionalmente, ocorreram diferenças entre as amostras armazenadas nas temperaturas diferentes nos dias 7, 14 e 30 ( $P < 0,05$ ), indicando uma maior estabilidade ao longo do tempo para as AgNPs-CbC armazenadas à 4°C (Figura IV 11A).

De acordo com a análise das distribuições do diâmetro hidrodinâmico em número (%), pode ser observada o aparecimento de uma nova subpopulação de AgNPs no trigésimo dia para o armazenamento a 25°C (Figura IV 11). O aparecimento de uma subpopulação de maiores dimensões sugere a ocorrência de um processo de agregação e/ou aglomeração das nanopartículas, em decorrência da diminuição da repulsão eletrostática possibilitada pela carga de superfície. Esses resultados indicaram uma maior instabilidade coloidal das partículas armazenadas à 25°C, sendo assim todas as sínteses subsequentes foram acondicionadas para armazenamento a 4°C.

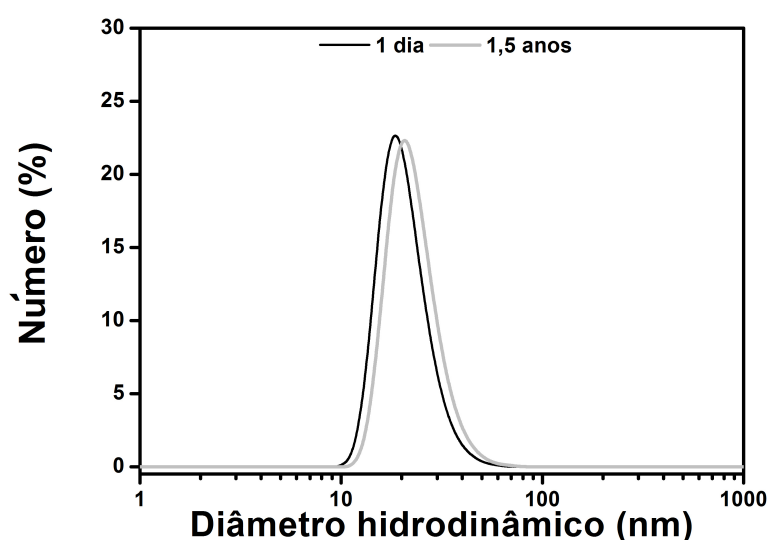


**Figura IV 11.** Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico (em número) obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) a partir das análises de monitoramento das AgNPs-CbC sintetizadas à temperatura de 75°C com CbC a 1 mg/mL e armazenadas a 4°C (A) e 25°C (B) durante 0, 7, 14 ou 30 dias.

Assim, as AgNPs-CbC foram mantidas a 4°C (sob fotoproteção) e tiveram sua estabilidade coloidal monitorada por DLS, da mesma suspensão, após 24 h e 1,5 anos de armazenamento. As AgNPs-CbC apresentaram diâmetro médio de  $39,12 \pm 1,66$  nm

após 24 h e  $38,77 \pm 0,34$  nm após 1,5 anos, PdI de  $0,352 \pm 0,008$  após 24 h e  $0,319 \pm 0,032$  após 1,5 anos, e potencial Zeta de superfície de  $-34,5 \pm 2,2$  mV após 24 h e  $-31,8 \pm 1,5$  mV após 1,5 anos. Com base nesses resultados, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as análises de diâmetro hidrodinâmico médio, PdI e potencial Zeta de superfície nos diferentes dias ( $P > 0,05$ ). Esses resultados indicam alta estabilidade cinética das AgNPs aja visto que as características físico-química foram mantidas mesmo em condição de suspensão aquosa, o que pode ser observado pelas curvas de distribuição de classe de diâmetro em número (Figura IV 12). Vale ressaltar que até o momento poucos trabalhos (desenvolvidos no próprio LNANO) avaliaram a estabilidade coloidal de AgNPs obtida por rota verde durante um período de tempo tão longo. A estabilidade de AgNPs sintetizadas utilizando extrato aquoso de folhas de bureré foram monitoradas ao longo do tempo de armazenamento e foram observadas diferenças entre as curvas de distribuição de classes de diâmetros, que passaram de bimodais com 24h e 2 meses para unimodal com 1 ano. Contudo, não foram observadas variações na carga de superfície e polidispersividade, não sendo relatada a variação no diâmetro hidrodinâmico médio (Albernaz 2014).

As informações obtidas com base nos ensaios de estabilidade realizados podem ser fundamentais para questões relacionadas ao tempo de prateleira e condições de armazenamento para um eventual produto tecnológico desenvolvido à base de AgNPs-CbC

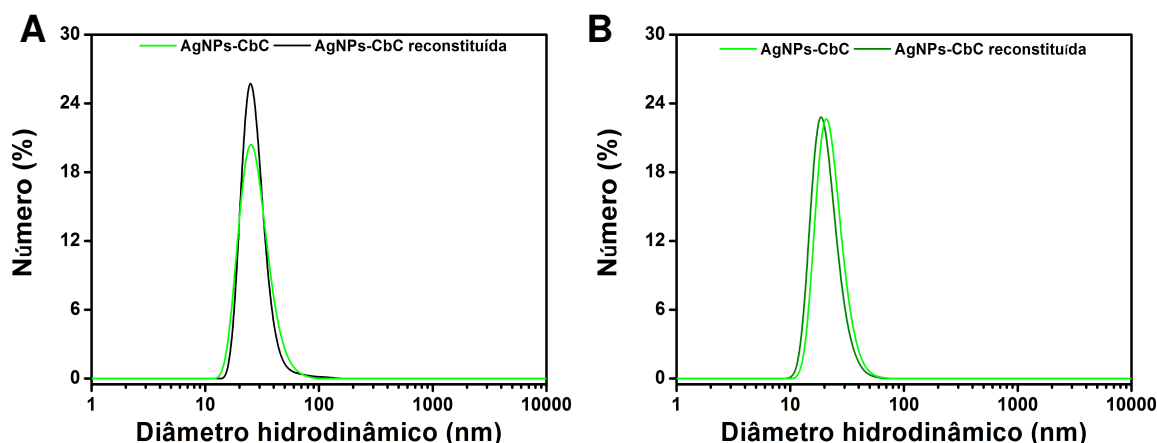


**Figura IV 12.** Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico (em número) obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) a partir das análises de monitoramento das AgNPs-CbC após 24 h e 1,5 anos de armazenamento a 4°C.

Outra forma que possibilita o armazenamento de nanopartículas por longos períodos de tempo, eventualmente sem comprometer as propriedades físico-químicas, é quando essas estão na forma de um pó. Estudo recente tem relatado que a utilização de processo de liofilização de nanossuspensões é benéfica para preservar a distribuição de tamanho da partícula original visando armazenamentos por longos períodos (MacCuspie et al., 2013). Neste sentido, as AgNPs-CbC foram submetidas a processo de liofilização no intuito de avaliar se suas características seriam preservadas após o processo de reconstituição em meio aquoso.

As AgNPs-CbC foram submetidas a processo de liofilização para obtenção de pó seco e posteriormente foram ressuspensas adicionando o mesmo volume inicial ou volume 10× menor de água ultrapura (para aumento de concentração), e as suspensões foram avaliadas por espalhamento de luz dinâmico. Não foram observadas diferenças expressivas no diâmetro hidrodinâmico das AgNPs-CbC antes e após o processo de liofilização para as duas condições avaliadas (Figura IV 13). Esses resultados indicam a possibilidade de armazenamento das AgNPs-CbC em pó por período indeterminado, bem como a possibilidade de concentrá-las visando ao aumento de concentração.

Em muitos casos, a grande dificuldade no processo de liofilização de AgNPs está relacionada com a etapa de congelamento. Suspensões coloidais de partículas estabilizadas eletrostaticamente, quando submetidas a congelamento, tendem a agregar irreversivelmente, devido às forças atrativas que surgem em função do pequeno espaço entre partículas (Albert et al., 2009). Contudo, nos casos em que há alguma força repulsiva ou barreira física, tal como a cobertura de revestimento propiciada pelas moléculas estabilizantes presentes nos extratos aquosos de plantas, as AgNPs podem ser capazes de retornar à condição de suspensão isoladamente dispersas quando em condições apropriadas (MacCuspie et al., 2013). Sendo assim, as moléculas que atuam como estabilizantes das AgNPs-CbC podem estar atuando também como uma barreira física que possibilita que as partículas mantenham suas características iniciais após o processo de ressuspensão.



**Figura IV 13.** Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico (em número) obtidos por espalhamento de luz dinâmica (DLS) a partir das análises de monitoramento das AgNPs-CbC após processo de liofilização e reconstituição em água ultrapura com o mesmo volume inicial (A) e volume 10× menor para aumento de concentração (B).

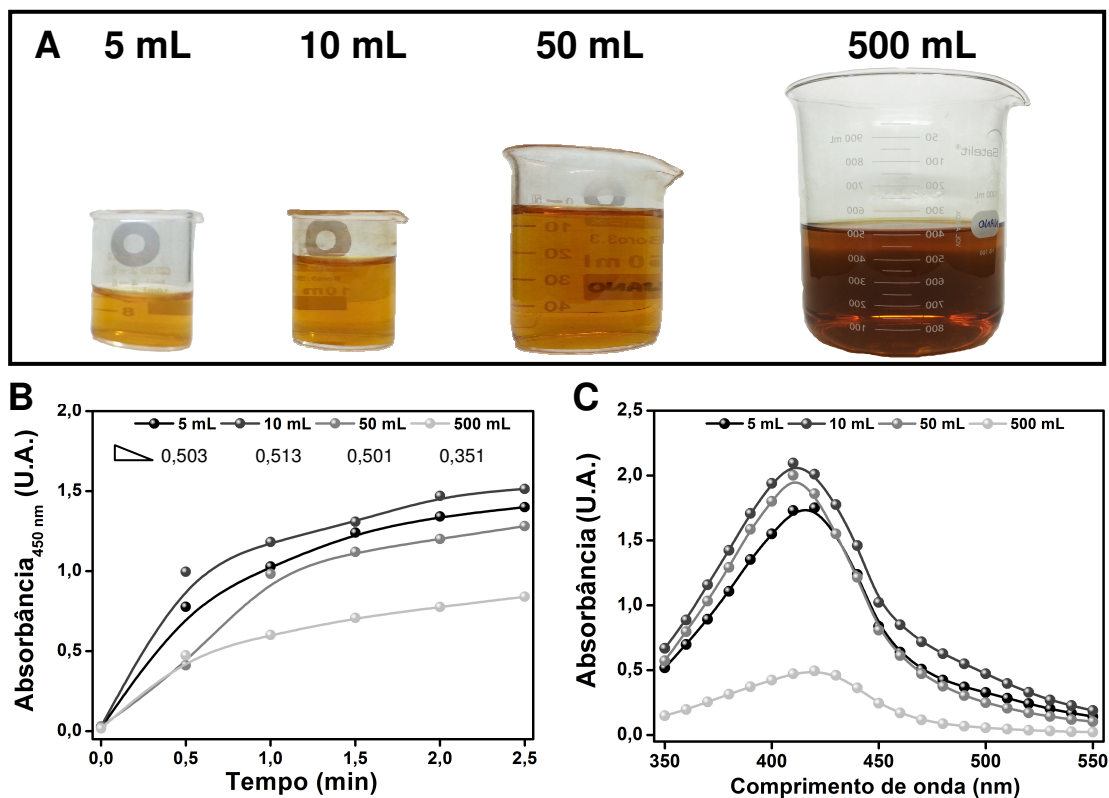
#### *Escalonamento*

O aumento da escala de síntese é provavelmente uma das etapas mais difíceis envolvidas na produção de nanomateriais reprodutíveis com vistas a aplicações biotecnológicas e biomédicas (Smitha et al., 2009). Os desafios do aumento da escala de síntese das NPMs estão relacionados à baixa abundância de algumas matérias-primas, à dificuldade em controlar a composição molecular, à heterogeneidade dos estádios vegetativos e à falta de equipamentos apropriados para a síntese em volumes maiores requeridos pela indústria.

O escalonamento da síntese de AgNPs utilizando 1 mM de  $\text{AgNO}_3$  e CbC a 1 mg/mL incubados a  $75^\circ\text{C}$  foi realizado para volumes finais em reação de batelada de 5, 10, 50 ou 500 mL, com consequentes aumentos de escala de 2×, 10× e 100× (Figura IV 14). Alterações na coloração dos meios reacionais de translúcida para marrom avermelhada (característica) e também o monitoramento espectrofotométrico, indicaram síntese das AgNPs-CbC nas quatro condições volumétricas avaliadas (Figura IV 14B). Adicionalmente, ocorreu aumento na largura da banda de absorção e diminuição de 10 nm no comprimento de onda de máximo de RPS das AgNPs-CbC sintetizadas nos volumes finais de 10 e 50 mL, quando comparadas às AgNPs-CbC presentes na suspensão resultante da síntese realizada em volume de 5 mL (Figura IV 14). Adicionalmente, ocorreu diminuição na intensidade do pico de máxima de RPS para a suspensão resultante do volume final de 500 mL quando comparado aos volumes de 5,



10 e 50 mL. Estudos indicam que o aumento gradual da largura da banda de RPS está relacionado a um aumento da polidispersividade do sistema coloidal (Wangoo et al., 2008). Então, esse fato foi investigado utilizando análises de DLS e potencial Zeta de superfície das AgNPs.



**Figura IV 14.** Escalonamento da rota de síntese de AgNPs-CbC. Fotografias de béqueres após as reações de síntese das AgNPs-CbC em diferentes volumes de reação (A). Cinéticas de formação (B) e espectros de absorção (C) das AgNPs-CbC sintetizadas em diferentes volumes reacionais com as demais condições de ensaio sendo mantidas. Onde  $\triangle$  indica taxa de formação com base na inclinação da curva

De fato, a análise por DLS indicou diferenças significativas entre os diâmetros hidrodinâmicos médios, PDI e potencial Zeta de superfície entre as quatro suspensões coloidais obtidas a partir das sínteses de AgNPs com CbC em diferentes volumes finais de reação, mas mantidas as mesmas proporções dos reagentes e demais condições experimentais ( $P < 0,05$ ) (Tabela IV 5). Entretanto, embora tenham sido observadas diferenças no tamanho, polidispersividade e potencial Zeta de superfície das AgNPs-

CbC após as reações, não foi observada nenhuma correlação linear entre a alteração das características e o aumento da escala de síntese (Tabela IV 5).

**Tabela IV 5.** Características físico-químicas das AgNPs-CbC obtidas por meio de processo de escalonamento. Valores referentes às médias e desvios padrão da média de três leituras independentes. Diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) em relação à síntese de 5 mL (\*) e 10 mL (<sup>§</sup>). Índice de polidispersividade (PdI).

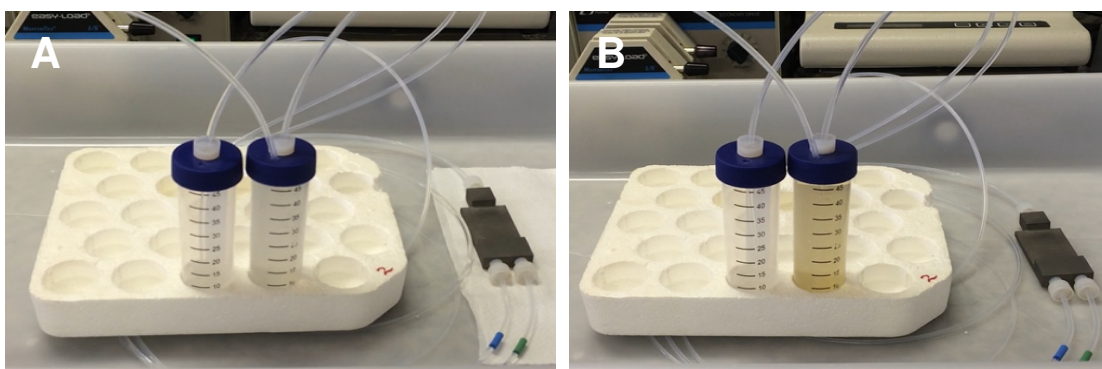
	<b>Diâmetro hidrodinâmico médio (d.nm)</b>	<b>PdI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Condutividade elétrica (<math>\mu\text{s/cm}</math>)</b>
<b>5 mL</b>	48,00 $\pm$ 1,82	0,429 $\pm$ 0,009	-29,0 $\pm$ 0,5	0,044 $\pm$ 0,003
<b>10 mL</b>	54,33 $\pm$ 2,04	0,461 $\pm$ 0,019*	-27,0 $\pm$ 1,0	0,040 $\pm$ 0,003
<b>50 mL</b>	38,37 $\pm$ 4,61 <sup>§</sup>	0,399 $\pm$ 0,007 <sup>§</sup>	-35,9 $\pm$ 1,0 <sup>§</sup>	0,043 $\pm$ 0,001
<b>500 mL</b>	46,49 $\pm$ 3,81 <sup>§</sup>	0,393 $\pm$ 0,017 <sup>§</sup>	-32,4 $\pm$ 2,3 <sup>§</sup>	0,029 $\pm$ 0,002

### Síntese utilizando sistema de microfluídica

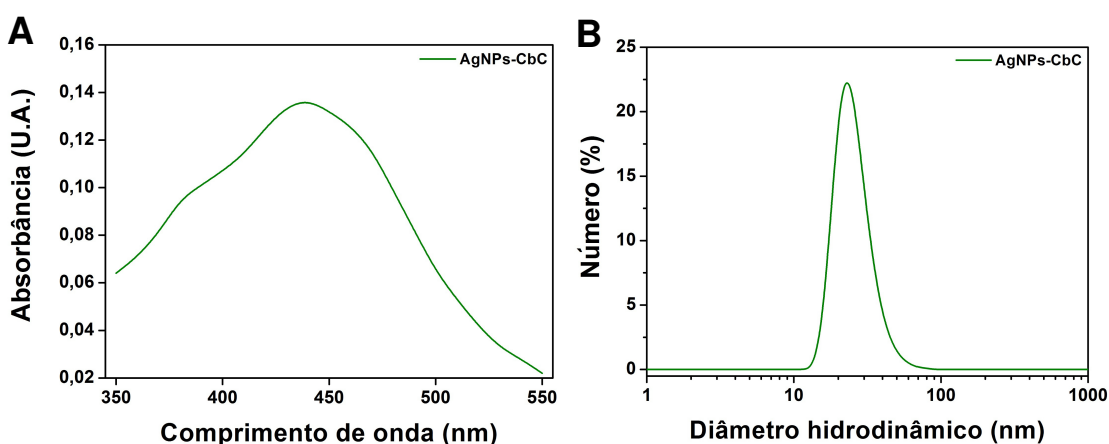
Sistemas de microfluídica têm sido utilizados em rotas de síntese de micro- e nanopartículas sob fluxo visando à obtenção de sistemas homogêneos com controle de tamanho, composição e morfologia (Valencia et al., 2012). Isso porque esse tipo de sistema reacional (*reactionware*) permite uma mistura rápida e homogênea dos meios reacionais pelos micro-canais, bem como possibilita o controle de temperatura, gradiente de concentração de reagentes, e pressão (Badilescu e Packirisamy, 2012). Sendo assim, sistema de microfluídica em fluxo contínuo foi utilizado para a síntese das AgNPs-CbC. Após 2,5 h observou-se mudança de coloração da suspensão de translúcida para amarelo claro (Figura IV 15). A suspensão apresentou absorção máxima do pico de RPS em 440 nm indicativo da formação de AgNPs (Figura IV 16). Além disso, a análise da suspensão coloidal de AgNPs-CbC por DLS indicou a presença de partículas com diâmetro médio de 84,14  $\pm$  5,49 nm e PdI de 0,456  $\pm$  0,009, e potencial Zeta de superfície de -24,0  $\pm$  0,3 mV.

Quando a suspensão obtida por rota de síntese em sistema de microfluídica foi comparada à suspensão sintetizada por rota convencional em béqueres ocorreu diminuição no valor de absorbância máxima da RPS, alargamento do pico de absorção e deslocamento do mesmo em +20 nm (440 nm). Além disso, ocorreu aumento do diâmetro hidrodinâmico médio e PdI. Contudo, quando as curvas de distribuição de

diâmetro em número foram comparadas foi possível observar que ambas as suspensões apresentavam partículas com ~22-23 nm.



**Figura IV 15.** Imagens fotográficas do processo de síntese de AgNPs-CbC utilizando sistema de microfluídica em fluxo contínuo a 25°C por 2,5 h. 0 (A) e 2,5 h (B).



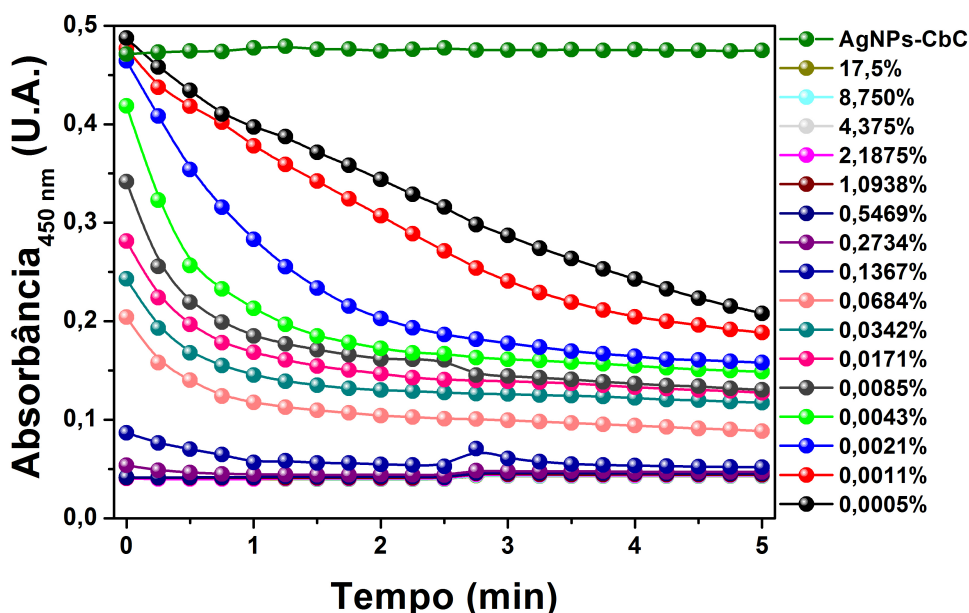
**Figura IV 16.** Espectro de absorção na região do visível após o processo de síntese utilizando sistema de microfluídica em fluxo contínuo a 25°C por 2,5 h (A). Curva de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico (em número) obtida por espalhamento de luz dinâmico (DLS) a partir das análises das suspensões de AgNPs-CbC sintetizadas utilizando sistema de microfluídica em fluxo contínuo a 25°C por 2,5 h (B).

### Dissolução das AgNPs-CbC

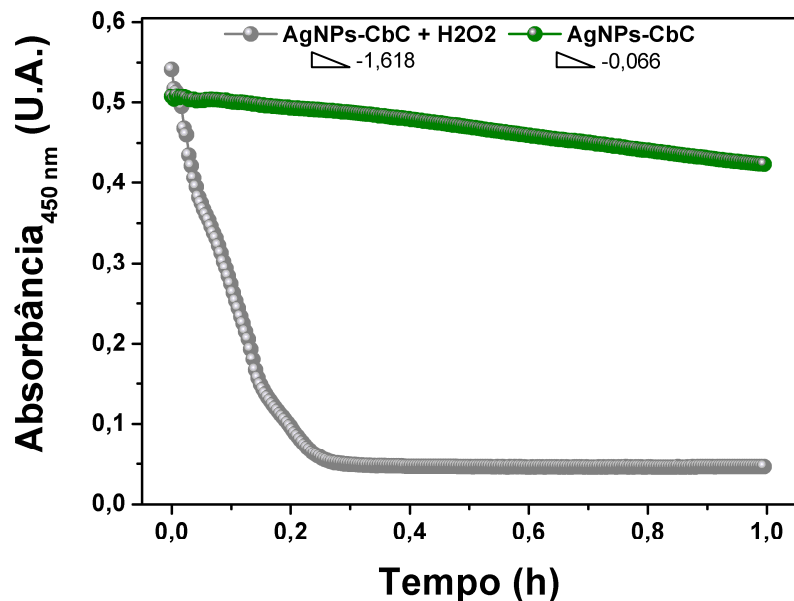
Além do desenvolvimento das rotas de síntese visando à obtenção de AgNPs para as mais diversas aplicações biotecnológicas, também têm sido discutidas formas e mecanismos para dissolver os nanossistemas produzidos (Peretyazhko et al., 2014). Isso porque tem ampliado as preocupações relacionadas aos potenciais riscos associados às AgNPs quando em contato com sistemas biológicos, aja visto que um dos mecanismos de atuação dessas partículas se dá por meio dos processos de oxidação e consequente

liberação de íons  $\text{Ag}^+$ . Além disso, com o aumento de volume de produção de AgNPs, como os realizados no presente estudo, surge a necessidade de desenvolvimento de rotas eficientes para a dissolução desses nanossistemas. Sendo assim, alguns estudos recentes têm mostrado o potencial de dissolução de AgNPs por meio da utilização de agentes oxidantes, como ácido acético (Peretyazhko et al., 2014), ácido cítrico (Silva, 2014), cloreto de sódio (NaCl) (Kent 2011; Albernaz 2014), cloro (Garg et al., 2016) e também peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (He et al., 2012).

Para investigar o possível evento de dissolução das suspensões de AgNPs-CbC, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de soluções de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em diferentes concentrações (17,5 a 0,0005% por meio de diluição seriada) a 100  $\mu\text{L}$  de AgNPs-CbC (500  $\mu\text{M}$  de concentração final de AgNPs-CbC durante o processo de dissolução). Avaliação espectrofotométrica (450 nm) indicou diminuição da absorbância das suspensões de AgNPs-CbC, indicando desestruturação das AgNPs na presença de diferentes concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilizadas (Figura IV 17). Foi possível observar que ocorreu a dissolução completa das partículas apenas para as maiores concentrações utilizadas do agente oxidante. Sendo assim, visando avaliar a cinética de dissolução completa das AgNPs-CbC foi escolhida a concentração de 0,004% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura IV 18).



**Figura IV 17.** Avaliação da cinética de dissolução das AgNPs-CbC utilizando diferentes concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como agente oxidante por 5 min.

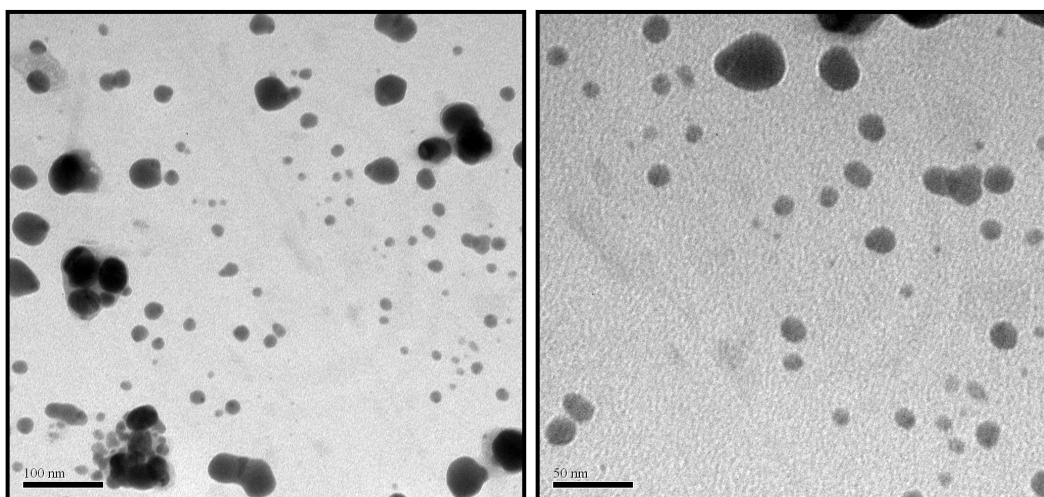


**Figura IV 18.** Cinética de dissolução de AgNPs-CbC utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0,004% por 1 h. Os valores apresentados na área do gráfico representam as taxas de dissolução observadas. Onde  $\nabla$  indica inclinação da curva.

### Propriedades morfológicas das AgNPs-CbC

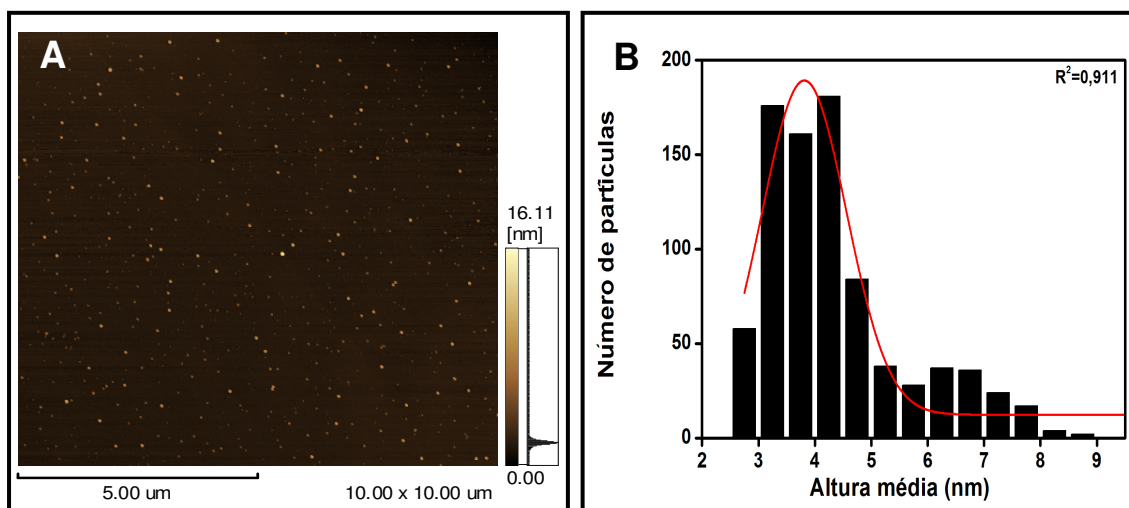
Análises por técnicas de microscopia tem sido de fundamental importância na caracterização das nanopartículas quanto à forma e tamanho. Sendo assim, as análises nanoestruturais visando a determinar o diâmetro seco e a forma das AgNPs-CbC foram realizadas utilizando microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia de força atômica (MFA).

Imagens obtidas por MET foram avaliadas qualitativamente e revelaram AgNPs-CbC de tamanhos variados e formatos esféricos, com apenas algumas estruturas anisotrópicas ou amorfas (Figura IV 19). Esses resultados corroboram os dados encontrados na literatura os quais indicam que a maioria das AgNPs sintetizadas por rotas de síntese verde utilizando extratos de plantas apresentam formatos predominantemente esféricos (Chandran et al., 2013; Philip 2010; Albernaz 2014; Silva 2014).



**Figura IV 19.** Fotomicrografias representativas obtidas a partir de análises por microscopia eletrônica de transmissão das AgNPs-CbC sintetizadas utilizando 1 mg/mL de extrato aquoso de folhas e 1 mM de  $\text{AgNO}_3$  submetidos à temperatura de  $75^\circ\text{C}$  por 2,5 h.

A avaliação por MFA revelou AgNPs-CbC com formatos esféricos (Figura IV 20), corroborando os dados obtidos por MET. Adicionalmente, as AgNPs apresentaram alturas médias de  $4,39 \pm 0,05$  nm, sendo aproximadamente 5 vezes menor que os valores determinados por DLS. Vale ressaltar que o incremento de tamanho indicado pelo DLS está relacionado à camada de recobrimento e solvatação formada na superfície das partículas a ja visto que as análises são realizadas em meio líquido.



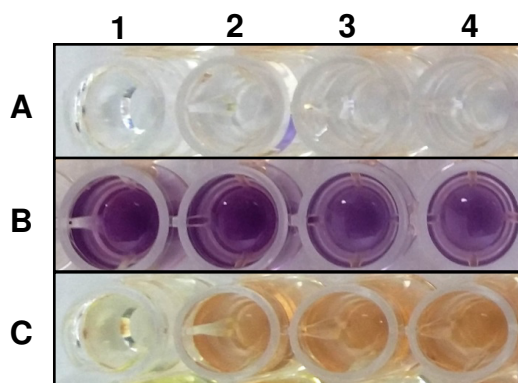
**Figura IV 20.** Imagens topográficas (A) e histogramas de distribuição de classes com ajuste para distribuição gaussiana (B) referentes aos valores de altura obtidos por microscopia de força atômica das AgNPs-CbC sintetizadas utilizando 1 mg/mL de extrato aquoso e 1 mM de  $\text{AgNO}_3$  submetidos a temperatura de  $75^\circ\text{C}$  por 2,5 h.

## Propriedades moleculares das AgNPs-CbC

Como já relatado na literatura, as folhas de *C. brasiliense* são constituídas por um complexo de biomoléculas dentre as quais estão flavonoides, saponinas, xantonas, catequinas, esteroides, fenois e polifenóis (Dias et al., 2011), todas com potencial para atuar na formação das AgNPs-CbC, sugerindo alto potencial antioxidante o qual requeria ser investigado.

### Potencial antioxidante do extrato CbC

O extrato das folhas de pequi mostrou alto potencial na formação de AgNPs-CbC sugerindo a capacidade antioxidante intrínseca ao extrato. Sendo assim, o extrato CbC foi submetido a ensaio utilizando DPPH no intuito de avaliar sua capacidade antioxidante total. Para isso, o extrato CbC foi incubado com DPPH por 30 min e após esse período foi observada coloração amarelada e a quantificação espectrofotométrica indicou potencial antioxidante de 64% quando comparado ao controle (Figura IV 21). Esses achados corroboram os encontrados por Paula-Júnior e colaboradores (2006) que relatam o alto potencial antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de *C. brasiliense* avaliado pelo método DPPH.



**Figura IV 21.** Ação antioxidante do extrato CbC pelo método DPPH: Branco metanol (A1-2), metanol + água (A3-4), DPPH metanol (B1-2), DPPH metanol + água (B3-4), extrato pequi (C1), DPPH + extrato pequi (C2-4).

O método DPPH é baseado na transferência de elétrons de um composto antioxidante para o radical livre (DPPH•) e está relacionado com a presença de grupos hidroxilas na molécula antioxidante (Mansur et al., 2012; Loganayaki et al., 2013). Assim, a complexidade da composição química do extrato pode influenciar o potencial

de cada constituinte químico em acessar o centro radicalar do DPPH• para doar um radical hidrogênio. Neste âmbito, a interação do DPPH• depende da estrutura do antioxidante e sugere-se também que a cinética de reação dos antioxidantes com o DPPH• influencie essa interação; onde determinados componentes químicos que apresentem uma cinética rápida de reação podem reduzir um número de moléculas de DPPH• que varia de acordo com o número de grupamentos hidroxila disponíveis (Mansur et al., 2012).

De fato, as análises de identificação molecular dos componentes do CbC realizadas posteriormente no presente estudo confirmaram essas observações (abundância de moléculas com presença de grupamentos hidroxila) e ainda expandiram com um detalhamento do metaboloma das folhas de *C. brasiliense* com centenas de componentes moleculares detectados e dezenas de moléculas identificados e comparadas com moléculas já descritas na literatura. Tendo em vista a obtenção prévia de informações sobre os componentes moleculares potencialmente responsáveis pela redução de íons  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$  e a estabilização das AgNPs-CbC, e considerando a possibilidade de detecção desses grupamentos e ambientes químicos, foram realizadas análises por espectroscopia FTIR (Figura IV 22), espectroscopia Raman (Figura IV 23) e espectrometria de massa MALDI-TOF (Figura IV 24).

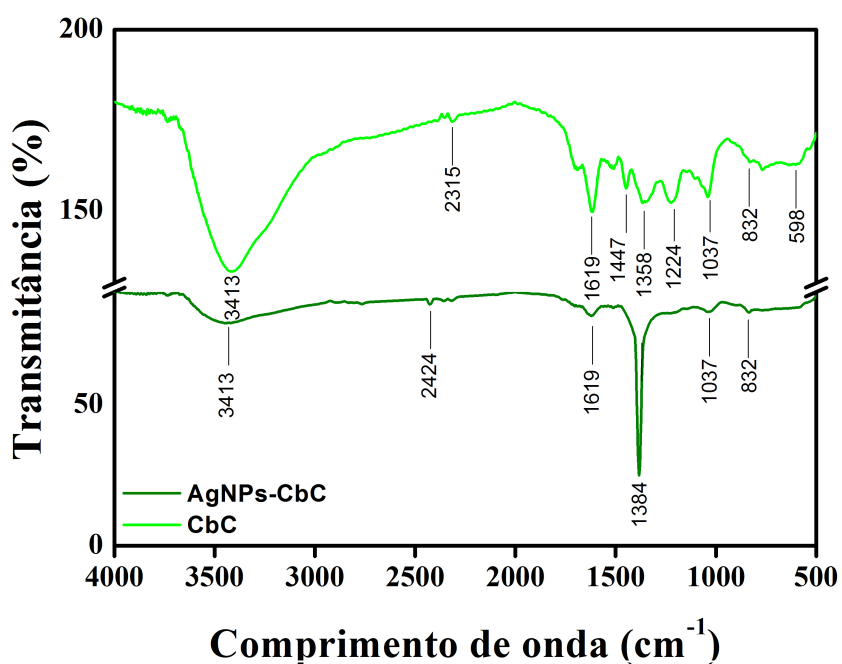
#### *Identificação dos grupos funcionais das moléculas do extrato CbC*

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) possibilita a identificação de grupos funcionais presentes em moléculas por meio das mudanças específicas nos níveis energéticos vibracionais e rotacionais das ligações químicas após sofrerem excitação em comprimento de onda específico. Os espectros de FTIR revelaram a presença de picos/bandas característicos para os espectros de extrato CbC (3413, 2315, 1619, 1447, 1358, 1224, 1037, 832 e 598  $\text{cm}^{-1}$ ) e AgNPs-CbC (3413, 2424, 1619, 1384, 1037 e 832  $\text{cm}^{-1}$ ), sendo que alguns são compartilhados entre as AgNPs-CbC e o CbC (3413, 2315, 1619, 1037 e 832  $\text{cm}^{-1}$ ) (Figura IV 22). O pico em 3413  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao alongamento das ligações de hidrogênio presentes em alcoóis e fenóis (Debnath et al., 2016); já o pico em 1618  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a grupos carbonila presente nas aminas, constituintes de proteínas e outras biomoléculas, como os alcaloides (Sreekanth et al., 2016). Adicionalmente, o pico em 832  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à



presença de anéis aromáticos (Kumar et al., 2014; Allafchian et al., 2016). O pico que é detectado em  $1384\text{ cm}^{-1}$  é atribuído ao estiramento das ligações N=O presente nos grupos nitro, estando associados ao sal metálico utilizado para a síntese das AgNPs (Sreekanth et al., 2016).

Alguns picos presentes em CbC apresentaram supressão e diminuição de intensidade nas amostras de AgNPs-CbC, sugerindo a participação de moléculas contendo estes grupamentos químicos no processo de biorredução dos íons  $\text{Ag}^+$  (Figura IV 22; Tabela IV 6).



**Figura IV 22.** Espectros obtidos por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) de AgNPs-CbC e CbC a 1 mg/mL.

**Tabela IV 6.** Sumarização das bandas de absorção identificadas a partir das análises de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

Comprimento de onda (cm <sup>-1</sup> )	Vibração	Grupo funcional ou componente	Referência
3413	O-H	Álcool e fenóis	Debnath et al., 2016
1618	C=O	Aminas e alcaloides	Sreekanth et al., 2016
1384	N=O	Grupos nitro	Sreekanth et al., 2016
832	-	Anéis aromáticos	Kumar et al., 2014; Allafchian et al., 2016

Apesar da importância reconhecida das análises por FTIR para identificação de agrupamentos funcionais envolvidos com a síntese de AgNPs, a espectroscopia Raman tem recentemente despertado ainda mais interesse para o estudo de pequenas moléculas orgânicas em função da tipicamente menor complexidade dos espectros. A espectroscopia Raman possibilita a identificação molecular por meio das interações inelásticas entre a luz incidente e o material. Essas interações acarretam em mudanças específicas nos níveis energéticos as quais correspondem a “impressões digitais ou assinaturas específicas” das moléculas. Assim, as AgNPs-CbC e CbC foram analisadas por espectroscopia Raman utilizando lasers de 532 e 785 nm na perspectiva de identificar comportamentos químicos de potenciais moléculas orgânicas responsáveis pela formação e estabilização das partículas (Figura IV 23). Os espectros obtidos revelaram presença de picos característicos para as AgNPs-CbC dependendo do tipo de laser utilizado.

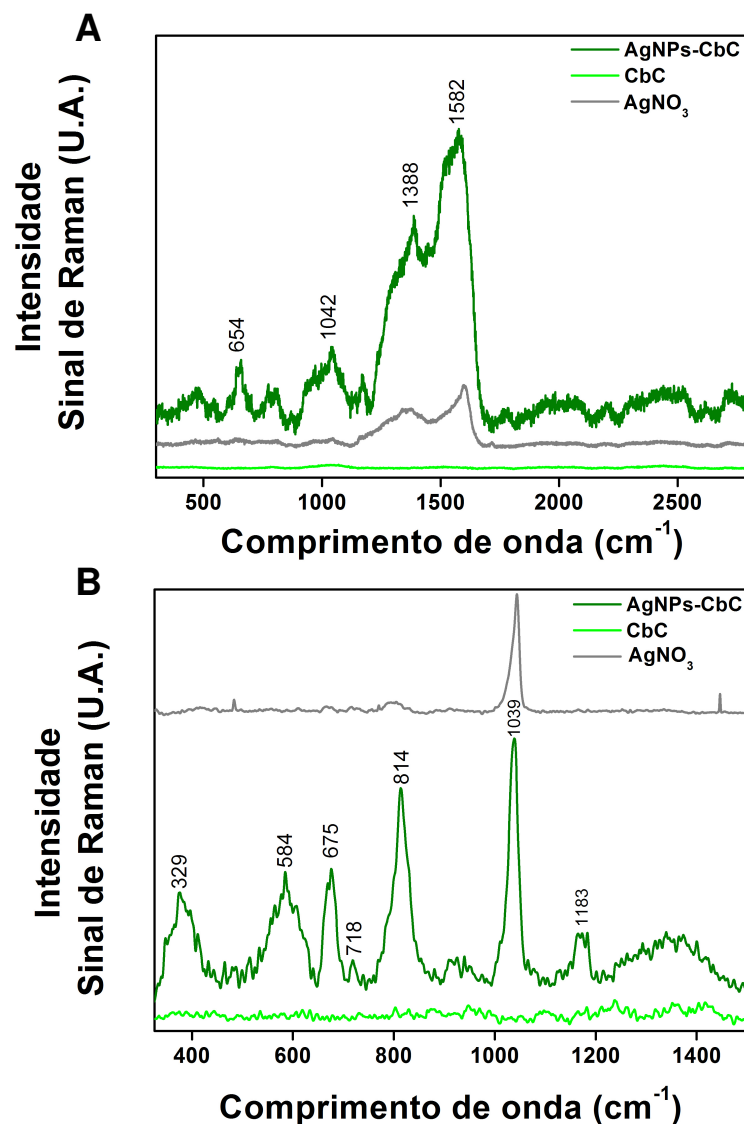
Utilizando o laser de 532 nm foi observada a presença dos picos 654, 1042, 1388 e 1582 cm<sup>-1</sup> e para o laser de 785 nm os picos 329, 584, 675, 814 e 1039, 1183 cm<sup>-1</sup> (Figura IV 23). A ligação existente entre as bandas em 1582 e 1388 cm<sup>-1</sup> presentes em AgNPs-CbC e AgNO<sub>3</sub> pode ser relacionada a presença da prata, fato já relatado por outros autores (Bhumi et al., 2015). Com relação às bandas em aproximadamente 654 e 1042, devido à baixa resolução obtida utilizando laser nesse comprimento de onda (532 nm), optou-se por buscar um instrumento com maior resolução e a utilização de um laser em um comprimento de onda (785 nm) que favorecesse a compreensão dos eventos moleculares na região em número de onda variando de 300 a 1500 cm<sup>-1</sup>.

Os espectros adquiridos utilizando o laser de 785 nm apresentou mais resolução e possibilitou a detecção de picos ou bandas em 329, 584, 675, 718, 814 e 1039, 1183

cm<sup>-1</sup>. O pico 1039 cm<sup>-1</sup> foi observado nas AgNPs-CbC, assim como no AgNO<sub>3</sub>, e correlaciona-se ao estiramento simétrico N-O, como observado previamente em um estudo que investigou diversos materiais à base de prata, incluindo o nitrato de prata (Martina et al., 2012). Dessa forma, os demais picos e bandas detectados nas AgNPs-CbC poderiam estar associados a pequenas moléculas que poderiam estar adsorvidos na superfície das AgNPs-CbC, estando relacionados com as moléculas presentes no extrato CbC. O pico muito intenso detectado em 814 cm<sup>-1</sup> já foi correlacionado com deformações planares do CH de anéis aromáticos (López 2013) e reflete informações estruturais sobre o ambiente químico de diversos compostos polifenólicos, como flavonoides, os quais foram posteriormente confirmados como presentes no CbC. O pico detectado em 675 cm<sup>-1</sup> também tem sido considerado útil como diagnóstico da presença de flavonoides em espectros adquiridos na região do infravermelho. Já a banda detectada em 584 cm<sup>-1</sup> pode ser correlacionada à deformação de anéis presentes em compostos fenólicos (Contreras-Cáceres et al., 2011). As bandas menos intensas com sinais em 718 e 1183 cm<sup>-1</sup> não puderam ser correlacionadas a nenhum ambiente químico previamente descrito na literatura, mas o pico em 329 pode ser relacionado à propriedade cristalina das AgNPs-CbC como já foi detectado para outros tipos de NPMs (Maiti et al, 2014), mas esse fato ainda precisa ser verificado futuramente por meio de difração de raios X.

**Tabela IV 7.** Sumarização das bandas de absorção identificadas a partir das análises de espectroscopia Raman.

Comprimento de onda (cm <sup>-1</sup> )	Vibração	Grupo funcional ou componente	Referência
1582	Ag	-	Bhumi et al., 2015
1388	Ag	-	Bhumi et al., 2015
1039	N-O	Nitrato de prata	Martina et al., 2012
814	CH	Anéis aromáticos polifenólicos	López 2013
584		Anéis aromáticos	Contreras-Cáceres et al., 2011

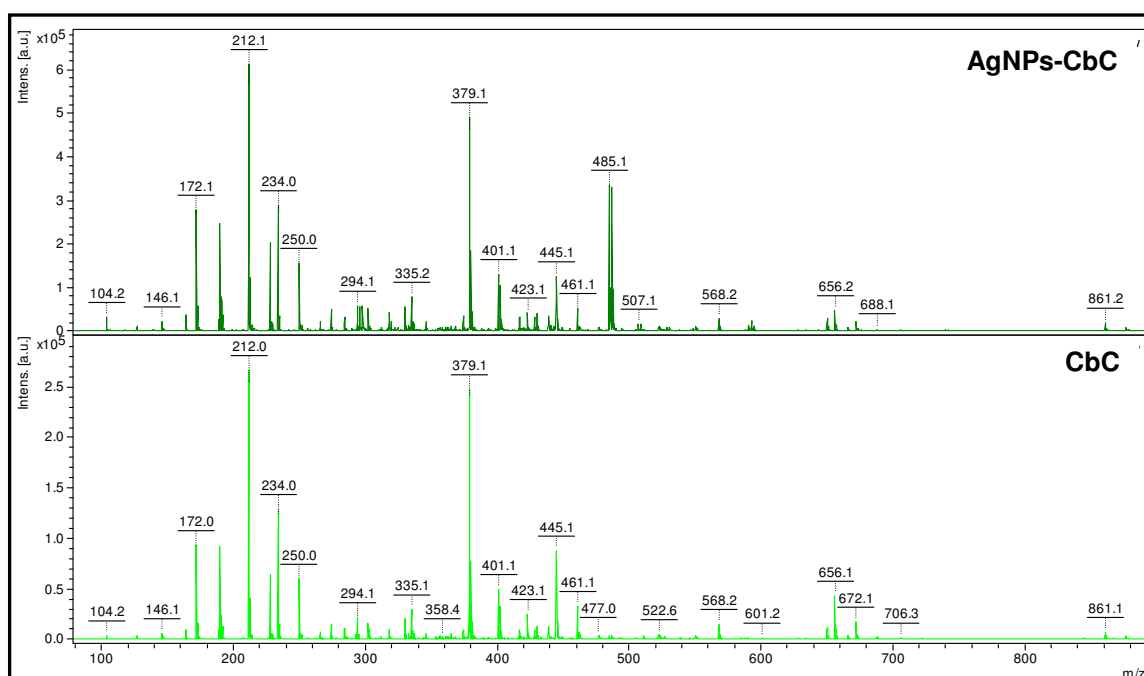


**Figura IV 23.** Espectros obtidos por espectroscopia Raman de AgNPs-CbC e CbC a 1 mg/mL utilizando laser de 532 nm no intervalo de 300 a 2800 cm<sup>-1</sup> (A) e laser de 785 nm (B) no intervalo de 300 a 1700 cm<sup>-1</sup>.

*Perfis de componentes moleculares presentes nas AgNPs-CbC e CbC*

As AgNPs-CbC e seus respectivos controles também foram avaliados por MALDI-TOF MS visando à determinação de perfis dos componentes moleculares presentes no CbC eventualmente relacionados com a formação das nanopartículas, mas principalmente que ainda estariam associados à superfície das AgNPs-CbC (Figura IV 24). Exceto por alguns íons específicos (m/z 485 e 487), não foram observadas diferenças expressivas nos perfis dos componentes moleculares de baixa massa entre as

duas amostras analisadas e sendo muitos dos íons detectados relacionados com a própria matriz utilizada para ionização por MALDI-TOF MS ( $m/z$  172, 212, 379, entre outros). Os dois íons,  $m/z$  485 e 487, são os mesmos identificados nas AgNPs-CsC (Capítulo II) e são possíveis resultados de modificações em uma mesma molécula ou classe de moléculas. Sendo assim, foi realizada análise do extrato CbC por cromatografia líquida de alta eficiência ultrarrápida em fase reversa seguida de análise por espectrometria de massa de ultra alta resolução (RP-UFLC-UHR MS) visando à separação, determinação de massa exata e identificação dos componentes moleculares presentes em maior abundância relativa nos extratos e potencialmente responsáveis pelo processo de biorredução e estabilização das AgNPs-CbC.



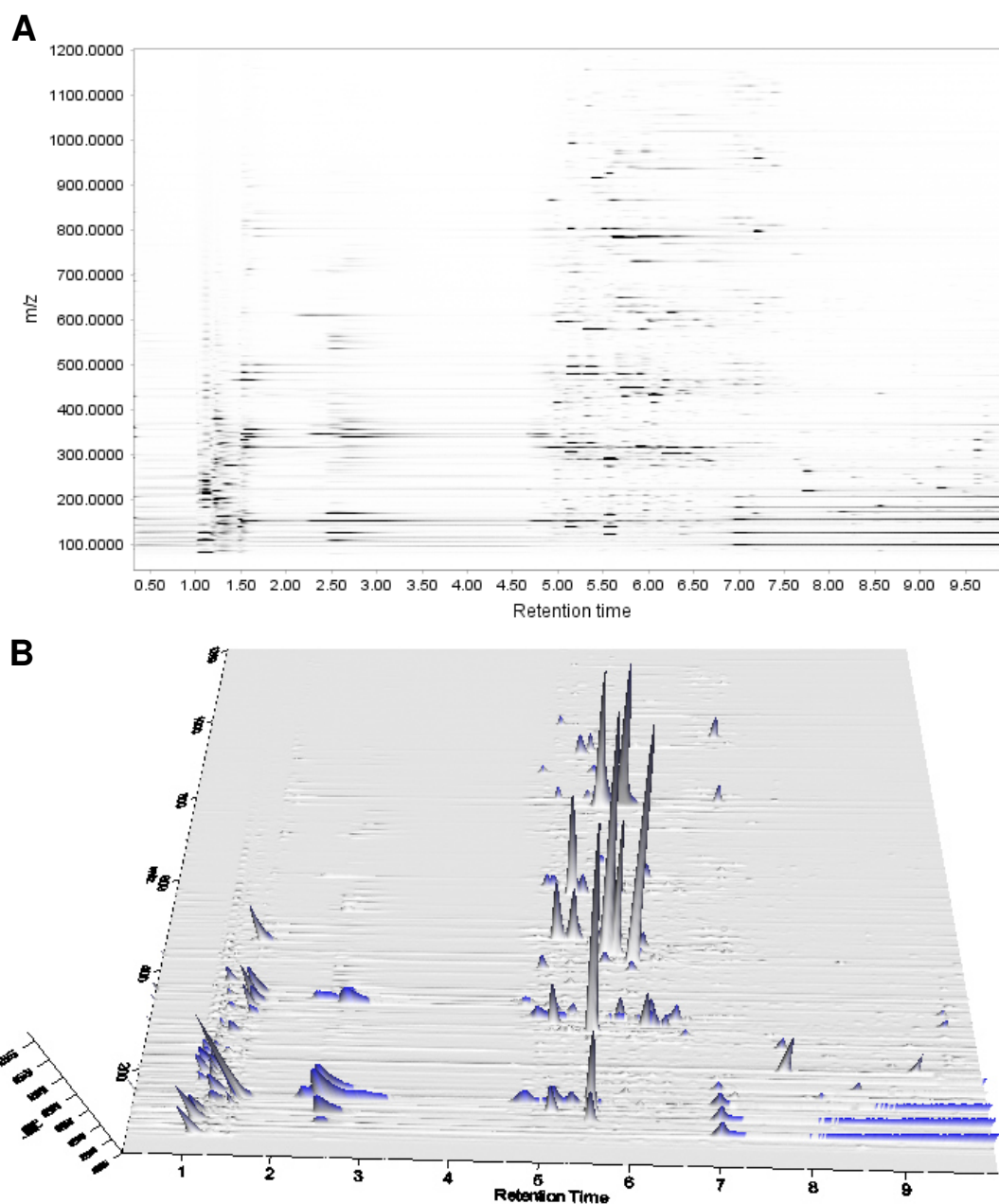
**Figura IV 24.** Espectros de massa MALDI-TOF adquiridos em modo refletido positivo dos perfis de baixa massa molecular de AgNPs-CbC e CbC.

#### *Identificação dos principais componentes moleculares presentes no CbC*

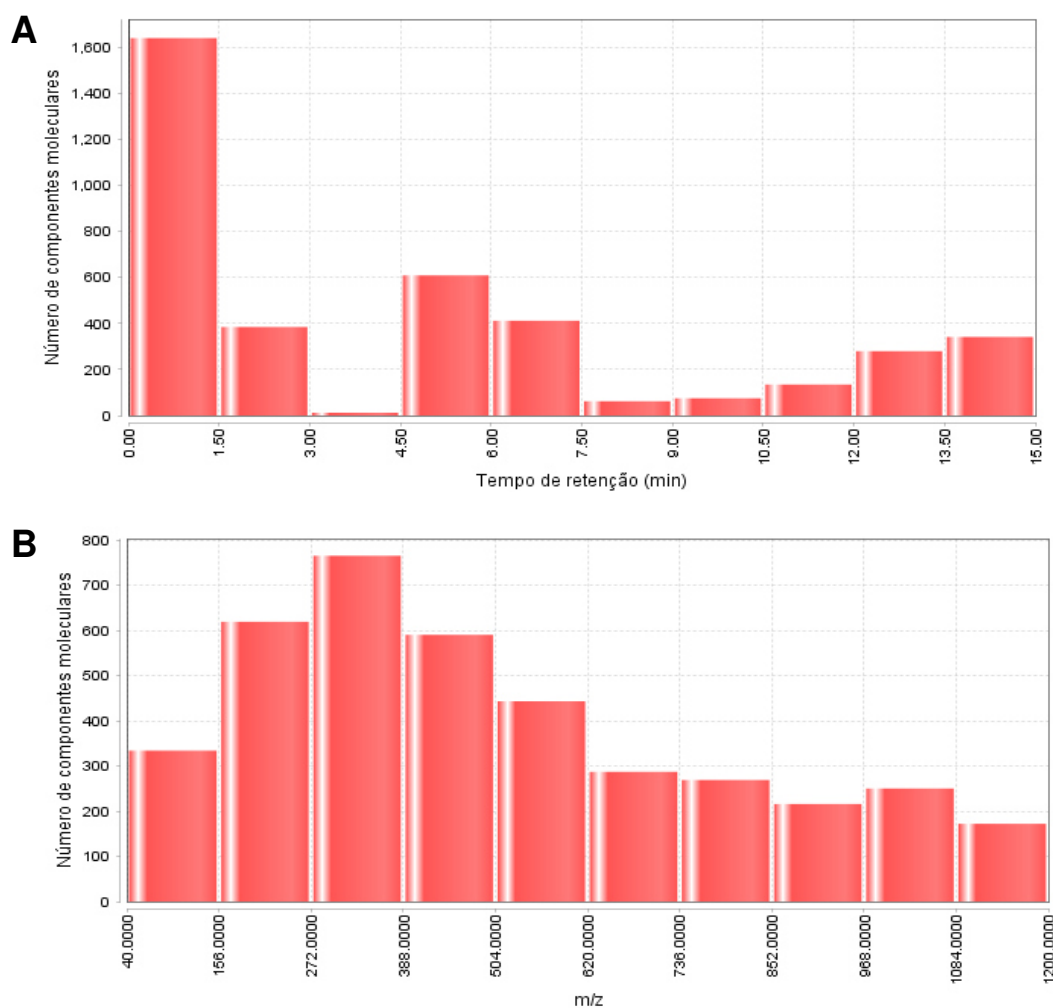
A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) tem sido apontada como uma ferramenta imprescindível em estudos de metabolômica. Isso porque, as análises de LC-MS possibilitam a separação e identificação de prováveis marcadores biológicos por meio dos inúmeros íons caracterizados por tempos de retenção e razões massa/carga ( $m/z$ ) específicos (Tsai, 2014). No entanto, para que isso

seja possível, é necessária a utilização de instrumentos analíticos que operem em alta resolução e acurácia para que possibilitem a detecção dos componentes moleculares com valores muito próximos aos da massa exata das moléculas carregadas (tipicamente com erros inferiores a 10 ppm, além de ser necessária a utilização de bancos de dados confiáveis e com informações de múltiplas moléculas. Ainda assim, todas as identificações são ainda consideradas tentativas visto que não são realizadas análises de ressonância magnética nuclear (RMN) acopladas ao sistema. Assim, os prováveis componentes moleculares presentes em CbC potencialmente envolvidos nos processos de redução e/ou estabilização das AgNPs foram identificados por LC-MS.

A inspeção visual do mapa bidimensional obtido pelos tempos de retenção e razões  $m/z$  dos íons detectados indicou a presença de inúmeros íons com diferentes  $m/z$ , referentes a moléculas eluídas principalmente nos tempos de 1 a 2 e 5 a 7 min (Figura IV 25A). Esse aspecto foi confirmado e reforçado pela representação 3D onde também foi possível observar variações notórias nas intensidades dos íons detectados (Figura IV 25). Análises quantitativas da abundância de componentes por meio de representações utilizando histogramas de distribuição em intervalos de classes indicaram que a maioria dos componentes moleculares eluíram nos tempos compreendidos entre 1 a 3 e 4 a 7 minutos (Figura IV 26A) e que foi possível a detecção de 3422 íons, sendo que a maioria está compreendida na faixa de  $m/z$  entre 150 a 600 (Figura IV 26B).



**Figura IV 25.** Representações 2D e 3D dos íons detectados a partir das análises de LC-MS do extrato CbC. Foram excluídos os calibrantes internos, assim como os componentes moleculares detectados antes do início do gradiente de eluição (antes de 0,3 min) e íons contaminantes que foram detectados (após 10 min).

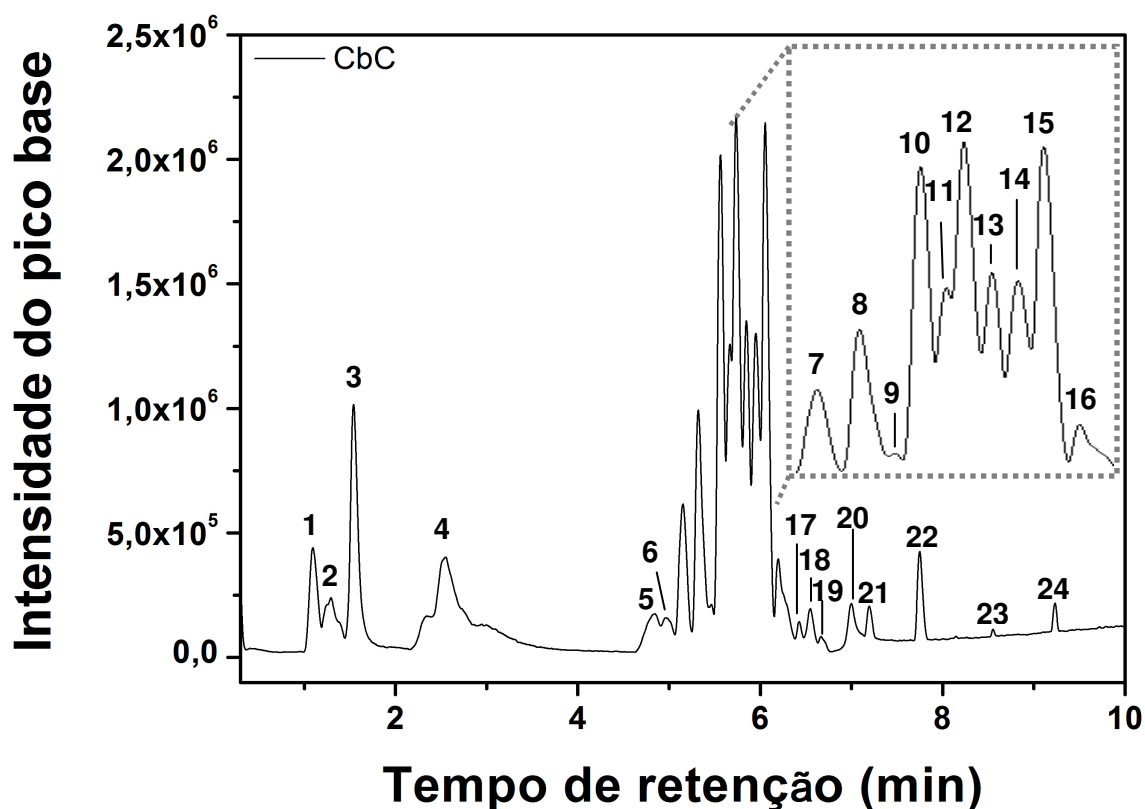


**Figura IV 26.** Histograma de distribuição em intervalos de classes do número de componentes detectados nos tempos de retenção dos componentes moleculares detectados por LC-MS de CbC (A). Histograma de distribuição em intervalos de classes do número de componentes moleculares detectados nas razões m/z de CbC (B).

De forma geral, as folhas de *C. brasiliense* são descritas em relação às classes de compostos como contendo taninos, saponinas, esteroides, cumarinas, resinas, terpenos e flavonoides (Porto, 2008; Dias et al., 2011). Contudo, pouco se sabe sobre a identidade molecular dos constituintes que fazem parte do perfil metabólico das folhas dessa espécie de planta, aja visto que a elucidação da constituição molecular de *C. brasiliense* tem sido mais extensivamente realizada com a casca e o fruto do Pequiizeiro (Rocha, et al., 2015). A casca do fruto é constituída por diversos componentes, dentre eles ácido gálico, ácido hidroxibenzoico, quercetina e ácido trihidroxidobenzeno (Rocha et al., 2015); e no fruto já foi descrita a presença de ácido gálico, ácido quínico, quercetina e quercetina 3-O-glicosídeo (Roesler et al., 2008), sendo todos estes potentes antioxidantes.



O fracionamento do extrato CbC possibilitou a obtenção de um total de 24 frações com sinais mais intensos e tempos de retenção distintos (Figura IV 27). A partir dessas frações foram identificados alguns componentes moleculares por meio de espectrometria de massa (Tabela IV 8 e Figura IV 28). Foram identificados um total de 25 componentes moleculares majoritários de CbC, sendo eles apigenina 7-o-glicosídeo, luteolina 6-c-glicosídeo, catequina ou epicatequina, pedunculagina, punicalina, fragmento de flavonoides (aglicona), procianidina b, ácido hidroxibenzoico, quercetina 3-o-glicosídeo, galocatequina ou epigalocatequina, quercetina, teogalina, ácido benzoico, ácido fosfórico, ácido gálico, ácido hidroxicinâmico, 5'-o-β-d-glucosylpyridoxine, hidroxiquercetina, levoglucosan ou galactosana, hidroxiquinol, anaferina, ácido elágico, soyasaponina III, quercetina 3-glicosídeo, miricitrina 2"-o-galato (Tabela IV 8). Vale ressaltar que alguns componentes não foram passíveis de serem identificados.

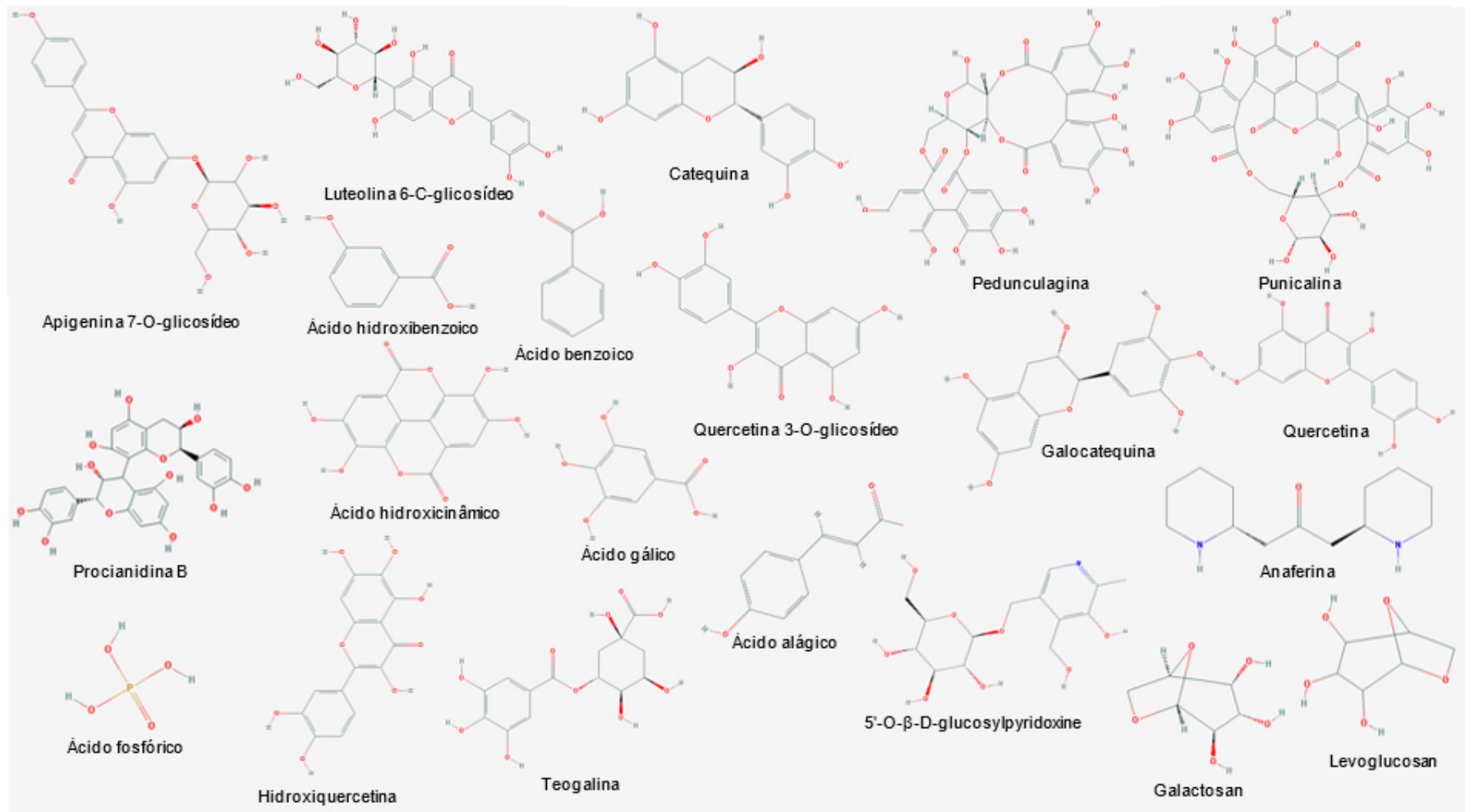


**Figura IV 27.** Perfil cromatográfico com base na intensidade dos componentes moleculares detectados com sinais mais intensos (picos base) presentes no extrato aquoso de folhas de *C. brasiliense* (A) fracionados em coluna  $C_{18}$  sob fluxo de 0,2 mL/min de ACN + 1% de ácido fórmico. Os números marcam os picos correspondentes às frações contendo os componentes moleculares posteriormente identificados com a massa acurada (exata) obtida por meio de espectrometria de massa em ultra alta resolução.

**Tabela IV 8.** Componentes moleculares majoritariamente detectados em extrato aquoso das folhas de pequi (CbC) utilizando cromatografia líquida ultrarrápida em fase reversa acoplada a espectrometria de massa em ultra alta resolução em modo positivo e ranqueados em ordem decrescente de intensidade relativa. m/z = razão massa/carga; TR = Tempo de retenção;  $\Delta$  m/z = variação de massa molecular entre a massa acurada (experimental) e a massa exata (calculada).

ID	Íon (m/z)	TR (min)	$\Delta$ m/z	Erro (ppm)	Aduto	Fórmula provável	Identidade provável	Classe	%
15	433,1103	6,05	-0,0026	6,06	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	Apigenina 7-O-glicosídeo	Flavonoide	0,39
12	449,1050	5,74	-0,0028	6,31	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	Luteolina 6-C-glicosídeo	Flavonoide	0,63
10	291,0844	5,57	-0,0019	6,57	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	Catequina ou Epicatequina	Flavonoide	0,40
14	785,0775	5,95	-0,0058	7,36	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>34</sub> H <sub>24</sub> O <sub>22</sub>	Pedunculagina	Tanino	0,45
11	783,0626	5,68	-0,0047	5,97	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>34</sub> H <sub>22</sub> O <sub>22</sub>	Punicalina	Tanino	0,36
5	153,0174	4,82	-0,0009	5,60	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	Fragmento de flavonoides (Aglicona)	Flavonoide	1,04
18	315,0693	6,55	-0,0018	5,70	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	Não identificado	Não identificada	0,44
8/9	579,1456	5,31	-0,0037	6,35	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	Procianidina B	Flavonoide	0,25
10	139,0382	5,57	-0,0008	5,54	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	Ácido hidroxibenzoico	Ácido carboxílico	0,28
7	479,0789	5,16	-0,0034	7,05	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>13</sub>	Quercetina 3-O-glicosídeo	Flavonoide	0,30
7	307,0795	5,13	-0,0017	5,63	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	Galocatequina ou Epigalocatequina	Flavonoide	0,10
22	219,1731	7,75	-0,0013	5,80	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	Não identificado	Não identificada	0,22
17	303,0480	6,19	-0,0019	6,36	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	Quercetina	Flavonoide	0,10
3	345,0799	1,55	-0,0014	3,98	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	Teogalina	Polifenol	0,31
10	123,0434	5,55	-0,0007	5,32	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	Ácido benzoico	Ácido carboxílico	0,10
20	98,9836	7,00	-0,0006	5,82	[M+H] <sup>+</sup>	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido fosfórico	Ácido inorgânico	2,94
4	171,0279	2,56	-0,0008	5,26	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	Ácido gálico	Ácido fenólico	0,27
10	165,0537	5,55	-0,0009	5,57	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Ácido hidroxicinâmico	Ácido carboxílico	0,07
3	332,1324	1,51	-0,0018	5,65	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>8</sub>	5'-O-β-D-glucosylpyridoxine	Organoxigenado	0,04
13	319,0428	5,90	-0,0020	6,40	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	Hidroxi-quercetina	Flavonoide	0,05
2	163,0594	1,29	-0,0009	-5,37	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	Levoglucosana ou Galactosana	Carboidrato	0,12
4	127,0383	2,55	-0,0009	7,68	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	Hidroxiquinol	Benzenotriol	0,22
1	198,9391	1,10	-	-	[M+H] <sup>+</sup>	-	Não identificado	Não identificada	0,05
24	225,1948	9,23	-0,0015	6,55	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O	Anaferina	Alcaloide	0,07
16	303,0118	6,29	-0,0015	4,87	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	Ácido elágico	Ácido fenólico	0,12
21	797,4616	7,19	-0,0066	8,25	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>42</sub> H <sub>68</sub> O <sub>14</sub>	Soyasaponina III	Saponina	0,03
16	465,0993	6,19	-0,0035	7,42	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	Quercetina 3-glicosídeo	Flavonoide	0,03
16	617,1094	6,24	-0,0043	7,00	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>16</sub>	Miricitrina 2"-O-galato	Flavonoide	0,03
19	285,0589	6,67	-0,0016	-5,70	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	Não identificado	Não identificada	0,03
23	187,1253	8,55	-	-	[M+H] <sup>+</sup>	-	Não identificado	Não identificada	0,03

\*Foram excluídos dessa lista os íons referentes aos isótopos de uma mesma molécula, os calibrantes internos e contaminantes que foram detectados; assim como os componentes moleculares detectados antes do início do gradiente de eluição (< 0.30 min).



**Figura IV 28.** Estruturas químicas dos componentes moleculares identificados no extrato CbC por busca das massas moleculares determinadas por LC-MS em bancos de dados.

Os flavonoides, em geral, são moléculas com forte propriedade antioxidante, devido às suas capacidades de doar prótons (Osonga et al., 2016; Rajendran et al., 2015). Além disso, diversos estudos têm demonstrado que essas moléculas apresentam a capacidade de reduzir metais na forma iônica para a forma neutra acarretando na formação de NPMs, devido a presença dos grupos -OH e C=O, em suas estruturas químicas (Rajendran et al., 2015). Diversos flavonoides foram identificados como componentes presentes no extrato CbC (Tabela IV 8; Figura IV 28), dentre eles apigenina 7-O-glicosídeo, luteolina 6-C-glicosídeo, catequina ou epicatequina, aglicona, procianidina B, quercetina 3-O-glicosídeo, galocatequina ou epigalocatequina, quercetina, hidroxiquercetina, quercetina 3-glicosídeo e miricitrina 2"-O-galato. Osonga e colaboradores (2016) demonstraram pela primeira vez que a apigenina e quercetina são capazes de reduzir  $Ag^+$  a  $Ag^0$  formando AgNPs esféricas e hexagonais, com diâmetros médios de 10,25 e 23 nm, respectivamente. Apigenina também foi capaz de reduzir íons ouro acarretando na formação de AuNPs (Rajendran et al., 2015). Moléculas de procianidina foram utilizadas eficientemente para a síntese e estabilização de AgNPs, sendo que a capacidade de síntese dessas moléculas foi atribuída à presença de grupos hidroxilas na posição orto- do anel aromático, e posterior estabilização por meio da interação dos átomos de oxigênio da molécula e a superfície das AgNPs (Liang et al., 2014).

Além dos flavonoides, outra classe de moléculas que tem sido apontada como atuante nos processos de biossíntese e estabilização de NPMs são os taninos os quais são antioxidantes poderosos pela sua capacidade de doar átomos de hidrogênio presentes em seus inúmeros grupamentos hidroxila (Shanker et al., 2016). Três taninos foram identificados no extrato CbC (pedunculagina, punicalina e ácido gálico) (Tabela IV 8; Figura IV 28). Dentre eles, o ácido gálico tem sido apontado por inúmeros trabalhos como agente redutor e estabilizante para formação de AgNPs (Wang et al., 2007; Li et al., 2015;). Nesse caso, a redução dos íons prata ( $Ag^+$ ) ocorre devido à oxidação do grupo fenol do ácido gálico, e o composto quinoide formado é adsorvido na superfície das AgNPs atuando como agente estabilizante (Wang et al., 2007). Mais recentemente, os taninos punicalina e pedunculagina, alguns dos constituintes principais do extrato da casca de romã, atuaram como agente redutor e estabilizante na síntese de nanopartículas de zinco (Fuku et al., 2016).

Moléculas de fenóis e polifenóis também foram encontradas no extrato CbC (ácido gálico e teogalina), e a presença dessas classes de moléculas nos extratos tem sido apontada como tendo relação direta com a atividade antioxidante (Choudhary et al., 2016). Acredita-se que inicialmente a oxidação dos fenóis (liberam prótons  $H^+$ ) leva a formação de radicais fenoxi ( $C_6H_5O^-$ ) estáveis. Desta forma os fenóis atuam como agentes redutores sendo oxidados pelo  $AgNO_3$  acarretando na formação das AgNPs (Choudhary et al., 2016).

#### *Síntese de nanopartículas de ouro*

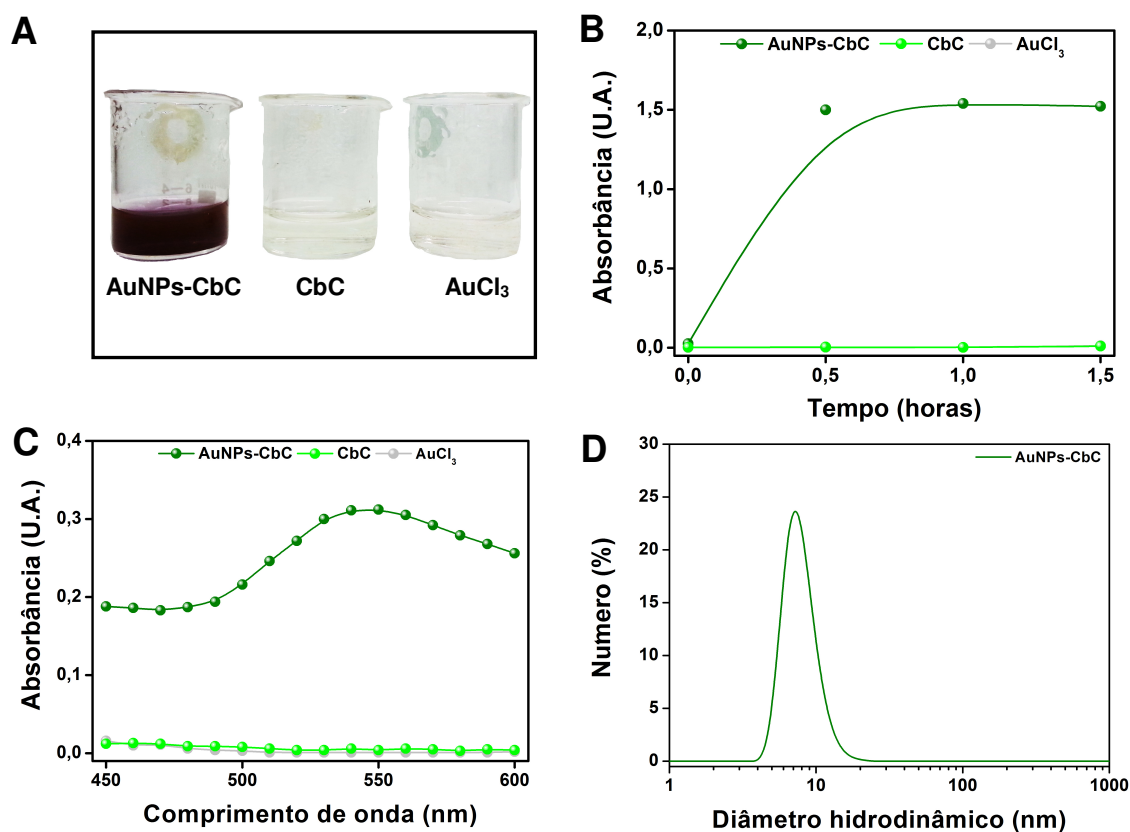
Algumas das moléculas que foram identificadas no extrato aquoso CbC já foram utilizadas na síntese de nanopartículas de ouro (AuNPs). Dentre elas, as moléculas apigenina e a quercetina já foram utilizadas para a síntese de AuNPs e apontadas como sendo responsáveis pelo processo de redução dos íons metálicos (Rajendran et al., 2015) e a quercetina como também sendo importante no processo de recobrimento (Das et al., 2012).

A reação entre CbC e  $AuCl_3$  acarretou em mudanças de coloração do meio reacional de translúcido a roxo (Figura IV 29A), indicando a ocorrência de formação das AuNPs-CbC, a qual foi confirmada pelo aumento de absorção durante o monitoramento espectrofotométrico (Figura IV 29B) com alcance do valor máximo em aproximadamente 30 min. Assim como a prata metálica, ouro metálico também apresenta efeito RPS característico quando nanoestruturado, sendo que este ocorre na faixa compreendida entre 500 e 600 nm (Huang et al, 2010). Sendo assim, as AuNPs foram submetidas a análise por espectroscopia de absorção na região do visível (450 a 600 nm) e tiveram seu pico de absorção máxima no comprimento de onda de 550 nm, indicando a presença de partículas nanométricas (Figura IV 29C).

Avaliação por espalhamento de luz dinâmico das AuNPs apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de  $39,10 \pm 0,75$  nm e índice de polidispersividade de  $0,500 \pm 0,009$ , indicativos de tamanho nanométrico e polidispersividade moderada, respectivamente. Vale ressaltar que a curva de distribuição em número indicou a presença majoritária de partículas com 7,5 nm de diâmetro hidrodinâmico (Figura IV 29). Avaliação por potencial Zeta revelou que as partículas apresentaram carga de superfície de  $-21,3 \pm 0,8$  mV, indicativo de estabilidade coloidal incipiente (ASTM,

1985). Esses resultados confirmaram o potencial redutor de CbC em sintetizar NPMs utilizando diferentes metais nobres. Estudos adicionais devem ser realizados visando a otimização do processo de síntese de AuNPs, utilizando extrato de *C. brasiliense*, e consequentemente aperfeiçoamento das características físico-químicas das AuNPs-CbC.

Poucos estudos têm comparado o potencial de um mesmo extrato vegetal na formação de NPMs a partir de diferentes íons metálicos. Velmurugan e colaboradores (2013) demonstraram o potencial do extrato de rizoma de *Zingiber officinale* (gingibre) para sintetizar AgNPs e AuNPs, as quais apresentaram o pico de RPS em 436 e 531 nm, respectivamente; corroborando os resultados obtidos no presente estudo quanto à possibilidade de bifuncionalidade de certos extratos de plantas para síntese de NPMs.



**Figura IV 29.** Fotografia de béqueres contendo CbC e AuCl<sub>3</sub>, CbC e AuCl<sub>3</sub> após incubação por 1,5 h à 75°C (A). Cinéticas de formação das AuNPs-CbC por 1,5 h a 75°C (B). Curvas de absorção na região do visível após o processo de síntese por 1,5 h a 75°C (C). Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico (em número) obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) a partir das análises das suspensões de AuNPs-CbC (D).

## **Avaliação nanotoxicológica das AgNPs-CbC**

As AgNPs sintetizadas utilizando extrato das folhas de *C. brasiliense* foram utilizadas em ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* visando avaliar possíveis atividades toxicológicas e definir suas potenciais aplicações.

Os ensaios *in vitro* foram realizados em bactérias (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*), leveduras (*Candida albicans*), células de mamíferos normais (fibroblastos, macrófagos e hemácias) e tumorais [câncer de mama murino (4T1) e humano (MCF-7)], nematoides (*Caenorhabditis elegans* e *Meloidogyne incognita*), células de insetos (Sf21), sementes e plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Os ensaios *in vivo* foram realizados em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) em casa de vegetação e em camundongos (C57Bl/6).

### *In vitro*

Estudos *in vitro* fornecem informações rápidas e eficazes para avaliar um grande número de parâmetros toxicológicos de nanopartículas, dentre eles a elucidação de mecanismos de interação e ação em células e organismos, estabelecimento de relações de concentração e efeito, bem como possibilitam o rastreamento de nanomateriais passíveis de serem utilizados para realização de testes *in vivo* (Arora et al., 2012).

### *Inibição de crescimento microbiano - Bactérias e leveduras*

Tem sido demonstrado que AgNPs possuem propriedades antimicrobianas potentes contra bactérias e fungos (Kim et al., 2009; Lee et al., 2010; Huang et al., 2011). Sendo assim, as AgNPs-CbC foram utilizadas em ensaios de concentração inibitória mínima (MIC) contra bactérias *E. coli* e *S. aureus*, e levedura *C. albicans*, visando a identificar a possível menor concentração de AgNPs capaz de inibir o crescimento desses microrganismos.

As AgNPs-CbC inibiram o crescimento visível de *E. coli* e *S. aureus* na concentração de 64 e 256  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Adicionalmente, os íons  $\text{Ag}^+$  também acarretaram em inibição do crescimento das bactérias nas mesmas concentrações das partículas (Tabela IV 9). Vale ressaltar que não foram observadas inibição de crescimento das bactérias após exposição à concentração equivalente de CbC. A ação antimicrobiana das AgNPs pode estar relacionada com a liberação de íons  $\text{Ag}^+$  pelas

nanopartículas, aja visto que as partículas apresentaram a mesma concentração inibitória que  $\text{Ag}^+$  livre.

O efeito antibacteriano das AgNPs tem sido bastante relatado nos últimos anos. Contudo, ainda não se chegou a um consenso sobre o mecanismo de ação pelo qual as partículas atuam (Feng et al., 2008; Prabhu e Poulouse 2012). Diversas teorias têm sido propostas para explicar a ação antibacteriana das AgNPs dentre elas, a que propõe que pode haver liberação de íons de prata pelas nanopartículas, e esses íons podem entrar nas células pela interação com canais iônicos, interagir com os grupos tiol de muitas enzimas vitais e inativá-las, fazendo com que várias funções celulares sejam alteradas. Além disso, os íons  $\text{Ag}^+$  podem levar à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) acarretando em danos na membrana celular, induzindo lise e conseqüentemente morte celular (Prabhu e Poulouse 2012).

A ação bactericida de AgNPs já foi demonstrada por Kim e colaboradores (2007) em nanopartículas obtidas por rota química em concentrações nanomolares para *E. coli* e *S. aureus*. As AgNPs-CbC, também apresentaram ação bactericida, contudo esta ocorreu em concentrações micromolares para os dois microrganismos investigados (Tabela IV 9). Essa diferença pode estar relacionada a diferenças nas rotas de síntese desenvolvidas (tendo em vista que os métodos empregados por Kim e colaboradores foram baseados em metodologias que podem gerar resíduos de síntese tóxicos) ou nas suscetibilidades das cepas de microrganismos utilizadas.

As AgNPs-CbC inibiram o crescimento de *C. albicans* na concentração de 8  $\mu\text{M}$ , sendo que, não ocorreu inibição de crescimento dessa levedura exposta a concentração equivalente de CbC. Íons  $\text{Ag}^+$  também acarretaram em inibição do crescimento das leveduras, mas a uma concentração de 16  $\mu\text{M}$  (Tabela IV 9). Além da inibição de crescimento, as AgNPs-CbC apresentaram efeito fungicida contra *C. albicans* uma vez que não houve recuperação do crescimento celular após o tratamento por 72 h. A atividade antifúngica de AgNPs já foi demonstrada em diversos estudos (Kim et al., 2009; Lee et al., 2010), contudo, os valores de MIC foram variáveis. Este fato pode estar relacionado a diferenças nas rotas de síntese das partículas, resultando em diferenças no tamanho, forma e potencial Zeta de superfície, e conseqüentemente em suas propriedades físico-químicas e estruturais as quais podem influenciar nas propriedades antimicrobianas das AgNPs.



**Tabela IV 9.** Concentração inibitória mínima (MIC) das AgNPs-CbC, AgNO<sub>3</sub> e CbC contra *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*. Valores representados a condição na qual ocorreu a inibição em pelo menos duas réplicas. N/A: Nenhuma Atividade.

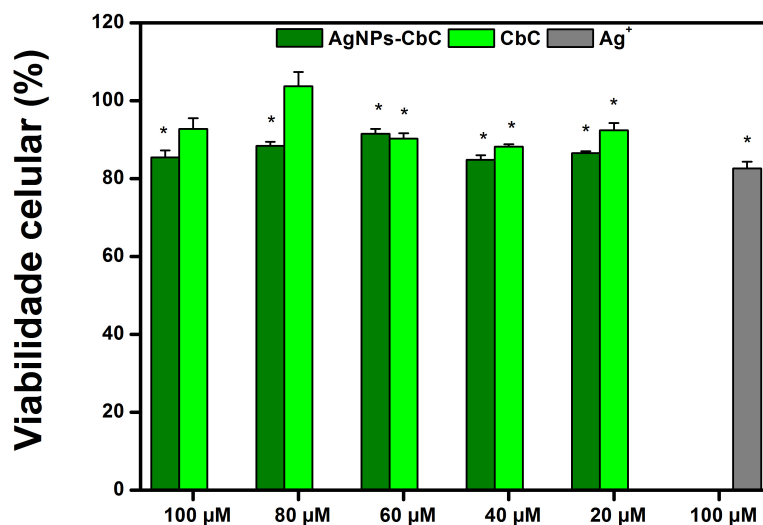
Microorganismos	MIC - $\mu\text{M}$		
	AgNPs-CbC	AgNO <sub>3</sub>	CbC
<i>E. coli</i>	64,0	64,0	N/A
<i>S. aureus</i>	256,0	256,0	N/A
<i>C. albicans</i>	8,0	16,0	N/A

#### *Viabilidade celular de fibroblastos e macrófagos*

O interesse na utilização de AgNPs em produtos de consumo tem crescido em virtude de apresentarem atividades antimicrobianas. Sendo assim, as AgNPs tem sido utilizadas na produção de vários produtos médicos, entre eles cateteres e implantes, têxteis, indústria de alimentos, tintas e produtos de uso doméstico (Lee et al., 2010; Vigneshwaran et al., 2007), surgindo a necessidade de determinar os potenciais efeitos biológicos frente à exposição à AgNPs. Sendo assim, ensaios *in vitro* utilizando diversas células de mamíferos têm sido realizados com vistas a avaliar potenciais atividades biológicas dessas nanopartículas como indicadores de toxicidade.

Neste contexto, a viabilidade celular de fibroblastos murinos (NIH3T3) foi avaliada após a exposição às AgNPs-CbC por meio de ensaio colorimétrico utilizando MTT (Mosmann, 1983). AgNP-CbC diminuíram a viabilidade de fibroblastos em no máximo 14,6%, (Figura IV 30); não sendo observada relação de toxicidade dose-dependente para as concentrações avaliadas. Entretanto, tem sido relatado que AgNPs apresentam alto potencial citotóxico para células de mamíferos. Lee e colaboradores (2014) demonstraram que AgNPs, sintetizadas por rota química, reduziram a viabilidade de fibroblastos de maneira concentração dependente, sendo que a máxima concentração testada (40  $\mu\text{g/mL}$ ) reduziu a viabilidade das células em ~70%. Além disso, foi demonstrado que as AgNPs foram internalizadas, acumularam-se no compartimento endossomal, induziram a formação de EROs e induziram as células à morte celular por apoptose e autofagia. Comparativamente, as AgNPs-CbC sintetizadas por rota de síntese verde, testadas em fibroblastos no presente estudo, a uma concentração 2,5× maior (100  $\mu\text{g/mL}$ ), reduziram a viabilidade em apenas 24,4%, indicando uma citotoxicidade menor do que aquela observada em estudo anterior com partículas obtidas por rota de síntese química (Lee et al., 2014). Esse resultado pode

estar diretamente relacionado às diferenças de resíduos formados em cada um dos métodos de síntese e sugere que AgNPs-CbC possam ser menos nocivas a células de mamíferos do que AgNPs produzidas por rotas de síntese química.

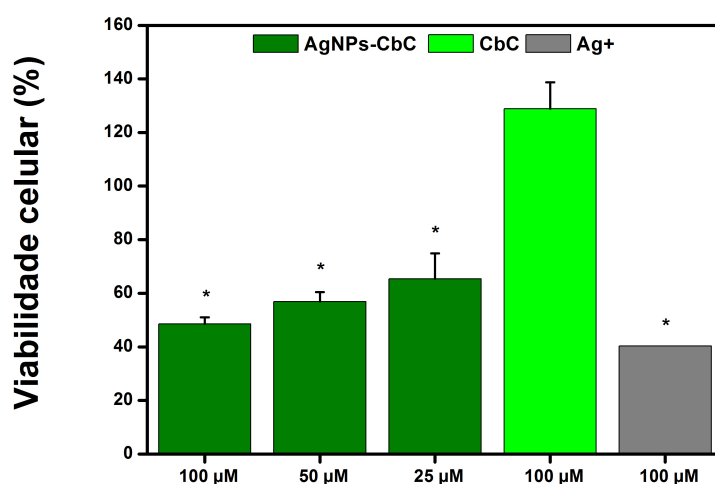


**Figura IV 30.** Avaliação da viabilidade de fibroblastos murinos (NIH3T3) pelo ensaio de MTT após 24 h de exposição a AgNPs-CbC, CbC e Ag<sup>+</sup> livre *in vitro*. \*Diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle (100% de viabilidade). Valores representados como a média  $\pm$  erro padrão da média.

Os macrófagos são células do sistema imunitário que desempenham um papel fundamental na resposta inflamatória, sendo responsáveis diretos pelo processo de fagocitose de agentes patogênicos, debris celulares e partículas estranhas (Junqueira e Carneiro 2008). Tem sido relatado que AgNPs, sintetizadas por rotas químicas, apresentam toxicidade contra macrófagos (Park et al., 2011; Zhang et al., 2011), sendo que poucos estudos têm avaliado AgNPs sintetizadas por rotas verdes neste tipo celular (Hazarika et al., 2016). Sendo assim, a viabilidade celular de macrófagos peritoneais de camundongos (C57Bl/6) também foi avaliada após a exposição às AgNPs-CbC, CbC e Ag<sup>+</sup> livre. AgNPs-CbC nas concentrações de 100, 50 e 25  $\mu$ M reduziram de maneira concentração dependente a viabilidade de macrófagos em 51,5%, 46,7% e 35,66%, respectivamente, em relação ao controle. Ag<sup>+</sup> na maior concentração testada (100  $\mu$ M) reduziu a viabilidade em 59,7%, e CbC em concentração equivalente de extrato presente nas partículas não acarretou em qualquer alteração na viabilidade celular (Figura IV 31).

Hazarika e colaboradores (2016) avaliaram a viabilidade celular de macrófagos murinos em cultura (RAW264.7) após exposição a AgNPs sintetizadas utilizando

extrato de *Thalictrum foliolosum* e observaram redução na viabilidade celular para concentrações acima de 5  $\mu\text{M}$ . Adicionalmente, tem sido relatada correlação entre o tamanho das partículas e o desencadeamento de efeitos inflamatórios e toxicológicos em macrófagos (Park et al., 2011). Contraditoriamente, AgNPs sintetizadas utilizando extrato de flores de *Lonicera hypoglauca* não acarretaram em alteração da viabilidade celular de macrófagos murinos (RAW 264.7) (Jan et al., 2016). Vale ressaltar que as diferenças de atividades das AgNPs podem estar relacionadas com diferenças nas características físico-químicas das partículas, bem como devido às suscetibilidades celulares (Ahmed et al., 2016), aja visto que os macrófagos utilizados no presente estudo são oriundos de células obtidas de cultivo primário.



**Figura IV 31.** Avaliação da viabilidade de macrófagos peritoneais murinos (C57Bl/6) pelo ensaio de MTT após 24 h de exposição a AgNPs-CbC, CbC e  $\text{Ag}^+$  livre em diferentes concentrações *in vitro*. \*Diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle (100% de viabilidade). Valores representados como a média  $\pm$  erro padrão da média, referentes a triplicatas experimentais.

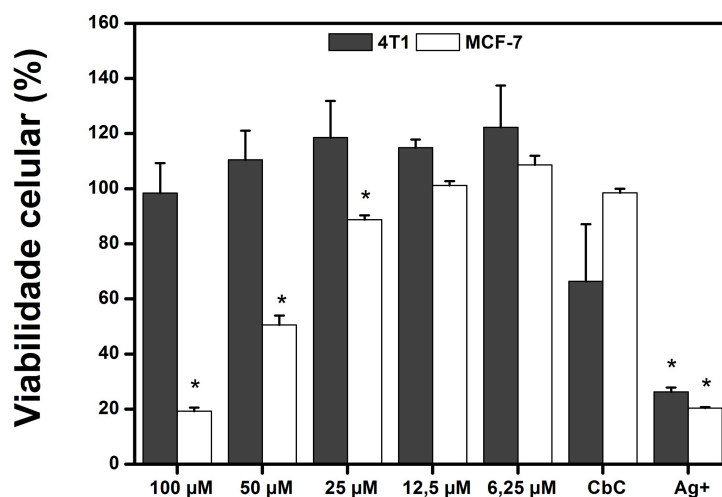
#### *Viabilidade de células de câncer de mama murino e humano*

Além da atividade antimicrobiana sabidamente conhecida, nos últimos anos a atividade anticancer de AgNPs também tem sido relatada (Zhang et al., 2016). Sendo assim e visando avaliar outras possíveis aplicações das AgNPs-CbC, a possível atividade anticancer *in vitro* foi avaliada em duas linhagens tumorais de mama.

Quando testadas diferentes concentrações de AgNPs-CbC em células de câncer de mama murino (4T1) e humano (MCF-7), não foi observada redução na viabilidade das células 4T1 para nenhuma das concentrações avaliadas (Figura IV 32). Contudo, foi

observada diminuição estatisticamente significativa na viabilidade das células MCF-7 em 80,8%, 49,5% e 11,2% para as concentrações de 100, 50 e 25  $\mu\text{M}$ , respectivamente, indicando efeito dose-dependente. Esses achados podem indicar potencial seletividade das AgNPs-CbC entre as linhagens ou até mesmo espécies. AgNPs sintetizadas por rota de síntese verde utilizando extrato de *Spirulina platensis* (microalga) reduziram a viabilidade de células de câncer de mama (MCF-7), sendo a citotoxicidade dependente da concentração utilizada. Concentração de AgNPs semelhante à do presente estudo reduziu em mais de 90% a viabilidade celular (Rejeeth et al., 2014).

Jan e colaboradores (2016) avaliaram a viabilidade de células MCF-7 após 48 h de exposição a 500  $\mu\text{g/mL}$  de AgNPs sintetizadas utilizando extrato das flores de *Lonicera hypoglauca*. As AgNPs reduziram a viabilidade celular em mais de 80% acarretando na indução de processo apoptótico, o qual foi confirmado pela regulação positiva do gene supressor de tumor p53, e subsequente aumento na expressão de moléculas pró-apoptóticas como Bax, caspase-3 e caspase-9 (Jan et al., 2016).



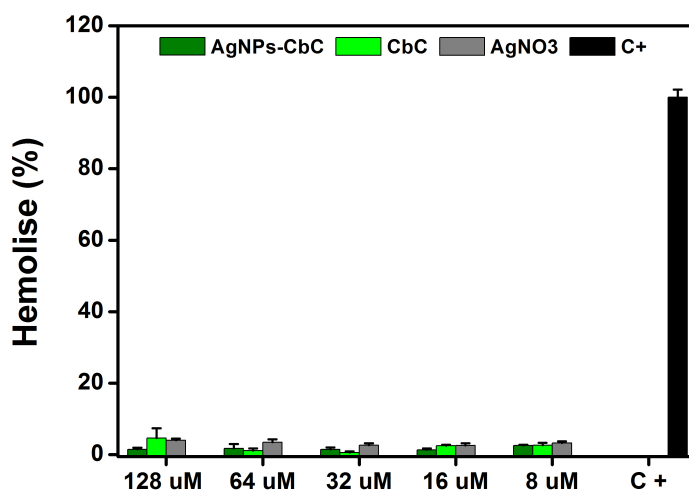
**Figura IV 32.** Avaliação da viabilidade de células de câncer de mama murino (4T1) e humano (MCF-7) pelo ensaio de MTT após 24 h de exposição a AgNPs-CbC, CbC (100  $\mu\text{M}$ ) e  $\text{Ag}^+$  livre (100  $\mu\text{M}$ ) em diferentes concentrações *in vitro*. \*Diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle (100% de viabilidade). Valores representados como a média  $\pm$  erro padrão da média.

#### Atividade hemolítica

AgNPs-CbC foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade de células de câncer de mama indicando possibilidade de aplicação dessas partículas para aplicação em sistemas biomédicos. Sendo assim, as AgNPs-CbC foram utilizadas em

ensaio de atividade hemolítica visando avaliar potencial toxicidade a células circulantes na corrente sanguínea de vertebrados. Nos últimos anos tem sido discutido o potencial efeito que AgNPs podem causar quando em contato com o sangue, como por exemplo, hemólise (lise de hemácias), formação de proteína corona e potencial agregação e aglomeração das AgNPs; além de interação com plaquetas e alteração das cascatas de coagulação (Huang et al., 2016).

O sangue é um tecido conjuntivo complexo composto por vários tipos celulares, os quais possuem funções específicas e imprescindíveis para a manutenção da homeostase do organismo. Dentre as células que constituem o sangue, as hemácias são as mais abundantes. Sendo assim, AgNP-CbC, CbC e Ag<sup>+</sup>, diluídas em diferentes concentrações, foram incubadas com sangue murino (C57Bl/6) visando avaliar potencial atividade hemolítica. Não foi observada relação dose-dependente para nenhuma das amostras testadas. As AgNPs-CbC não desencadearam hemólise considerável, indicando que 98,5% das células mantiveram-se íntegras até mesmo para a maior concentração testada (100 µM) (Figura IV 33), sendo considerada como sendo um sistema com baixa taxa hemolítica. Esses resultados diferem-se dos encontrados por Huang e colaboradores (2016) que observaram taxa hemolítica dose-dependente para AgNPs com 20 nm. A diferença de atividade hemolítica pode estar relacionada às propriedades físico-química das AgNPs testadas aja visto que no presente estudo as AgNPs foram sintetizadas por rota de síntese verde e a outra por rota química.

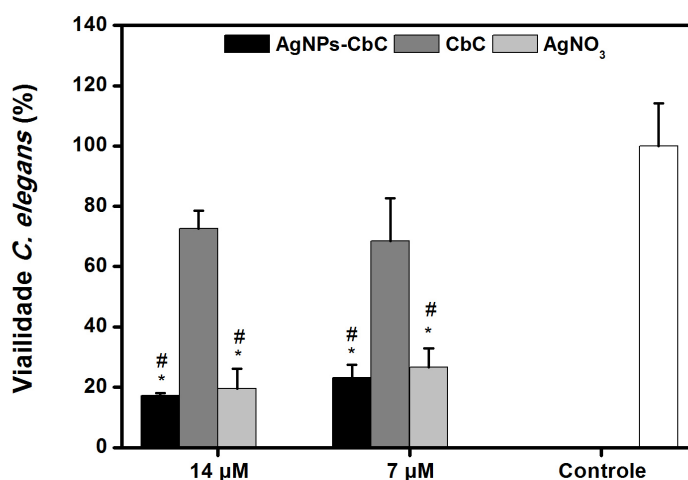


**Figura IV 33.** Avaliação do percentual de hemólise avaliado em ensaio com hemácias de camundongos após exposição à AgNPs-CbC, CbC e Ag<sup>+</sup> livre *in vitro*. Valores representados como a média ± erro padrão da média de triplicatas.

Além do potencial das AgNPs para aplicações biomédicas devido às suas características antimicrobianas e antitumorais, nos últimos anos tem sido discutida a potencialidade dessas partículas para o controle de nematoides (Ahn et al., 2014, Rho et al., 2009; Yang et al., 2012). Contudo, a maioria dos estudos utilizam AgNPs obtidas por rotas químicas, sendo que poucos estudos avaliaram a atividade de AgNPs obtidas por rotas verdes utilizando plantas (Silva 2014).

#### Atividade contra nematoides

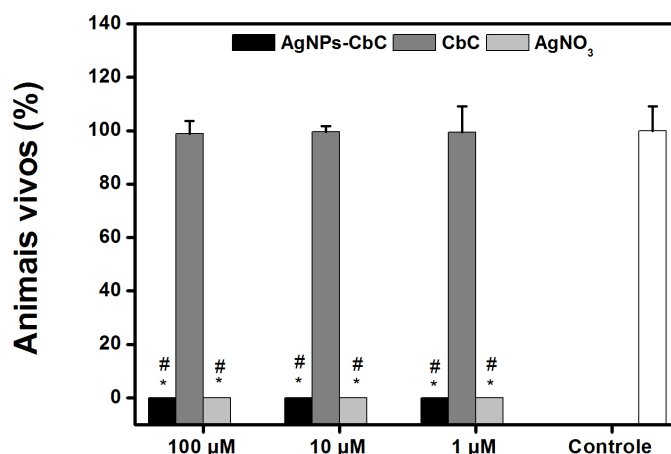
*Caenorhabditis elegans* é um nematoide de vida livre de solo utilizado como organismo modelo animal em testes de toxicidade animal *in vitro*. Nesse sentido, as AgNPs-CbC, e seus respectivos controles, foram utilizados em ensaios de viabilidade em *C. elegans*, por meio de ensaio colorimétrico utilizando MTT. As AgNPs reduziram em 82,8% e 86,9% a viabilidade dos nematoides quando comparadas ao controle sem tratamento para as concentrações de 14 e 7  $\mu$ M, respectivamente ( $P < 0,05$ ) (Figura IV 34). Esses resultados foram semelhantes aos tratamentos com  $AgNO_3$  livre, para as duas concentrações testadas, onde a redução da viabilidade foi de 80,5% e 84,3%. AgNPs sintetizadas por rotas químicas contendo diferentes revestimentos também acarretaram na morte de *C. elegans*, sendo que o estresse oxidativo mitocondrial e danos ao DNA foram apontados como sendo os principais mecanismos de toxicidade das nanopartículas (Yang et al., 2012).



**Figura IV 34.** Viabilidade de nematoides *Caenorhabditis elegans* após exposição por 24 h a AgNPs-CbC, CbC e  $AgNO_3$ . Diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle (\*) e CbC (#). Valores representados como a média  $\pm$  erro padrão da média de triplicatas.

Tendo em vista que as nanopartículas apresentaram atividade nematicida para o nematoide modelo *C. elegans*, a atividade das AgNPs-CbC também foi investigada contra *M. incognita*, um fitonematoide formador de galhas em plantas e praga responsável pela devastação de inúmeras culturas brasileiras, dentre elas algodão, tomate e soja.

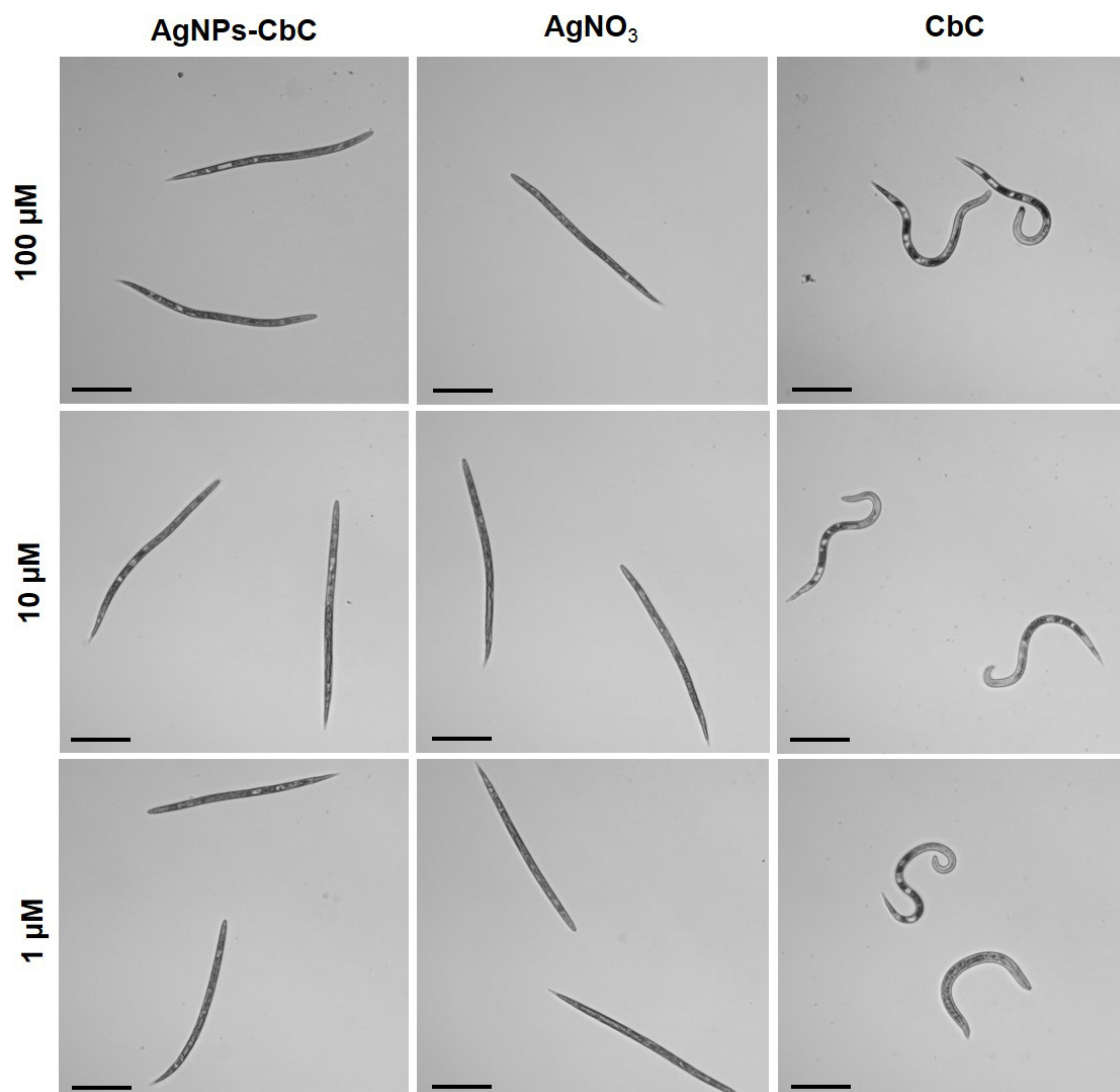
AgNPs-CbC e  $\text{Ag}^+$  levaram à morte de 100% dos nematoides para as três diferentes concentrações testadas (100, 10 e 1  $\mu\text{M}$ ), sendo que CbC não alterou a viabilidade dos nematoides (Figura IV 35). Em um estudo recente envolvendo síntese de AgNPs por rota química também foram reportados 100% de imobilidade e mortalidade para nematoides *M. incognita* expostos a três concentrações distintas 800, 400 e 200 mg/mL (Ardakani, 2013), corroborando os dados obtidos no presente estudo, ainda que naquele estudo em concentrações muito maiores do que aquelas utilizadas no presente estudo.



**Figura IV 35.** Percentual de indivíduos de *Meloidogyne incognita* vivos após ensaio de recuperação por 24 h após a exposição às AgNPs-CbC, CbC e  $\text{AgNO}_3$  por 24 h em três diferentes concentrações. Diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle (\*) e prata livre (#). Valores representados como a média  $\pm$  erro padrão da média de triplicatas com 60 animais cada.

A análise dos aspectos morfológicos revelou que os nematoides, após 24 h de incubação com as AgNPs-CbC e  $\text{Ag}^+$ , apresentaram-se esticados, paralisados (ausência de movimentação serpentiforme detectável em microscópio) e com presença de pigmentação escura (Figura IV 36). Os aspectos esticados e não serpentiformes são característicos da morte desses organismos. Resultados semelhantes foram obtidos por Silva (2014) após o tratamento de nematoides *M. incognita* com AgNPs sintetizadas

com extrato de folhas da mangabeira. Apesar dos mecanismos de morte ainda não estarem totalmente elucidados, tem sido relatado que as AgNPs acarretam a morte dos nematoides pela indução de estresse oxidativo mitocondrial e danos ao DNA (Ahn et al., 2014).



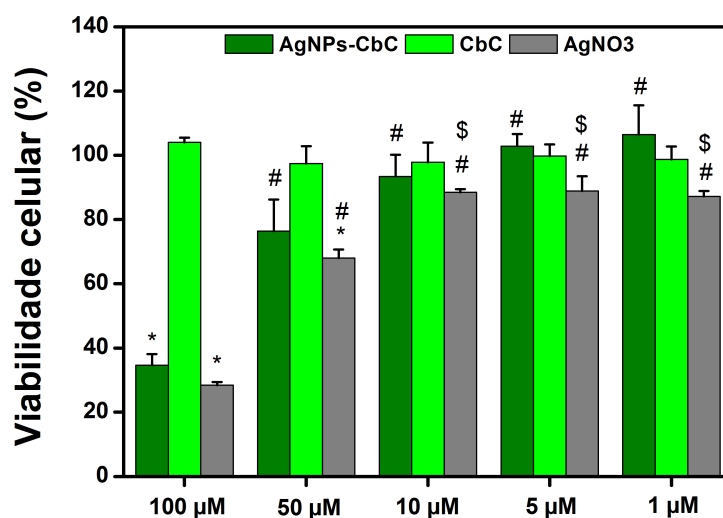
**Figura IV 36.** Imagens fotográficas em microscopia de luz de nematoides *Meloidogyne incognita* após exposição a diferentes concentrações de AgNPs-CbC, AgNO<sub>3</sub> e CbC por 24 h *in vitro*. Barra = 25 μm.

Uma vez que as AgNPs-CbC, em concentrações extremamente baixas (1 μM), foram capazes de causar a morte dos fitonematoides (*M. incognita*) e vislumbrando sua potencial aplicação no campo contra esses e outros organismos considerados pragas de plantas, as AgNPs também foram testadas em células de insetos pragas de plantas, mantidas em cultura.



### Atividade contra células de inseto (Sf21)

As células de insetos têm sido amplamente estudadas para a utilização na produção de biopesticidas. Sendo assim, a viabilidade de células de inseto (Sf21) foi avaliada após a exposição às AgNPs-CbC, CbC e Ag<sup>+</sup> livre, por meio de ensaio colorimétrico utilizando MTT (Mosmann, 1983). AgNP-CbC e Ag<sup>+</sup>, na concentração testada de 100 µM reduziram a viabilidade das células (Sf21) em 65%, e 71%, respectivamente (Figura IV 37). Vale ressaltar que CbC não acarretou em redução da viabilidade celular em nenhuma das concentrações equivalentes testadas.

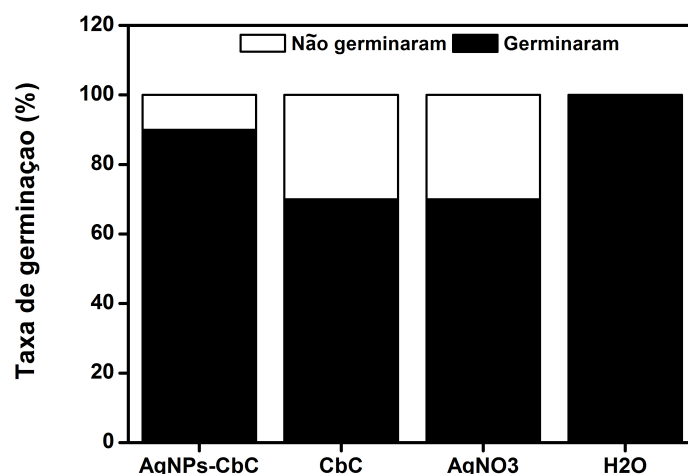


**Figura IV 37.** Avaliação da viabilidade de células ovarianas isoladas de *Spodoptera frugiperda* (Sf21) pelo ensaio de MTT após 24 h de exposição à AgNPs-CbC, CbC e Ag<sup>+</sup> livre *in vitro*. \*Diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle (100% de viabilidade); #Diferença estatisticamente significativa em relação às concentrações de 100 e 50 µM. Valores representados como a média  $\pm$  erro padrão da média.

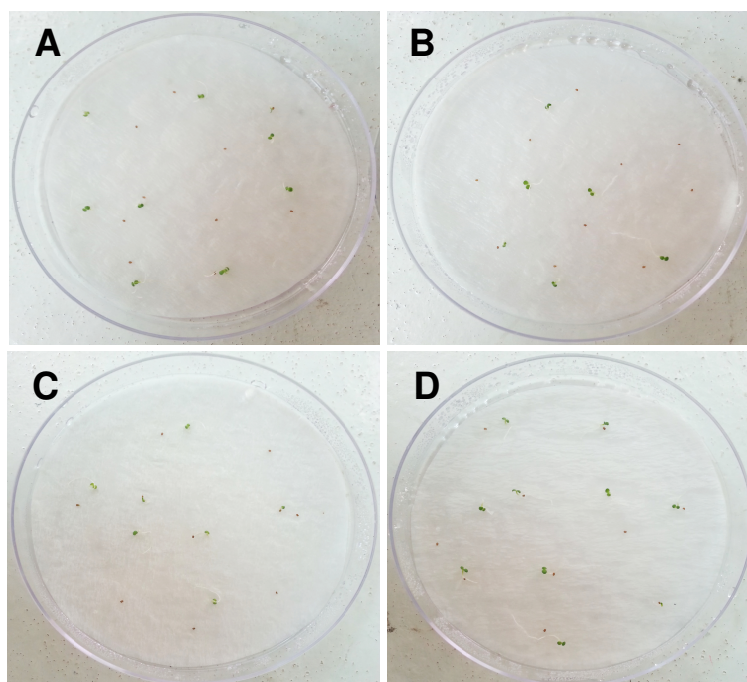
Mediante revisão de literatura essa é a primeira vez que AgNPs são testadas nesta linhagem de células de insetos. Sendo assim, a utilização dessas células em ensaios de toxicidade pode abrir uma nova linha de possibilidades no desenvolvimento de nanossistemas para o controle de insetos praga. Considerando a atividade das AgNPs-CbC contra fitonematoides e células de insetos praga *in vitro*, sementes de plantas de tabaco, mantidas em sala de cultivo de tecidos vegetais foram utilizadas para avaliar possível toxicidade ao modelo vegetal *in vitro*.

### Atividade sobre a germinação de sementes

Recentemente, ensaios de germinação de sementes têm sido realizados visando avaliar potencial toxicidade de AgNPs em plantas (Yin et al., 2012; Hojjat and Hojjat, 2016). No presente estudo, sementes de *Nicotiana tabacum* foram expostas às AgNPs-CbC, CbC e  $\text{Ag}^+$ , à uma concentração de  $100 \mu\text{M}$ , e acarretaram em taxa de germinação de 90%, 70% e 70%, respectivamente, quando comparadas ao controle ( $\text{H}_2\text{O}$ ) (Figura IV 38). Vale ressaltar que visualmente não foram observadas diferenças morfológicas entre os grupos para as sementes que germinaram (Figura IV 39).



**Figura IV 38.** Taxa de germinação de sementes de *N. tabacum* após exposição às AgNPs-CbC, CbC e  $\text{AgNO}_3$  à  $100 \mu\text{M}$ .



**Figura IV 39.** Imagens fotográficas das sementes submetidas à exposição com as AgNPs-CbC (A),  $\text{AgNO}_3$  (B), CbC (C) e  $\text{H}_2\text{O}$  (D) após o processo de germinação.

Os resultados obtidos nesse estudo contrastam com os encontrados por Yin e colaboradores (2012), os quais mostraram que AgNPs apresentaram efeito tóxico mais pronunciado que AgNO<sub>3</sub>, na mesma concentração, em sementes de *Lolium multiflorum* (Azevão). Além disso, no trabalho de Yin e colaboradores (2012) as sementes expostas às AgNPs tiveram o crescimento da raiz retardado. Entretanto, considerando que as AgNPs-CbC não alteraram significativamente a taxa de germinação de sementes de tabaco e considerando que para produção de sementes e germinação um dos desafios é a proliferação de microrganismos e consumo por insetos praga, é possível que as AgNPs possam ser utilizadas no desenvolvimento de revestimentos e incrustações para preservar sementes a serem utilizadas em plantios a campo.

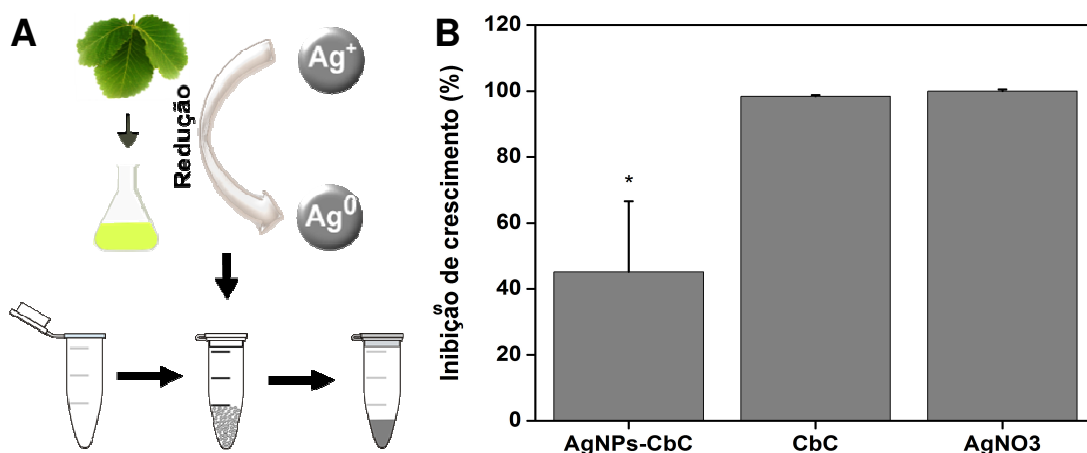
De fato, é possível que a ausência de efeitos expressivos no presente estudo possa estar relacionada com a espécie de planta cuja semente foi testada (tabaco), em comparação às espécies avaliadas quanto à germinação em outros estudos anteriores (Yin et al, 2012), e que essa espécie pode apresentar alguma tolerância à prata sendo que esse fato é bastante relevante para investigações na área de tecnologia de sementes aja visto que um dos desafios atuais dessa área é o desenvolvimento de materiais que possam ser utilizados para incrustação de sementes no intuito de prevenir o ataque de patógenos (ex: fungos e bactérias) e pragas (ex: insetos) em sementes que são utilizadas para o plantio de inúmeras culturas. Adicionalmente, esse resultado sinalizou para a possibilidade de aplicação das AgNPs como agente de cobertura de superfícies, não apenas de sementes, como até mesmo de materiais.

#### *Imobilização de AgNPs-CbC na superfície de microtubos*

Nanopartículas de prata, obtidas por rotas químicas, têm sido utilizadas no recobrimento de superfícies visando à obtenção de utensílios com propriedades antimicrobianas. Contudo, o potencial de imobilização de AgNPs obtidas por síntese verde em suportes tem sido pouco explorada (Silva 2014; Balashanmugam e Kalaichelvan, 2015).

A cada síntese de AgNPs-CbC realizada foi observado que após a retirada da suspensão do recipiente utilizado (béqueres de vidro e microplacas de poliestireno), o mesmo apresentava coloração amarelada, indicando a adsorção de partículas nas paredes dos recipientes durante o processo de síntese (Figura IV 40). Sendo assim, as

AgNPs-CbC foram sintetizadas utilizando microtubos de polipropileno de 1,5 mL os quais foram utilizados posteriormente para avaliar o possível crescimento de leveduras *Candida albicans* visando avaliar o potencial de controle de microrganismos com a fina camada de AgNPs-CbC formada na superfície de recipientes. Após 24 h de incubação foi observada a diminuição do crescimento das leveduras nos microtubos que foram utilizados para a síntese das AgNPs-CbC (Figura IV 40).



**Figura IV 40.** Representação esquemática da síntese verde de nanopartículas metálicas via redução química de íons prata ( $Ag^+$ ) a prata zerovalente ( $Ag^0$ ) utilizando extrato aquoso de folhas de *C. brasiliense* em microtubos de polipropileno (A). Taxa de inibição de crescimento de leveduras *C. albicans* em microtubos de propipropileno com AgNPs-CbC imobilizadas após 24 h.

Tem sido relatado que um dos possíveis mecanismos de ação antimicrobiana relacionados às AgNPs se dá pela liberação de íons  $Ag^+$  e esses por sua vez induzem processos de estresse oxidativo nas células (Kalatunga et al., 2016; Maurer and Meyer 2016). De fato, tem sido proposto a ação de AgNPs em *C. albicans* se dá pelos íons  $Ag^+$  livres, os quais entram na célula e interagem com proteínas presentes nas membranas mitocondriais acarretando em alterações na cadeia transportadora de elétrons e fazendo com que ocorra aumento na produção de EROs. Esses por sua vez podem se difundir pela célula e interagir com os componentes intracelulares, acarretar em alterações na permeabilidade celular por desestabilização da membrana celular, e consequentemente induzir as células a entrar em processo apoptótico (Kalatunga et al., 2016). Sendo assim, a diminuição da taxa de crescimento das leveduras *C. albicans* pode estar relacionada à

eventual liberação progressiva e sustentada de íons  $\text{Ag}^+$  pelas AgNPs adsorvidas nas paredes dos tubos que interagem com as células inibindo o crescimento.

Adicionalmente, Balashanmugam e Kalaichelvan (2015) demonstraram que tecidos de algodão contendo AgNPs, sintetizadas utilizando extrato aquoso obtidos a partir de folhas de *Cassia roxburghii* DC, apresentaram atividade antibacteriana contra as bactérias Gram positivas *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, e Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* e *Escherichia coli*. Adicionalmente, AgNPs imobilizadas em microtubos de polipropileno acarretaram na morte de nematoides *M. incognita in vitro* em estudo recente desenvolvido no laboratório de Nanobiotecnologia no qual foi desenvolvida a presente Tese (Silva 2014).

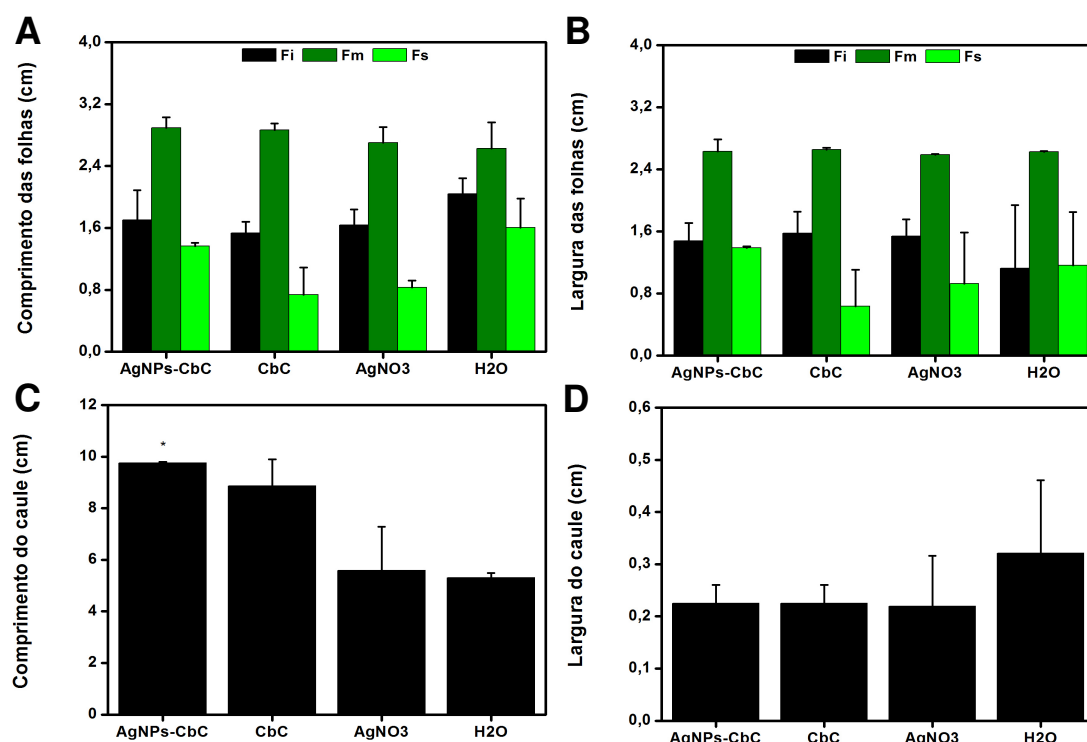
#### *Avaliação de toxicidade de AgNPs-CbC em plantas Nicotiana tabacum in vitro*

As AgNPs-CbC não alteraram significativamente a taxa de germinação de sementes de tabaco e inibiram o desenvolvimento de microrganismos quando adsorvidas em microtubos abrindo perspectiva para o desenvolvimento de recipientes funcionalizados com AgNPs para o cultivo de plantas, assim como para aplicação direta de AgNPs-CbC a plantas nas quais se pretenda prevenir ou mitigar a presença de microrganismos patogênicos e organismos praga.

Neste sentido e para avaliar essa possibilidade, as AgNPs-CbC, CbC e  $\text{Ag}^+$  foram aplicadas na base de plantas de *N. tabacum* a uma concentração de 100  $\mu\text{M}$ . Após 21 dias, as plantas foram coletadas e tiveram parâmetros morfológicos (comprimento e largura das folhas e caule) e bioquímicos (quantificação de clorofila e peroxidação lipídica) analisados. As avaliações morfométricas das folhas não indicaram diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre as plantas submetidas à presença de CbC e  $\text{AgNO}_3$  em relação ao controle (Figura IV 41A-B). Vale ressaltar que foi observado aumento do tamanho do caule das plantas submetidas à exposição das AgNPs-CbC em relação ao controle (Figura IV 41C) e esse fato ainda que não possa ser considerado um efeito adverso, despertou interesse quanto ao impacto na fisiologia vegetal, por exemplo na produção de fatores de crescimento e hormônios.

O etileno é um hormônio vegetal gasoso importante no desenvolvimento das plantas, e sua produção e ação podem ser alteradas mediante eventos estressores, sendo que esses podem ser físicos ou químicos (Taiz e Zeiger 2009). Diversos metais podem

inibir a ação do etileno dentre eles a prata (Kumar et al., 2009). Vale ressaltar quanto maior a concentração de etileno menor o desenvolvimento da planta. Tem sido observado que quando a biossíntese ou a ação do etileno são inibidas em plantas mantidas em cultivo, ocorre aumento significativo do caule, brotos e área foliar (Reis et al., 2003). Sendo assim, a aumento no tamanho do caule nas plantas tratadas pode estar relacionada à liberação gradativa de íons  $Ag^+$  pelas AgNPs-CbC que por sua vez acarretam na inibição do etileno ou outros fatores de crescimento, estimulando um maior desenvolvimento da planta. Esses fatos ainda precisam ser verificados.



**Figura IV 41.** Parâmetros morfométricos médios de folhas (A-B) e caule (C-D), onde folha inferior, folha média e folha superior são representadas por Fi, Fm e Fs, respectivamente, *in vitro* após exposição à 2 mL de AgNPs-CbC, CbC ou AgNO<sub>3</sub> na concentração de 100  $\mu$ M, por 21 dias. Valores representados como a média  $\pm$  erro padrão da média, n = 4 para folhas e n = 2 para caule. Diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) em relação controle (\*).

Tem sido relatado que plantas tratadas com AgNPs tiveram seu metabolismo alterado e conseqüentemente aumento na produção de clorofila. A clorofila é um biomarcador importante que reflete os estados fisiológicos de crescimento e metabólico das plantas. O teor de clorofilas nas folhas é influenciado por diversos fatores bióticos e abióticos, os quais estão relacionados diretamente ao potencial fotossintético das plantas

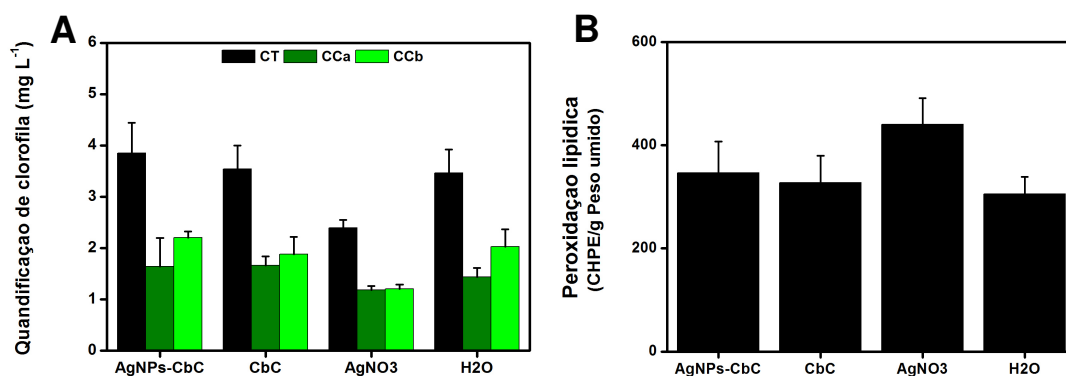
(Taiz et al., 2010). Sendo assim, levantou-se a hipótese que as plantas que foram tratadas com AgNPs-CbC e tiveram seus parâmetros morfológicos alterados também poderiam apresentar alteração na produção de clorofila. Para avaliar essa hipótese, as concentrações de clorofila total e clorofilas a e b das plantas tratadas com AgNPs-CbC e controles foram quantificadas.

Não foram observadas alterações nas concentrações de clorofila total e clorofilas a e b para as plantas expostas aos diferentes tratamentos (AgNPs-CbC, CbC e AgNO<sub>3</sub>) em relação ao controle (H<sub>2</sub>O) (P < 0,05) (Figura IV 42A). Um estudo recente reportou que AgNPs e Ag<sup>+</sup> em baixas concentrações (5 a 50 mg/L) também não acarretaram em alterações do teor de clorofila total em folhas de tabaco quando comparados ao controle e resultados semelhantes foram observados para os teores de clorofilas a e b (Beneta, 2012), corroborando os resultados obtidos no presente estudo. Contudo, apesar de não alterar o teor de clorofila nas plantas, as AgNPs-CbC poderiam causar alguma forma de estresse oxidativo a vista que esse é o provável mecanismo de ação tóxica de AgNPs.

De fato, o estresse oxidativo em plantas pode ser influenciado por diversos fatores bióticos e/ou abióticos, que levam à ativação de mecanismos de defesa específicos, sendo um deles a resposta à geração de EROs. Essas EROs reagem com os componentes celulares de modo inespecífico, danificando lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (Taiz et al., 2010). A peroxidação lipídica é um fator importante que contribui para a perda da função celular em situações de estresse oxidativo em plantas, sendo utilizado como um biomarcador importante da fisiologia vegetal (Taiz et al., 2010).

O grau de peroxidação lipídica, como um indicador de estresse oxidativo em plantas, foi determinado no presente estudo pela medição do teor de hidroperóxidos que são produtos primários da peroxidação dos lipídeos. AgNPs-CbC, CbC e Ag<sup>+</sup> na concentração testada não acarretaram em alteração do perfil de peroxidação lipídica quando comparadas às plantas controle (P < 0,05) (Figura IV 42B), indicando a ausência de efeito deletério aos componentes lipídicos das membranas celulares. Resultados semelhantes foram observados para AgNPs e Ag<sup>+</sup> em baixas concentrações (5 a 25 mg/L) em plantas *Nicotiana tabacum* (Beneta, 2012). Vale ressaltar que nesse mesmo estudo (Benetta, 2012), concentrações de 100 a 200 mg/L acarretaram na

elevação das concentrações de clorofila e em alteração da peroxidação lipídica das plantas testadas.



**Figura IV 42.** Análises quantitativa do teor de clorofila total, clorofilas a e b (A) e peroxidação lipídica (B) de folhas de plantas *Nicotiana tabacum in vitro* após exposição a 2 mL das AgNPs-CbC, CbC e AgNO<sub>3</sub> na concentração de 100 μM, por 21 dias, sendo CT (clorofila total), CCa (clorofila a) e CCb (clorofila b).

Conforme relatado, as AgNPs-CbC não induziram alteração na produção de clorofilas e não acarretaram na ocorrência de efeitos deletérios aos componentes lipídicos das membranas celulares nas plantas *in vitro*, sendo assim as AgNPs-CbC foram utilizadas em ensaios *in vivo* em plantas de *N. tabacum*.

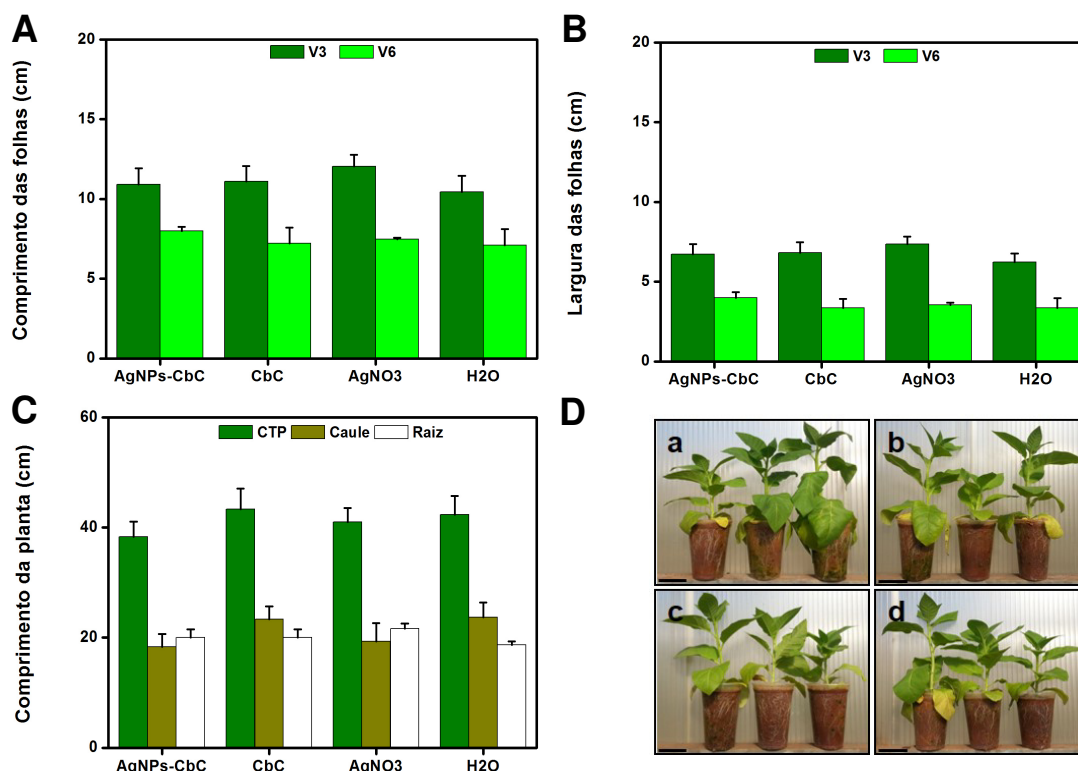
#### Avaliação de toxicidade de AgNPs-CbC em plantas *Nicotiana tabacum in vivo*

*N. tabacum* possui suas características genéticas e moleculares bem elucidadas. Sendo assim, estas plantas têm sido utilizadas nos últimos anos como sistemas modelos vegetais em estudos *in vivo* de nanotoxicologia (Domokos-Szabolcsy et al., 2012; Frazier et al., 2014). Visando à possível aplicação futura no campo, as AgNPs-CbC foram utilizadas em ensaios *in vivo* em casa de vegetação.

Dez mL das AgNPs-CbC, CbC e Ag<sup>+</sup> foram aplicadas na base das plantas *N. tabacum* a uma concentração de 100 μM. Após 14 dias, as plantas foram coletadas e tiveram parâmetros morfológicos e bioquímicos analisados. A inspeção visual das plantas não indicou alterações perceptíveis em resposta aos tratamentos entre os diferentes grupos (Figura IV 43D). A análise morfométrica das folhas não indicaram diferenças estatisticamente significativas entre as plantas submetidas à presença de AgNPs-CbC, CbC ou AgNO<sub>3</sub> em relação ao controle (H<sub>2</sub>O) (Figura IV 43). Diferentemente dos resultados do estudo *in vitro* exposição às AgNPs-CbC, assim como

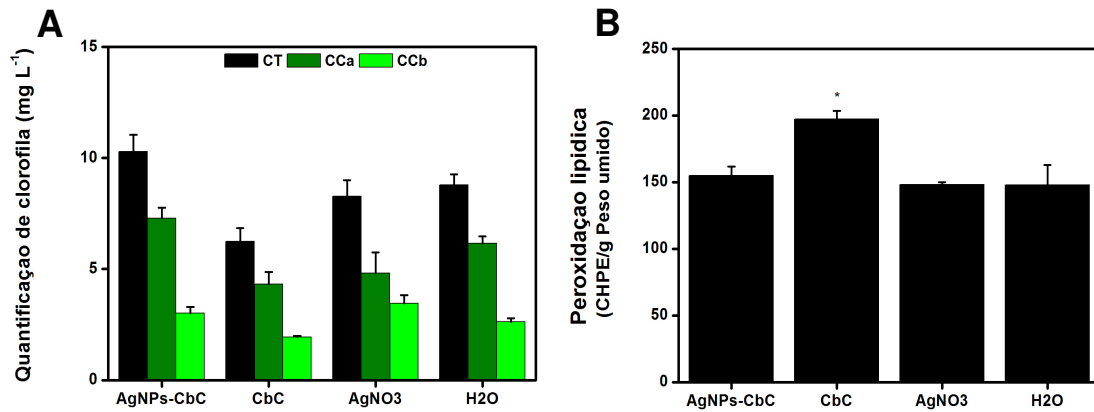


também CbC ou AgNO<sub>3</sub> não acarretaram em alterações nos tamanhos dos caules. Esse fato pode estar relacionado às diferenças entre os modos de cultivo das plantas.



**Figura IV 43.** Parâmetros morfométricos médios de folhas (A-B), caule, raiz e planta inteira (C), onde CTP refere-se a comprimento total da planta e V3 e V6 referem-se aos estádios foliares 3 e 6, respectivamente. Imagens fotográficas das plantas após 14 dias de inoculação de 10 mL à 100 μM das amostras AgNPs-CbC (a), CbC (b), AgNO<sub>3</sub> (c) e H<sub>2</sub>O (d). Valores representados como a média ± erro padrão da média, n = 6 para folhas e n = 3 para caule e raiz. Barra de escala: 6 cm.

No presente estudo também não foram observadas alterações nas concentrações de clorofila total e clorofilas a e b para as plantas tratadas (AgNPs-CbC, CbC e AgNO<sub>3</sub>) em relação ao controle (H<sub>2</sub>O) ( $P < 0,05$ ), corroborando os resultados obtidos nos estudos *in vitro* (Figura IV 44A). Adicionalmente, AgNPs-CbC e Ag<sup>+</sup> na concentração testada não acarretaram em alteração do perfil de peroxidação lipídica quando comparadas às plantas controles ( $P < 0,05$ ), também corroborando os resultados obtidos nos estudos *in vitro* (Figura IV 44B). Contudo, CbC *in vivo* acarretou em aumento significativo da peroxidação lipídica em relação ao controle, indicando a ocorrência de algum possível efeito deletério aos componentes lipídicos das membranas celulares de *N. tabacum* (Figura IV 44B).



**Figura IV 44.** Análises quantitativas do teor de clorofila total e clorofilas a e b (A) e peroxidação lipídica (B) de plantas *Nicotiana tabacum in vivo* após exposição de 10 mL a 100  $\mu$ M das amostras AgNPs-CbC, CbC e AgNO<sub>3</sub> por 14 dias, sendo CT (clorofila total), CCa (clorofila a) e CCb (clorofila b). \*Diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle.

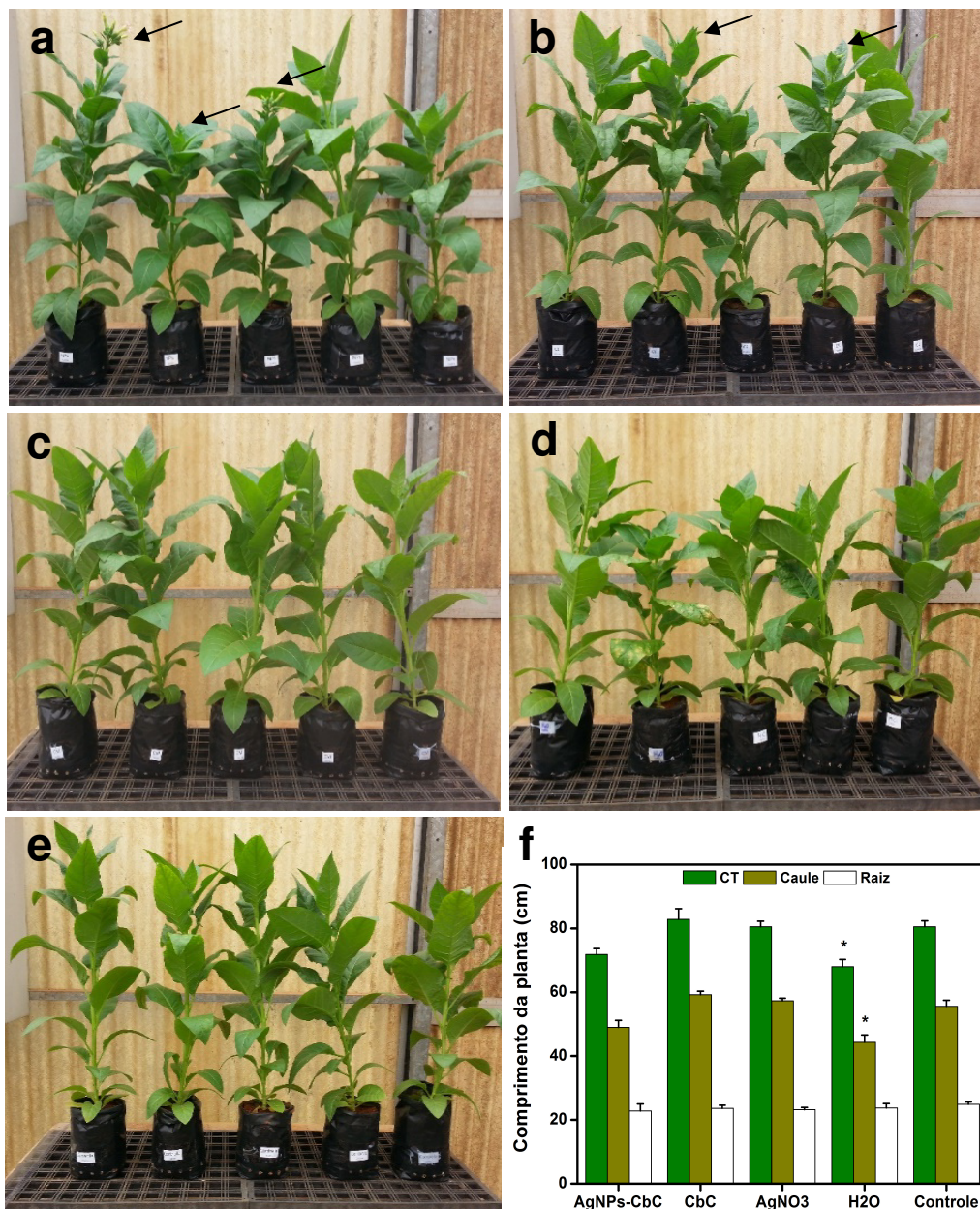
#### *Avaliação da toxicidade de AgNPs-CbC em nematoides in vivo*

Uma vez que as AgNPs em baixas concentrações (1  $\mu$ M) foram capazes de causar a morte dos fitonematoides *in vitro* e não foram identificados efeitos deletérios expressivos às plantas *in vivo* e *in vitro* abrem-se perspectivas de aplicação das AgNPs-CbC no campo visando ao controle de *M. incognita*.

Sendo assim, AgNPs-CbC foram utilizadas em ensaios *in vivo* em casa de vegetação visando avaliar potenciais efeitos nematotóxicos. Plantas infestadas com nematoides foram tratadas com AgNPs-CbC, CbC e Ag<sup>+</sup> a uma concentração de 100  $\mu$ M, e após 45 dias as plantas foram coletadas, tiveram parâmetros morfológicos e bioquímicos analisados, e suas raízes foram utilizadas para obtenção de ovos.

A inspeção visual das plantas não indicou alterações anatômicas perceptíveis entre as plantas que foram tratadas com AgNPs-CbC, CbC e Ag<sup>+</sup> a uma concentração de 100  $\mu$ M em relação às plantas controles sem nematoides, contudo foi observado que plantas dos grupos AgNPs-CbC e CbC já apresentavam botões florais (Figura IV 45A-B). Adicionalmente, as plantas infestadas com nematoides e que foram apenas irrigadas com H<sub>2</sub>O apresentaram tamanho reduzido quando comparado ao grupo controle sem nematoides (Figura IV 45D). As análises morfométricas das plantas não indicaram diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre as plantas submetidas à presença de AgNPs-CbC, CbC e AgNO<sub>3</sub> em relação ao controle (Figura IV 45F),

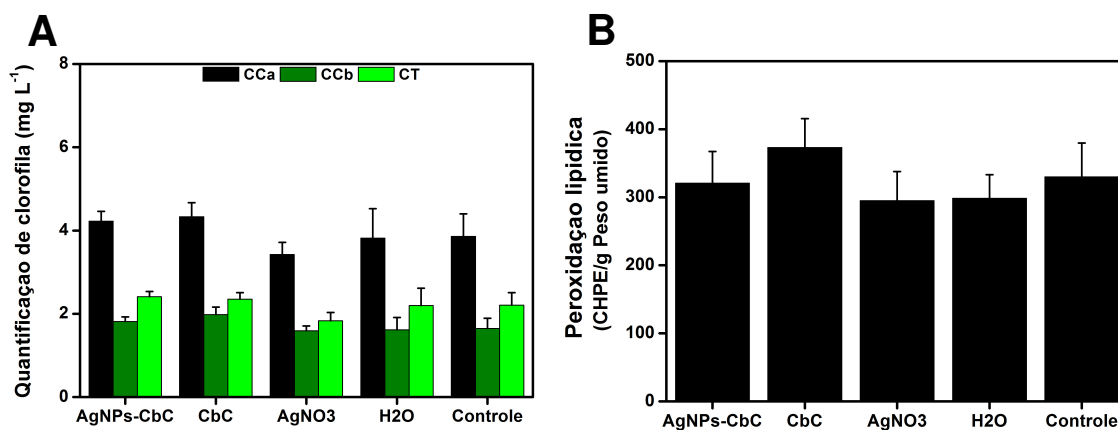
contudo as plantas infestadas com nematoides que receberam apenas água apresentaram tamanho reduzido em relação as plantas controle ( $P < 0,05$ ) (Figura IV 45F).



**Figura IV 45.** Imagens fotográficas das plantas infestadas com *M. incognita* após 45 dias de tratamento com 10 mL na concentração de 100  $\mu$ M de AgNPs-CbC (a), CbC (b), AgNO<sub>3</sub> (c) e H<sub>2</sub>O (d), e plantas controle sem nematoides (E). Parâmetros morfométricos médios de caule, raiz e planta inteira (C), onde CT refere-se a comprimento total da planta. Valores representados como a média  $\pm$  erro padrão da média, n = 5. Diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) em relação controle (\*).

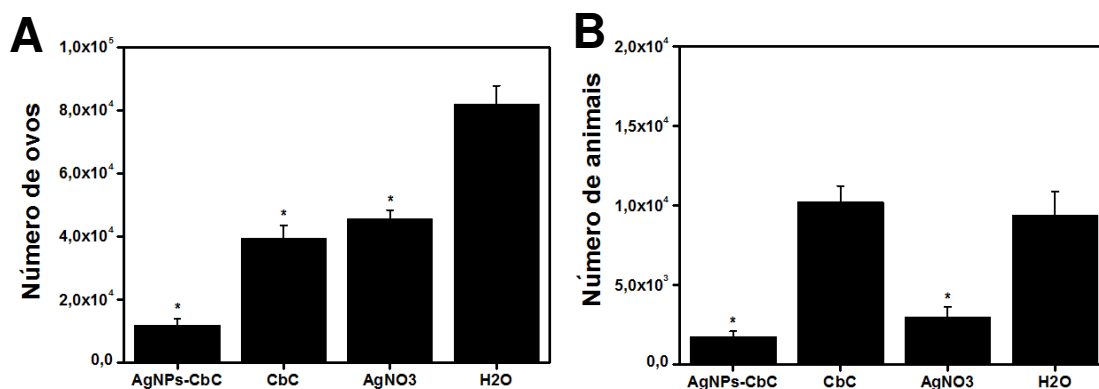
No presente estudo não foram observadas alterações nas concentrações de clorofila total e clorofilas a e b para as plantas de tabaco infestadas com *M. incognita*

tratadas (AgNPs-CbC, CbC, AgNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O) em relação ao controle (H<sub>2</sub>O) ( $P < 0,05$ ), corroborando os resultados obtidos nos estudos *in vitro* (Figura IV 46A). Adicionalmente, AgNPs-CbC e Ag<sup>+</sup> na concentração testada não acarretaram em alteração do perfil de peroxidação lipídica quando comparadas às plantas controles ( $P < 0,05$ ), corroborando os resultados obtidos nos estudos *in vitro* (Figura IV 46B).



**Figura IV 46.** Análise quantitativa do teor de clorofila total e clorofilas a e b (A) e peroxidação lipídica (B) de plantas *Nicotiana tabacum* infestadas com nematoide *M. incognita in vivo* após exposição às AgNPs-CbC, CbC, AgNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O por 45 dias, sendo CT (clorofila total), CcA (clorofila a) e CcB (clorofila b), e controle a plantas que não sofreram infestação.

Os tratamentos não induziram alteração na produção de clorofilas e não acarretaram na ocorrência de efeitos deletérios aos componentes lipídicos das membranas celulares nas plantas. Contudo, a avaliação das raízes revelou diminuição estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) no número de ovos de nematoides nas plantas tratadas com AgNPs-CbC (85%), CbC (51%) e AgNO<sub>3</sub> (44%) (Figura IV 47A). A análise do potencial de eclosão dos ovos também foi avaliada e foi observada menor taxa de eclosão dos ovos a indivíduos J2 nos grupos tratados com AgNPs-CbC (82%) e Ag<sup>+</sup> (68%) ( $P < 0,05$ ) (Figura IV 47). Esses resultados indicam potencial de utilização das AgNPs-CbC para controle do fitonematoide *M. incognita in vivo*.



**Figura IV 47.** Análise quantitativa do número de ovos obtidos a partir da extração radicular de plantas *Nicotiana tabacum in vivo* após exposição às AgNPs-CbC, CbC, AgNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O por 45 dias (A). Análise quantitativa do número de juvenis de segundo estágio (J2) obtidos a partir da eclosão dos ovos extraídos de plantas *Nicotiana tabacum in vivo* após exposição às AgNPs-CbC, CbC, AgNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O por 45 dias (B). N = 6 plantas por grupo. Diferença estatisticamente significativa (P < 0,05) em relação controle (\*).

Estudos *in vitro* tem demonstrado a potencialidade de AgNPs no controle de nematoides (Cromwell et al., 2014). O efeito nematicida foi avaliado contra *C. elegans in vitro* e *in vivo* por Cromwell e colaboradores (2014), e foi observado que o efeito nematicida está diretamente relacionado à concentração e número de doses de AgNPs aplicadas no solo. O efeito nematicida foi ainda confirmado pelo tratamento do solo com AgNPs na concentração de 150 µg/mL durante 2 a 4 dias de aplicações que efetivamente reduziu o número de organismos J2 das plantas (Cromwell et al, 2014). Contudo, o mecanismo pelo qual as AgNPs atuam em nematoides ainda precisa ser elucidado e isso vem sendo motivo de outros estudos em andamento no LNANO.

No presente estudo, as AgNPs foram capazes de diminuir significativamente o número de ovos e a taxa de eclosão a indivíduos J2, mas não foram capazes de controlar totalmente o desenvolvimento dos organismos. Aumento na efetividade e controle desses organismos pode ser modulado com a repetição da aplicação das partículas (múltiplas doses). Vale destacar que este estudo é o primeiro a utilizar AgNPs sintetizadas por rota de síntese verde no controle desses organismos. Além disso, os resultados apresentados reforçaram a necessidade de testes em eventuais organismos não alvos, como mamíferos, para iniciar esforços em relação à segurança desses sistemas quanto a aplicações futuras na agricultura e biomedicina.

### *Avaliação de toxicidade de AgNPs-CbC em camundongos in vivo*

Na última década, as AgNPs têm atraído grande interesse no meio acadêmico e na indústria devido à sua potente atividade antimicrobiana, que pode ser explorada em diversos setores. Conseqüentemente tem crescido também a preocupação relacionada à possível toxicidade desses nanomateriais devido ao aumento da exposição de seres humanos e outros vertebrados, e isso tem gerado debates recentes relacionados à segurança e impacto na saúde (Guo et al., 2016).

As AgNPs-CbC demonstraram grande potencial de serem utilizadas para o controle de microrganismos e fitonematoides, sem afetar plantas e causando poucas alterações a células de mamíferos. Sendo assim, o potencial efeito toxicológico agudo das partículas sobre a saúde de camundongos foi investigado *in vivo*. Para isso, as AgNPs-CbC, CbC e Ag<sup>+</sup> a uma concentração de 64 µM (considerando um volume de sangue de aproximadamente 2,5 mL em cada animal) foram injetadas por via intravenosa (veia caudal) e após 24 h os animais foram eutanasiados e tiveram sangue e órgãos (fígado, baço, rim e pulmão) coletados para análises hematológicas-bioquímicas e histológicas, respectivamente.

O sangue é um tecido conjuntivo complexo composto por vários tipos celulares, os quais possuem funções específicas e imprescindíveis para a manutenção da homeostase do organismo. Assim, avaliação de parâmetros hematológicos (hemograma e leucograma) tornam-se importante em estudos nanotoxicológicos. Isso porque, quando AgNPs são administradas por via endovenosa, o sangue e seus componentes são os primeiros elementos do organismo com os quais as partículas entram em contato e essas podem reagir com o componente exógeno e eventualmente desencadear respostas inflamatórias agudas (Fontanive 2012, Nel et al., 2006).

Análise dos parâmetros hematológicos - hemograma (série vermelha) e leucograma (série branca) - não indicaram alterações estatisticamente significativas para os grupos que receberam administração endovenosa de AgNPs-CbC, CbC, Ag<sup>+</sup> e H<sub>2</sub>O quando comparados ao grupo controle ou padrões de referência (Tabela IV 10 e Tabela IV 11) para a maioria dos parâmetros analisados (P < 0,05). Aumentos significativos no número de hemácias e hematócrito ocorreram apenas para o grupo tratado com Ag<sup>+</sup> em relação ao grupo controle (Tabela IV 11). Ainda que esse fato não tenha sido possível correlacionar com nenhum achado semelhante da literatura, aumentos no número de

hemácias (policitemia) e hematócrito são comumente relacionados com aumento dos requerimentos de captação, transporte e/ou distribuição de oxigênio nos tecidos. Entretanto, considerando a curta duração para manifestação desse efeito (24 h) pode não ter havido tempo suficiente para esse tipo de alteração na homeostase que geralmente envolve ação hormonal (eritropoietina) e atuação medular, sendo que esses resultados ainda precisam ser investigados quanto aos mecanismos envolvidos futuramente. Contudo, como as AgNPs-CbC não demonstraram tal efeito observado para íons prata livres, é possível que a nanoestruturação tenha minimizado de alguma forma esse efeito.

**Tabela IV 10.** Análise dos parâmetros hematológicos (série vermelha) dos camundongos (C57Bl/6) 24 h após a administração intravenosa das AgNPs-CbC, CbC, AgNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O. Valores representados como a média ± erro padrão da média, n = 5.

	<b>Hemácias</b> (milhões/mm <sup>3</sup> )	<b>Hemoglobina</b> (g/dL)	<b>Hematócrito</b> (%)	<b>VCM</b> (fl)	<b>HCM</b> (pg)	<b>CHCM</b> (g/dL)	<b>RDW</b> (%)
<b>AgNPs-CbC</b>	9,14 ± 0,15	13,40 ± 0,32	43,72 ± 0,64	47,87 ± 0,47	15,02 ± 0,12	30,98 ± 0,39	18,35 ± 0,64
<b>CbC</b>	8,67 ± 0,40	12,59 ± 0,88	42,35 ± 2,22	48,75 ± 0,41	14,85 ± 0,36	31,28 ± 0,17	17,28 ± 0,98
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	9,21 ± 0,19*	14,00 ± 0,21	45,00 ± 0,49*	48,78 ± 0,73	15,18 ± 0,18	31,10 ± 0,32	16,80 ± 0,68
<b>H<sub>2</sub>O</b>	8,90 ± 0,09	13,44 ± 0,27	43,60 ± 0,38	49,00 ± 0,16	15,34 ± 0,12	27,95 ± 2,17	16,04 ± 0,63
<b>Controle</b>	8,27 ± 0,32	12,40 ± 0,64	40,00 ± 1,77	48,10 ± 0,59	14,90 ± 0,29	31,40 ± 0,21	15,73 ± 1,14
<b>Referência<sup>#</sup></b>	7,14 - 12,20	10,8 - 19,2	37,3 - 62,0	42,7 - 56,0	11,7 - 16,8	24,6 - 35,9	15,9 - 21,1

\*Diferença estatisticamente significativa (P < 0,05) em relação controle. VCM = Volume corpuscular médio; HCM = Hemoglobina corpuscular média; CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW (Red Cell Distribution Width) = Distribuição da Largura das hemácias. <sup>#</sup>Charles river research models: C57Bl/6 Mouse Hematology

**Tabela IV 11.** Análise dos parâmetros hematológicos (série branca) dos camundongos (C57Bl/6) 24 h após a administração intravenosa das AgNPs-CbC, CbC, AgNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O. Valores representados como a média ± erro padrão da média, n = 5.

	<b>Leucócitos</b> (%/mm <sup>3</sup> )	<b>Linfócitos</b> (%/mm <sup>3</sup> )	<b>Bastonetes</b> (%/mm <sup>3</sup> )	<b>Segmentados</b> (%/mm <sup>3</sup> )	<b>Eosinófilos</b> (%/mm <sup>3</sup> )	<b>Basófilos</b> (%/mm <sup>3</sup> )	<b>Monócitos</b> (%/mm <sup>3</sup> )
<b>AgNPs-CbC</b>	6883,33 ± 457,83	82,00 ± 3,02	0,00 ± 0,00	16,00 ± 2,21	0,33 ± 0,33	0,00 ± 0,00	1,50 ± 0,61
<b>CbC</b>	6500,00 ± 1361,98	88,50 ± 1,94	0,00 ± 0,00	10,75 ± 1,55	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,75 ± 0,38
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	6480,00 ± 863,94	86,00 ± 2,98	0,00 ± 0,00	12,80 ± 2,56	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,20 ± 0,54
<b>H<sub>2</sub>O</b>	8660,00 ± 535,35	87,80 ± 0,66	0,00 ± 0,00	11,00 ± 0,84	0,20 ± 0,20	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,45
<b>Controle</b>	8725,00 ± 1652,96	84,00 ± 4,36	0,00 ± 0,00	15,25 ± 3,97	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,75 ± 0,48
<b>Referência<sup>#</sup></b>	-	61,26 - 87,82	-	7,36 - 28,59	0,13 - 4,51	0,00 - 1,26	2,18 - 11,02

<sup>#</sup>Charles river research models: C57Bl/6 Mouse Hematology



Além da avaliação hematológica, a dosagem de marcadores bioquímicos tem sido amplamente utilizada para o monitoramento e diagnóstico de possíveis danos causados em órgãos (Fontanive 2012). Sendo assim, foram realizadas análises de diversos marcadores bioquímicos (Gama glutamiltranspeptidase (GGT), transaminase glutâmico-oxalacética (AST), transaminase glutâmico pirúvica (ALT), bilirrubina total (TBIL), bilirrubina direta (DBIL), bilirrubina indireta (IBIL), glicemia, colesterol total e frações [Lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de alta densidade (HDL)] e triglicerídeos visando avaliar possíveis danos ao fígado, baço e rim (Tabela IV 12 e Tabela IV 13).

As análises dos parâmetros bioquímicos não indicaram alterações estatisticamente significativas para os grupos que receberam administração endovenosa de AgNPs-CbC, CbC, Ag<sup>+</sup> e H<sub>2</sub>O quando comparados ao grupo controle ou valores de referência (Tabela IV 12 e Tabela IV 13) ( $P < 0,05$ ). Esses resultados corroboram os encontrados por Xue e colaboradores (2011) que demonstraram que AgNPs administradas em baixas concentrações (7,5 e 30 mg/Kg) por via intravenosa em camundongos não acarretaram em alterações nos parâmetros bioquímicos (creatinina; GOT, transaminase glutâmico-oxalacética, lactato desidrogenase, colesterol total e proteína total) avaliados.

**Tabela IV 12.** Análise dos parâmetros bioquímicos obtidos a partir de soro sanguíneo dos camundongos (C57Bl/6) 24 h após a administração intravenosa das AgNPs-CbC, CbC, AgNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O. Valores representados como a média ± erro padrão da média, n = 5.

	AST (U/l)	ALT (U/l)	GGT (U/l)	TBIL (mg/dL)	DBIL (mg/dL)	IBIL (mg/dL)
<b>AgNPs-CbC</b>	122,33 ± 1,87	62,50 ± 9,44	12,00 ± 3,22	0,77 ± 0,07	0,37 ± 0,05	0,40 ± 0,05
<b>CbC</b>	101,80 ± 12,60	47,60 ± 7,30	4,80 ± 1,02	0,65 ± 0,12	0,25 ± 0,08	0,39 ± 0,08
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	108,00 ± 6,44	50,40 ± 6,18	14,60 ± 5,37	0,78 ± 0,12	0,26 ± 0,09	0,52 ± 0,08
<b>H<sub>2</sub>O</b>	123,60 ± 11,51	58,80 ± 4,73	6,40 ± 1,86	0,83 ± 0,04	0,35 ± 0,11	0,48 ± 0,11
<b>Controle</b>	137,00 ± 0,63	50,00 ± 7,16	7,80 ± 3,15	0,62 ± 0,17	0,24 ± 0,11	0,39 ± 0,13
<b>Referência<sup>#</sup></b>	43 - 397	27 - 195	0 - 9	0,2 - 0,6	-	-

Gama glutamil transpeptidase (GGT), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), bilirrubina total (TBIL), bilirrubina direta (DBIL), bilirrubina indireta (IBIL). <sup>#</sup> Charles river research models: C57Bl/6 Mouse Hematology.

**Tabela IV 13.** Análise dos parâmetros bioquímicos obtidos a partir de soro sanguíneo dos camundongos (C57Bl/6) 24 h após a administração intravenosa das AgNPs-CbC, CbC, AgNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O. Valores representados como a média ± erro padrão da média, n = 5.

	Glicose (mg/dL)	Colesterol Total (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	Não HDL (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)
<b>AgNPs-CbC</b>	66,83 ± 10,18	137,33 ± 20,10	39,83 ± 5,88	62,67 ± 18,74	97,50 ± 21,88	173,33 ± 32,19
<b>CbC</b>	81,80 ± 26,87	112,80 ± 18,58	44,8 ± 5,34	44,80 ± 20,14	68,00 ± 22,82	116,60 ± 20,93
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	92,80 ± 25,66	128,00 ± 19,00	45,00 ± 4,94	59,80 ± 17,16	83,00 ± 21,60	117,00 ± 20,22
<b>H<sub>2</sub>O</b>	48,00 ± 6,11	103,00 ± 6,99	39,60 ± 5,15	37,40 ± 8,76	63,40 ± 8,21	130,60 ± 12,59
<b>Controle</b>	91,25 ± 20,63	95,60 ± 4,37	48,60 ± 8,54	26,80 ± 9,01	47,00 ± 9,50	104,20 ± 10,46
<b>Referência</b>	-	77,24 - 209,5	-	-	-	98,16 - 209,58

Lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de alta densidade (HDL). <sup>#</sup> Charles river research models: C57Bl/6 Mouse Hematology.

Análises histológicas de órgãos e tecidos têm sido bastante utilizadas em estudos *in vivo* utilizando nanopartículas visando avaliar aspectos estruturais relacionados a potenciais toxicidades de AgNPs (Hyau et al., 2008; Guo et al., 2016; Recordati et al., 2016). Tem sido reportado que as AgNPs se acumulam principalmente no baço, fígado, pulmões e rins (Xue et al., 2012). Sendo assim, de modo a complementar os resultados obtidos por meio da avaliação hematológica e bioquímica, e investigar potenciais alterações, os órgãos (fígado, baço, pulmão e rim) dos animais foram coletados e processados para análise histológica. O aspecto morfológico dos órgãos foi observado por microscopia de luz em secções coradas pelo método da H&E, considerando os órgãos do grupo controle (sem tratamento) como referência em relação aos grupos que receberam às AgNPs-CbC, CbC, Ag<sup>+</sup> ou H<sub>2</sub>O.

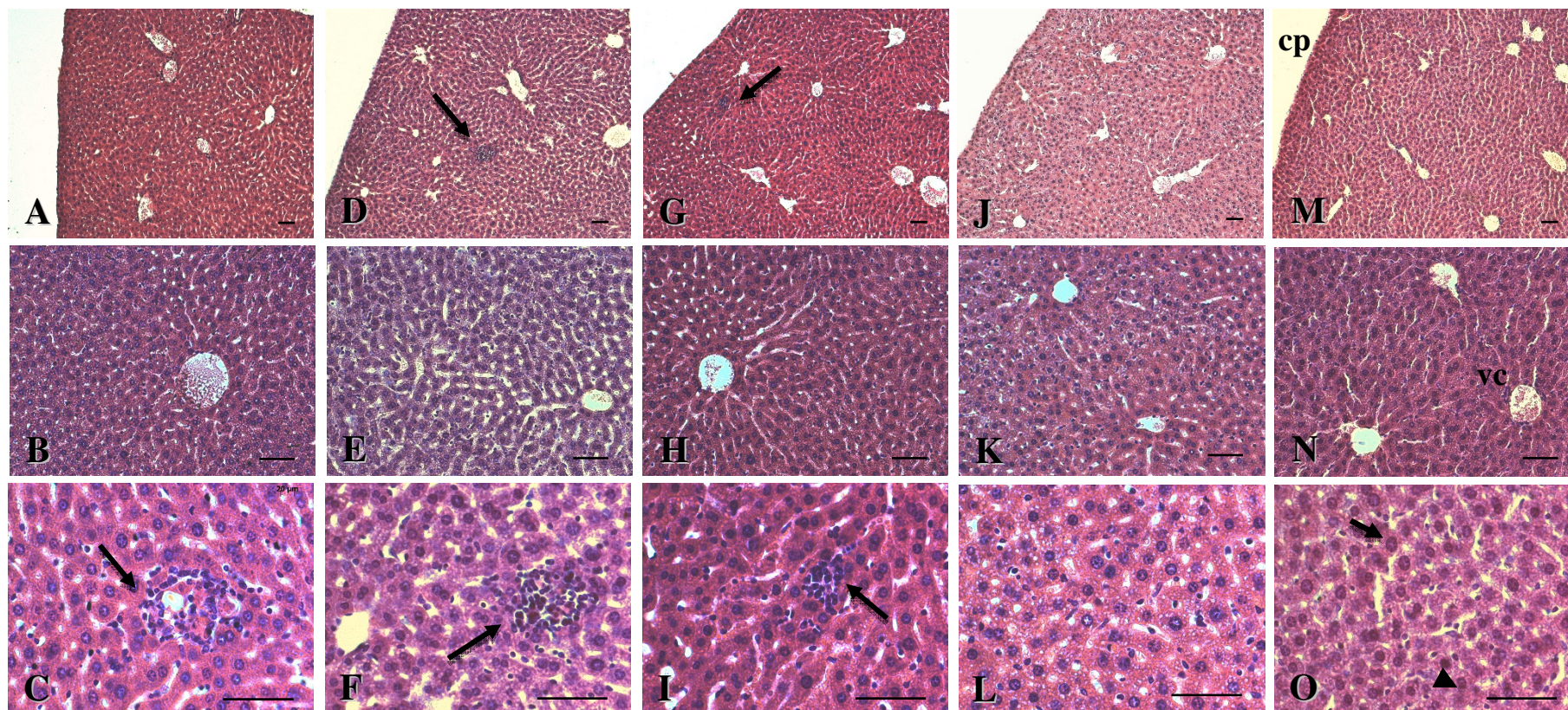
Cortes histológicos do fígado dos animais que foram submetidos à exposição às AgNPs-CbC, CbC, Ag<sup>+</sup> ou H<sub>2</sub>O e controle apresentaram cápsula íntegra e parênquima preservado com a presença de veias centro lobulares, redes de capilares sinusoides e hepatócitos com núcleos e membranas bem definidos (Figura IV 48). Contudo, foi possível observar a presença de pequenos infiltrados inflamatórios nos cortes histológicos dos animais tratados com AgNPs-CbC, CbC e Ag<sup>+</sup> (Figura IV 48 C-F-I).

Su e colaboradores (2014) avaliaram a toxicidade e taxa de dissolução de AgNPs em ratos *in vivo*, após 24 h da administração intravenosa de 500 µg/Kg. Naquele estudo, a concentração de Ag<sup>+</sup> foi quantitativamente maior no baço, rim, pulmão, cérebro e menor no fígado. A análise histológica revelou presença de infiltrados inflamatórios e presença de áreas necróticas no fígado, não sendo observadas alterações morfológicas no rim, pulmão e cérebro. Desse modo, a presença de infiltrados inflamatórios nos fígados dos animais tratados com AgNPs-CbC poderia estar relacionada com a presença de íons Ag<sup>+</sup>, os quais seriam resultados do metabolismo e dissolução das AgNPs por esse órgão.

Os mecanismos de ação desempenhados pelas AgNPs quando em contato com sistemas vivos são diversificados. Estudo muito recente demonstrou que injeção intravenosa em camundongos em única dose induziu a formação de infiltrados inflamatórios no fígado após 4 h de exposição, teve seu máximo em 72 h e diminuição no sétimo dia (Guo et al., 2016). Vale ressaltar que no mesmo estudo a administração intravenosa de AgNO<sub>3</sub> não acarretou em processo inflamatório no tecido, indicando

diferentes mecanismos de toxicidade entre prata livre e nanoestruturada (Guo et al., 2016). Outro estudo demonstrou que AgNPs com 30 nm de diâmetro revestidas com polietilenoglicol (PEG) e administradas por via intravenosa (8 mg/kg) não acarretaram em alterações morfológicas visíveis no fígado e rins de camundongos após 24 e 48 h de exposição (Marçal et al., 2016).

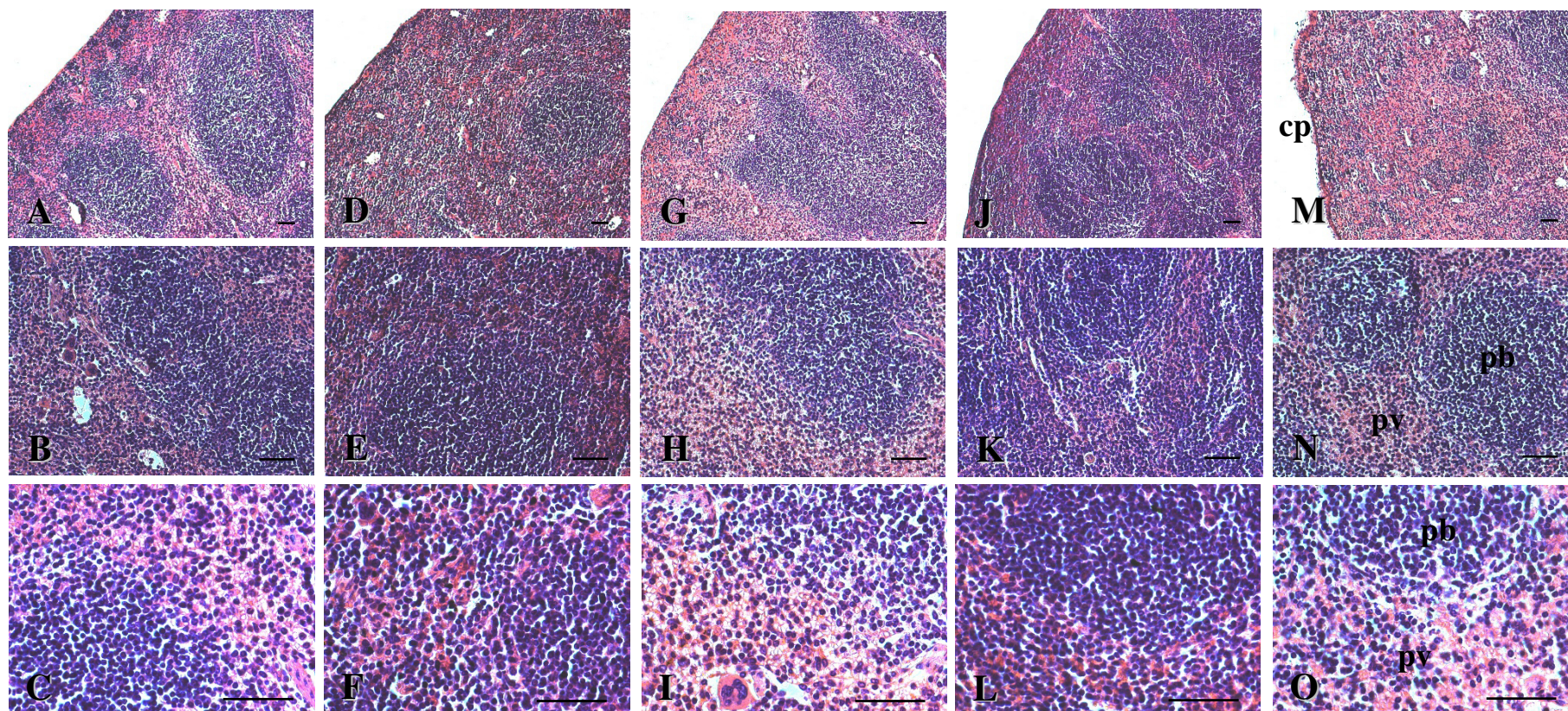
Adicionalmente, poucos estudos relatam o potencial toxicológico de extratos obtidos a partir de pequi (Almeida et al., 2010; Fonseca et al., 2016), principalmente considerando as folhas. No entanto, estudo publicado recentemente avaliou toxicidade de extratos aquosos da casca e da folha de *C. brasiliense* (Fonseca et al., 2016). Foi observado que altas concentrações de extratos de casca (500, 250 e 125 mg/Kg) e folha (300 e 150 mg/Kg), quando injetados em camundongos acarretaram em 100% de mortalidade nas primeiras 24 h após a administração intraperitoneal (Fonseca et al., 2016). Sendo assim, os infiltrados inflamatórios presentes nos cortes histológicos do fígado dos animais expostos ao extrato aquoso da folha de pequi (CbC), podem estar relacionados às moléculas presentes no extrato mesmo em concentração muito mais baixa.



**Figura IV 48.** Imagens histológicas dos fígados de camundongos (C57Bl/6) 24 h após a administração intravenosa de 64  $\mu$ M das AgNPs-CbC (A-C), CbC (D-F), AgNO<sub>3</sub> (G-I) e H<sub>2</sub>O (J-L), e do grupo controle sem tratamento (M-N). Nas secções são observadas cápsulas íntegras (cp) e regiões parenquimatosas preservadas (A, D, G, J, M), contendo veias centro lobulares (vc), hepatócitos (seta pequena) e capilares sinusoides (cabeça de seta) (B-C, E-F, H-I, K-L, N-O), e a presença de pequenos infiltrados inflamatórios (setas grandes) nos grupos AgNPs-CbC (C), CbC (F) e AgNO<sub>3</sub> (I). Coloração: H & E. Barra de escala = 50  $\mu$ m. Espessura dos cortes = 5  $\mu$ m.

As secções histológicas do baço dos animais que foram submetidos à exposição às AgNPs-CbC, CbC, Ag<sup>+</sup>, H<sub>2</sub>O e controle apresentaram cápsula íntegra e parênquima bem preservado, sendo possível observar a polpa branca constituída por nódulos linfáticos, e polpa vermelha rica em glóbulos vermelhos (Figura IV 49). Não foram observadas alterações morfológicas, presenças de infiltrados inflamatórios próximos a vasos sanguíneos ou aglomerados de nanopartículas (Figura IV 49).

Em estudo recente, AgNPs foram injetadas por via intravenosa (7,5; 30; e 120 mg/mL) e após 7 e 14 dias os camundongos foram eutanasiados (Xue et al., 2012). Não foram observadas diferenças histopatológicas notáveis no cérebro, coração, baço, rins, testículos e ovários em todos os animais experimentais. Adicionalmente, a análise molecular dos órgãos revelou maior presença de prata no fígado e baço, seguidos pelo testículo, rim, cérebro e pulmão. Contudo, foi observado que no grupo controle (AgNO<sub>3</sub>) a concentração de prata foi superior em relação aos grupos que receberam AgNPs (Xue et al., 2012). Além desse estudo, AgNPs esféricas com 20, 80 e 100 nm foram administradas durante 28 dias por via intravenosa em ratos (Lankveld et al., 2010). Naquele estudo, os autores demonstraram por análise molecular que as AgNPs com 20 nm distribuíram-se principalmente no fígado, seguido por rins e baço; enquanto que as partículas maiores com 80 e 100 nm foram distribuídas principalmente no baço seguido pelo fígado e pulmões (Lankveld et al., 2010), indicando direcionamento tecidual dependente do tamanho.

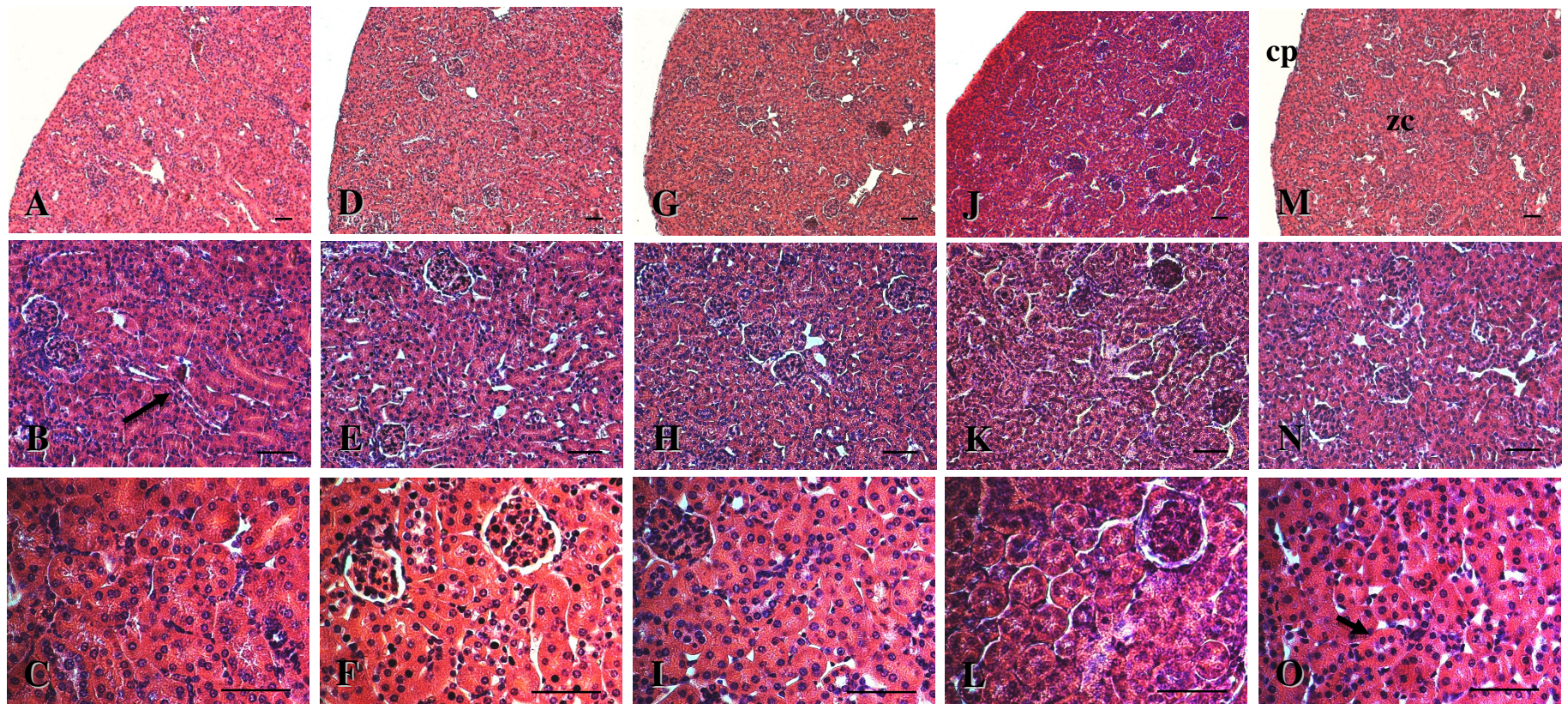


**Figura IV 49.** Imagens histológicas dos baços de camundongos (C57Bl/6) 24 h após a administração intravenosa de 64  $\mu\text{M}$  das AgNPs-CbC (A-C), CbC (D-F),  $\text{AgNO}_3$  (G-I) e  $\text{H}_2\text{O}$  (J-L), e do grupo controle sem tratamento (M-N). Nas secções são observadas cápsulas íntegras (cp) (A, D, G, J, M), regiões parenquimatosas divididas em polpas brancas (pb) e vermelhas (pv) (B-C, E-F, H-I, K-L, N-O) sem indicativo de alterações morfológicas. Coloração: H&E. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ . Espessura dos cortes = 5  $\mu\text{m}$ .

Os cortes histológicos dos rins dos animais que foram submetidos à exposição às AgNPs-CbC, CbC, Ag<sup>+</sup>, H<sub>2</sub>O e controle apresentaram cápsulas íntegras e zonas corticais preservadas (Figura IV 50), sendo possível observar corpúsculos renais, túbulos contorcidos distais e túbulos contorcidos proximais com características normais e preservadas (Figura IV 50), sem indicativo de alterações morfológicas e de aglomerados de AgNPs-CbC.

Como relatado anteriormente, Lankveld e colaboradores (2010) avaliaram efeito de AgNPs (esféricas com 20, 80 e 100 nm) administradas em única e múltiplas doses durante 28 dias em camundongos. Os autores observaram efeito tempo-dependente no qual em única dose as AgNPs acarretaram em alterações morfológicas e indícios de inflamação, e em múltiplas doses induziram pequena inflamação periférica e lesão na membrana glomerular nos rins (Lankveld et al., 2010). Adicionalmente, não foram identificadas diferenças significativas relacionadas ao tamanho das partículas.

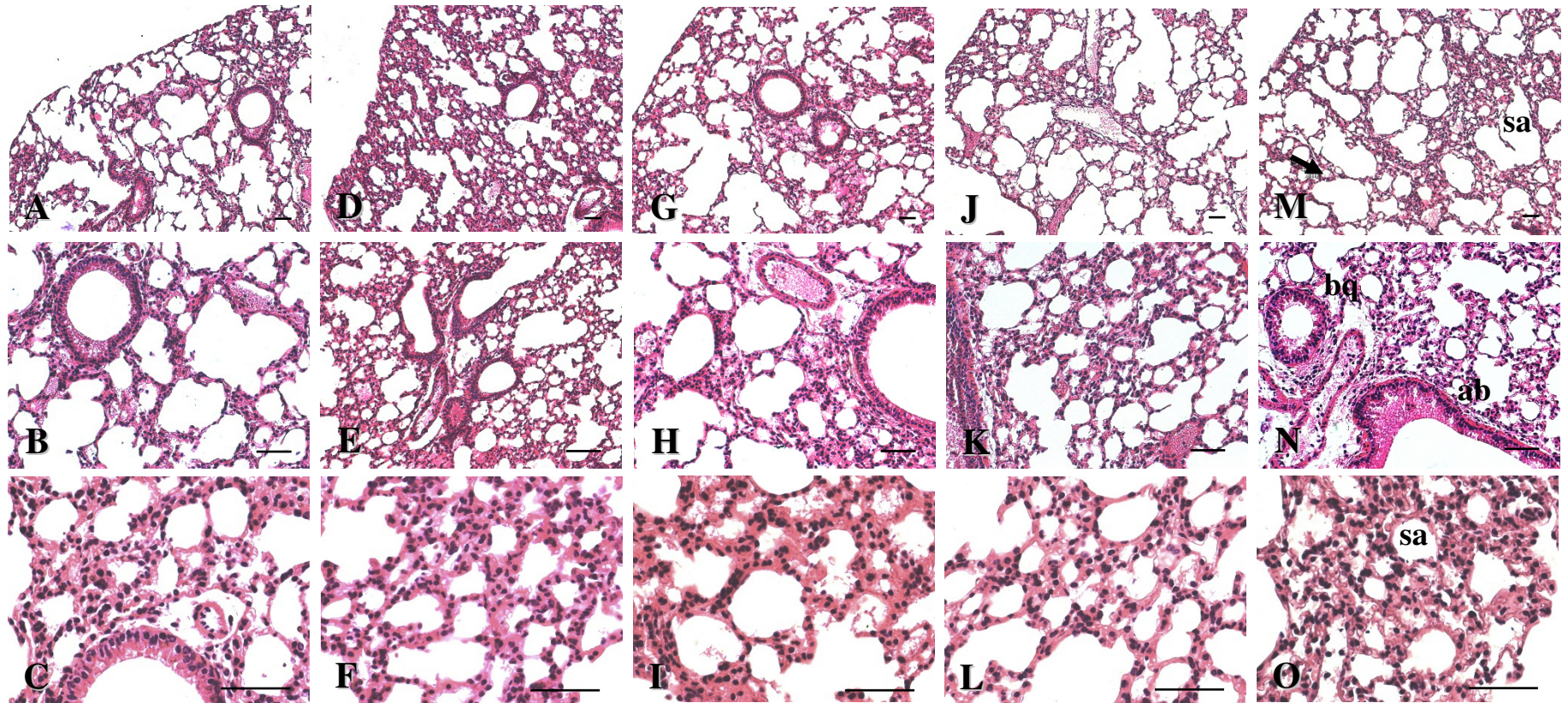




**Figura IV 50.** Imagens histológicas dos rins de camundongos (C57Bl/6) 24 h após a administração intravenosa de 64  $\mu$ M das AgNPs-CbC (A-C), CbC (D-F),  $\text{AgNO}_3$  (G-I) e  $\text{H}_2\text{O}$  (J-L), e do grupo controle sem tratamento (M-N). Nas secções são observadas cápsulas íntegras (cp) e zonas corticais (zc) preservadas (A, D, G, J, M). Na zona cortical é possível observar corpúsculos renais, túbulos contorcidos distais (seta grande) e túbulo contorcido proximal (seta pequena) com características preservadas (B-C, E-F, H-I, K-L, N-O) sem indicativo de alterações morfológicas. Coloração: H & E. Barra de escala = 50  $\mu$ m. Espessura dos cortes = 5  $\mu$ m.

As secções histológicas dos pulmões dos animais que foram submetidos à exposição às AgNPs-CbC, CbC, Ag<sup>+</sup>, H<sub>2</sub>O e controle apresentaram características preservadas, podendo ser observados sacos alveolares, bronquíolos, alvéolos, artérias bronquiolares e capilares com características preservadas para todos os grupos, sem indicativo de alterações morfológicas ou de aglomerados de AgNPs-CbC (Figura IV 51).

Alteração morfológica de tecidos pulmonares após exposição às AgNPs tem sido relatada na literatura (Vanderzande et al., 2012; Xue et al., 2012; Jong et al., 2013; Guo et al., 2016). Xue e colaboradores (2012) demonstraram que concentrações mais altas de AgNPs acarretaram no desenvolvimento de pequenos edemas intersticiais e aparecimento de infiltrado inflamatório (30 mg Kg<sup>-1</sup> após 14 dias) e no aumento na espessura das paredes alveolares, além de focos de infiltrados inflamatórios (120 mg Kg<sup>-1</sup> após 7 dias) (Xue et al., 2012). Adicionalmente, a administração intravenosa de AgNPs (25 µg referente a Ag<sup>+</sup>) em camundongos acarretou no desenvolvimento de hiperplasia fibrosa que foi observada nas imediações de vasos sanguíneos do pulmão após 24 h de exposição (Lankveld et al., 2010). Esses achados contrapõem-se aos encontrados na presente Tese e esse fato pode ser relacionado às diferenças na realização dos ensaios, como dose, tempo de exposição e rota de síntese utilizada para a obtenção das AgNPs.



**Figura IV 51.** Imagens histológicas dos pulmões de camundongos (C57Bl/6) 24 h após a administração intravenosa de 64  $\mu$ M das AgNPs-CbC (A-C), CbC (D-F),  $\text{AgNO}_3$  (G-I) e  $\text{H}_2\text{O}$  (J-L), e do grupo controle sem tratamento (M-N). Nas secções foram observados sacos alveolares (sa), bronquíolos (bq) e capilares (seta) com características preservadas para todos os grupos (B-C, E-F, H-I, K-L, N-O) Coloração: H & E. Barra de escala = 50  $\mu$ m. Espessura dos cortes = 5  $\mu$ m.

Estudos *in vivo* em roedores (camundongos e ratos) têm sido desenvolvidos utilizando diferentes vias de exposição visando caracterizar a cinética de distribuição nos tecidos e potenciais efeitos tóxicos de AgNPs (Kim et al., 2010; Park et al., 2010; Samberg et al., 2010; Stebounova et al., 2011; Hadrup et al., 2012; Ansari et al., 2014). Contudo, os resultados obtidos relacionados a efeitos adversos após a administração de AgNPs ainda têm se mostrado bastante controversos. Alguns estudos indicam que AgNPs podem apresentar efeitos tóxicos no fígado, rins, pulmão, intestino delgado, sistema nervoso e imunológico (Sung et al., 2009; Kim et al., 2010; Park et al., 2010; Xue et al., 2012; Ansari et al., 2014). No entanto, outros estudos relatam que AgNPs não causam efeitos adversos relevantes (Stebounova et al., 2011; Hadrup et al., 2012; Vanderzande et al., 2012; Ansari et al., 2014).

Estes resultados contraditórios podem estar relacionados à variabilidade nas características das AgNPs investigadas, como forma de obtenção (sintetizadas em laboratório ou adquirida comercialmente), rotas de síntese utilizadas (química, física ou biológica), tamanho, forma, carga de superfície, estado de dispersão, agente revestimento e concentração avaliada. Além disso, variações relacionadas às características dos animais como sexo, a idade e o desenho experimental (dose, tempo de exposição e número de animais) também podem influenciar nos resultados obtidos e influenciar nesses efeitos divergentes relatados por inúmeros autores (Vanderzande et al., 2012).

## **Sumarização dos resultados**

Tendo em vista as inúmeras abordagens realizadas no presente capítulo IV relacionadas às rotas de síntese, bem como às atividades biológicas avaliadas, optou-se por resumir e sumarizar os resultados obtidos para fins de considerações finais na forma de três tabelas a seguir, as quais contemplam as diferentes condições de síntese (Tabela IV 14), atividades biológicas *in vitro* (Tabela IV 15) e atividades biológicas *in vivo* (Tabela IV 16). Os resultados não serão rediscutidos, mas serão apresentados como um painel final para observação global dos principais legados desse Capítulo IV.

**Tabela IV 14.** Sumarização dos resultados obtidos referentes às diferentes condições de sínteses das AgNPs-CbC com extrato aquoso de folhas de *Caryocar brasiliense*.

<b>AgNPs-CbC</b>					
<b>Condição de síntese</b>	<b>Taxa de Formação</b>	<b>RPS</b>	<b>Diâmetro médio (nm)</b>	<b>PdI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
<b>25°C por 24h</b>	-	420	59,10 ± 2,10	0,386 ± 0,053	-22,1 ± 0,8
<b>75°C por 2h</b>	-	420	59,25 ± 2,00	0,462 ± 0,013	-24,3 ± 3,4
<b>Planta 1</b>	0,587	430	55,69 ± 0,11	0,384 ± 0,018	-29,0 ± 1,6
<b>Planta 2</b>	0,574	430	41,39 ± 2,73	0,312 ± 0,054	-31,1 ± 0,7
<b>Planta 3</b>	0,693	420	52,28 ± 1,67	0,327 ± 0,049	-30,5 ± 0,5
<b>Planta 4</b>	0,698	420	39,09 ± 0,85	0,329 ± 0,060	-30,6 ± 0,7
<b>Planta 5</b>	0,762	430	51,82 ± 0,50	0,286 ± 0,001	-33,2 ± 0,5
<b>Norte</b>	0,587	430	51,98 ± 0,75	0,384 ± 0,018	-29,0 ± 1,6
<b>Sul</b>	0,681	430	50,00 ± 0,55	0,292 ± 0,006	-27,2 ± 1,6
<b>Leste</b>	0,568	430	55,69 ± 0,11	0,283 ± 0,004	-29,5 ± 0,7
<b>Oeste</b>	0,703	420	52,64 ± 0,27	0,280 ± 0,003	-27,3 ± 0,9
<b>10 lotes</b>	-	-	43,12 ± 3,30	0,363 ± 0,017	-29,7 ± 1,10
<b>Estabilidade 1,5 anos</b>	-	-	38,77 ± 0,34	0,319 ± 0,032	-31,8 ± 1,5
<b>5 mL</b>	0,503	420	48,00 ± 1,82	0,429 ± 0,009	-29,0 ± 0,5
<b>10 mL</b>	0,513	420	54,33 ± 2,04	0,461 ± 0,019	-27,0 ± 1,0
<b>50 mL</b>	0,501	420	38,37 ± 4,61	0,399 ± 0,007	-35,9 ± 1,0
<b>500 mL</b>	0,351	420	46,49 ± 3,81	0,393 ± 0,017	-32,4 ± 2,3
<b>Microfluídica</b>	-	440	84,14 ± 5,49	0,456 ± 0,009	-24,0 ± 0,3

- Condição não avaliada.

**Tabela IV 15.** Sumarização dos resultados obtidos referentes aos ensaios de atividade biológica *in vitro* com as AgNPs-CbC sintetizadas utilizando extrato aquoso de folhas de *Caryocar brasiliense*.

<i>In vitro</i>			
Teste de atividade biológica	Modelo utilizado	Concentração	Alteração na viabilidade
<b>Concentração inibitória mínima</b>	<i>Escherichia coli</i>	≥ 64 µM	↓ 100%
	<i>Staphylococcus aureus</i>	≥ 256 µM	↓ 100%
	<i>Candida albicans</i>	≥ 8 µM	↓ 100%
<b>Viabilidade celular</b>	Fibroblasto (NIH3T3)	100 µM	↓ 14,6%
	Macrófago peritoneal (C57Bl/6)	100 µM	↓ 51,5%
	Câncer de mama murino (4T1)	100 µM	0%
	Câncer de mama humano (MCF-7)	100 µM	↓ 80,8%
	Células de insetos (Sf21)	100 µM	↓ 65%
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	7 µM	↓ 80,5%
<b>Hemólise</b>	Hemácias murinas (C57Bl/6)	128 µM	↓ 1,5%
<b>Mortalidade</b>	<i>Meloidogyne incognita</i>	1 µM	↓ 100%
<b>Toxicidade em sementes (germinação)</b>	<i>Nicotiana tabacum</i>	100 µM	↓ 10%
<b>Toxicidade em plantas</b>	<i>Nicotiana tabacum</i>	100 µM	0%

↓Taxa de redução

**Tabela IV 16.** Sumarização dos resultados obtidos referentes aos ensaios de atividade biológica *in vivo* com as AgNPs-CbC sintetizadas utilizando extrato aquoso de folhas de *Caryocar brasiliense*

<i>In vivo</i>			
Teste de atividade biológica	Modelo utilizado	Concentração	Alteração
<b>Toxicidade em plantas</b>	Morfologia	100 µM	SA
	Bioquímica		SA
<b>Controle de nematoides (<i>Meloidogyne incognita</i>)</b>	Morfologia	100 µM	SA
	Bioquímica		SA
	Número de ovos		↓ 85,5%
	Eclosão		↓ 81,6%
<b>Camundongos (C57Bl/6)</b>	Hematologia	64 µM	SA
	Bioquímica		SA
	Histologia		IF

SA - Sem alteração; IF - infiltrado inflamatório no fígado.

## CONCLUSÃO

Os constituintes moleculares presentes em extratos aquosos das folhas de *Caryocar brasiliense* exibiram efeito pronunciado na nucleação, crescimento e estabilização das AgNPs-CbC em suspensões coloidais aquosas.

As AgNPs-CbC sintetizadas (1 mg/mL de CbC, 2,5h a 75°C) apresentaram formato esférico, tamanho nanométrico (diâmetro hidrodinâmico médio em torno de 50,0 nm), polidispersividade moderada (PdI = 0,429) e estabilidade coloidal moderada (potencial Zeta de superfície de aproximadamente -25,0 mV).

A rota de síntese selecionada apresentou alta reprodutibilidade das sínteses realizadas utilizando folhas oriundas da mesma planta, mas não quando utilizado folhas de plantas diferentes de *Caryocar brasiliense*.

AgNPs-CbC podem ser produzidas em sistemas de batelada e microfluídica.

As suspensões se mantiveram coloidalmente estáveis por 1,5 anos quando armazenadas a 4°C, mas não quando armazenadas a 25°C sendo que nesse caso ocorreu instabilidade após 1 mês de armazenamento.

Baixa concentração de peróxido de hidrogênio (0,004%) foi capaz de dissolver completamente as AgNPs-CbC em poucos minutos.

Foi possível identificar alguns dos possíveis compostos que estão relacionados ao processo de redução e estabilização das CbC-AgNPs, dentre os quais estão flavonoides, taninos e compostos fenólicos

As AgNPs-CbC apresentaram efeito citotóxico mais pronunciado contra bactéria Gram-negativa em relação à bactéria Gram-positiva, ainda que em ambos os casos em concentrações micromolares, semelhante à da prata livre.

As AgNPs-CbC em suspensão e imobilizadas na superfície de microtubos inibiram o crescimento de *Candida albicans in vitro*.

As AgNPs-CbC na concentração de 100 µM reduziram a viabilidade de fibroblastos, macrófagos, células de câncer de mama murino e humano em 14,6%, 51,5%, 0% e 24,4%, respectivamente.

As AgNPs-CbC nas concentrações de 100 µM reduziram a viabilidade de células de inseto (Sf21) em 65% *in vitro*.

As AgNPs-CbC apresentaram baixa taxa hemolítica para hemácias murina.



Efeito nematicida, semelhante ao da prata livre, foi observado contra os nematoides *Caenorhabditis elegans* e *Meloidogyne incognita in vitro* após exposição às nanopartículas em concentrações de 7 e 1  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

As AgNPs-CbC na concentração de 100  $\mu\text{M}$  não causaram efeitos toxicológicos avaliados por parâmetros morfométricos e bioquímicos em plantas *Nicotiana tabacum in vitro* e *in vivo*.

As AgNPs-CbC na concentração de 100  $\mu\text{M}$  reduziram em 85% o número de ovos de nematoides *Meloidogyne incognita in vivo*, bem como em 82% a taxa de eclosão dos mesmos.

As AgNPs-CbC na concentração de 64  $\mu\text{M}$  injetadas por via endovenosa não acarretaram em alterações nos perfis hematológicos e bioquímicos de camundongos *in vivo*.

As AgNPs-CbC, após 24 h da administração intravenosa, não acarretaram em alterações morfológicas significativas no baço, rim e pulmão de camundongos, sendo observados apenas pequenos infiltrados inflamatórios no fígado.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo representa um avanço no conhecimento relacionado à seleção e otimização das rotas de síntese verde utilizando diferentes espécies de plantas, por meio de abordagens confirmatórias em uma mesma espécie; variações nas rotas de síntese; caracterização físico-química/estrutural; investigação de reprodutibilidade, escalonamento e estabilidade coloidal; avaliação de mecanismos de solubilização; investigação dos constituintes moleculares dos extratos; e avaliação de possíveis atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* das AgMPs e AgNPs obtidas por meio de rotas de síntese verde em diferentes organismos modelo.

Esses achados poderão auxiliar no entendimento dos mecanismos de formação de AgNPs por extratos de plantas, bem como contribuir para o entendimento das diferenças de propriedades físico-químicas e atividades observadas, além de auxiliar estudos futuros na escolha racional das plantas para utilização na síntese verde de AgNPs e outros metais, diminuindo o empirismo que predomina atualmente nos processos de síntese verde. Adicionalmente, essas informações auxiliarão no desenvolvimento de simulador preditivo baseado em modelagem matemática o qual poderá ser empregado para formação de NPMs por meio de rotas de síntese verde.

## CRONOGRAMA DE ATIVIDADES REALIZADAS

### Semestres

Atividades	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°
1. Revisão Bibliográfica	*	*	*	*	*	*	*	*
2. Disciplinas da Pós-Graduação	*	*	*					
3. Desenvolvimento e otimização de rotas de síntese de micro- e nanopartículas metálicas utilizando extrato de plantas do Cerrado	*	*	*	*				
4. Caracterização física e química das micro- e nanopartículas		*	*	*	*			
5. Caracterização dos extratos					*	*		
6. Testes de potencialidade biológica <i>in vitro</i>			*	*	*			
7. Testes de potencialidade biológica <i>in vivo</i>				*	*	*	*	
8. Avaliação de toxicidade das nanopartículas <i>in vivo</i> em plantas				*	*	*	*	
9. Investigação de resposta aguda após a exposição às AgNPs em camundongos <i>in vivo</i>						*	*	
10. Exame de qualificação				*				
11. Publicação de artigo científico e capítulo de livros			*				*	
12. Redação da tese				*				
13. Defesa de tese (09/12/2016)								*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed, K. B. R.; Nagy, A. M.; Brown, R. P.; Chang, Q.; Malghan, S. M.; Goering, P. L. Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. **Toxicol. In Vitro.**, 2016. DOI:10.1016/j.tiv.2016.10.012

Ahmed, S.; Ahmad, M.; Swami, B. L.; Ikram, S. Plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green Expertise. **J. Adv. Res.**, v. 7, n. 1, p. 17-28, 2016.

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. 343-52, 2014.

Albernaz, V. L. Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico. 2014. **Dissertação** Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, Universidade de Brasília.

Albert, G. C.; Roumeliotis, M.; Carson, J. J. L. The effect of temperature and freeze–thaw processes on gold nanorods. **Nanotechnol.**, v. 20, p. 1-6, 2009.

Allafchian, A. R.; Mirahmadi-Zare, S. Z.; Jalali, S. A. H.; Hasemi, S. S.; Vahabi, M. R. Green synthesis of silver nanoparticles using phlomis leaf extract and investigation of their antibacterial activity. **J Nanostruct Chem.**, 2016. DOI: 10.1007/s40097-016-0187-0

Almeida A. C.; Macedo-Sobrinho, E.; Pinho, L.; Souza, P. N. S.; Martins, E. R.; Duarte E. R.; Santos, H. O.; Brandi, I. V.; Cangussu, A. S.; Costa J. P. R. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. **Ciência Rural.**, v. 40, n. 1, p. 200-203, 2010.

Alvarenga, A. L.; Schwan, R. F.; Dias, D. R.; Schwan-E, K. R. F.; Bravo-Martins, C. E. C. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 9, n. 4, p. 86-91, 2007.

Amendola, V.; Bakr, O. M.; Stellacci, F. Effect of shape, size, structure, and assembly. **Plasmonics**, v. 5, n. 1, p. 85-97, 2010.

Amin, M.; Anwar, F.; Janjua, M. R. S. A.; Iqbal, M. A.; Rashid, U. Green synthesis of silver nanoparticles through reduction with *Solanum xanthocarpum* L. berry extract: Characterization, antimicrobial and urease inhibitory activities against *Helicobacter pylori*. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 13, p. 9923-9941, 2012.

Amorati, R.; Attanasi, O. A.; Favi, G.; Menichetti, S.; Pedullia, G. F.; Viglianisic, C. Amphiphilic antioxidants from “cashew nut shell liquid” (CNSL) waste. **Org. Biomol. Chem.**, v. 9, p. 1352-1355, 2011.

Amory, D. E.; Rouxhet, P. G. Surface properties of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces carlbergensis*: chemical composition, electrostatic charge and hydrophobicity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 938, n. 1, p. 61-70, 1988.

Ansari, M. A.; Khan, H. M.; Khan, A. A.; Alzohairy, M. A.; Waseem, M.; Ahmad, M. K.; Mahdi, A. A. Biochemical, histopathological, and transmission electron microscopic ultrastructural changes in mice after exposure to silver nanoparticles. **Environ. Toxicol.**, p. 1-12, 2014.

Araruna, F. B.; Quelemes, P. V.; Faria, B. E. F.; Kuckelhaus, S. a. S.; Marangoni, V. S.; Zucolotto, V.; Da Silva, D. A.; Júnior, J. R. S.; Leite, J. R. S. A.; Eiras, C. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles reduced and stabilized by Cashew Tree Gum. **Adv. Sci. Eng. Med.**, v. 5, n. 8, p. 890-893, 2013.

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.

Armendariz, V.; Herrera, I.; Jose-Yacaman, M.; Troiani, H. E.; Santiago, P.; Gardea-Torresdey, J. L. Size controlled gold nanoparticle formation by *Avena sativa* biomass: use of plants in nanobiotechnology. **J. Nanopart. Res.**, v. 6, n. 4, p. 377-382, 2004.

Arnon, D. J. Copper enzymes in isolated chloroplasts Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant. Physiology**. Maryland, v.24, n.1, p. 1-15, 1949.

Arora, S.; Rajwade, J. M.; Paknikar, K. M. Nanotoxicology and *in vitro* studies: the need of the hour. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.258, n.2, p.151-65, 2012.

Arunachalam, K. D.; Annamalai, S. K.; Hari, S. One-step green synthesis and characterization of leaf extract-mediated biocompatible silver and gold nanoparticles from *Memecylon umbellatum*. **Int. J. Nanomedicine**, v. 8, p. 1307-15, 2013.

American Society for Testing and Materials. Zeta Potential of Colloids in Water and Waste Water ASTM Standard D 4187-4182, 1985.

Balashanmugam, P.; Kalaichelvan, P. T. Biosynthesis characterization of silver nanoparticles using *Cassia roxburghii* DC. aqueous extract, and coated on cotton cloth for effective antibacterial activity. **Int. J. Nanomedicine**, v. 10, p. 87-97, 2015.

Bar, H.; Bhui, D. K.; Sahoo, G. P.; Sarkar, P.; De, S.; Misra, A. Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*. **Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp**, v. 339, n. 1, p. 134-139, 2009.

Batista, H. L. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais de plantas do estado do Tocantins. 2008. **Dissertação**. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

Beneta, D. Toxicity of silver nanoparticles in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Tese**. 2012. Department of Biology, Universidade de Zagreb, Faculty of Science.

Bessa, L. A.; Silva, F. G.; Moreira, M. A.; Teodoro, J. P. R.; Soares, F. a. L. Growth and nutrient accumulation of *Anacardium othonianum* Rizz seedlings grown in nutrient solution. **Chilean J. Agr. Res.**, v. 73, n. 3, p. 301-308, 2013a.

Bessa, N.G.F.de; Borges, J.C.M; Beserra, F.P.; Carvalho, R.H.A.; Pereira, M.A.B.; Fagundes, R.; Campos, S.L.; Ribeiro, L.U; Quirino, M.S; Chagas Junior, A. F; Alves, A. Preliminary phytochemical screening of native Cerrado plants of medicinal popular use by the rural community of the Vale Verde settlement - Tocantins. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v.15 n. 4, 692-707, 2013b.

Borges, R. T. Caracterização do ambiente de ocorrência natural, fruto e pseudofruto de caju arbóreo do Cerrado (*Anacardium othonianum*), fenologia e implantação de coleção na EA/UFG. 2012. **Dissertação**. Programa de PósGraduação em Agronomia da Universidade Federal de Goiás.

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. **Ind. Crop. Prod.**, v. 58, p. 46-54, 2014.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Sci. Technol.**, v. 28, p. 25-30, 1995.

Bystrzejska-Piotrowska, G.; Golimowski, J.; Urbana, P. L. Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management. **Waste Manage**, v. 29, n. 9 p. 2587-2595, 2009.

Carvalho, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Embrapa Informação Tecnológica. **Colombo: Embrapa Florestas**, Brasília-DF, v.3, 2008.

Chandran, S. P.; Chaudhary, M.; Pasricha, R.; Ahmad, A.; Sastry, M. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract. **Biotechnol. Prog.**, v. 22, n. 2, p. 577-583, 2006.

Chen, X.; Jesen, L. Understanding the shape effect on the plasmonic response of small ligand coated nanoparticles. **J. Opt.**, v. 18, p. 1-9, 2016.

Cheong, Y. H.; Chang, H. S.; Gupta, R.; Wang, X.; Zhu, T.; Luan, S. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 129, n. 2, p. 661-677, 2002.

Choudhary, M. K.; Kataria, J.; Cameotra, S. S.; Singh, J. A facile biomimetic preparation of highly stabilized silver nanoparticles derived from seed extract of *Vigna radiata* and evaluation of their antibacterial activity. **Appl. Nanosci.**, v. 6, n. 1, p. 105-111, 2016.

Bhumi, G.; Linga, R. M.; Savithramma, N. Green synthesis of silver nanoparticles from the leaf extract of *Adhatoda vasica* nees. and assessment of its antibacterial activity. **Asian J. Pharm. Clin. Res.**, v. 8, n. 3, p. 62-67, 2015.

Chung, I.; Park, I.; Seung-Hyun, K.; Thiruvengadam, M.; Rajakumar, G. Plant-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles: Their Characteristic Properties and Therapeutic Applications. **Nanoscale Res Lett.** v. 11, p. 40, 2016.

Contreras-Cáceres, R.; Sierra-Martin, B.; Fernández-Barbero, F. Surface-Enhanced Raman Scattering Sensors based on Hybrid Nanoparticles. *Microsensors*, Prof. Igor Minin (Ed.), InTech, 2011.

Cromwell, W. A.; Yang, Joopil, Y.; Starr, J. L.; Jo, Y. Nematicidal Effects of Silver Nanoparticles on Root-knot Nematode in Bermudagrass. **J. Nematol.**, v. 46, n. 3, p. 261-266, 2014.

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 Surf. B: Biointerf.**, v. 81, n. 1, p. 67-73, 2010.

Das, K. D.; Chakraborty, A.; Bhattacharjee, S.; Dey, S. Biosynthesis of stabilised gold nanoparticle using an aglycone flavonoid, quercetin. **J. Exp. Nanosci.**, v. 8, n. 4, p. 649-655, 2012.

Das, R. K.; Nayanmoni, G.; Bora, U. Green synthesis of gold nanoparticles using *Nyctanthes arbortristis* flower extract. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 34, p. 615–619, 2011.

Debnath, G.; Dutta, S.; Saha, A; Das, P. Green synthesis, characterization and antibacterial activity of silvernanoparticles (Agnps) from grass leaf extract *Paspalum conjugatum* P.J. **Berguis. J. Mycopathol. Res.**, v. 54, n. 3, p. 371-376, 2016.

Demming-Adams, B.; Adams, W. W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. **Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 43, p. 599-626, 1992.

Dias, A. M; Morais, M. C. Estudo morfoanatômico e prospecção fitoquímica das folhas de *Caryocar brasiliense* Cambess (Caryocaraceae) ocorrentes na base aérea de Anápolis-GO. **Trabalho de conclusão de curso**. Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2011.

Domokos-Szabolcsy, E.; Sztrik A.; Babka B.; Prokisch, J.; Fari, M. Accumulation of red elemental selenium nanoparticles and their biological effects in *Nicotiana tabacum*. **Plant Growth Regul.**, v. 68, n. 3, p. 525-531, 2012.

Dubey, S. P.; Lahtinen, M.; Sillanpää, M. Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles. **Process Biochem.**, v. 45, n. 7, p. 1065-1071, 2010.

Dwivedi, A. D.; Gopal, K. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract. **Colloids Surf A Physicochem. Eng. Asp.**, v. 369, n. 3, p. 27-33, 2010.

El-Said, W. A.; Cho, H. Y.; Yea, C. H.; Choi, J. W. Synthesis of metal nanoparticles inside living human cells based on the intracellular formation process. **Adv. Mater.**, v. 26, n. 6, p. 910-8, 2014.



Feng, Q. L.; Wu, J.; Chen, G. Q.; Cui, F. Z.; Kim, T. N.; Kim, J. O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 52, p. 662-668, 2008.

Frazon, R. C. Fruteiras nativas do Cerrado têm potencial para exploração. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/131/>>. Acesso em: 22 fev. 2015.

Frazier, T.P.; Burklew, C. E.; Zhang, B. Titanium dioxide nanoparticles affect the growth and microRNA expression of tobacco (*Nicotiana tabacum*). **Funct Integr Genomics.**, v. 14, n. 1, p. 75-83, 2014.

Fonseca, L. D.; Bastos, G. A.; Costa, M. A. M. S.; Ferreira, A. V. P.; Silva, M. L. F.; Vieira, T. M.; Morais-Costa, F.; Oliveira, N. J. F.; Duarte, E. R. Effects of aqueous extracts of *Caryocar brasiliense* in mice. **Acta Sci. Vet.**, v. 44, n. 1359, p. 1-6, 2016.

Fontanive, V. C. P. Síntese, caracterização e análise *in vitro* e *in vivo* da toxicidade de nanopartículas de ferrite de cobalto para aplicações biomédicas. **Dissertação de mestrado**. Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2012.

Fuku, X.; Diallo, A.; Maaza, M. Nanoscaled electrocatalytic optically modulated ZnO nanoparticles through green process of *Punica granatum* L. and their antibacterial activities. **Int. J. Electrochem.**, v. 2016, 1-10, 2016.

Gardea-Torresdey, J. L.; Gomez, E.; Peralta-Videa, J. R.; Parsons, J. G.; Troiani, H. E.; Jose-Yacaman, M. Alfalfa sprouts: a natural source for the synthesis of silver nanoparticles. **Langmuir**, v. 19, n. 4, p. 1357-1361, 2003.

Garg, S.; Rong, H.; Miller, C. J.; Waite, T. D. Oxidative dissolution of silver nanoparticles by chlorine: Implications to silver nanoparticle fate and toxicity. **Environ Sci Technol.**, v. 50, n. 7, p. 3890-3896, 2016.

Ghaseminezhad, S. M.; Hamed, S.; Shojaosadati, S. A. Green synthesis of silver nanoparticles by a novel method: Comparative study of their properties. **Carbohydr. Polym.**, v. 89, n. 2, p. 467-472, 2012.

Guo, H.; Zhang, J.; Boudreau, M.; Meng, J.; Yin, J.; Liu, J.; Xu, H. Intravenous administration of silver nanoparticles causes organ toxicity through intracellular ROS-related loss of interendothelial junction. **Part Fibre Toxicol.**, p. 13-21, 2016.

Hadacek, F., Bachmann, G. Low-molecular-weight metabolite systems chemistry. **Front. Environ. Sci.**, v. 3, n.12, p. 1-21, 2015.

Hadrup, N.; Loeschner, K.; Bergström, A.; Wilcks, A.; Gao, X.; Vogel, U.; Frandsen, H. L.; Larsen, E. H.; Lam, H. R.; Mortensen, A. Subacute oral toxicity investigation of nanoparticulate and ionic silver in rats. **Arch Toxicol.**, v. 86, p. 543–51, 2012.

Hammer, Ø.; Harper, D. A. T.; Ryan, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontol. Electron.**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.

Haridasan, M. Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. **Brazilian J. of Plant Physiol.** v. 20, p. 183-195, 2008.

Hazarika, S. N.; Gupta, K.; Shamin, K. N. A. M; Bhardwaj, P.; Coruah, R.; Yadav, K. K.; Naglot, A.; Ded, P.; Mandal, M.; Doley, R.; Veer, V.; Baruah, I.; Namsa, N. D. One-pot facile green synthesis of biocidal silver nanoparticles. **Mater. Res. Express**, v. 3, n. 7, p. 2053-1591, 2016.

He, D.; Garg, S.; Waite, T. D. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidation of zero-valent silver and resultant interactions among silver nanoparticles, silver ions, and reactive oxygen species. **Langmuir.**, v. 28, n. 27, p. 10266-10275, 2012.

Heath, J. R. Size-dependent surface-plasmon resonances of bare silver particles. **Phys Rev. B Condens. Matter**, v. 40, n. 14, p. 9982-9985, 1989.

Hermes-Lima, M.; Willmore, W. G.; Storey, K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. **Free Radical Biol. Med.**, v. 19, n. 3, p. 271-280, 1995.

Hojjat, S. S.; Hojjat, H. Effects of silver nanoparticle exposure on germination of Lentil (*Lens culinaris* Medik.). **Intl J Farm & Alli Sci.**, v. 5, n. 3, p. 248-252, 2016.

Hoo, C. M.; Starostin, N.; West, P.; Mecartney, M. L. A comparison of atomic force (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. **J. Nanopart. Res.**, v. 10, p. 89-96, 2008.

Huang, H.; Lai, W.; Cui, M.; Lin, Y.; Fang, Q.; Liu, Y.; Xie, L. An Evaluation of Blood Compatibility of Silver Nanoparticles. **Sci. Rep.**, v. 6, 1-15, 2016.

Huang, L.; Tang, X.; Zhang, W.; Jiang, R.; Chen, D.; Zhang, J.; Zhong, H. Imaging of Endogenous Metabolites of Plant Leaves by Mass Spectrometry Based on Laser Activated Electron Tunneling. **Scientific Reports**, v. 6, n. 24164, p. 1-8, 2016.

Huang, X.; Wu, H.; Pu, S.; Zhang, W.; Liao, X.; Shi, B. One-step room-temperature synthesis of Au@Pd core-shell nanoparticles with tunable structure using plant tannin as reductant and stabilizer. **Green Chem.**, v. 13, p. 950-957, 2011.

Hyau, J.; Lee, B. S.; Ryu, H. Y.; Sung, J. H.; Chung, K. H.; Yu, J. Effects of repeated silver nanoparticles exposure on the histological structure and mucins of nasal respiratory mucosa in rats. **Toxicol. Lett.**, v. 182, pp. 24-28, 2008.

Iravani, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chem.**, v. 13, p. 2638-2650, 2011.

Iravani, S. H.; Korbekandi, H.; Mirmohammadi, S. V.; Zolfaghari, B. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. **Res. Pharm. Sci.**, 9(6):385-406, 2014.

Jabir, N. R.; Tabrez, S.; Ashraf, G. M.; Shakil, S.; Damanhour, G. A.; Kamal, M. A. Nanotechnology-based approaches in anticancer research. **Int. J. Nanomedicine**, v. 7, p. 4391-408, 2012.

Jang, S. J.; Jun, Y. I.; Tettey C. O.; Mo, K. K.; Mook, S. H. In-vitro anticancer activity of green synthesized silver nanoparticles on MCF-7 human breast cancer cells. **Mater Sci. Eng. C**, v. 68, n. 1, p. 430-435, 2016.

Jha, A. K.; Prasad, K.; Prasad, K.; Kulkarni, A. R. Plant system: nature's nanofactory. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 219-23, 2009.

Joanitti, G. A.; Silva, L. P. The emerging potential of byproducts as platforms for drug delivery systems. **Curr. Drug Targets**, v. 14, 2013.

Jong, W. H.; Vanderven, L. T. M.; Sleijffers, A.; Park, M. V. D. Z.; Jansen, E. H. J. M.; Loveren, H. V.; Vandebriel, R. J. Systemic and immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28 days repeated dose toxicity study in rats. **Biomaterials**, v. 34, p. 8333-8343.

Judy, J. D.; Tollamadugu, N. V. K. V.; Bertsch, P.M. Pin Oak (*Quercus palustris*) leaf extract mediated synthesis of triangular, polyhedral and spherical gold nanoparticles. **Adv. Nanoparticles**, v.1, p.79-85, 2012.

Junqueira, L.C.U.; Carneiro, J. Histologia Básica. 11ª Ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2008, 524p.

Kalatunga, D. C. M.; Dananjaya, S. H. S.; Gosahewa, G. I.; Lee, J.; Zoysa M. Chitosan silver nanocomposite (CAgNC) as an antifungal agent against *Candida albicans*. **Med. Mycol.**, n. 0, v. 0, p. 1-10, 2016.

Kent, R. D. Controlled evaluation of silver nanoparticle dissolution using atomic force microscopy. **Thesis**. Virginia Polytechnic Institute and State University. Virginia, Unites States, 2011.

Khalil, M. M. H.; Ismail, E. H.; El-Bagdady, K. Z.; Mohamed, D. Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. **Arabian J. Chem.**, v. 7, n. 6, p. 1131-1139, 2014.

Kharissova, O. V.; Dias, H. V.; Kharisov, B. I.; Perez, B. O.; Perez, V. M. The greener synthesis of nanoparticles. **Trends Biotechnol.**, v. 31, n. 4, p. 240-248, 2013.

Kim, K. J.; Sung, W. S.; Suh, B. K.; Moon, S. K.; Choi, J. S.; Kim, J. G.; Lee, D. G. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. **Biometals**, v. 22, n. 2, p. 235-342, 2009.

Kim, S.; Thiessen, P. A.; Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, Han L, He J, He S, Shoemaker BA, Wang J, Yu, B.; Zhang, J.; Bryant, S. H. PubChem substance and compound databases. **Nucleic Acids Res.**, v. 4, n. 44, p. 1202-1213, 2016.

Kim, Y. S.; Song, M. Y.; Park, J. D.; Song, K. S.; Ryu, H. R.; Chung, Y. H.; Chang, H. K.; Lee, J. H.; Oh, K. H.; Kelman, B. J.; Hwang, I. K.; Yu, I. J. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. **Part Fibre Toxicol.**, v. 7, n. 20, p. 1-11, 2010.

Krishnaraj, C.; Jagan, E. G.; Rajasekar, S.; Selvakumar, P.; Kalaichelvan, P. T.; Mohan, N. Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v. 76, n. 1, p. 50-56, 2010.

Kumar, B.; Smita, K.; Cumbal, L.; Camacho, J.; Gallegos-Hermández, E.; Chavéz-Lopes, M. G.; Grijalva, M.; Andrade, K. One pot phytosynthesis of gold

nanoparticles using *Genipa americana* fruit extract and its biological applications. **Mater. Sci. Eng. C.**, v. 62, n. 1, p. 725-731, 2016.

Kumar, P. V.; Pammi, S.; Kollu, P.; Satyanarayana, K.; Shameem, U. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Boerhaavia diffusa* plant extract and their anti bacterial activity. **Ind. Crop. Prod.**, v. 52, p. 562-566, 2014.

Kumar, V.; Parvatam, G.; Ravishankar, G. A. AgNO<sub>3</sub> - a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. **Electron. J. Biotechnol.**, v. 12, n. 2, p. 1-16, 2009a.

Kumar, V.; Yadav, S. K. Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. **Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 84, n. 2, p. 151-157, 2009b.

Lankveld, D.P.K; Oomin, A.G.; Prystek, P.; Neigh, A.; Jong, A.; Noorlander, C. W.; Eijkeren, J. C. H.; Geertsma, R. E.; Jong, W. H. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. **Biomaterials**, v. 31, p. 8350-8361, 2010.

Lee, D. Y.; Bowen, B. P.; Northen, T. R. Mass spectrometry-based metabolomics, analysis of metabolite-protein interactions, and imaging. **Biotechniques**. v. 49, n. 2, p. 557-565, 2010.

Lee, J.; Kim, K. J.; Sung, W. S.; Kim, J. G.; Lee, D. G.; . The silver nanoparticle (Nano-Ag): a new model for antifungal agents In: Perez, D. P. (Ed.). **Silver Nanoparticles**, 2010.

Lee, Y. H.; Cheng, F. Y.; Chiu, H. W.; Tsai, J. C.; Fang, C. Y.; Chen, C. W; Wang, Y. Y. Cytotoxicity, oxidative stress, apoptosis and the autophagic effects of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts. **Biomaterials**, v. 35, p. 4706-4715, 2014.

Li, D.; Liu, Z.; Yuan, Y.; Liu, Y.; Niu, F. Green synthesis of gallic acid-coated silver nanoparticles with high antimicrobial activity and low cytotoxicity to normal cells. **Process. Chem.**, v. 50, n. 3, p. 357-366, 2015.

Liang, M.; Su, R.; Huang, R.; Qi, W.; Yu, Y.; Wang, L.; He, Z. Facile *in situ* synthesis of silver nanoparticles on procyanidin grafted eggshell membrane and their catalytic properties. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 6, p. 4638-4649, 2014.

Liberio, M. S.; Joanitti, G. A.; Azevedo, R. B.; Cilli, E. M.; Zanotta, L. C.; Nascimento, A. C.; Sousa, M. V.; Pires Junior, O. R.; Fontes, W.; Castro, M. S. Anti-proliferative and cytotoxic activity of pentadactylin isolated from *Leptodactylus labyrinthicus* on melanoma cells. **Amino Acids**, v. 40, n. 1, p. 51-9, 2011.

Lichtenthaler, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Packer, L., Douce, R. (Eds.). **Methods in enzymology**. London: Academic Press, v.148, p.350-3581, 1987.

Lloyd, J. R.; Byrne, J. M.; Coker, V. S. Biotechnological synthesis of functional nanomaterials. **Curr. Opin Biotechnol.**, v. 22, n. 4, p. 509-515, 2011.

López, M. M. C. Estudio del comportamiento de antioxidantes naturalesadicionados a poliolefinas en aplicaciones industriales. **Tese**. Departamento de Física. Universidade de A Coruña, 2013.

MacCuspie, R. I. Colloidal stability of silver nanoparticles with various surface coatings in biologically relevant conditions. **J. Nanopart. Res.**, v. 13, n. 7, p. 2893-2908, 2011.

MacCuspie, R. I.; Allen, A. J.; Martin, M. N.; Hackley, V. A. Just add water: reproducible singly dispersed silver nanoparticle suspensions on-demand. **J. Nanopart. Res.**, v. 15, p. 1-12, 2013.

Maciel, J. S.; Kosaka, P. M.; De Paula, R. C. M.; Feitosa, J. P. A.; Petri, D. F. S. Formation of cashew gum thin films onto silicon wafers or amino-terminated surfaces and the immobilization of Concanavalin A on them. **Carbohydr. Polym.**, v. 69, p. 522-529, 2007.

Maiti, K. A.; Maiti, A.; Neogi, R.; Kothari, D.C. Differential susceptibility of gram positive and gram negative bacteria towards ZnO nanoparticles. **IJCPS.**, v. 3, p. 68-78, 2014.

Mansur, M. C. P. P. R.; LEITÃO, S. G.; Lima, L. M.; Ricci-Junior; S. G. R.; Barbi, N. S.; Martins, T. S.; Dellamora-Ortiz, G. M.; Leo, R. R.; Vieira, R. C.; Leitão, G. G.; Santos, E. P. Evaluation of the antioxidant and phototoxic potentials of *Bauhinia microstachya* var. massambabensis Vaz Leaf Extracts. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 31, p. 200-206, 2012.

Marçal, R.; Corrola, J.; Jarak, I.; Corvo, M. L.; Duarte, I. F.; Pereira, M. L. Microscopic studies of liver and kidney in mice exposed to silver nanoparticles. **Microsc. Microanal.**, v. 22, n. 54, p. 18-19, 2016.

Marchiol, L. Synthesis of metal nanoparticles in living plants. **IJA**, v. 7, n. 37, p. 274-282, 2012.

Martina, I.; Wiesinger, R.; Jembrih-Simbürger, D.; Schreiner, M. Micro-Raman characterisation of silver corrosion products: instrumental set up and reference database. **e-PS.**, v. 9, p. 1-8, 2012.

Maurer, L. L.; Meyer, J. N. A systematic review of evidence for silver nanoparticle-induced mitochondrial toxicity. **Environ. Sci. Nano.**, v. 3, p. 311-322, 2016.

Mendoza-Reséndez, R.; Núñez, N. O.; Barriga-Castro, E. D.; Luna, C. Synthesis of metallic silver nanoparticles and silver organometallic nanodisks mediated by extracts of *Capsicum annuum* var. aviculare (piquin) fruits. **RSC Advances**, v. 1, p. 20765-20771, 2013.

Mertha, A.; Silva, L. P. MALDI-TOF MS profiling approach: how much can we get from it? **Front Plant Sci.** v. 6, n. 184, p. 1-3, 2015.

Mittal, A. K.; Chisti, Y.; Banerjee, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnol. Adv.**, v. 31, n. 2, p. 346-356, 2013.

MMA. O Bioma Cerrado. Ministério do Meio Ambiente. 2015. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>. Acesso em: 22 fev de 2015.

Mogensen, K. B.; Kneipp, K. Size-dependent shifts of plasmon resonance in silver nanoparticle films using controlled dissolution: Monitoring the onset of surface screening effects. **J. Phys. Chem. C.** 2014.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

Mubofu, E. B.; Mdoe, J. E. G.; Kinunda, G. The activity of invertase immobilized on cashew nut shell liquid-templated large pore silica hybrids. **Catal. Sci. Technol.**, v. 1, p. 1423-1431, 2011.

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.

Mukunthan, K. S.; Balaji, S. Cashew Apple Juice (*Anacardium occidentale* L.) Speeds up the synthesis of silver nanoparticles. **Int. J. Green Nanotechnol.**, v. 4, n. 2, p. 71-79, 2012.

Murdock, R. C.; Braydich-Stolle, L.; Schrand, A. M.; Schlager, J. J.; Hussain, S. M. . Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to *in vitro* exposure using dynamic light scattering technique. **Toxicol. Sci.**, v. 101, n. 2, p. 239-253, 2008.

Murphy, C. J.; Sau, T. K.; Gole, A. M.; Orendorff, C. J.; Gao, J.; Gou, L.; E., S.; Hunyadi, S. E.; Li, T. Anisotropic metal nanoparticles: synthesis, assembly, and optical applications. **J. Phys. Chem. B**, v. 109, n. 29, p. 13857-13870, 2005.

Narayanan, K. B.; Sakthivel, N. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. **Adv. Colloid. Interface Sci.**, v. 169, n. 2, p. 59-79, 2011.

Nel, A.; Xia, T.; Madler, L.; Li, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, p. 622-627, 2006.

Neves, E. S.; Ferreira, P. M.; Lima, L. H.; Peron, A. P. Action of aqueous extracts of *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) leaves on meristematic root cells of *Allium cepa* L. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 86, n. 3, p. 1131-7, 014.

Noguez, C. Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The influence of shape and physical environment. **J. Phys. Chem. C**, v. 111, p. 3806 - 3819, 2007.

Oberdorster, G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. **J. Intern. Med.**, v. 267, n. 1, p. 89-105, 2010.

Oberdorster, G.; Oberdorster, E.; Oberdorster, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environ. Health Perspect**, v. 113, n. 7, p. 823-839, 2005.

Osonga, F. J.; Kariuki, V. M.; Yazgan, I.; Jimenez, A.; Luther, J. S.; Sadik, O. A. Synthesis and antibacterial characterization of sustainable nanosilver using naturally-derived macromolecules. **Sci. Total Environ.**, v. 1, p. 977-986, 2016.

Park, E. J.; Bae, E.; Yi, J.; Kim, Y.; Choi, K.; Lee, S. H.; Yoon, J.; Lee, B. C.; Park, K. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral



administration of silver nanoparticles. **Environ Toxicol Pharmacol.**, v. 30, p. 162-168, 2010.

Park, Y.; Hong, Y. N.; Weyers, A.; Kim, Y. S.; Linhardt, R. J. Polysaccharides and phytochemicals: a natural reservoir for the green synthesis of gold and silver nanoparticles. **IET Nanobiotechnol.**, v. 5, n. 3, p. 69-78, 2011.

Park, S.; Lim, D.; Lim, H.; Kwon, T.; Choi, J.; Jeong, S.; Choi, I.; Cheon, J. Size dependent macrophage responses and toxicological effects of Ag nanoparticles. **Chem. Commun.**, v. 47, p. 4382-4384, 2011.

Paula-Junior, W. et al. Leismanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Camb. Leaves hydroethanolic extract. **Res. Bras. Farmacogn.**, v.16, p. 625-630, 2006.

Paulilo, M. T. S.; Lapa, F. S.; Falkenberg, M. B. Effect of light intensity and growth substratum on plant development and production of secondary metabolites in *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schult. **Rev. Árvore**, v. 34, n.3, 417-433, 2010.

Prabhu, S.; Poulouse, E. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. **Nano Letters**, v.2, n.32, p. 1-10, 2012.

Peretyazhko, T. S.; Zhang, Q.; Colvin, V. L. Size-Controlled dissolution of silver nanoparticles at neutral and acidic pH conditions: Kinetics and size changes. **Environ. Sci. Technol.**, v. 48, n. 20, p. 11954-11961, 2014.

Philip, D. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus rosa sinensis*. **Physica E Low Dimens. Syst. Nanostruct.**, v. 42, n. 5, p. 1417-1424, 2010a.

Philip, D. Rapid green synthesis of spherical gold nanoparticles using *Mangifera indica* leaf. **Spectrochim. Acta Mol. Biomol.**, v. 77, n. 4, p. 807-810, 2010b.

Pluskal, T.; Castillo, S.; Villar-Briones, A.; Orešič, M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry based molecular profile data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 395, p. 1-11, 2010.

Porto, C. S. Potencial antioxidante de extratos obtidos a partir de frutos e folhas do pquei (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Dissertação**. Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, 2008.

Quelemes, P. V.; Araruna, F. B.; De Faria, B. E.; Kuckelhaus, S. A.; Da Silva, D. A.; Mendonca, R. Z.; Eiras, C.; Dos, S.; M.J., S.; Leite, J. R. Development and

antibacterial activity of cashew gum-based silver nanoparticles. **Int. J. Mol. Sci**, v. 14, n. 3, p. 4969-4981, 2013.

Quester, K.; Avalos-Borja, M.; Vilchis-Nestor, A. R.; Camacho-Lopez, M. A.; Castro-Longoria, E. SERS properties of different sized and shaped gold nanoparticles biosynthesized under different environmental conditions by *Neurospora crassa* extract. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. 1-8, 2013.

Rai, M.; Ingle, A. Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 94, n. 2, p. 287-93, 2012.

Rai, M.; Yadav, A.; Gade, A. CRC 675-Current trends in phytosynthesis of metal nanoparticles. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 28, n. 4, p. 277-284, 2008.

Rai, M. K.; Deshmukh, S. D.; Ingle, A. P.; Gade, A. K. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. **J. Appl. Microbiol.**, v. 112, n. 5, p. 841-52, 2012.

Rajathi, K.; Sridhar, S. Room temperature synthesis of silver nanoparticles by using arial part of *Tephrosia purpurea* extract in biological method and evaluation of its antibacterial Activity. **Int. J. Green Chem. Bioprocess**, v. 2, n. 4, p. 39-43, 2012.

Raveendran, P.; Fu, J.; Wallen, S. L. Completely “Green” synthesis and stabilization of metal nanoparticles. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 125, n.46, p. 13940-13941, 2003.

Recordati, C.; Maglie, M.; Bianchesse, S.; Angentiere, S.; Cella, C.; Mattiello, S.; Cubadda, F.; Aureli, F.; D'Amato, M.; Raggi, A.; Lenardi, C.; Milani, P.; Scanziani, E. Tissue distribution and acute toxicity of silver after single intravenous administration in mice: nano-specific and size-dependent effects. **Part Fibre Toxicol.**, v. 13, n. 12, p. 1-12, 2016.

Reis, L. B.; Paiva-Neto, V. B.; Toledo, E. A. P; Costa, M. G. C.; Rego, M. M.; Carvalho, C. R.; Finger, F.L.; Otoni, W.C. Axially bud development of passion fruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.**, v. 39, n. 6, p. 618-622, 2003.

Rejeeth, C.; Nataraj, B.; Vivek, R.; Sakthivel, M. Biosynthesis of silver nanoscale oarticles using *Spirulina platensis* induce growth-inhibitory effect on human breast cancer cell line MCF-7. **Med. Aromat. Plants**, v. 3, n. 3, p. 1-7, 2014.

Rajendran, I.; Dhandapani, H.; Anantanarayanan, R.; Rajaram, R. Apigenin mediated gold nanoparticle synthesis and their anti-cancer effect on human epidermoid carcinoma (A431) cells. **RSC Advances**, v. 5, p. 51055-51066, 2015.

Ribeiro, J. F.; Walter B.M.T. Tipos de Vegetação do Bioma Cerrado. Brasília, DF: Embrapa Cenargen, 2007. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/arvore/AG01\\_23\\_911200585232.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/arvore/AG01_23_911200585232.html)>. Acessado em: 22 fev. 2015.

Ribeiro, V. G. P.; Barreto, A. C. H.; Denardin, J. C.; Mele, G.; Carbone, L.; Mazzetto, S. E.; Sousa, E. M. B.; Fachine, P. B. A. Magnetic nanoparticles coated with anacardic acid derived from cashew nut shell liquid Fachine. **J. Mater. Sci**, v. 48, p. 7875-7882, 2013.

Rocha, L. B.; Melo, A. M.; Paula, S. L. A.; Nobre, S. A. M.; Abreu, I. N. Gallic acid as the major antioxidant in pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit peel. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 17, n. 4, 2015.

Roesler, R.; Catharino, R. R.; Malta, L. G.; Eberlin, M. N.; Pastore, G. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterisation of components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chem.**, v. 110, p. 711-717, 2008.

Roh, J.; Sim, S. J.; Yi, J.; Park, K.; Chung, K. H.; Ryu, D.; Choi, J. Ecotoxicity of silver nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using functional ecotoxicogenomics. **Environ. Sci. Technol.**, v. 43, n. 10, p. 3933-3940, 2009.

Ruban, A. V. Plants in light. **Commun. Integr. Biol.**, v. 2, n. 1, p. 50-55, 2009.

Santos, F. S.; Santos, R.F.; Dias, P.P.; Zañão, L.A.; Tomassoni, F. A cultura do Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Acta Iguazu**. v.3, n.3, p.46-57, 2013.

Samberg, M. E.; Oldenburg, S. J.; Monteiro-Riviere, N. A. Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin in vivo and keratinocytes *in vitro*. **Environ Health Perspect.**, v. 118, p. 407-13, 2010.

Schwitzguébel, J. P. Hype or hope: the potential of phytoremediation as an emerging green technology. **Remed. J.**, v. 11, n. 4, p. 63-78, 2001.

Senapati, S.; Ahmad, A.; Khan, M. I.; Sastry, M.; Kumar, R. Extracellular biosynthesis of bimetallic Au-Ag alloy nanoparticles. **Small**, v. 1, n. 5, p. 517-520, 2005.

Shankar, S. S.; Ahmad, A.; Pasricha, S. Bioreduction of chloraurate ions by geranium leaves and its endophytic fungus yields gold nanoparticles of different shapes. **J. Mater. Chem.**, v. 13, p. 1822-1826, 2003.

Shanker, U.; Jassal, V.; Rani, M.; Kaith. Towards green synthesis of nanoparticles: From bio-assisted sources to benign solvents. A review. **Int. J. Environ. Anal. Chem.**, v. 96, n. 9, p. 801-835, 2016.

Shao, Y.; Jin, Y.; Dong, S. Synthesis of gold nanoplates by aspartate reduction of gold chloride. **Chem. Commun. (Camb)**, n. 9, p. 1104-1105, 2004.

Shukla, R.; Nune, S. K.; Chanda, N.; Katti, K.; Mekapothula, S.; Kulkarni, R. R.; Welshons, W. V.; Kannan, R.; Katti, K. V. Soybeans as a phytochemical reservoir for the production and stabilization of biocompatible gold nanoparticles. **Small**, v. 4, n. 9, p. 1425-1436, 2008.

Silva, L. D. Síntese verde, caracterização e atividade biológica de nanopartículas de prata obtidas utilizando extratos de *Hancornia speciosa* Gomes - Apocynaceae (mangabeira). 2014. **Dissertação**. Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, Universidade de Brasília.

Silva, L. P.; Reis, I. G.; Bonatto, C. C. Green synthesis of metal nanoparticles by plants: current trends and challenges. Green processes for nanotechnology: from inorganic to bioinspired nanomaterials. **Springer**, p. 160, 2015.

Silva, N. L. A.; Miranda, F. A. A.; Conceição, G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Cientia Plena**, v. 6, n. 2, p. 1-17, 2010.

Singh, A.; Jain, D.; Upadhyay, M.K.; Khandelwal, N.; Verma, H.N. Green synthesis of silver nanoparticles using *Argemone mexicana* leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. **Dig. J. Nanomater. Bios.**, v.5, n.2, p.483-489, 2010.

Sivaraman, S. K.; Elango, I. K.; Santhanam, V. A green protocol for room temperature synthesis of silver nanoparticles in seconds. **Current Sci.**, v. 97, n. 7, p. 1055-1059, 2009.

Smitha, S. L.; Philip, D.; Gopchandran, K. G. Green synthesis of gold nanoparticles using *Cinnamomum zeylanicum* leaf broth. **Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.**, v. 7, n. 3, p. 735-739, 2009.

Song, J. Y.; Kim, B. S. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 32, p. 79-84, 2009.

Sreekanth, T. V. M.; Pandurangan, M.; Kim, D. H.; Lee, Y. R. Green Synthesis: In-vitro Anticancer Activity of Silver Nanoparticles on Human Cervical Cancer Cells. **J. Clust. Sci.**, 2016. DOI:10.1007/s10876-015009-64-9.

Srivastava, P.; Bragança, J.; Ramanan, S. R.; Kowshik, M. Synthesis of silver nanoparticles using haloarchaea isolate *Halococcus salifodinae* BK3. **Extremophiles**, v. 17, n. 5, p. 821-831, 2013.

Strohalm, M.; Kavan, D.; Novak, P.; Volny, M.; Havlicek, V. 2010. mMass 3: a cross-platform software environment for precise analysis of mass spectrometric data. **Anal. Chem.**, v. 82, p. 4648-4651, 2010.

Stebounova, L. V.; Adamcakova-Dodd, A.; Kim, J. S.; Park, H.; O'Shaughnessy, P. T.; Grassian, V. H.; Thorne, P. S. Nanosilver induces minimal lung toxicity or inflammation in a subacute murine inhalation model. **Part Fibre Toxicol.**, v. 8, n. 5, p. 1-12, 2011.

Su, C.; Liu, H.; Hsia, S.; Sun, Y. Quantitatively profiling the dissolution and redistribution of silver nanoparticles in living rats using a knotted reactor-based differentiation scheme. **Anal. Chem.**, v. 86, n. 16, p. 8267-8274, 2014.

Sung, J.H.; Ji, J.H.; Park, J.D.; Yoon, J.U.; Kim, D.S.; Jeon, K.S.; Song, M. Y.; Jeong, J.; Han, B. S.; Han, J. H.; Chung, Y. H.; Chang, H. K.; Lee, J. H.; Cho, M. H.; Kelman, B. J.; Yu, J. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. **Toxicol. Sci.**, v. 108; p. 452-61, 2009.

Suffredini, I. B.; Varella, A. D.; Younes, R. N. Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de três extratos vegetais antibacterianos selecionados da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica brasileiras. **Ver. Inst. Ciênc. Saúde**, v. 25, n. 2, p. 127-129, 2007.

Taiz, L.; Zeiger, E. Fisiologia Vegetal. **Artmed**, 3ª ed. 2010.

Tan, Y. N.; Lee, J. Y.; Wang, D. I. Uncovering the design rules for peptide synthesis of metal nanoparticles. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 132, n. 16, p. 5677-86, 2010.

Thakkar, K. N.; Mhatre, S. S.; Parikh, R. Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 6, n. 2, p. 257-262, 2010.

Thimmappaiah, S. M. G.; Shobha, D.; Anil, S. R. Assessment of cashew species for molecular diversity. **J. Plantation Crops**, v. 32, n. 2, p. 146-151, 2009.

Thwala, M.; Musee, N.; Sikhwivhilu, L.; Wepener, V. The oxidative toxicity of Ag and ZnO nanoparticles towards the aquatic plant *Spirodela punctata* and the role of testing media parameters. **Environ. Sci. Process Impacts**, v. 15, n. 10, p. 1830-1843, 2013.

Tsai, T. Bayesian alignment model for analysis of LC-MS-based omic data. 2014. Tese. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University Tese. Arlington, Virginia.

Uhlik, O.; Strejcek, M.; Junkova, P.; Sanda, M.; Hroudova, M.; Vlcek, C.; Mackova, M.; Macek, T. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)-Time of Flight Mass Spectrometry- and MALDI Biotyper-Based Identification of Cultured Biphenyl-Metabolizing Bacteria from Contaminated Horseradish Rhizosphere Soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77, n. 19, p. 6858-6866, 2011.

Valencia, P. M.; Farokhzad, O. C.; Karnik, R.; Langer, R. Microfluidic technologies for accelerating the clinical translation of nanoparticles. **Nature Nanotechn.**, v. 7, p. 623-629, 2012.

Vanderzande, M.; Vandebriel, R. J.; Van, E. D.; Kramer, E.; Herrera, Z. R.; Serrano, C. S. R.; Gremmer, E.R.; Mast, J.; Peters, R.J.; Hollman, P.C.; Hendriksen, P.J.; Marvin, H.J.; Peijnenburg, A. A.; Bouwmeester, H. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. **ACS Nano**. v. 6, p. 7427-7442, 2012.

Veeraputhiran, V. Bio-catalytic synthesis of silver nanoparticles. **Int. J. Chem. Tech Res**, v. 5, n. 5, p. 2555-2562, 2013.

Vigneshwaran, N.; Kathe, A. A.; Varadarajan, P. V.; Nachane, R. P.; Balasubramanya, R. H. Functional finishing of cotton fabrics using silver nanoparticles. **J. Nanosci Nanotechnology**, v. 7, p. 1893-1897, 2007.

Vinod, V. T.; Saravanan, P.; Sreedhar, B.; Devi, D. K.; Sashidhar, R. B. A facile synthesis and characterization of Ag, Au and Pt nanoparticles using a natural hydrocolloid gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*). **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v. 82, n. 2, p. 291-298, 2011.

Viswanath, B.; Kundu, P.; Mukherjee, B.; Ravishankar, N. Predicting the growth of two-dimensional nanostructures. **Nanotechnol.**, v. 19, n. 19, p. 195603, 2008.

Walter, B. M. T. Fitofisionomias do bioma Cerrado: síntese termiológica e relações florísticas. 2006. **Tese**. Programa de Pós-graduação em Ecologia. Universidade de Brasília, Brasília.

Wang, W.; Vinocur, B.; Altman, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Plant**, v. 218, n. 1, p. 1-14, 2003.

Wang, W. X.; Chen, Q. F.; Jiang, C.; Yang, D. Z.; Liu, X. M.; Xu, S. K. One-step synthesis of biocompatible gold nanoparticles using gallic acid in the presence of poly-(N-vinyl-2-pyrrolidone). **Colloids Surf A: Physicochem. Engin. Asp.**, v. 301, p. 73-79, 2007.

Wangoo, N.; Bhasin, K. K.; Metha, S. K.; Suri, R. Synthesis and capping of water-dispersed gold nanoparticles by an amino acid: Bioconjugation and binding studies. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 323, p. 247-254, 2008.

Wardle, D. A.; Nilsson, M. C.; Gallet, C.; Zackrisson, O. An ecosystem-level perspective of allelopathy. **Biol. Rev.**, v. 73, n. 3, p. 305-319, 1998.

Wiley, B.; Sun, Y.; Mayers, B.; Xia, Y. Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: the case of silver. **Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 454-463, 2005.

Xu, L.; Han, G.; Hu, J.; He, Y.; Pan, J.; Li, Y.; Xiang, J., Hydrophobic coating- and surface active solvent-mediated self-assembly of charged gold and silver nanoparticles at water-air and water-oil interfaces. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 11, p. 6490-6497, 2009.

Xue, Y.; Zhang, S.; Huang, Y.; Zhang, T.; Liu, X.; Hu, Y.; Zhang, Z.; Tang, M. Acute toxic effects and gender-related biokinetics of silver nanoparticles following an intravenous injection in mice. **J Appl Toxicol.**, v. 32, p. 890-899, 2012.

Yang, X.; Gondikas, A. P.; Marinakos, S. M.; Auffan, M.; Liu, J.; Hsu-Kim, H.; Meyer, J. Mechanism of silver nanoparticle toxicity is dependent on dissolved silver and surface coating in *Caenorhabditis elegans*. **Environ. Sci. Technol.**, v. 46, p. 1119-1127, 2012.

Yehia, M.; Labib, S. H.; Ismail, S. M. Structural and magnetic properties of nano-NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> prepared using green nanotechnology. **Phys. B**, v. 446, p. 49-54, 2014.

Yildirim, L. Thanh, N. T. K.; Loizidou, M.; Seifalian, A. M. Toxicology and clinical potential of nanoparticles. **Nano Today**, v. 6, p. 585-607, 2011.

Yin, L.; Colman, B. J.; McGill, B. M.; Wright, J. P.; Bernhardt, E. S.; Rozhkova, E. A. Effects of Silver Nanoparticle Exposure on Germination and Early Growth of Eleven wetland Plants. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. 1-7, 2012.

Zhan, S.; Zhang, W.; Niitepold, K.; Hsu, J.; Haeger, J. F.; Zalucki, M. P.; Altizer, S.; De Roode, J. C.; Reppert, S. M.; Kronforst, M. R. The genetics of monarch butterfly migration and warning colouration. **Nature**, v. 514, n. 7522, p. 317-321, 2014.

Zhang, L.; Pornpattananangku, D.; Hu, C. M.; Huang, C. M. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. **Curr. Med. Chem.**, v. 17, n. 6, p. 585-594, 2010.

Zhang, T.; Wang, L.; Chen, Q.; Chen, C. Cytotoxic potential of silver nanoparticles. **Yonsei Med. J.**, v. 55, n. 2, p. 283-291, 2014.

Zhang, X.; Shen, W.; Gurumathan, S. Silver nanoparticle-mediated cellular responses in various cell lines: An *in vitro* model. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, p. 1-26, 2016.

Zhang, Y.; Zheng, J.; Gao, G.; Kong, Y. F.; Zhi, X.; Wang, K.; Zhang, X. Biosynthesis of gold nanoparticles using chloroplasts. **Int. J. Nanomedicine**, v. 6, p. 2899-2906, 2011.



## ANEXO

### Produção Científica

- **Artigos científicos**

BONATTO, C. C.; Joanitti, G. A.; Silva, L. P. *In vitro* cytotoxic activity of chitosan- bullfrog oil microemulsions against melanoma cells. IET Nanobiotechnology, 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. (Capítulo II)

Pereira, F. D. E. S.; BONATTO, C. C.; Lopes, C. A. P.; Pereira, A. L.; Silva, L. P. Use of MALDI-TOF mass spectrometry to analyze the molecular profile of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on glass and plastic surfaces. Microbial Pathogenesis, v. 86, p. 32-37, 2015.

BONATTO, C. C.; Silva, L. P. Cocoa content influences chocolate molecular profile investigated by MALDI-TOF mass spectrometry. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014.

- **Capítulos de livros**

Silva, L. P.; Reis, I. G.; BONATTO, C. C. Green synthesis of metal nanoparticles by plants: current trends and challenges. Green Processes for Nanotechnology: From Inorganic to Bioinspired Nanomaterials. Springer, 2015. (Capítulo I)

Silva L. P.; BONATTO, C. C.; Soares, F. D. E.; Silva, L. D., Albernaz, V. L.; Polez, V. L. P. Nanotecnologia Verde para Síntese de Nanopartículas Metálicas. Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria: Fundamentos e Aplicações. Biotecnologia Aplicada à Saúde e Agro&Indústria. Editora Edgard Blücher, 2016. (Capítulo I)

Silva, L. P.; BONATTO, C. C.; Polez, V. L. P. Green synthesis of metal nanoparticles by fungi: current trends and challenges. In: Ram Prasad. (Org.). Advances and Applications Through Fungal Nanobiotechnology. 1ed. Alemanha: Springer, 2016, v. 1, p. 1-433.

Silva, L. P.; Silveira, A. P.; BONATTO, C. C.; Reis, I. G.; Milreu, P. V. Silver nanoparticles as antimicrobial agents: past, present and future. In Nanostructure in therapeutic medicine. 1 ed, Elsevier, 2016, v.2 (Aceito para publicação). (Capítulo I)

- **Resumos em eventos**

Carvalho, L. J. C. B.; Cipriano, T. M.; BONATTO, C. C.; Silva, L. P.; Aragão, F. J. L.; Anderson, J. V.; Wenquan, W.; Chen, S.; Souza, C. R. B.; Vieira, E. A.; Schaal, B. A. Branching enzyme isoform I-null gene mutation in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) alters amylopectin branching pattern and zeta potential of altered starch. In: World Congress on Root & Tuber Crops - WCRTC, 2016, Guangxi. World Congress on Root & Tuber Crops - WCRTC, 2016.

Caruso, G. R.; Santos, P. S.; BONATTO, C. C.; Rai, M.; Silva, L. P.; Goulart, L. R.; Naves, K. S. C.; Faria, P. C. B. Evaluation of bactericidal effect of silver nanoparticles produced by *Phoma* spp. fungi. In: 23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015. Anais do 23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015.

BONATTO, C. C.; Reis, I. G.; Ramada, M. H. S.; Abrao, F. Y.; Silva, L. P. Síntese verde de Nanopartículas metálicas utilizando plantas da biodiversidade Brasileira. In: 10º Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e o Caribe. 10º SIRGEALC, 2015, Bento Gonçalves. Anais do 10º Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e o Caribe 10º SIRGEALC, 2015.

BONATTO, C. C.; Reis, I. G.; Ramada, M. H. S.; Abrao, F. Y.; Silva, L. P. Green synthesis of metal nanoparticles using aqueous extracts of plants. In: VI Simpósio em Biologia Anima, 2015, Brasília. VI Simpósio em Biologia Anima, 2015.

BONATTO, C. C.; Reis, I. G.; Marina, C. F. L.; Ramada, M. H. S.; Abrao, F. Y.; Silva, L. P. Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extrato aquoso de folhas de *Caryocar brasiliensis*. In: I Simpósio Nacional de Aplicações Biotecnológicas (SINABIOTEC), 2014, Uberlândia. Anais do I Simpósio Nacional de Aplicações Biotecnológicas (SINABIOTEC). Uberlândia: Revista Horizonte Científico, 2014. v. 8. p. 112-113.

BONATTO, C. C.; Reis, I. G.; Marina, C. F. L.; Ramada, M. H. S.; Abrao, F. Y.; Soll, C. B.; Polez, V. L. P.; Silva, L. P. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Caryocar brasiliensis* leaves. 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: Embrapa, 2014.

BONATTO, C. C.; Medeiros, K. A.; Oliveira, K. M.; Curley, R.C.; Ortega, D. B.; Fioravante, T. F.; Magalhães, B. S.; Rodrigues, M. A.; Bemquerer, M. P.; Silva, L. P. Atomic Force Microscopy Applications to Biomedical Sciences. In: XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2013, Caxambu, Minas Gerais-MG. Anais do XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2013.

BONATTO, C. C.; Joanitti, G. A.; Silva, L. P. Atividade biológica *in vitro* de microemulsões à base de óleo de rã associadas ou não a polímeros de quitosana. In: XVIII Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2013, Brasília. Anais do XVIII Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2013.

- **Premiações**

2014 - 1º Lugar no concurso de painéis do I Simpósio Nacional de Aplicações Biotecnológicas (SINABIOTEC), Universidade Federal de Uberlândia, UFU. Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extrato aquoso de folhas de *Caryocar brasiliensis*.

2014 - 1º Lugar no concurso de painéis do XIX Encontro do Talento Estudantil, Recursos Vegetais, categoria Pós-Graduação, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Caryocar brasiliensis* leaves.

- **Divulgação científica**

Silva, L. P.; BONATTO, C. C.; Joanitti, G. A.; Ereno, D. Ativos naturais - Glóbulos vermelhos do sangue são fonte de proteínas e lipídeos para a produção de pequenas

cápsulas e candidatos a medicamentos. Revista Pesquisa FAPESP. 2015. (Programa de rádio ou TV/Entrevista).

Ereno, D.; BONATTO, C. C.; Polez, V. L. P.; Silva, L. D.; Silva, L. P. Nanopartículas verdes. Pesquisa FAPESP, Brasil, p. 70 - 74, 08 set. 2014.

Silva, L. P.; Silva, L. D.; BONATTO, C. C.; Polez, V. L. P.; Rocha, T. L.; Ramada, M. H. S.; John, L. Combate invisível tem mangaba na munição. Planeta Sustentável, Editora abril. 2014.

- **Depósitos de Registro de Patente**

BONATTO, C. C.; Silva, L. P.; Joanitti, G. A. Method for obtaining bioactive molecules in microstructured and nanostructured carrier systems. 2015, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: WO2016119030A1, título: "Method for obtaining bioactive molecules in microstructured and nanostructured carrier systems", Instituição de registro: WTO - World Trade Organization. Depósito PCT: 15/01/2016; Pedido do Exame: 04/08/2016.

BONATTO, C. C.; Joanitti, G. A.; Silva, L. P. Processo de obtenção de moléculas bioativas em sistemas carreadores micro e nanoestruturados. 2015, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020150020694, data de depósito: 29/01/2015, título: "Processo de obtenção de moléculas bioativas em sistemas carreadores micro e nanoestruturados", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

- **Minicursos ministrados**

BONATTO, C. C.; Silva, L. P. Microscopia de Força Atômica. 2013. Congresso Brasileiro de Microscopia e Microanálise.

BONATTO, C. C.; Barbosa, E. F. Entendendo a Microscopia de Força Atômica e suas aplicações em Nanotecnologia. 2013. Simpósio em Biologia Animal - Universidade de Brasília.

BONATTO, C. C. Nanobiotecnologia. 2015. I Semana da Biotecnologia - Universidade de Brasília.

Silva, L. P.; BONATTO, C. C. Nanobiotecnologia. 2016. XV Semana da Biologia - Universidade de Brasília.

