

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA**

Andressa dos Santos Corrêa

Avaliação físico-química de nanopartículas de ouro reduzidas com citrato de sódio e capeadas com *Virola oleifera*

**Vitória
2017**

Andressa dos Santos Corrêa

Avaliação físico-química de nanopartículas de ouro reduzidas com citrato de sódio e capeadas com *Viola oleifera*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientador: Prof. Marco Cesar Cunegundes Guimarães

Co-orientador: Jairo Pinto de Oliveira.

**Vitória
2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos trinta dias do mês de junho de dois mil e dezessete, os membros da banca examinadora, Prof. Dr. Marco César Cunegundes Guimarães, orientador, Dr. Jairo Pinto de Oliveira, Coorientador, Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira, Prof. Dr. André Romero da Silva, reuniram-se para apreciação da dissertação de mestrado intitulada "**Avaliação físico-química de nanopartículas de ouro reduzidas com citrato de sódio e capeadas com *Virola oleifera***", de autoria do candidato **Andressa dos Santos Corrêa**, aluna do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo. Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, o candidato foi APROVADA..... pela Comissão Examinadora. Foi concedido um prazo de sessenta dias, para o candidato efetuar as correções sugeridas pela Comissão Examinadora e apresentar o trabalho em sua redação definitiva, em duas vias impressas e uma digital, sob pena de não expedição do Diploma. E, para constar, foi lavrada a presente ata e vai assinada pelos membros da Comissão.

Prof. Dr. Marco César Cunegundes Guimarães – Orientador

Dr. Jairo Pinto de Oliveira – Coorientador

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira - Examinador Interno

Prof. Dr. André Romero da Silva – Examinador Externo

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)

C824a Corrêa, Andressa dos Santos, 1992 -
Avaliação físico-química de nanopartículas de ouro reduzidas com
citrato de sódio e capeadas com *Virola oleifera* / Andressa dos Santos
Corrêa – 2017.
84 f. : il.

Orientador: Marco César Cunegundes Guimarães.
Coorientador: Jairo Pinto de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Nanopartículas Metálicas. 2. Antioxidantes. 3. Citotoxicidade
Imunológica. I. Guimarães, Marco César Cunegundes. II. Oliveira, Jairo Pinto
de. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. IV. Título.

CDU: 61

Agradecimentos

À Deus por toda paciência, bondade, presença, disponibilidade e amor.

Ao professor Marco, meu orientador e ao Jairo, meu co-orientador, por toda paciência e empenho em me ajudar sempre.

A todas as pessoas do laboratório, do programa, e todas que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho. Principalmente à Ingrid, Larissa, Wanderson, Rayssa, Débora, Tadeu, Flávio, Mateus, Valmara e Natália por serem pessoas tão especiais em diversos sentidos e por tudo que me ensinaram a ponto de me ajudarem a crescer como ser humano.

Ao professor André Romero pelo suporte dado durante os momentos de dúvidas durante o trabalho e pela atenção.

Ao Gustavo, ao Lutero e a Lívia por todos os ensinamentos, paciência e pelo exemplo de vida.

À Francine e ao Arthur por serem amigos tão especiais e pela prova de que nossa amizade não mudou com a distância.

À Stephany, Julia, Hilde e todas as pessoas que me ajudaram tanto. Ao Henrique por ser realmente meu confidente, melhor amigo e também parte de minha família e também ao André, por toda atenção, amizade e carinho mesmo depois de tanto tempo longe.

Aos meus pais e principalmente à minha mãe, porque não teria conseguido sem teu apoio.

Aos técnicos do Labpetro, Paulo César e Antônio Augusto, pelas análises de DRX e FTIR, respectivamente e por todo carinho, atenção e disponibilidade de sempre.

Ao Enrique pelas análises de Raman e por sempre se colocar a disposição para ajudar e esclarecer dúvidas, inclusive de teoria.

À Suely pelo apoio e por me ajudar em muitas coisas, inclusive possibilitando a realização de algumas análises.

Ao Estevão e Divan pelas análises de UV-visível.

À FAPES pela bolsa.

“Há alguns que desejam saber só por saber, e isso é torpe curiosidade; outros para se tornarem conhecidos, e isso é vergonhosa vaidade. Há outros ainda que desejam o conhecimento para vender seus frutos ou dinheiro ou honras, e isso é infame exploração. Finalmente, há os que desejam saber para se edificar e isso é prudência, e outros que desejam saber para ensinar e servir e isso é amor. ”

Bernard de Clairvaux

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Variação da energia livre durante as etapas de formação de nanocristais (extraído de GRASSESCHI, 2015)18
- Figura 2.** Esquema de níveis de energia eletrônica em espécies metálicas (extraído de PEREIRA, 2015)19
- Figura 3:** Dupla camada elétrica e dependência da intensidade do potencial de superfície com a distância.....22
- Figura 4:** Representação esquemática da estabilização de partículas pelo efeito a) eletrostático e b) estérico (Extraído de Marangoni, 2012)23
- Figura 5:** Lei de Bragg. Fonte (BLEICHER, SASAKI, 2000).....32
- Figura 6.** Espectro de UV-Visível (A), Difratoograma de raios-x (B), histograma de distribuição de tamanho (C) valor da razão de aspecto e imagens de microscopia eletrônica de transmissão das AuNPs sintetizadas com citrato (D, E e F).....42
- Figura 7.** Espectros de absorvância de diferentes concentrações de extrato de *Virola oleifera* em mg/mL.....43
- Figura 8.** Determinação do tempo ótimo para o capeamento (A) e triagem dos valores de pH com base no aumento da adsorção de extrato (B).....45
- Figura 9.** Variáveis resposta do planejamento fatorial 3^2 (área sob o pico de LSPR e absorvância máxima). O diagrama de pareto para a variável área (A), mostra que apenas o pH foi significativo. Isso também pode ser visto no diagrama de pareto para a absorvância máxima (B). E os gráficos de superfície mostram que a maior absorvância máxima (D) e a maior área sob o pico de RPSL se deram para 0,1 mg/mL e pH 4.....48
- Figura 10.** Contribuição individual do pH e da concentração nos parâmetros área sob o pico de RPSL e absorvância máxima.....48
- Figura 11.** Espectros de RPSL obtidos para os experimentos do planejamento fatorial (A). Efeito do pH sobre o deslocamento do comprimento de onda máximo dos espectros de RPSL (B, C e D).....49
- Figura 12:** Espectro de absorção mostrando o coloide de AuNPs capeadas com *Virola oleifera* da formulação otimizada, em diferentes concentrações de NaCl (0,25; 0,50; 1,0; 5,0 e 10,0 mM) e em diferentes faixas de pH (3,0; 5,0; 7,0; 9,0; 11,0) e o controle (sem alteração no pH do meio)50
- Figura 13.** Valores de potencial zeta em função do pH e da concentração de extrato final na dispersão coloidal.....51

Figura 14. Potencial zeta da dispersão da condição ótima de capeamento (0,1 mg/mL e pH 4), determinada a partir do planejamento fatorial e da dispersão de AuNPs sintetizadas com citrato.....	52
Figura 15: Avaliação da variação do potencial zeta e do diâmetro médio das AuNPs capeadas com <i>Virola oleifera</i> (0,1 mg/mL e pH 4) com a variação da concentração de NaCl (0,25; 0,50; 1,00; 5,00 e 10,00 mM).....	53
Figura 16: Avaliação da variação do potencial zeta e do diâmetro médio das AuNPs capeadas com <i>Virola oleifera</i> (0,1 mg/mL e pH 4) com a variação do pH (3,0; 5,0; 7,0; 9,0 e 11,0).....	53
Figura 17. Comparação entre os espectros de FTIR das AuNPs sintetizadas com citrato, da <i>Virola oleifera</i> e das AuNPs capeadas.....	54
Figura 18. Comparação entre os espectros Raman das AuNPs capeadas, AuNPs sintetizadas com citrato de sódio e extrato de <i>Virola oleifera</i>	56
Figura 19: Nanopartículas capeadas contrastadas com acetato de uranila para visualização da parte orgânica (extrato de <i>Virola</i>), com magnificação de 200.000x (a) e 800.000x (b, c e d).....	57
Figura 20. AuNPs sintetizadas com citrato e capeadas com <i>Virola oleifera</i> da condição ótima, 0,1 mg/mL (magnificação de 200.000x). Abaixo imagens obtidas após contrastação do material com acetato de uranila, sendo possível observar a presença do extrato no entorno das partículas.....	58
Figura 21. Gráficos de DLS para AuNPs capeadas com <i>Virola oleifera</i> (0,1 mg/mL e pH 4).....	59
Figura 22. Gráficos de DLS para todas as condições avaliadas no planejamento fatorial.....	60
Figura 23. Atividade Antioxidante (AA%) das AuNP's sintetizadas com resina de <i>Virola oleifera</i> em comparação ao material vegetal puro. Ensaio de DPPH e FRAP.....	61
Figura 24. Comparação entre os resultados do ensaio de citotoxicidade para as AuNPs capeadas e não-capeadas com <i>Virola oleifera</i>	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de Variância.

AuNP - Nanopartícula de Ouro

DLS - Espalhamento Dinâmico da Luz (do inglês DLS- Dynamic Light Scattering)

FT-IR - Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier (do inglês Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

L - Litro

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

mg - Miligrama

mL - Mililitro

µL - Microlitro

NP - Nanopartícula

NPs - Nanopartículas

RPSL - Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada

SERS - Espectroscopia Raman amplificada por superfície (do inglês Surface Enhanced Raman spectroscopy)

DRX - Difração de raios-X (do inglês X-Ray Diffraction)

ICP- MS – Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

RPM - rotações por minuto

SS – Soma dos quadrados

DF – Grau de Liberdade

MSQ – Quadrados das Médias

F – Teste F

P – Valor de p.

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power

AA% - atividade antioxidante

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Morfologia de partículas e sua dependência de diversos fatores.....	25
Tabela 2. Dados do planejamento fatorial.....	33
Tabela3. Valores de pKa dos flavonoides em maior quantidade na resina de <i>Virola oleífera</i>	45
Tabela 4. Área – absorvância máxima dos espectros de <i>Virola</i> para os experimentos do planejamento fatorial 3^2	46
Tabela 5. ANOVA para a variável Absorvância Máxima da dispersão de AuNPs capeadas utilizando planejamento fatorial 3^2	46
Tabela 6. ANOVA para a variável área da dispersão de AuNPs capeadas utilizando planejamento fatorial 3^2	47

RESUMO

O capeamento de nanopartículas de ouro sintetizadas com citrato de sódio com extrato de *Virola oleifera* foi o objetivo principal desta dissertação, que visou prepará-las e caracterizá-las avaliando como a concentração final de extrato e o pH poderiam influenciar na adsorção do extrato à superfície das partículas. Além disso, foi realizada uma avaliação da atividade antioxidante e citotóxica de tais AuNPs, a fim de averiguar sua potencial aplicação biológica. Para isso realizou-se um estudo do tempo ótimo de adsorção, e posteriormente uma triagem dos intervalos de pH e concentração final de extrato e subsequentemente um planejamento fatorial 3^2 para determinação da melhor condição de capeamento. Observou-se que, a adsorção de extrato foi maior no intervalo de pH compreendido entre 3 e 5 e que a condição mais estável foi a de menor concentração final de extrato. Foi realizado um estudo de caracterização estrutural das nanopartículas sintetizadas com citrato de sódio para confirmação da estrutura cristalina característica de nanopartículas de ouro, bem como morfológica por microscopia eletrônica de transmissão. Além disso, a presença de moléculas aromáticas adsorvidas nas AuNPs foi confirmada por FTIR e RAMAN. Os resultados dos ensaios de DPPH e FRAP mostraram que as AuNPs capeadas possuíam expressiva atividade. E o ensaio de citotoxicidade revelou que a citotoxicidade das AuNPs capeadas é baixa.

Palavras chave: Nanopartículas Metálicas, Antioxidantes, Citotoxicidade Imunológica.

ABSTRACT

The capping of gold nanocrystals using sodium citrate with *Viola oleifera* was the focus of this thesis, which aim/aiming at synthesize and characterize evaluate the final extract concentration and pH influence in surface particle adsorption. Furthermore, was analysed antioxidant activity and citotoxicity of AuNPs, for investigate your potential biological application. For this goal, the best capping time, and subsequently the optimum pH range and final extract concentration was determined and was realizes a 3^2 factorial design with 3 levels and 2 variables (pH and extract concentration) to verify the optimal capping conditions. In this way, it has been proved the adsorption was most intense between pH 3 and 5 and the most stable was the lower final extract concentration. The x-ray diffraction and the transmission electron microscopy confirmed the face-centered cubic structure of citrate AuNPs and the quasi spherical aspect, respectively. The adsorption of aromatic molecules was confirmed by spectroscopy techniques: Fourier-Transform Infrared (FTIR) and Raman. The DPPH and FRAP analyzes shows enhancement of antioxidant activity with capping of citrate gold nanoparticles. Furthermore, the citotoxicity assay shows low citotoxicity of capped gold nanoparticles.

Keywords: metallic nanoparticles, antioxidants and immunologic citotoxicity.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURA

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Métodos de síntese química de nanopartículas.....	16
2.2 Mecanismos de formação de nanopartículas.....	18
2.2.1 Síntese de AuNPs com citrato de sódio.....	20
2.2.2 Estabilidade de uma dispersão coloidal.....	21
2.3 Capeamento de AuNPs com extratos vegetais.....	23
2.3.1 Extratos vegetais como agentes estabilizantes.....	23
2.4 Biocompatibilidade das nanopartículas de ouro.....	25
2.4.1 Citotoxicidade de AuNPs.....	26
2.5 Ensaio de atividade antioxidante.....	27
3.OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo Geral.....	29
3.2 Objetivos Específicos.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Síntese das AuNPs com citrato de sódio.....	30
4.2 Triagem das variáveis influentes no capeamento.....	33
4.3 Preparo das AuNPs capeadas.....	33
4.4 Caracterização das AuNPs pela Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	34
4.5 Estudo da estabilidade coloidal utilizando o Potencial Zeta.....	35
4.6 Caracterização das AuNPs utilizando a Espectroscopia Raman.....	37
4.7 Caracterização das AuNP por Espectroscopia no Infravermelho (FTIR...)	37
4.8 Análise de atividade antioxidante.....	38
4.8.1 Análise de atividade antioxidante pelo método DPPH.....	38
4.8.2 Análise de atividade antioxidante pelo método FRAP.....	39
4.9 Ensaio de citotoxicidade.....	39

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 Síntese e caracterização de AuNPs.....	41
5.2 Avaliação do capeamento com <i>Virola oleifera</i>.....	42
5.3 Espectroscopia no UV-visível.....	45
5.4 Estudo da estabilidade da melhor condição.....	50
5.4.1 Análise de espectroscopia no UV-visível.....	50
5.4.2 Análise de Potencial zeta.....	50
5.5 Identificação dos grupamentos adsorvidos à superfície das AuNPs capeadas.....	53
5.5.1 Espectroscopia no infravermelho.....	53
5.5.2 Espectroscopia Raman.....	55
5.6 Microscopia eletrônica de transmissão.....	56
5.7 Espalhamentos de luz dinâmico (DLS)	58
5.8 Atividade antioxidante.....	60
5.9 Atividade citotóxica.....	61
6 CONCLUSÕES.....	63
7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	64
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
ANEXO I (Resumos de trabalhos apresentados durante o mestrado).....	79
ANEXO II (Publicações durante o mestrado).....	84

1 INTRODUÇÃO

Nanopartículas são definidas como materiais de escala microscópica com tamanho compreendido entre 1-100 nm de diâmetro (National Nanotechnology Initiative). Esse tamanho reduzido, bem como as formas variadas que essas partículas podem assumir, está diretamente relacionado às suas propriedades ópticas e eletrônicas. Nessa escala, as propriedades físico-químicas diferem da forma *bulk* (macroscópica) devido às simetrias distintas ou efeito de confinamento eletrônico.

Os nanomateriais têm sido amplamente utilizados, devido às suas características físico-químicas singulares, tais como as propriedades ópticas (YU *et al.*, 2013), eletrônicas e magnéticas (ZHOU *et al.*, 2010; MIKAMI *et al.*, 2013), além da excelente relação área/volume. Assim, esses nanomateriais tem se tornado cada vez mais atrativos para aplicações biomédicas, como terapia gênica, tratamento de câncer, carreamento de drogas e antígenos bem como o desenvolvimento de biossensores (ANKER, 2008; HONG, 2009; DIMMELER, 2014; WILCZEWSKA, 2012; YEO, 2015). Desse modo, tem-se buscado o desenvolvimento de rotas de síntese que apresentem nanomateriais estáveis e com controle de tamanho e forma definidos (CHO *et al.*, 2010; DANIEL; ASTRUC, 2004; ZHAROV *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 2003).

Para a formação de nanopartículas de ouro (AuNPs), há um consenso quase universal relacionado à utilização de síntese química, estabelecida pela redução de um íon metálico por um agente redutor. A utilização do citrato de sódio como agente redutor foi introduzido por Turkevich em 1951, se tornando desde então a estratégia mais comumente utilizada para a síntese desses nanomateriais (KIMLING *et al.*, 2006); HAISS *et al.*, 2007; MARTINEZ *et al.*, 2012; THAN *et al.*, 2014). No entanto, pesquisas anteriores realizadas neste campo mostraram que AuNPs possuem efeitos citotóxicos dependentes de sua concentração, tamanho e modificação da superfície e carga. Este último, potencialmente nocivo, uma vez que a membrana plasmática de células eucariotas possui densidade de carga positiva, o que se apresenta como empecilho à internalização de nanopartículas de densidade de carga oposta (TATUR *et al.*, 2013).

Para contornar o problema da carga negativa superficial das AuNPs, várias

estratégias têm sido propostas com o intuito de alterar a superfície dos nanomateriais com biomoléculas e favorecer a interação com modelos biológicos (CONNOR *et al.*, 2005). Nesse sentido, os extratos vegetais com capacidade redutora vêm sendo explorados para a síntese e funcionalização de nanopartículas metálicas. Alguns dos quais tem demonstrado a redução da carga superficial negativa devido à adsorção de flavonoides (WANG *et al.*, 2007), diminuindo a citotoxicidade.

No entanto, a aplicação destes sistemas tem sido dificultada pela falta de reprodutibilidade e pela ausência de elucidação dos mecanismos de síntese (DÚRAN; SEABRA, 2012; SEABRA *et al.*, 2013; RAI *et al.*, 2014 b; INGALE *et al.*, 2015). Assim, o presente trabalho visa o desenvolvimento de nanopartículas com baixa citotoxicidade e com potencial atividade antioxidante. Para isso, nanopartículas de ouro monodispersas sintetizadas com citrato de sódio foram capeadas com *Virola oleifera* utilizando um experimento fatorial 3². As nanopartículas foram caracterizadas e testadas frente a sua estabilidade, capacidade antioxidante e citotóxica.

Através do desenvolvimento deste nanomaterial espera-se ter contribuído para que nanopartículas capeadas com extratos vegetais possam evoluir para aplicação biomédica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Métodos de síntese química de nanopartículas

Nanopartículas são definidas como partículas coloidais com diâmetro de 1 e 100 nm em ao menos uma dimensão (National Nanotechnology Initiative). Essas estruturas formam os chamados sistemas nanoestruturados, que apresentam propriedades físico-químicas (mecânicas, elétricas, térmicas e optoeletrônicas) singulares (YU *et al.*, 2004; MIESZAWSKA *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2010; MIKAMI & YUSUKE *et al.*, 2013). Essas propriedades se devem à sua forma, tamanho e distribuição de tamanho (CHO *et al.*, 2010; DANIEL; ASTRUC, 2004; ZHAROV *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 2003).

As estratégias de síntese de nanoestruturas consistem em métodos físicos e químicos. Dentre os métodos físicos, destacam-se a irradiação UV, tecnologia de aerossóis, litografia, ablação a laser e os campos ultrassônicos (MAFUNE *et al.*, 2001; ZHANG; WANG, 2008; TREGUER *et al.*, 1998). Para as sínteses químicas, destacam-se as reduções química e fotoquímica, além da eletroquímica (CHEN *et al.*, 2001; RODRÍGUEZ-SANCHEZ *et al.*, 2002; EUSTIS *et al.*, 2005; FRATTINI *et al.*, 2005; STAROWIICZ, *et al.*, 2006). Especificamente para AuNPs, são bem estabelecidas as sínteses químicas, principalmente com citrato de sódio, introduzido por Turkevich *et al.*, (1951), e o boroidreto de sódio. Os métodos físicos consistem na redução de um material em escala macroscópica a materiais na escala nano. Nesse tipo de metodologia cujos métodos também são denominados de técnicas de *top-down*, a alta demanda energética dificulta o controle de tamanho, bem como o controle da composição desses materiais (AO *et al.*, 2008; FANG *et al.*, 2008; BARROS, 2014). Já nos métodos químicos, também denominados de *bottom-up* íons metálicos são reduzidos por um agente redutor, resultando na formação de átomos metálicos. Ao unirem, esses átomos formam primeiramente um núcleo, que após o processo de crescimento origina a nanopartícula, sendo possível obter partículas com uma reduzida distribuição de tamanho (SHIBATA *et al.*, 2006; MEDINA-RAMIREZ *et al.*, 2009; SARDAR *et al.*, 2009).

Conforme uma série de estudos, alguns fatores podem influenciar tanto na morfologia quanto na estabilidade das nanopartículas. Dentre eles estão

temperatura, concentração do precursor metálico ou do redutor, pH, tempo e agitação (POLTE *et al.*, 2010). Além deles está a cinética de formação de nanopartículas e de adsorção de estabilizantes à superfície (WANG *et al.*, 2005). Desse modo, busca-se controlar tais fatores para obtenção de sínteses reprodutíveis. Outros pontos importantes da síntese são a obtenção de uma morfologia bem definida e uma dispersão coloidal estável (YOU *et al.*, 2013; KULKARNI *et al.*, 2014).

Nesse contexto, a síntese química com biocompostos atuando na redução de íons metálicos apresenta-se como uma alternativa importante aos métodos físicos e químicos tradicionais. Nesse tipo de síntese, são utilizadas biomoléculas como agentes redutores (NAGAJYOTHI & LEE, 2011; NAGHUNANDAN *et al.*, 2010; DAHL *et al.*, 2007; SHANKAR *et al.*, 2004; BEGUM *et al.*, 2009; N. ROY *et al.*, 2010; MITTAL *et al.*, 2013). Elas podem ocorrer por redução de precursores metálicos por intermédio de organismos unicelulares ou pluricelulares tais como algas (XIE *et al.*, 2007), fungos (AHMAD, 2003; DHILLON *et al.*, 2012), bactérias (JOERGER *et al.*, 2001; HUSSEINY *et al.*, 2007; KORBEBAND *et al.*, 2009, SANGHI & VERMA, 2010; DHILLON *et al.*, 2012), açúcares (MITTAL *et al.*, 2013), aminoácidos, diversas partes de organismos vegetais (folhas, raízes, látex, sementes e caules) (PARSONS *et al.*, 2007; ALMEIDA DE MATOS *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2011) e polímeros biodegradáveis (KHARISSOVA *et al.*, 2013).

2.2 Mecanismos de formação de nanopartículas

A formação das nanopartículas ocorre em dois processos consecutivos, denominados nucleação e crescimento, respectivamente (MULLIN, 1997; PUNTE *et al.*, 2002; ROBINSON *et al.*, 2009). O primeiro é o de nucleação, definido como aquele em que é formado um núcleo. É esse núcleo que possibilita o posterior crescimento da partícula, segunda etapa de sua formação. A figura 1 mostra que a formação do núcleo só é definitiva se um raio crítico for atingido. Para isso, há necessidade de uma energia de ativação consideravelmente alta, fornecida pela supersaturação do sistema (THAN *et al.*, 2014).

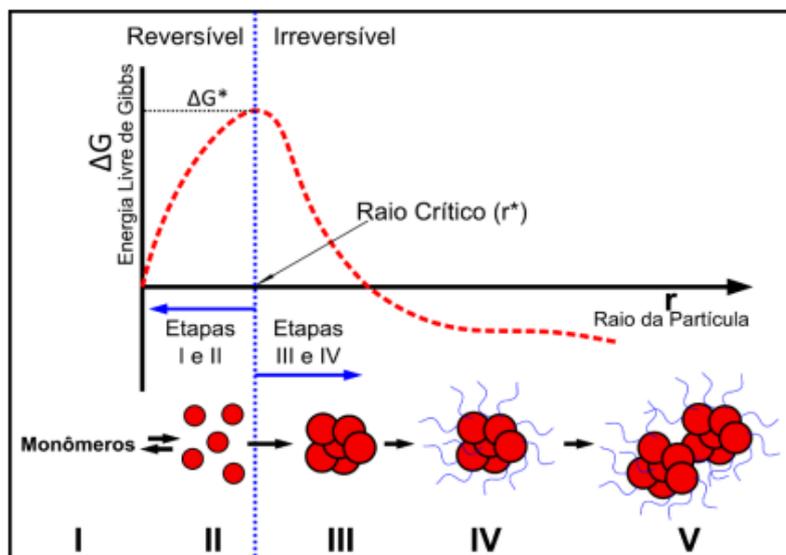


Figura 1. Variação da energia livre durante as etapas de formação de nanocristais (extraído de GRASSESCHI, 2015).

As nanopartículas apresentam elevada área superficial proporcionalmente ao seu tamanho (THAN *et al.*, 2014). Por isso, apresentam-se reativas e instáveis termodinamicamente, estando assim sujeitas à agregação natural. A atração pode estar relacionada a forças de atração de van der Waals, de curto alcance, o que faz com que possam acabar se agregando (MEDINA-RAMIREZ *et al.*, 2009).

O fator relação área/volume citado anteriormente não apenas resulta na elevada instabilidade das partículas em suspensão, mas também nas propriedades optoeletrônicas e magnéticas distintas das apresentadas pelos metais constituintes das NPs em escala macroscópica (*bulk*). Uma explicação para tal fato está na estrutura eletrônica de tais materiais, pela teoria das bandas. Primeiramente, na

forma "bulk", os orbitais atômicos se sobrepõem, formando um orbital contínuo (Teoria das bandas) (CAO, 2004; EUTIS & EL-SAYED, 2006; ORENDORFF *et al.*, 2005). Ou seja, nesse caso, as diferenças entre os níveis eletrônicos são mínimas, devido às ligações deslocalizadas. Então, pela quantidade ínfima de energia entre os níveis eletrônicos, os condutores apresentam altas condutividades térmica e elétrica.

Na figura 2, temos os níveis de energia apresentando diferenças energéticas progressivamente menores, até aquisição de um caráter contínuo pelas bandas energéticas. É possível observar ainda o caráter discreto das bandas de energia mais superficiais das nanopartículas (ALIVISATOS, 1996). Essa característica da distribuição eletrônica das NPs se deve a limitação à deslocalização eletrônica, por sua constituição com uma quantidade menor de átomos. Conseqüentemente, haverá um *gap* de energia entre as bandas, acompanhando sempre a extensão dessa limitação.

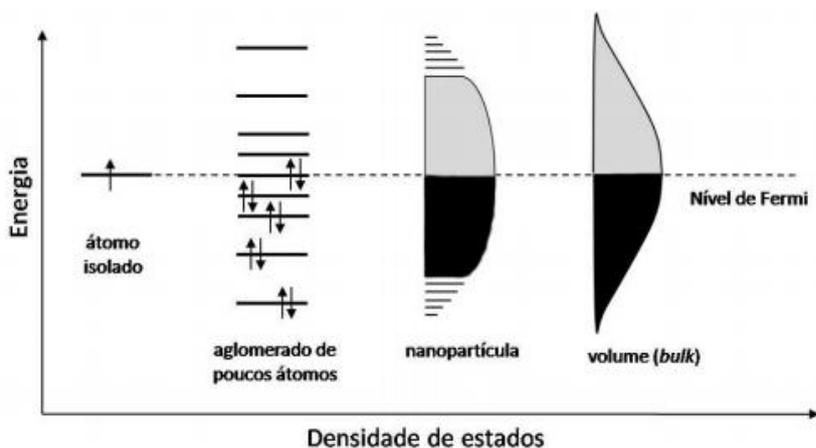


Figura 2. Esquema de níveis de energia eletrônica em espécies metálicas (extraído de PEREIRA, 2015).

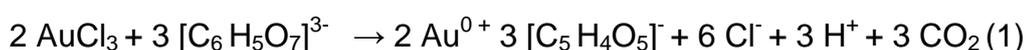
Devido ao caráter discreto das bandas de energia superficiais, as NPs apresentam as características peculiares anteriormente descritas. Elas se devem a dois efeitos dependentes de tamanho: o denominado confinamento quântico e outro, denominado efeito de superfície (EUTIS & EL-SAYED, 2005; RODUNER, 2006; BARROS, 2014). Em decorrência da redução extrema de seu tamanho e assim da mobilidade dos elétrons, tais materiais passam a apresentar características distintas. Assim, em consequência do confinamento eletrônico, a energia do sistema aumenta (RODUNER, 2006; EUTIS & EL-SAYED, 2005). Já o efeito de superfície, se deve ao

número de coordenação incompleto dos átomos superficiais como consequência da redução da quantidade de átomos vizinhos na superfície. Assim sendo, com a redução de tamanho, maior a proporção de átomos superficiais em relação à quantidade total, e, por conseguinte, maior a energia superficial (RODUNER, 2006; CAO, 2004; BARROS, 2014).

2.2.1 Síntese de AuNPs com citrato de sódio

A síntese de AuNPs com citrato é uma das mais simples descritas na literatura (KIMLING *et al.*, 2006; HAISS *et al.*, 2007; MARTÍNEZ *et al.*, 2012; THAN *et al.*, 2014). Além disso, há a vantagem de o próprio citrato promover estabilização das partículas em suspensão. Além disso, a considerável labilidade de seu complexo com o ouro, permitiu a modificação da superfície das partículas sintetizadas com citrato de sódio com considerável facilidade. Desse modo, é possível trabalhar com a modificação das propriedades superficiais para utilizá-los em aplicações específicas. Por exemplo, conjugação com anticorpo ou outra molécula para desenvolvimento de sensores para diagnóstico de doenças ou detecção de poluentes, respectivamente (GRASSESCI, 2015).

Essa síntese envolve a utilização de uma solução de citrato de sódio, uma de ácido tetracloroáurico (que, em solução, dissocia-se em AuCl_3 , H^+ e Cl^-), misturadas sob agitação e aquecimento (POLTE *et al.*, 2010). Assim, controlando-se as concentrações dos reagentes e os fatores que influenciam na síntese, é possível controlar também a forma e tamanho das partículas. A equação 1 representa a reação de oxido-redução balanceada da síntese de AuNPs com citrato a partir do HAuCl_4^- :



Embora o mecanismo de formação das AuNPs na síntese com citrato não tenha sido esclarecido por completo, evidências experimentais mostram que a acetoadicarboxilato tem um papel importante, não só na estabilização da dispersão, como também na organização do processo de nucleação (FRENS, 1973). Além disso, o citrato atua não só como agente redutor (TURKEVICH *et al.*, 1951), mas também como agente estabilizante (BIGGS, 1994) e controlador do pH (JI *et al.*,

2007)

2.2.2 Estabilidade de uma dispersão coloidal

Uma dispersão coloidal é um sistema no qual um componente num determinado estado da matéria é finamente dividido em um meio de estado físico distinto, por exemplo, sólido disperso em líquido. Quando uma partícula está imersa em um líquido, adquire cargas superficiais. Essa distribuição de cargas depende tanto da carga da partícula quanto do meio no qual ela está inserida, estando diretamente relacionada com a distribuição de íons nas proximidades da superfície. As cargas superficiais podem ser originadas por meio de mudanças no pH do meio, pela promoção da ionização das moléculas em questão (TURKEVICH *et al.*, 1951). Mas também por dissociação de substâncias em solução e pela adsorção de íons por forças eletrostáticas entre eles e a superfície (AGNIHOTRI *et al.*, 2009).

Essas cargas superficiais estão envolvidas diretamente no processo de estabilização de uma dispersão coloidal. Isso porque, quanto maior o módulo das forças repulsivas entre as partículas, maior será a contraposição às forças atrativas que promovem sua agregação. Desse modo, a formação da dupla camada elétrica, apresenta grande importância para a estabilidade cinética dos coloides. Sua formação ocorre por meio da interação da superfície com íons em solução. Esses íons podem ser denominados contra-íons ou co-íons, conforme apresentem carga de natureza oposta ou idêntica à das partículas, respectivamente. Portanto, a superfície da partícula atrai os contra-íons repele os co-íons, sendo formada então a dupla camada elétrica (RANGEL, 2006).

Há três modelos distintos para descrever a estrutura da dupla camada elétrica. O primeiro, de Helmholtz, considera apenas uma camada de íons de carga oposta à superficial da partícula, envolvidos por suas esferas de hidratação e por elas separados da superfície. Essa camada é localizada pelo plano externo de Helmholtz (PEH), que passa pelos íons solvatados. Numa região limitada pela superfície metálica e pelo plano de Helmholtz, ocorre uma variação linear do potencial elétrico. Já o segundo, de Gouy-Chapman, considera a distribuição de Boltzman e assim, o fato de o efeito perturbador da agitação térmica levar à existência de uma dupla camada difusa, com íons dispersos em solução. Esse fato foi desconsiderado por

Helmoltz (ATKINS, 2008).

Pelo fato de ambos modelos considerarem como mais relevante uma característica da disposição dos íons em decorrência de alterações nas condições físico-químicas do meio, nenhum deles foi capaz de representar a natureza real da dupla camada. Isso porque, enquanto Helmholtz subestima os efeitos da agitação térmica, considerando uma maior rigidez na disposição dos íons próximos à superfície, Gouy-Chapman subestima essa rigidez, estando seu modelo, portanto, em outro extremo. Combinando-se ambos modelos, originou-se o de Stern, com uma camada de íons mais próximos, representando a rigidez na disposição proposta por Helmholtz, e os mais afastados, mais dispersos, conforme Gouy-Chapman, como ilustra a figura 3:

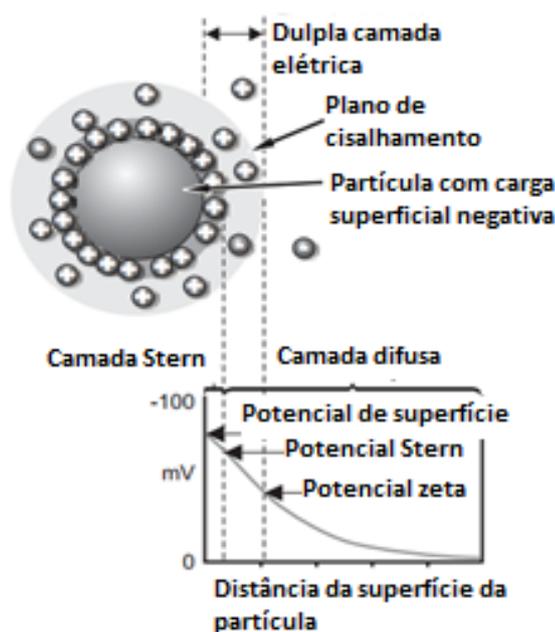


Figura 3: Dupla camada elétrica e dependência da intensidade do potencial de superfície com a distância.

Por apresentarem elevada energia superficial, as nanopartículas apresentam uma tendência natural à agregação. Isso se deve às interações atrativas de van der Waals entre elas (MEDINA-RAMIREZ *et al.*, 2009). Assim, há necessidade de moléculas capeadoras para prevenção da agregação, que atuam conforme descrito na figura 4. Na síntese química, geralmente o capeamento ocorre simultaneamente à etapa de redução. Os agentes estabilizantes mais comuns nesse caso são aqueles caracterizados pela presença de grupos tiol, ou citrato ou aminoácidos

(SELVAKANNAN *et al.*, 2003; JADZINSKY *et al.*, 2007). Esses agentes são capazes também de controlar os processos de nucleação e crescimento dos nanocristais (GRASSECHI, 2015).

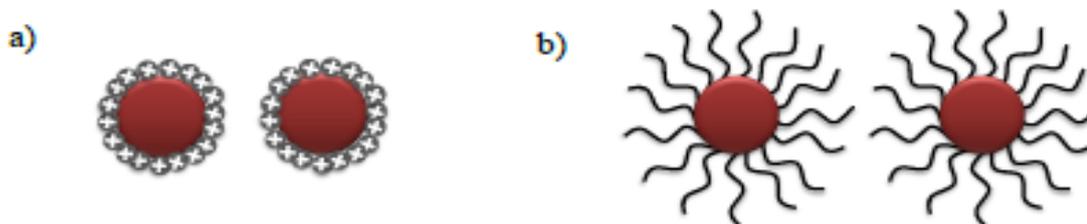


Figura 4. Representação esquemática da estabilização de partículas pelo efeito a) eletrostático e b) estérico (Extraído de Marangoni, 2012).

No caso dos ligantes tiolados, ocorre a formação de monocamadas automontadas. Elas são resultantes de sua adsorção à superfície e capazes de promover a estabilização da nanopartícula. Isso ocorre pela redução da energia livre superficial por formação de uma ligação covalente forte entre o átomo de enxofre e o metal (GRASSECHI, 2015).

2.3 Capeamento de AuNPs com extratos vegetais

2.3.1 Extratos vegetais como agentes estabilizantes

Nas rotas de síntese verde, agentes quelantes/redutores e capeadores se adsorvem às superfícies subsequentemente ao processo de redução do íon metálico. Essas moléculas promovem o capeamento e, conseqüentemente, sua estabilização. Isso evita reações adicionais e agregação, dispensando o uso de estabilizantes utilizados em várias sínteses convencionais (KHARISSOVA *et al.*, 2013).

Além da estabilidade, a adsorção das biomoléculas à superfície de AuNPs pode resultar na intensificação de suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, e biológicas em geral (RAZZAQ *et al.*, 2010). A atividade antioxidante de nanopartículas de ouro, mesmo sem adição de ligantes, foi demonstrada por meio de inibição de ROS por sua utilização como medicamento a pacientes diabéticos (BARATHMANIKKANTH *et al.*, 2010). Neste estudo foi avaliada a atividade de AuNPs no controle da condição hiperglicêmica por indução de diabetes em camundongos via streptozotocina. A quantidade de enzimas de defesa antioxidante aumentou e as condições glicêmicas foram assim controladas

(BARATHMANIKKANTH *et al.*, 2010). Nie *et al.*, 2007 mostraram a intensificação da atividade antioxidante de um análogo da vitamina E, por adsorção à AuNPs. A intensificação da atividade antioxidante também foi reportada num estudo realizado por Razzaq *et al.*, 2010, utilizando ácido ascórbico. Assim, a atividade antioxidante de biomoléculas pode ser aumentada por funcionalização de AuNPs.

Além disso, estudos teóricos quantitativos de correlação entre estrutura eletrônica e atividade antioxidante mostram que a estratégia de modificar estruturalmente moléculas para tentar aumentar esse potencial geralmente resulta em aumento da sua toxicidade. Nesse contexto, a funcionalização de AuNPs apresenta-se como uma alternativa para aumento da atividade antioxidante, por promover sua amplificação, em alguns casos, sem necessidade de modificações estruturais. Além disso, estudos mostram a intensificação da reatividade de grupamentos funcionais de agentes capeadores por adsorção à AuNPs (LEU *et al.*, 2012).

Nanopartículas de metais nobres em geral reduzem drasticamente a energia de ativação de reações anti-radicaais livres (RAVEENDRAN *et al.*, 2003; SARDAR *et al.*, 2009; ALEXANDRIDS, 2011). Na literatura são descritas interações entre radicais livres e nanopartículas, sugerindo sua adsorção à superfície de AuNPs. Também há discussões sobre a possibilidade de interações de troca entre o elétron desemparelhado de radicais livres e os da banda de condução do metal (HE, 2009).

As propriedades espectroscópicas são fortemente dependentes da identidade das espécies adsorvidas em sua superfície (BOISELER e ASTRUC, 2009; THAKKAR 2010; IRAVANI, 2011; PARK, 2011; KHARISSOVA *et al.*, 2013; ROY *et al.*, 2013). A banda de superfície plasmônica apresenta alta sensibilidade à presença de doadores e receptores de elétrons à superfície (BOISELER & ASTRUC, 2009). Conseqüentemente, modificações no espectro de absorção da banda plasmônica podem ser observadas pela interação de moléculas com a superfície das AuNPs devido a interação das mesmas com as cargas superficiais e conseqüente modificação da densidade de carga das partículas (EUTIS & EL-SAYED, 2006; BARROS, 2014).

2.4 Biocompatibilidade das nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro (AuNPs) têm sido utilizadas em aplicações biomédicas (SPERLING *et al.*, 2008; PRABAHARAN, 2009; BHATTACHARYA *et al.*, 2008), diagnóstico de doenças e monitoramento *in vivo* de diversos biomarcadores de doenças. Elas ainda podem atuar também como próprio agente terapêutico (TORRES-CHAVOLA *et al.*, 2010; DIMMELER, 2014; WILCZEWSKA, 2012; YEO, 2015) e medicamento (LI *et al.*, 2016).

Como carreadores, as nanopartículas apresentam muitas vantagens frente aos sistemas convencionais de entrega fármacos (EL-SAYED, 2006; HAN b. *et al.*, 2007). A sua capacidade de adsorção seletiva permite carrear drogas e genes, direcionando-os para células de interesse. Esse direcionamento ocorre por conjugação com moléculas específicas, proteínas, peptídeos, oligonucleotídeos (HAN a *et al.*, 2007). No entanto, devido a rapidez dos resultados de testes de diagnóstico, da praticidade e quantidade de material necessário, o custo benefício poderia viabilizar aplicações envolvendo as AuNPs sintetizadas.

Além disso, a escala nanométrica favorece a captação celular. Isso por apresentarem tamanho próximo ao de proteínas e constituintes celulares em geral. Seu diminuto tamanho faz com que passem por barreiras mecânicas entre as células com facilidade. A fluidez desse processo pode ser obtida pelo ajuste da densidade de carga superficial, o tamanho e a natureza dos ligantes (SURI, 2007). Outra possibilidade é o direcionamento e a seletividade do tratamento. Isso pode ser feito por afinidade química ou por propriedades físicas. Uns dos principais exemplos são a conjugação com biomoléculas, que apresentam grande especificidade em relação aos seus alvos, e os nanocarreadores magnéticos, que são direcionados a alvos específicos ao serem submetidos a um campo eletromagnético externo (WILCZEWSKA, 2012; ARRUEBO, 2007). Além dessas aplicações, há possibilidade de aplicação das AuNPs nos processos de purificação de água por adsorção (BINDHU & UMADEVI, 2014) e como agente anti-glicante (SINGHA *et al.*, 2009).

2.4.1 Citotoxicidade de AuNPs

Nanopartículas de ouro são amplamente utilizadas em aplicações biomédicas para testes de imagem e diagnóstico. O ouro é inerte e por isso possui alta resistência à oxidação, apresentando, portanto, alta biocompatibilidade (BINDHU & UMADEVI, 2014). Por isso, esperava-se que as AuNPs também o fossem. No entanto, estudos têm demonstrado toxicidade de algumas AuNPs (GOODMAN *et al.*, 2004; PERNODET *et al.*, 2006). Essa toxicidade pode ter origem na densidade de carga superficial, devido à influência direta nos processos de internalização celular, e no tamanho de partícula, que influencia diretamente na toxicidade pela maior dificuldade de excreção de partículas menores pelos organismos, ocorrendo também aumento da concentração intracelular devido ao tamanho reduzido das partículas, o que também contribui para o aumento da toxicidade (SHUKLA *et al.*, 2005; TSOLI 2005; CONNOR, *et al.*, 2005). Semelhantemente, agregação no interior celular é um possível fator relacionado ao aumento da citotoxicidade (CONNOR *et al.*, 2005). Em razão disso, os estudos de estabilidade de AuNPs são de grande importância para tais aplicações (PERNODET *et al.*, 2006).

No caso das partículas poliméricas, que apresentam tamanhos maiores que as AuNPs, a ação de opsoninas é indesejada, pois há o acúmulo de partículas no fígado, no pulmão. Além disso, se a doença não estiver concentrada nestes órgãos, acabamos por perder a eficiência da formulação (FRANK *et al.*, 2008).

Esse processo pode ser controlado por modificações da superfície química das partículas. Assim, essas alterações podem facilitar ou não o processo de endocitose, podendo levar inclusive ao aumento do tempo desses materiais na corrente sanguínea. Esse fato se deve principalmente pela ocorrência de intensificação da interação das partículas com proteínas séricas, que favorecem a internalização das nanopartículas caracterizadas com superfícies positivamente carregadas ou com moléculas hidrofóbicas adsorvidas. De modo oposto, são exemplos de aumento da resistência à internalização celular de partículas revestidas com polímeros anti-vegetativos como polietileno-glicol (GOODMAN, 2004).

Pan *et al.*, 2007, avaliaram a citotoxicidade de AuNPs em quatro linhagens distintas de célula, utilizando nanopartículas de ouro de 0,8 a 15 nm de diâmetro. Como

resultado, as linhagens de fibroblastos, células epiteliais, macrófagos e de melanoma apresentaram maior sensibilidade a partículas de pouco mais de um nanômetro, ao passo que as de 15 nm mostraram-se não tóxicas. Isso pode ser devido à maior facilidade de internalização das AuNPs menores ser favorecida, levando a um aumento de sua concentração no meio celular e consequente aumento da citotoxicidade.

O tamanho das AuNPs interfere na cinética de saturação do processo de endocitose. Sendo assim, as dimensões das nanopartículas estão diretamente ligadas à sua toxicidade (CHITHRANI, 2006). O capeamento de AuNPs de citrato com cisteína de 4 nm ou capeadas com biotina, reduzidas com glicose com 12 nm, capeadas com brometo de cetil trimetil amônio de 18 nm não apresentam sinais de toxicidade após a endocitose (CONNOR *et al.*, 2005).

2.5 Ensaio de atividade antioxidante

O ataque de espécies reativas de oxigênio pode provocar danos a tecidos celulares. Tais danos são provocados pela tentativa de estabilização dos mesmos atacando diversos tipos de moléculas presentes nos organismos vivos. Assim, como consequência da captação de um elétron para pareamento com o seu desemparelhado, essas moléculas apresentam a capacidade de desencadeamento de uma reação em cadeia (YOUNGSON, 1995).

Pelo fato de o peróxido de hidrogênio, espécie reativa de oxigênio, embora não considerado radical livre, pode provocar danos ao DNA celular após penetrar a membrana nuclear (ANDERSON, 2000). Desse modo, embora os radicais livres estejam envolvidos em processos biológicos importantes, tais como o de produção de energia e fagocitose, busca-se agentes capazes de frear danos quando sua quantidade excede a ideal para os organismos (BOREK, 1997).

O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um radical livre, cuja captura promove decréscimo da absorvância a 515 nm. O método que consiste na captura desse radical por antioxidantes é denominado método DPPH (BRAND-WILLIAMS *et al.*,

1995), cuja modificação por SÁNCHEZ-MORENO *et al.* (1998) possibilitou a medida de parâmetros cinéticos.

O FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) – Poder Antioxidante de Redução do Ferro) permite mensurar a redução do ferro para avaliação da atividade antioxidante de fluidos biológicos. A mensuração da atividade antioxidante do composto biológico se dá pelo acompanhamento da mudança de absorbância a 593 nm (PULIDO *et al.*, 2000; BENZIE, 1996).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Preparar e caracterizar as nanopartículas de ouro capeadas com resina de *Virola oleifera*, a partir do citrato de sódio com controle de parâmetros que influenciam as propriedades das partículas.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar o efeito da variação do pH e da concentração de *Virola* sobre o capeamento das nanopartículas de Au via planejamento fatorial 3^2
- Caracterizar estrutural e fisico-quimicamente as nanopartículas a partir da:
 - Identificação da estrutura cristalina das AuNPs;
 - De determinação da influência do pH e da concentração sobre a interação de grupos funcionais com as nanopartículas;
 - Análise da estabilidade coloidal;
 - Determinação da morfologia das nanopartículas e sua distribuição de tamanho.
- Avaliar a atividade antioxidante das nanopartículas de ouro por DPPH e FRAP.
- Comparar a citotoxicidade das AuNPs capeadas e não-capeadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Síntese das AuNPs com citrato de sódio

Previamente à síntese das nanopartículas de ouro (AuNPs), todas as vidrarias foram lavadas com solução de ácido nítrico e ácido clorídrico concentrados, na proporção 1:3 (1HNO₃:3HCl). Em seguida, lavou-se em torno de cinco vezes com água destilada, e após com água ultrapura (purificada a partir sistema Milli-Q da Millipore 18Ω), a qual foi utilizada em todos os ensaios, bem como na preparação das soluções utilizadas.

Após, aproximadamente, 1 hora foram preparadas duas soluções estoque para a síntese de AuNPs: uma solução aquosa de citrato de sódio tribásico (C₆H₅Na₃O₇), na concentração de 1% (3,4 x 10⁻² M), e uma solução aquosa de ácido tetracloroáurico tri-hidratado (HAuCl₄.3H₂O) na concentração de 2,5 x 10⁻⁴M de ouro (Au), utilizando água ultrapura como solvente.

Para a reação química de síntese das AuNPs, adicionou-se 1 mL da solução de citrato em 15 mL de solução de ácido tetracloroáurico, à temperatura de 100°C. A mistura foi submetida à agitação de 400 RPM durante 15 minutos, tempo no qual houve a estabilização da cor vermelha característica do ouro coloidal, conforme descrito na metodologia de síntese de Oliveira *et al.*, 2017. O ouro coloidal foi resfriado em banho de gelo, acondicionado em frascos estéreis do tipo “Falcon” e armazenados em geladeira (2-8°C) para uso posterior.

Por ser capaz de confirmar a formação das nanopartículas pela banda característica de LSPR em torno de 522 nm, além de fornecer importantes informações conforme descrito anteriormente, a espectroscopia no UV-visível foi a primeira técnica de caracterização utilizada.

Para a caracterização das AuNPs no UV-Visível foram utilizadas cubetas de quartzo previamente lavadas com detergente, água e água destilada, em seguida, foi feito o ambiente com água ultrapura. Para a análise, utilizou-se o volume de 2 mL de ouro coloidal resfriado, recém-preparado, que foi acondicionado em uma cubeta de quartzo. Para o branco, utilizou-se água ultrapura. A cubeta com o coloide foi introduzida no porta-amostras do espectrofotômetro EvolutionTM300, da Thermo. Então, realizou-se a leitura da absorbância no intervalo de 200 a 800 nanômetros.

Através do espectro no UV-visível foi possível determinar o tamanho majoritário e a concentração das nanopartículas de ouro sintetizadas. A concentração aproximada de AuNPs foi determinada pela metodologia descrita por Wolfgang, H. (2007). Em seu método, o tamanho e a concentração de AuNPs sintetizadas com o citrato podem ser calculados a partir de dados do espectro de absorção do coloide: sua absorbância máxima (A_{SPR}), sua absorção em 450 (A_{450}), o coeficiente de extinção molar neste mesmo comprimento de onda (ϵ_{450}), o qual foi tabelado para partículas de diferentes tamanhos de nanopartículas, após validação experimental. Primeiramente, o diâmetro majoritário das partículas é determinado pela razão entre a absorbância máxima e à 450 nm. Essa determinação é possível pela verificação do coeficiente de extinção decimal molar correspondente a um certo diâmetro em dados tabulares. Assim, o diâmetro médio (d) das AuNPs sintetizadas com citrato é calculado a partir da razão a seguir:

$$d = A_{SPR} \div A_{450} \quad \text{Equação (2)}$$

A partir de então, a concentração (c) de AuNPs é calculada pela seguinte razão:

$$c = A_{450} \div \epsilon_{450} \quad \text{Equação (3)}$$

O coeficiente de extinção decimal molar (ϵ_{450}) depende da frequência da radiação incidente e é característico de cada substância. Essa propriedade cuja definição é a capacidade da matéria em extinguir a luz em um comprimento de onda específico. Assim, no caso específico de coexistência de várias substâncias em solução e em concentrações distintas, o valor desse coeficiente é o somatório dos produtos entre cada coeficiente individual e a concentração molar de cada uma (WEDLER, G., et al., 2001). Aqui os ϵ_{450} foram previamente estabelecidos e tabulados para diferentes razões A_{SPR} / A_{450} de AuNPs. Após a obtenção da concentração de AuNPs em mol.L⁻¹ a concentração foi transformada em g.L⁻¹, por meio do cálculo da massa individual de uma partícula a partir da equação 4:

$$m_{particle} = \left(\frac{\pi d^3}{6} \right) \rho \quad \text{Eq. 4}$$

As AuNPs sintetizadas com citrato tiveram ainda sua estrutura cristalina analisada por meio de difração de raios-X. Nessa análise, o difratograma obtido resulta do espalhamento elástico desses raios, que não mudam de frequência após a colisão com os átomos da amostra. Ou seja, permanecem com a mesma quantidade de energia original. No caso de um arranjo periódico de átomos, ou seja, de um arranjo cristalino, as relações de fase entre os espalhamentos também será periódica, possibilitando então a observação dos efeitos de difração de raios X em ângulos diversos, como ilustra a figura 5. A lei de Bragg, descrita pela equação 5, estabelece uma correlação entre o parâmetro de rede e o comprimento de onda da radiação incidente (SCHEFFER, 2014):

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad \text{Eq. 5}$$

Por meio das interferências construtivas e destrutivas que ocorrem quando a estrutura ordenada de um cristal espalha radiação incidente de comprimento de onda pequeno (no caso raios-X), podemos identificar a fase cristalina das AuNPs. O fenômeno descrito anteriormente e que permite a definição dessa estrutura denomina-se difração e ocorre devido à proximidade entre a ordem das distâncias entre os centros de espalhamento e o comprimento de onda da radiação incidente (EGERTON, 2008).

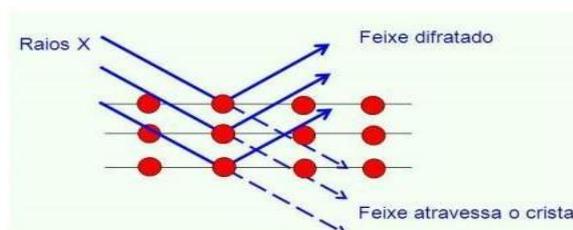


Figura 5: Lei de Bragg. Fonte (BLEICHER, SASAKI, 2000).

A análise de amostras sólidas é realizada focalizando-se um feixe de elétrons sobre as mesmas situadas no centro de uma câmara denominada de Debye-Scherrer. No interior desta câmara há um filme fotográfico que, ao ser sensibilizado por alguns raios difratados, permite a geração de cones de difração. Ela permite a coleta de raios X entre 0° e 180° , em termos de 2θ (SCHEFFER, 2014).

Para a análise de raios-X, o coloide de ouro sintetizado com o extrato vegetal foi concentrado por centrifugação (14.000 rpm, 10 min) e colocado numa placa de petri e seco numa estufa a temperatura de 60°C por cerca de 10 minutos, para posterior

remoção do material com uma lâmina. O pó obtido foi analisado varredura realizada na região 2 θ , de 10° a 100°, sendo 0.01° por minuto, com uma constante de tempo de 2 segundos. Para realização das medidas foi utilizado um difratômetro da Phillips PW 1710 (Cu $k\alpha$ radiação), pertencente ao Laboratório de Instrumentação do LabPetro da UFES.

4.2 Triagem das variáveis influentes no capeamento

Como diversos fatores influenciam no processo de adsorção, há necessidade de uma triagem prévia das faixas de pH, concentração do extrato, temperatura e agitação, assim como do tempo para saturação da superfície. No entanto, optou-se pela realização dos experimentos a 25 °C em razão da comparação das atividades antioxidantes entre os resultados do estudo anterior, em que nanopartículas foram sintetizadas utilizando diretamente o extrato, nessa temperatura e a formulação otimizada pelo planejamento fatorial 3².

O extrato de *Virola oleífera* foi solubilizado em meio aquoso em água ultrapura em todo o trabalho. Esse extrato foi fornecido seco e pulverizado pelo Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Vila Velha. Após a triagem do intervalo de pH, tempo e concentração que levassem à maior quantidade de *Virola* adsorvida à superfície das AuNPs. Foi realizado um planejamento fatorial com objetivo de se determinar a melhor condição de capeamento. Para isso, foram consideradas as variáveis pH e concentração de extrato, em mg/mL. Os dados considerados em tal planejamento estão na Tabela 2:

Tabela 2. Dados do planejamento fatorial.

Condições Experimentais	
Conc. (mg.mL ⁻¹)	pH
0,1 (-)	3 (-)
0,1 (-)	4 (0)
0,1 (-)	5 (+)
0,2 (0)	3 (-)
0,2 (0)	4 (0)
0,2 (0)	5 (+)
0,3 (+)	3 (-)
0,3 (+)	4 (0)
0,3 (+)	5 (+)
0,2 (0)	4(0)
0,2 (0)	4 (0)

4.3 Preparo das AuNPs capeadas

As nanopartículas capeadas foram preparadas pela adição de extrato de *Virola oleifera*, após ajuste de pH com soluções de 0,1 mol.L⁻¹ de NaOH e HCl, de forma que as concentrações finais da mesma fossem de 0,1, 0,2 e 0,3 mg/mL, sob agitação a 200 rpm por 5 minutos.

4.4 Caracterização das AuNPs pela Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Foram feitas imagens de nanopartículas resultantes da síntese com citrato e da condição ótima do fatorial (0,1 mg/mL de extrato e pH 4) por microscopia eletrônica de transmissão. Para isso, foi utilizado um microscópio eletrônico (JEM-1400, JEOL, USA inc.), operando a 120 kV. Cerca de 10µL das amostras foram gotejadas sobre grades de cobre de 400 mesh, contendo um filme suporte de resina formvar e secas a temperatura ambiente.

Foi realizada contrastação negativa com adição de acetato de uranila sobre a grade das amostras da condição ótima, 30 minutos após a adição do coloide sobre a mesma. As imagens foram obtidas após secagem total.

As imagens do Microscópio Eletrônico de Transmissão foram obtidas em diferentes aumentos (80.000X; 200.000X) visando obter informações gerais da amostra, e imagens mais detalhadas das nanopartículas quanto a forma e tamanho.

A distribuição de tamanho das partículas foi determinada pela análise das imagens obtidas utilizando o software Image J, que fornece informações sobre área de cada nanopartícula. Por meio dos valores de área foi possível calcular o raio e conseqüentemente o diâmetro, usando o Excel. Como apenas a parte inorgânica aparece nas imagens de microscopia de transmissão, o procedimento foi realizado apenas para as AuNPs sintetizadas com citrato e não capeadas.

Com os valores de diâmetro de 1000 partículas, foi obtido um histograma para avaliação da frequência de cada diâmetro utilizando o software Statistica versão 6.0.

Além disso, foi calculada a razão de aspecto, conferindo uma medida da esfericidade das partículas. Para isso, foram medidos os diâmetros maior e menor de 1000 partículas. Considera-se como esférica uma partícula cujo valor da razão de

aspecto situe-se entre 0,9 e 1,0.

A razão de aspecto é calculada pela divisão do diâmetro menor de cada partícula pelo diâmetro maior da mesma ou pela divisão do maior pelo menor de um grupo de, em geral, 500 ou 1000 nanopartículas. No entanto, optou-se por dividir-se o menor diâmetro pelo maior, de forma a obter-se um valor com significado plausível, o que não seria possível procedendo-se de modo contrário. Esses valores obtidos são somados e então divididos pelo número total de nanopartículas. A determinação dos diâmetros foi realizada utilizando-se o software Gatan Digital Micrograph e o cálculo de seu valor no Excel.

4.5 Estudo da estabilidade coloidal utilizando o Potencial Zeta

A função da dupla camada elétrica é impedir a coalescência das partículas. Isso poderia ocorrer caso as colisões entre elas contivessem uma quantidade de energia capaz de rompê-la. Uma perturbação capaz de provocar tal fenômeno poderia ser um aumento suficiente da temperatura, devido à agitação térmica (ATKINS, 2008). O raio denominado de cisalhamento, que delimita a camada difusa, é o ponto cujo potencial elétrico (também denominado potencial zeta (ζ)) é um importante parâmetro para mensuração da estabilidade de uma dispersão coloidal (MAHMOUDI *et al.*, 2011).

Como o potencial zeta fornece uma medida da intensidade das forças repulsivas entre as partículas. Assim, quanto maior o módulo do potencial zeta, mais estável a dispersão. Essa estabilidade deve-se a uma maior contraposição às forças atrativas entre as partículas, culminando numa tendência menor à agregação. O cálculo desse potencial é realizado a partir da medida da velocidade (mobilidade eletroforética) de deslocamento da partícula entre dois eletrodos de carga oposta. Para obtenção de seu valor, substitui-se o da mobilidade eletroforética na fórmula de mobilidade de Smoluchowski, equação 6:

$$\mu = \left(\frac{\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{\eta} \right) \quad \text{Eq. 6}$$

Onde μ é a mobilidade eletroforética, ε é a permissividade do meio, ε_0 a permissividade no vácuo, ξ o módulo do potencial zeta e η a viscosidade do meio.

Há outras formas de se calcular o potencial zeta, considerando a influência de fatores diferentes dos considerados a partir da equação de Henry. Enquanto ele considerou a influência do tamanho da partícula, força iônica e natureza de ligantes quando presentes (AGNIHOTRI, S. *et al.*, 2009, TENNYSON, L.D. *et al.*, 2012), outras formas podem considerar o parâmetro de Debye-Huckel, (κ , cujo recíproco κ^{-1} representa a espessura da camada difusa) bem como o raio R da partícula. No entanto, como Smoluchowski atribui à função de Henry um valor constante de 1.5, as equações apresentam o mesmo resultado como consequência de suas aplicações:

$$\mu = \frac{\varepsilon \xi f(\kappa R)}{1,5\eta} \quad \text{Eq. 7}$$

Onde μ é a mobilidade eletroforética, ξ o módulo do potencial zeta, f é a função de Henry, na qual κ é o parâmetro de Debye-Hückel e R o raio da partícula e η a viscosidade do meio.

Como descrito na seção 2.5.2.1, o potencial zeta pode ser calculado pela equação 7:

$$\mu = \frac{\varepsilon \xi f(\kappa R)}{1,5\eta} \quad \text{Eq. 7}$$

Onde ε é a constante dielétrica do meio, ξ o potencial zeta, η a viscosidade do coloide, κ o parâmetro de Debye-Hückel, e R o raio da partícula.

A correlação entre força iônica do meio e espessura da camada e, conseqüentemente estabilidade coloidal se dá pela equação 8:

$$\kappa^2 = \left[\frac{e^2}{\varepsilon K_B T} \right] \sum_i z_i^2 n_i \quad \text{Eq. 8}$$

Onde o termo $z_i^2 n_i$ representa a força iônica do meio, onde z_i é a carga do íon em questão e n_i quantidade de íons em solução. Desse modo, aumentando-se o valor deste termo, ocorre um aumento do parâmetro de Debye-Hückel, diretamente proporcional a ele. E como a espessura da camada é o inverso desse parâmetro, ela diminui com o aumento da força iônica (ATKINS, 2008). Dessa forma a compreensão do significado físico do parâmetro de Hückel fornece um embasamento teórico para a correlação entre modificação da estabilidade da dispersão devido a mudanças no valor do pH, por exemplo.

As análises de potencial zeta foram realizadas para amostras de todas as condições de capeamento que foram avaliadas no planejamento fatorial, bem como para as nanopartículas sintetizadas com citrato. As análises foram realizadas em triplicata para as partículas preparadas. Para as da condição ótima e não capeadas também foram realizadas em triplicata. O equipamento utilizado foi o Analisador de tamanho de partículas da Microtrac modelo Zetatrac NPA152. Para o teste, uma alíquota de 2 mL da dispersão coloidal de nanopartículas são adicionados em uma cubeta de teflon contendo um par de eletrodos de paládio para a medida do potencial zeta.

4.6 Caracterização das AuNPs utilizando a Espectroscopia Raman.

A espectroscopia Raman é uma técnica útil na identificação de moléculas. Isso só é possível devido à especificidade na frequência vibracional de cada ligação numa determinada molécula. O espectro Raman consiste em um gráfico de intensidade de energia versus deslocamento de um pico característico da vibração. A intensidade pode ser tomada como arbitrária, considerando-se apenas o deslocamento caso não se deseje estudar os efeitos de intensificação.

A preparação da amostra foi realizada pela centrifugação de 2 mililitros do coloide em um tubo eppendorf estéril de 2 mililitros à velocidade de 16873 g por 10 minutos. Após o procedimento foi descartado o sobrenadante e adicionada água ultrapura para nova etapa de centrifugação. Após nova re-suspensão em água ultrapura, uma gota do coloide metálico foi seca sobre a superfície de vidro e levados para análise em Espectroscopia Raman (ALPHA 300R Confocal Raman Spectrometer) utilizando fonte de laser de 532 nm e varredura na região de 600-4000 cm^{-1} . Foram realizadas

análises das AuNPs sintetizadas com citrato, do extrato de *Virola oleifera* e das nanopartículas capeadas.

4.7 Caracterização das AuNP utilizando a Espectroscopia no Infravermelho.

Apesar de ambas as técnicas realizarem identificação de moléculas, elas são complementares. Isso porque os modos vibracionais ativos em uma e em outra não são os mesmos. Por exemplo, os estiramentos simétricos são modos vibracionais ativos apenas no Raman. Uma explicação para esse fato é a necessidade de um momento de dipolo intrínseco para a atividade no infravermelho. Nesse caso, o campo elétrico incidente precisa de um momento de dipolo oscilando de forma rítmica, com a frequência de vibração da molécula para ser acoplado. Ou seja, precisa encontrar um campo oscilante de mesma frequência. No caso do Raman, é necessária a mudança na polarizabilidade para uma molécula ter atividade.

A espectroscopia no infravermelho tem sido utilizada para caracterizar nanopartículas produzidas por diversas rotas de síntese (YALLAPPA *et al.*, 2005; N. PURREZA *et al.*, 2015). O espectro infravermelho revela assinaturas vibracionais dos constituintes presentes no meio em que a dispersão coloidal estava inserida, ou seja, durante a síntese ou quando as nanopartículas são inseridas em um meio complexo tal como o extrato biológico, revelando proteínas e metabólitos por meio de grupamentos funcionais amina, álcool, cetonas, aldeídos, e ácidos carboxílicos. Dessa forma essa técnica permite a detecção de grupamentos funcionais e moléculas adsorvidas à superfície das nanopartículas, bem como o monitoramento da superfície química.

Com o objetivo de confirmar a adsorção dos constituintes do extrato e a presença do citrato na superfície das AuNPs as medidas de Espectroscopia de Infravermelho foram realizadas no modo FT-IR (FT-MIR FTLA 2000 Bomem) do Laboratório de Instrumentação do LabPetro da UFES. Para esta análise as amostras foram preparadas a partir de centrifugação de 2 mililitros do coloide em um tubo eppendorf estéril de 2 mililitros à velocidade de 16.873 g por 10 minutos. Após o procedimento foi descartado a sobrenadante e adicionada água ultrapura para nova etapa de centrifugação. Foram realizadas análises das AuNPs sintetizadas com citrato, do

extrato de *Virola oleifera* e das nanopartículas capeadas (0,1 mg/mL e pH 4) após secagem em um recipiente fechado e ao abrigo de luz e calor, com sílica. A transmitância/absorbância foi mensurada nas frequências vibracionais entre 4.000 cm^{-1} a 600 cm^{-1} .

4.8 Análise de atividade antioxidante

4.8.1 Análise de atividade antioxidante pelo método DPPH

A atividade antioxidante das AuNPs sintetizadas com citrato de sódio (controle) e das capeadas da formulação otimizada foi determinada através do método do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) segundo Scherer e Godoy (2009) modificado, no qual foram utilizadas 20 μL de uma solução etanólica do extrato de *Virola oleifera*, AuNPs sintetizadas com citrato de sódio (controle), das capeadas da formulação otimizada e trolox (controle positivo) e 280 μL de uma solução etanólica de DPPH 40 $\mu\text{g/mL}$. Todos os testes foram realizados em triplicata. As microplacas foram mantidas no escuro, em temperatura ambiente (25 °C) por 90 min, e após esse período, a absorbância foi medida a 517 nm. A atividade de eliminação dos radicais foi calculada conforme a equação 9:

$$I\% = \frac{(Abs_1 - Abs_0) \times 100}{Abs_0} \quad \text{Eq. 9}$$

Onde a absorbância Abs_0 é a do branco e Abs_1 é a absorbância do teste.

4.8.2 Análise de atividade antioxidante pelo método FRAP

O segundo método utilizado para determinar a atividade antioxidante das amostras. AuNPs sintetizadas com citrato de sódio (controle) e das capeadas da formulação otimizada foi o método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) de acordo com BENZIE et al. (1996), modificado. Para o preparo do reagente FRAP foram misturados 25 mL da solução de acetato de sódio tri hidratado (0, 3M; pH 3.6) + 2,5 mL da solução de TPTZ (2,4,6-Ris (2-piridil) -s-Triazine (10 mM/L) em HCl 40 mM + 2,5 mL da solução aquosa de cloreto férrico (20 mM), totalizando 30 mL de solução FRAP, que foi utilizada imediatamente após a sua preparação. Uma alíquota de 30 μL das soluções dos testes foi adicionada juntamente com 270 μL do reagente

FRAP. No branco foram adicionados 30 µL de etanol e 270 µL do reagente FRAP. Após 5 minutos de reação, a leitura foi realizada em 595 nm, utilizando leitora de microplacas. A atividade antioxidante foi calculada da seguinte forma:

$$I\% = \frac{(Abs_1 - Abs_0) \times 100}{Abs_0} \quad \text{Eq. 9}$$

Onde a absorbância Abs_0 é a do branco e Abs_1 é a absorbância na presença das amostras em diferentes concentrações.

4.9 Ensaio de citotoxicidade

Para se avaliar os efeitos citotóxicos das AuNPs capeadas, foram realizados testes *in vitro* utilizando a linhagem celular J774A.1. Foi colocado 100µL de células, com a concentração de 5×10^4 células/mL por poço, em uma placa de 96 poços. As células foram colocadas nos poços um dia anterior, para que as mesmas pudessem aderir, nas respectivas concentrações dos testes de viabilidade com células da linhagem J774A 1.

Após a incubação por 48 horas, a viabilidade celular foi verificada através do corante alamarBlue®. As amostras foram lidas no aparelho espectrofotômetro Varioskan® Flash, com os mesmos parâmetros utilizados nas leituras de viabilidade de promastigotas.

Os dados foram analisados através do programa Microsoft® Excel®, através da Equação 9:

$$\% \text{Cél.sobrev.} = \frac{(\epsilon_{\text{OXI}})_{\lambda_2} A_{\lambda_1} - (\epsilon_{\text{OXI}})_{\lambda_1} A_{\lambda_2} \text{ do meio de diluição do teste}}{(\epsilon_{\text{OXI}})_{\lambda_2} A_{\lambda_1}^0 - (\epsilon_{\text{OXI}})_{\lambda_1} A_{\lambda_2}^0 \text{ do cont. não tratado}} \quad \text{Eq. 9}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese e caracterização de AuNPs

As AuNPs foram sintetizadas segundo a metodologia descrita na seção 4.1. Como primeiro passo da caracterização, realizou-se análise de espectroscopia no UV-Visível, para o monitoramento do comportamento óptico da dispersão. Nessa análise, foi confirmada a formação de AuNPs de tamanho em torno 20 nm, pelo pico de RPSL em 522 nm, característico de AuNPs esféricas com esse diâmetro, conforme descrito na literatura (EUSTIS, S. *et al.* 2006). Além disso, a dispersão apresentou-se monodispersa pelo fato da banda de plasmon ter se apresentado bastante estreita. E por não haver nenhuma banda após 600 nm, pressupõem-se não haver agregação significativa entre as moléculas da dispersão coloidal.

A técnica de difração de raios-x caracteriza a amostra por meio de análise elementar. Como a estrutura cristalina apresenta um parâmetro de rede, ou seja, distância característica entre os centros espalhadores podemos encontrar seus ângulos específicos de difração. Por meio do cálculo da intensidade relativa de cada pico, frente ao de maior intensidade, pode-se buscar a estrutura a partir do banco de dados disponibilizado pela ICDD (International Center of Diffraction Data). E pelo fato de tais parâmetros estarem catalogados, podemos então identificar a estrutura cristalina da AuNP, cuja identificação é feita pelos valores de 2θ (SCHEFFER, 2014).

O difratograma de raios-x apresentou cinco picos: a $38,17^\circ$; $44,29^\circ$; $64,86^\circ$ e $77,88^\circ$ e $81,65^\circ$ na região 2θ que estão relacionados, respectivamente, aos seguintes planos cristalográficos (111), (200), (220), (311) e (222), como pode ser visto na figura 6B. Isso confirma a estrutura cristalina cúbica de face centrada das AuNPs sintetizadas com citrato de utilizadas para o capeamento.

Por meio das imagens de microscopia eletrônica de transmissão, foi possível determinar por meio do software Image J o diâmetro médio das partículas. A curva de distribuição Gaussiana mostra um desvio padrão de $14,92 \pm 2,12$ nm, conforme pode ser observado no histograma da figura 6 C. A razão de aspecto é um parâmetro que fornece uma medida da esfericidade das nanopartículas e apresenta importância em aplicações biológicas, como na penetração de nanopartículas em

tecidos (AGARWAL, R. *et al.*, 2015; KERSEY, F. R., 2012). Avaliando-se então este parâmetro, foi possível confirmar a esfericidade de tais partículas por meio do cálculo da razão de aspecto, utilizando-se 1000 partículas para o cálculo. Como a medida que o valor de tal parâmetro se aproxima da unidade, a esfericidade da partícula aumenta, e o valor obtido foi de $0,9369 \pm 0,0666$ nm, confirmou-se a esfericidade de tais partículas quantitativamente.

Tal esfericidade também pode ser determinada qualitativamente, pelas imagens de microscopia eletrônica de transmissão (Figuras 6D, 6E e 6F). Essas imagens também confirmaram monodispersividade e homogeneidade na distribuição de tamanho de partículas, confirmada estatisticamente.

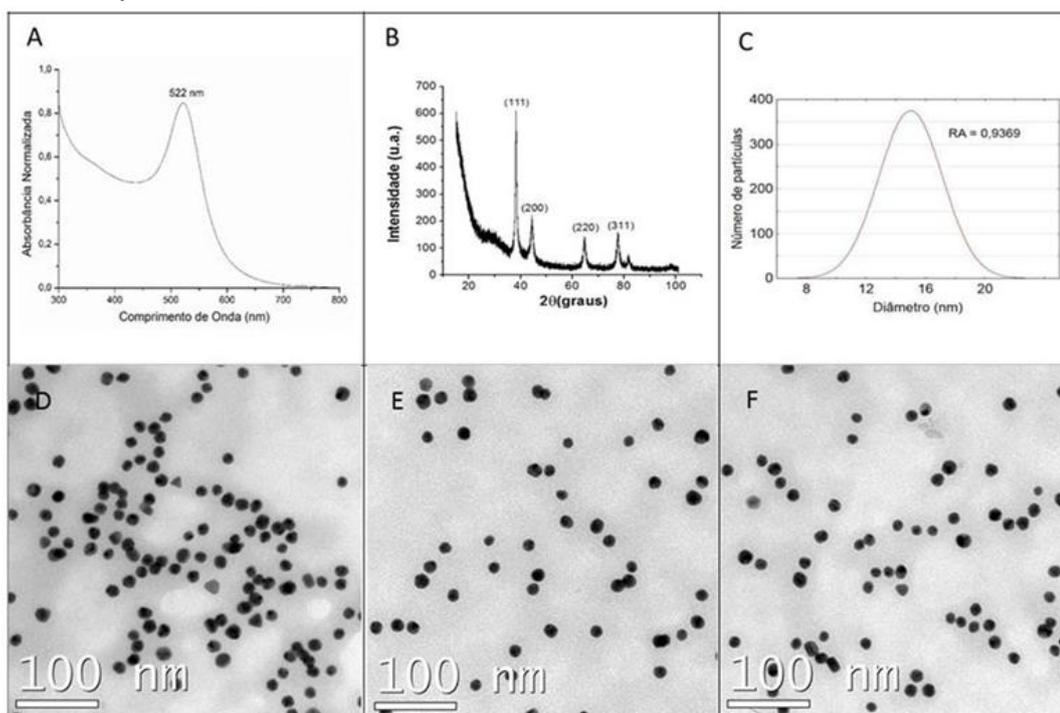


Figura 6. Espectro de UV-Visível (A), Difratoograma de raios-x (B), histograma de distribuição de tamanho (C) valor da razão de aspecto e imagens de microscopia eletrônica de transmissão das AuNPs sintetizadas com citrato (D, E e F).

5.2 Avaliação do capeamento com *Virola oleifera*

Como descrito na metodologia, as nanopartículas foram sintetizadas com citrato, a partir do resultado de um estudo prévio do grupo para otimização da síntese (OLIVEIRA, 2017). Como a mudança no pH da dispersão pode promover modificações por si só na banda de RPSL por mudança no índice de refração do

meio, fez-se necessário tomar o espectro de absorção das AuNPs sintetizadas com citrato, como parâmetro para avaliação da quantidade de *Virola* adsorvida.

Previamente, foi realizado um estudo para obtenção de uma curva padrão, a fim de se obter uma equação para correlação entre os valores de concentração e absorção de *Virola*. Isso foi possível pelo fato de seu pico característico de absorbância ocorrer em 280 nm, como pode ser visto na Figura 7:

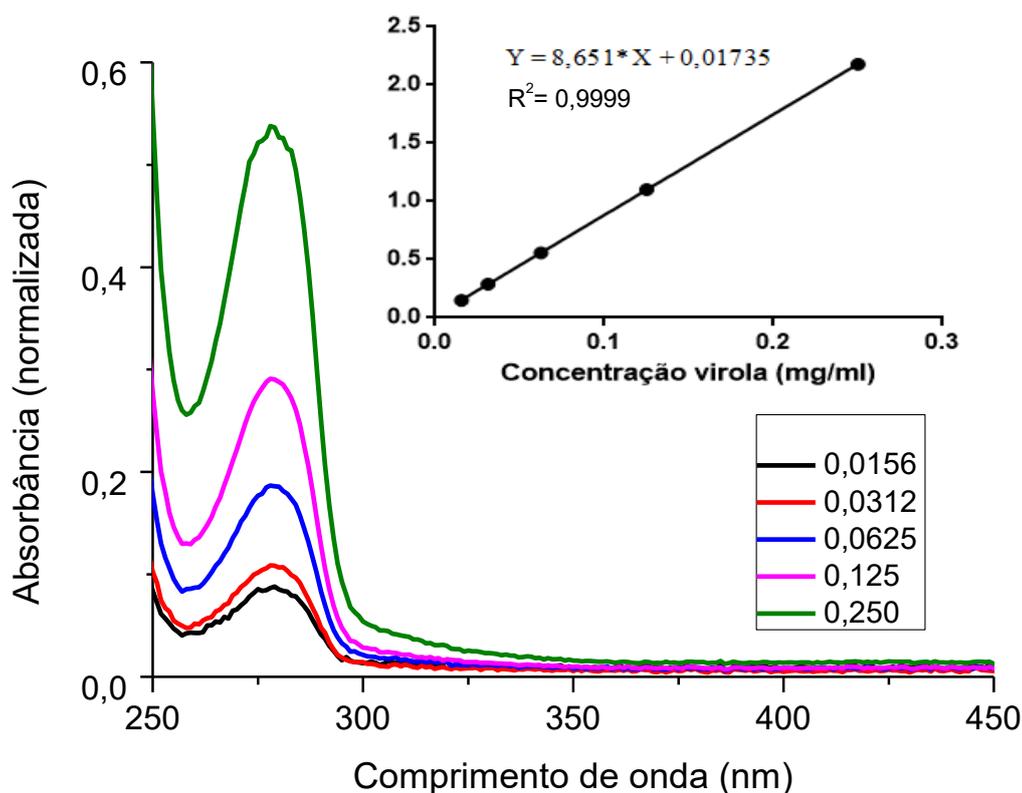


Figura 7. Espectros de absorbância de diferentes concentrações de extrato de *Virola oleifera* em mg/mL.

Portanto, foram escolhidos os valores de concentração de 0,1, 0,2 e 0,3 mg/mL para o capeamento das nanopartículas previamente sintetizadas, seguindo o intervalo de concentrações utilizado anteriormente em estudo de síntese de AuNPs com *Virola oleifera* (MILANEZE, 2015). Uma observação importante é que, os valores de concentração são os finais, após a adição do extrato ao coloide de AuNPs sintetizadas com citrato, a partir de uma solução de extrato de 1,0 mg/mL.

Após o estabelecimento do intervalo de concentração, foi realizada uma análise do tempo ótimo, considerando-se como ótimo aquele em que, não haveria mudanças

expressivas na concentração de *Virola* adsorvida. Para isso, foram realizadas retiradas de alíquotas de 5 em 5 minutos, durante o tempo de 1 h e agitação constante de 200 rpm, para a concentração média de 0,2 mg/mL de extrato. O experimento foi realizado em triplicata e, foi analisada a absorbância do sobrenadante a 280 nm, após centrifugação a 16873 g por 10 minutos, condição avaliada anteriormente em pesquisas do grupo, mostrando sedimentação total das AuNPs sintetizadas com citrato. A análise dos resultados mostrou que, até 5 minutos, a concentração de *Virola* no sobrenadante caiu linearmente, atingindo 60 % da absorbância, conforme a figura 8 A, estabilizando-se após esse período. Isso indica que após esse tempo, não houve acréscimo na quantidade de *Virola* adsorvida à superfície.

Outro ponto importante foi a realização da triagem do melhor intervalo de pH para a adsorção. Para isso, a absorbância do sobrenadante a 280 nm foi analisada, considerando-se o tempo de 5 minutos, a concentração de 0,2 mg/mL e os valores de pH de 3,0; 5,0; 7,0; 9,0 e 11,0. Já que a concentração de *Virola* não passou de 0,02 mg/mL (Fig. 8 B), os resultados mostraram que para os valores de pH mais ácidos, entre 3 e 5, a concentração de *Virola* no meio foi mínima, enquanto que para valores de pH acima de 5, praticamente todo extrato adicionado permaneceu no meio. Uma possível justificativa é o fato de que com o aumento do pH, aumenta a quantidade de flavonoides desprotonados. E, uma vez que a superfície da partícula está carregada negativamente, a repulsão eletrostática impede a adsorção desses flavonoides à superfície das partículas. Os melhores resultados de capeamento estão relacionados com o pKa de boa parte dos constituintes orgânicos do extrato, correspondentes aos grupamentos ácido carboxílico (COOH), conforme Tabela 3.

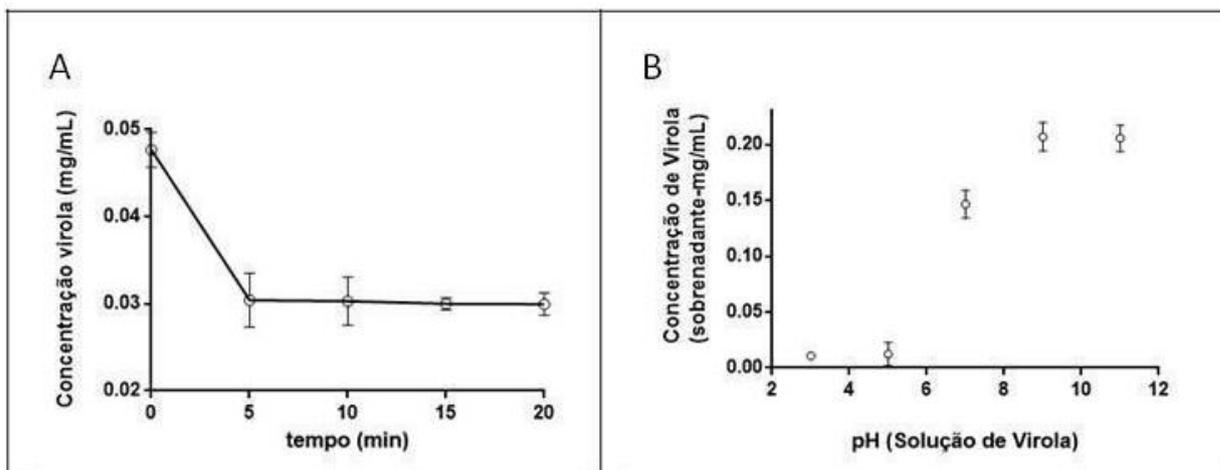
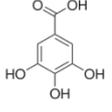
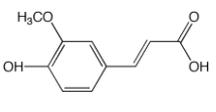
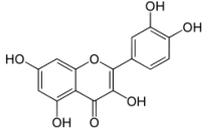
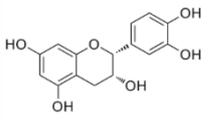


Figura 8. Determinação do tempo ótimo para o capeamento (A) e triagem dos valores de pH com base no aumento da adsorção de extrato (B).

Tabela3. Valores de pKa dos flavonoides em maior quantidade na resina de *Virola oleifera*.

Flavonoide	Estrutura	pKa	Referência
Ácido gálico		4.40	<i>PATY, F. 1963.</i>
Ácido ferúlico		pKa = 4.42 (hydroxy) (est) pKa = 4.58	<i>SPARC, 2008;</i> <i>Serjeant EP; Dempsey B, 1979.</i>
Quercetina		pKa1 = 7.17 pKa2 = 8.26 pKa3 = 10.13 pKa4 = 12.30 pKa5 = 13.11 (est) (Fenol)	<i>SPARC, 2006; SPARC, 2008.</i>
Epicatequina		3 (Fortemente ácido) 9 (Fortemente básico)	http://foodb.ca/compounds/FD B002576

5.3 Espectroscopia no UV-visível

De posse dos dados resultantes da triagem do pH, concentração e determinação do tempo ótimo, foi realizado um planejamento fatorial 3^2 com três pontos centrais, para avaliação da condição que resultaria em maior concentração de partículas após o

processo de centrifugação para remoção do excesso de extrato. Como se verifica na Tabela 4, as variáveis estudadas foram pH e concentração do extrato, sendo a área sob o pico de RPSL e o valor da absorbância máxima as propriedades monitoradas. Essa tabela apresenta os valores de área e absorbância máxima dos espectros de UV-visível obtidos para cada uma das condições de capeamento. Optou-se por trabalhar apenas em temperatura ambiente de 25 °C, a fim de evitar uma possível degradação dos constituintes do extrato.

Tabela 4. Área – absorbância máxima dos espectros de *Virola* para os experimentos do planejamento fatorial 3².

Condições Experimentais		Variáveis Resposta	
Conc. (mg.mL ⁻¹)	pH	Área	Abs. Máx.
0,1 (-)	3 (-)	1,83739	0,1345
0,1 (-)	4 (0)	8,03915	0,35704
0,1 (-)	5 (+)	5,37726	0,26965
0,2 (0)	3 (-)	0,71614	0,1003
0,2 (0)	4 (0)	5,32841	0,26871
0,2 (0)	5 (+)	3,55089	0,19572
0,3 (+)	3 (-)	1,84977	0,14505
0,3 (+)	4 (0)	4,96933	0,26871
0,3 (+)	5 (+)	3,2376	0,20181
0,2 (0)	4 (0)	6,17139	0,29701
0,2 (0)	4 (0)	7,09074	0,32472

Para verificar a influência das variáveis apresentadas na Tabela 2, a análise de variância (ANOVA) foi realizada e os resultados são apresentados nas Tabelas 5 e 6, para as variáveis área e absorbância máxima, respectivamente. Pode-se verificar que a 95% de confiança somente a variável pH foi significativa para ambas.

Tabela 5. ANOVA para a variável Absorbância Máxima da dispersão de AuNPs capeadas utilizando planejamento fatorial 3².

Variáveis	SS	DF	MSQ	F	P
(1) Concentração L+Q	0,005596	2	0,002798	3,61269	0,093375
(2) pH L+Q	0,060851	2	0,030425	39,28746	0,000357
Error	0,004647	6	0,000774		
Total SS	0,069199	10			

As variáveis significativas são apresentadas em negrito; SS – Soma dos quadrados; DF – Grau de Liberdade; MSQ – Quadrados das Médias; F – Teste F; P – Valor de p, L+Q – Soma quadrática em torno da média (soma quadrática devido à regressão linear + soma quadrática residual, respectivamente).

Tabela 6. ANOVA para a variável área da dispersão de AuNPs capeadas utilizando planejamento fatorial 3².

Variáveis	SS	DF	MSQ	F	P
(3) Concentração L+Q	5,54381	2	2,77191	3,82026	0,085106
(4) pH L+Q	45,27602	2	22,63801	31,19987	0,000675
Error	4,35348	6	0,72558		
Total SS	54,47117	10			

As variáveis significativas são apresentadas em negrito; SS – Soma dos quadrados; DF – Grau de Liberdade; MSQ – Quadrados das Médias; F – Teste F; P – Valor de p. L+Q – Soma quadrática em torno da média (soma quadrática devido à regressão linear + soma quadrática residual, respectivamente).

O cálculo da concentração de AuNPs resultante da síntese com citrato foi realizado seguindo a metodologia de Haiss e colaboradores (2007), utilizando os dados de absorvância no UV-visível. Como resultado, obtivemos a concentração de 26,63 mg/mL, condizente com os dados obtidos anteriormente para a mesma síntese em estudos prévios do grupo de pesquisa, por meio da técnica de ICP-MS (OLIVEIRA, 2017).

Por meio do diagrama de pareto (Figuras 9 A e 9C) é possível ver que, tanto para a variável área quanto para absorvância máxima, apenas o pH foi significativo. E como pode ser observado por meio do gráfico de superfície que representa a interação entre as variáveis, a maior área e a maior absorvância máxima foram encontradas para a concentração de 0,1 mg/mL e para o pH 4. O resultado do fatorial mostrou que o aumento do pH causa um aumento na área e também na intensidade de absorvância máxima.

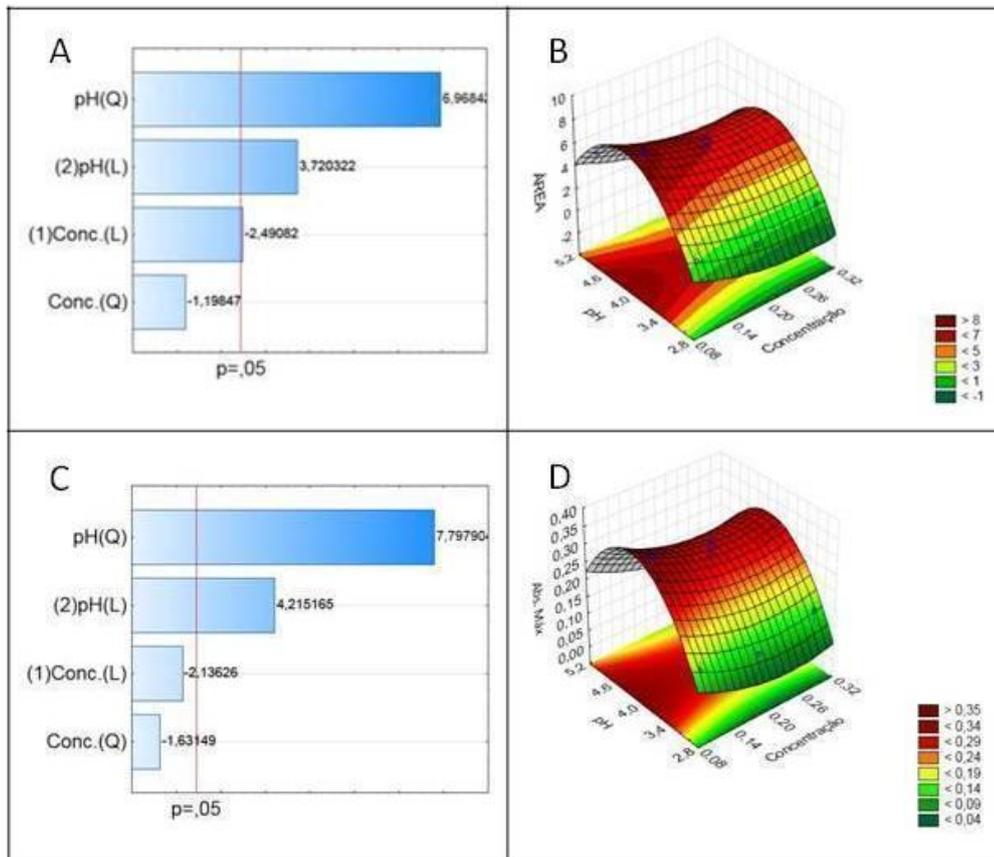


Figura 9. Gráficos de superfície resposta (área sob o pico de RPSL e absorvância máxima) apresentando interação entre as variáveis pH e concentração final de extrato. O diagrama de pareto para a variável área (A), mostra que apenas o pH foi significativo. Isso também pode ser visto no diagrama de pareto para a absorvância máxima (B). E os gráficos de superfície mostram que a maior absorvância máxima (Figura D) e a maior área sob o pico de LSPR se deram para 0,1 mg/mL e pH 4.

Analisando-se ainda as contribuições individuais das variáveis avaliadas para os fatores pH e concentração, observa-se que os maiores valores da área e da absorvância máxima ocorreram para as concentrações de 0,1 mg/mL e pH 4, como pode ser visto na Figura 10:

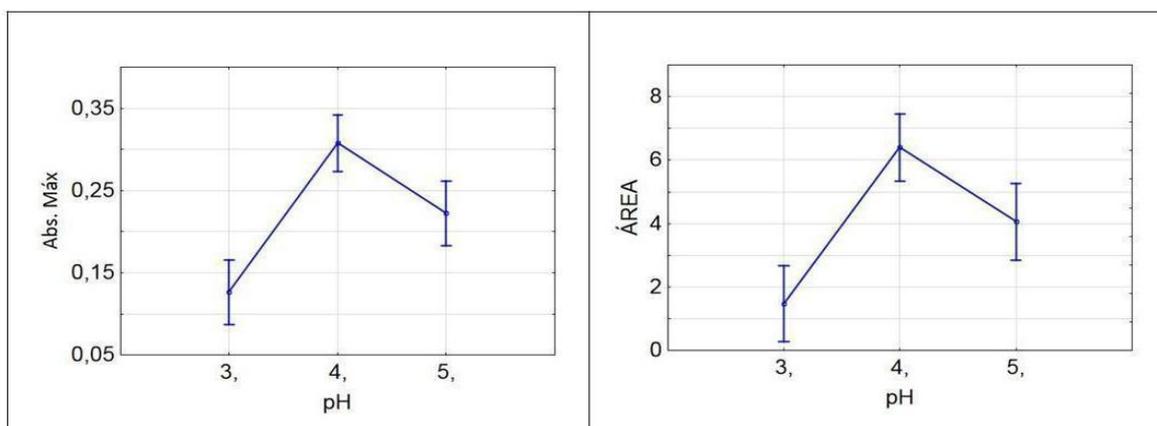


Figura 10. Contribuição individual do pH e da concentração nos parâmetros área sob o pico de RPSL e absorvância máxima.

Os espectros de absorção das nanopartículas de ouro capeadas com *Virola oleifera* apresentaram deslocamentos em relação ao pico de absorção de 522 nm, característico das AuNPs não capeadas, como pode ser visto na figura 11. Assim, com pico de absorção entre 533 e 540 nm, pode-se inferir a adsorção da *Virola oleifera* sobre a superfície das AuNPs sintetizadas com citrato de sódio (AYAZ AHMED *et al.*, 2014).

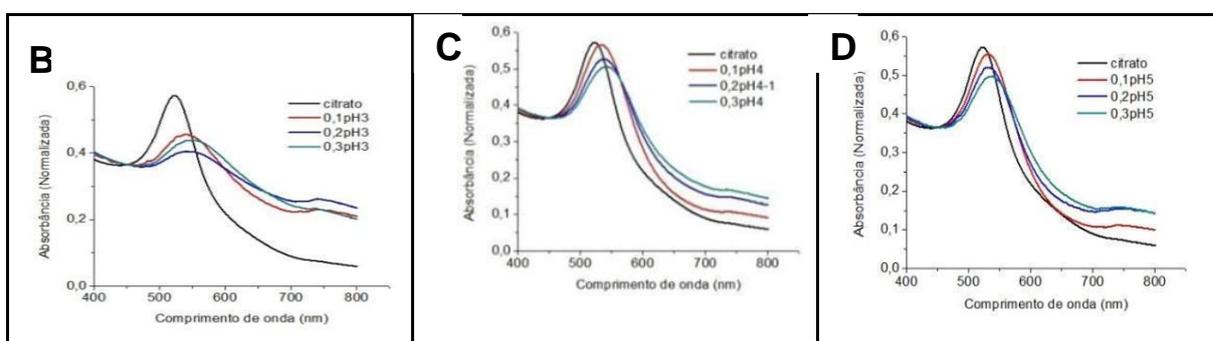
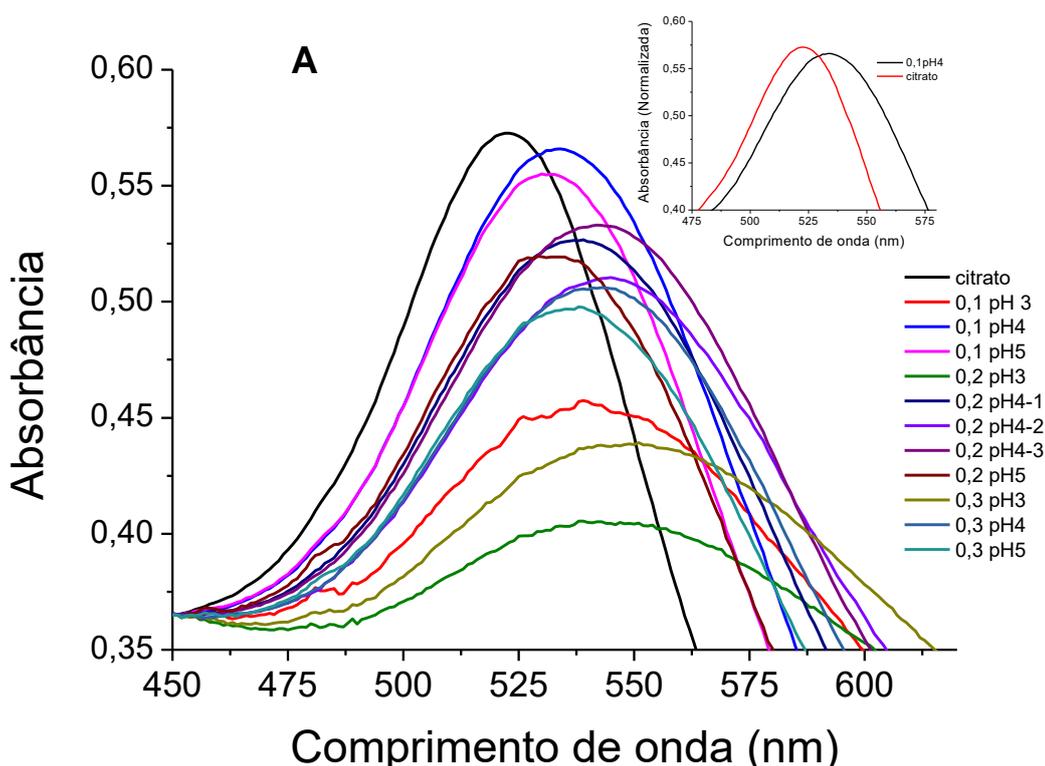


Figura 11. Espectros de RPSL obtidos para os experimentos do planejamento fatorial (A). Efeito do pH sobre o deslocamento do comprimento de onda máximo dos espectros de RPSL (B, C e D).

Para o pH 3, observa-se um deslocamento de banda bastante expressivo para todas as concentrações (Figura 11 B). No entanto, para pH 4 e 5, o deslocamento de banda apresenta-se discreto (Figura 11 C e D, respectivamente). Isso pode indicar

uma instabilidade maior das suspensões a pH 3 em quaisquer concentrações utilizadas. A absorbância também diminui de forma bastante expressiva para esse valor de pH, assim como há um alargamento de banda, que é característico de agregação. Isso pode indicar uma maior instabilidade da dispersão no pH 3, condição sob a qual visualmente foi possível observar tendência à agregação.

5.4 Estudo da estabilidade da melhor condição

5.4.1 Análise de espectroscopia no UV-visível

Foi observada a ocorrência de deslocamentos de banda mais intensos com a alteração da concentração de eletrólitos no meio do que com a mudança de pH. O abaixamento da absorbância e o deslocamento de banda mostram uma progressão do nível de agregação com o aumento da concentração de NaCl, como pode ser visto na figura 12:

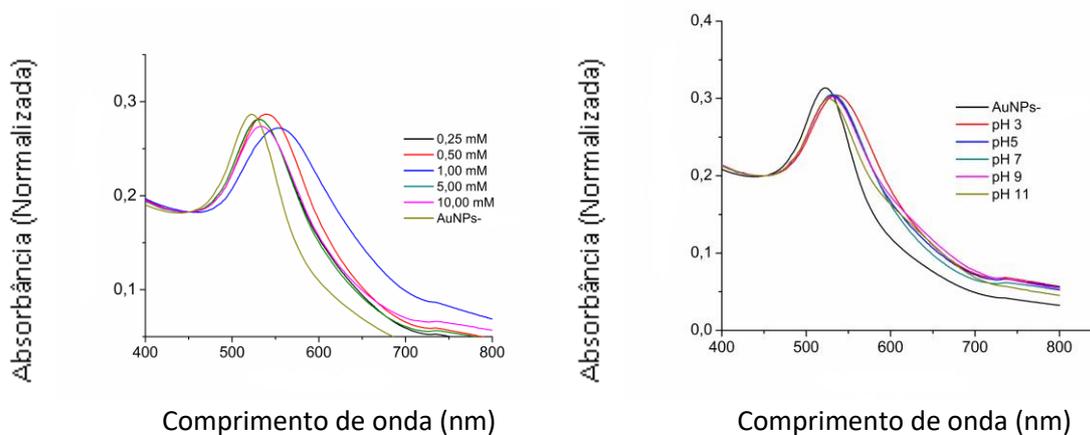


Figura 12: Espectro de absorção mostrando o coloide de AuNPs capeadas com *Virola oleifera* da formulação otimizada, em diferentes concentrações de NaCl 0,25; 0,50; 1,0; 5,0 e 10,0 mM e em diferentes faixas de pH (3,0; 5,0; 7,0; 9,0; 11,0) e o controle (sem alteração no pH do meio).

5.4.2 Análise de Potencial zeta

Como a solução de *Virola* normalmente apresenta pH em torno de 5,0 a adição de ácido promove aumento da força iônica do meio. E com esse aumento da força iônica, a espessura da camada difusa (inverso do valor do parâmetro de Debye-

Hückel), também diminui, reduzindo assim a intensidade da repulsão que se contrapõe às forças atrativas impedindo a agregação. Desse modo, a redução do pH do extrato reduz a estabilidade dessa dispersão coloidal. Pode-se observar também que o potencial zeta torna-se menos negativo que o das AuNPs sintetizadas com citrato e não capeadas, para todas as condições estudadas, como pode ser visto na figura 13. Essa modificação do potencial zeta para negativo com a redução do pH poderia ser justificada pela ocorrência de protonação dos grupos hidroxila dos flavonoides da *Virola* de forma intensa o suficiente para provocar uma repulsão eletromagnética molecular a ponto de dificultar a aproximação dos flavonoides da partícula.

Pode-se observar também que, com o aumento da concentração de *Virola*, o potencial zeta apresentou redução de seu módulo para todos os valores de pH. O aumento da concentração de *Virola*, e por consequência, o aumento da espessura do revestimento da AuNP favoreceu a redução do módulo do potencial zeta, uma vez que a carga líquida resultante se torna menos negativa à medida que flavonoides são adsorvidos. Pode-se observar que, em relação ao pH, há uma relação entre o intervalo de maior redução do potencial zeta e os valores de pKa de diversos grupamentos funcionais dos flavonoides presentes no extrato.

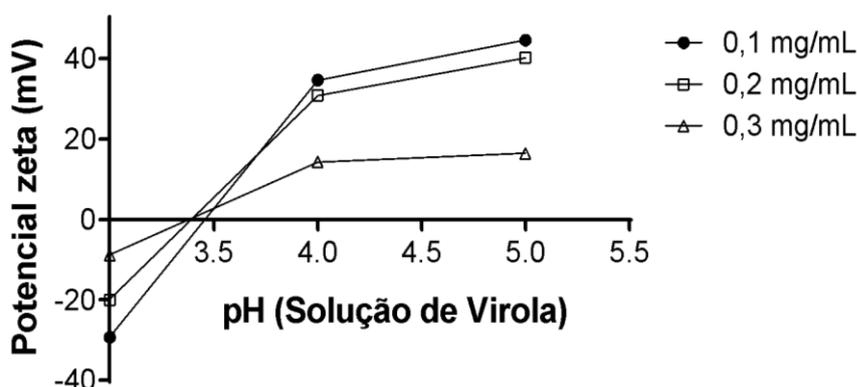


Figura 13. Tendência dos valores de potencial zeta em função do pH e da concentração de extrato final na dispersão coloidal.

Os valores de potencial zeta da formulação otimizada a partir do planejamento fatorial, de 0,1 mg/mL e pH 4 e do citrato, apresentaram magnitudes semelhantes. No entanto, o potencial zeta do citrato apresentou-se negativo. Isso era esperado em virtude da densidade de carga negativa devido às moléculas de citrato desprotonadas e adsorvidas à sua superfície. Já o da formulação otimizada

apresentou-se positivo, como pode ser visto na figura 14. Uma explicação para o valor positivo do potencial zeta das partículas protonadas é a adsorção de biomoléculas protonadas.

Essa redução da negatividade do potencial zeta também foi observada por Chakraborti e colaboradores (2013), num estudo de capeamento de AuNPs com quercetina, após síntese com citrato.

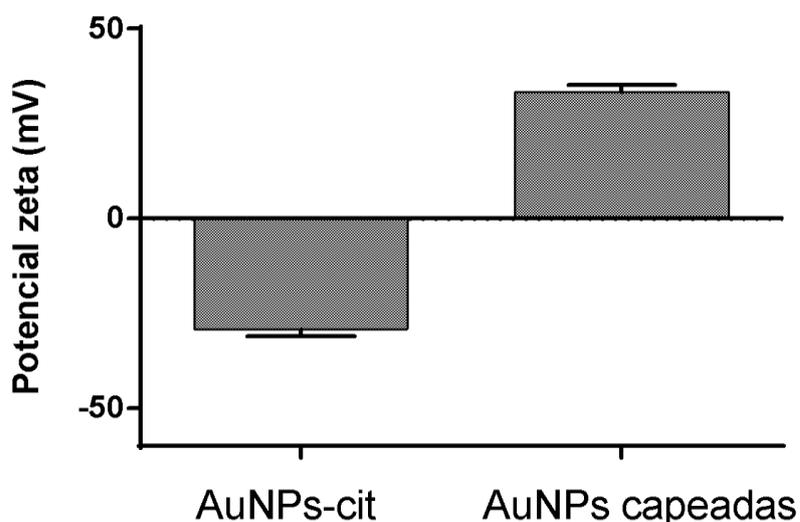


Figura 14. Potencial zeta da dispersão da condição ótima de capeamento (0,1 mg/mL e pH 4), determinada a partir do planejamento fatorial e da dispersão de AuNPs sintetizadas com citrato.

Para verificação da estabilidade de AuNPs variou-se a concentração de NaCl e verificando modificações no potencial zeta bem como na distribuição de tamanho das partículas. Pode-se observar na figura 15 que o potencial zeta apresentou redução com o aumento da concentração de NaCl sendo monitorado o diâmetro médio das mesmas aumentou. Isso mostra que os dados apresentam concordância entre si, pois o aumento do diâmetro é indicativo de redução da estabilidade, conforme apresentando na Figura 15, pela redução do potencial zeta. Tais dados concordam com os ensaios feitos nas mesmas condições em análise de UV-vis.

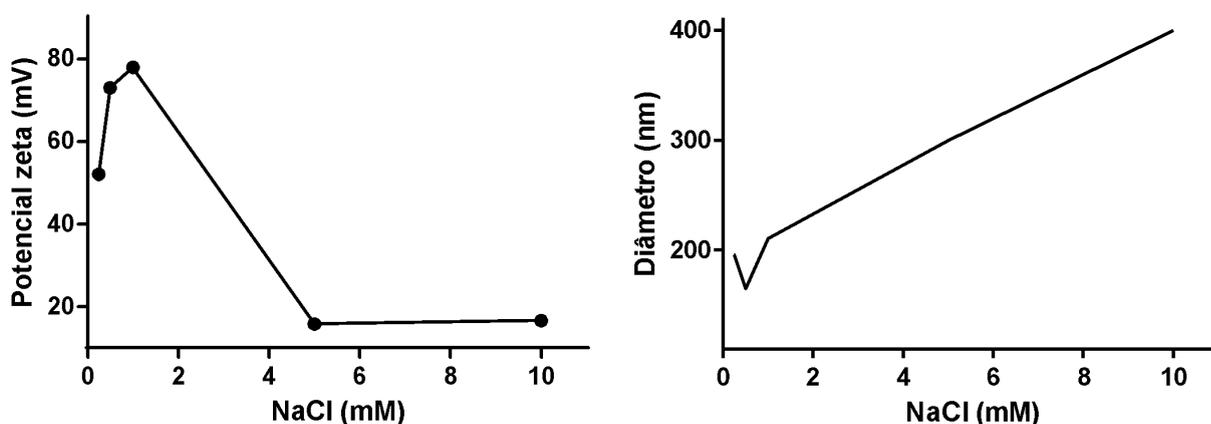


Figura 15: Avaliação da variação do potencial zeta e do diâmetro médio das AuNPs capeadas com *Virola oleifera* (0,1 mg/mL e pH 4) com a variação da concentração de NaCl (0,25; 0,50; 1,00; 5,00 e 10,00 mM).

Já em relação à variação de pH, os mais alcalinos resultaram em tamanhos médios de partícula muito menores, indicando maior estabilidade por levarem a menor agregação das partículas. O potencial zeta apresentou aumento com o aumento do pH, o que condiz com aumento do diâmetro médio resultante desse aumento, como mostra a figura 16:

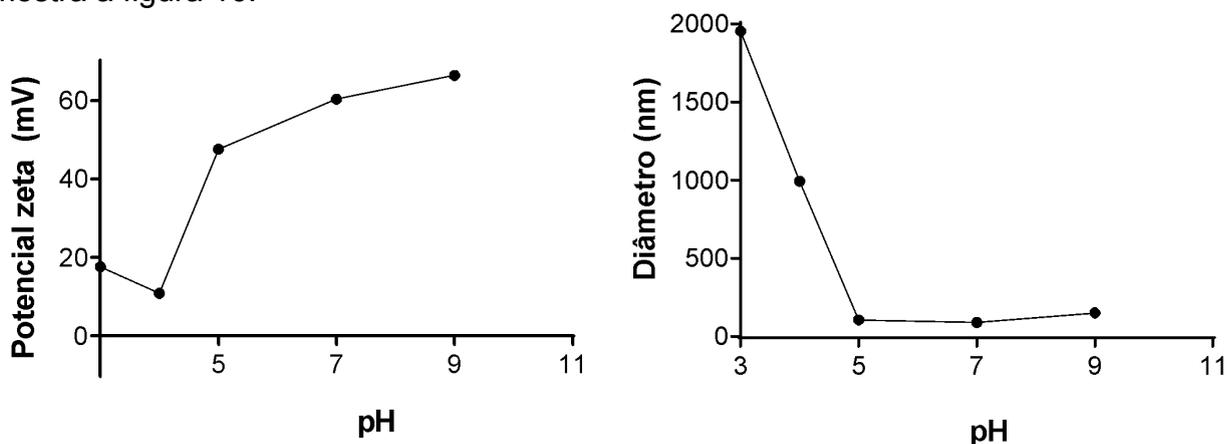


Figura 16: Avaliação da variação do potencial zeta e do diâmetro médio das AuNPs capeadas com *Virola oleifera* (0,1 mg/mL e pH 4) com a variação do pH (3,0; 5,0; 7,0; 9,0 e 11,0).

5.5 Identificação dos grupamentos adsorvidos à superfície das AuNPs capeadas

5.5.1 Espectroscopia no infravermelho

A confirmação da adsorção de uma biomolécula à superfície da nanopartícula é obtida por análises de FTIR e Raman.

A figura 17 mostra os espectros do extrato de *Virola*, bem como das partículas capeadas e não-capeadas:

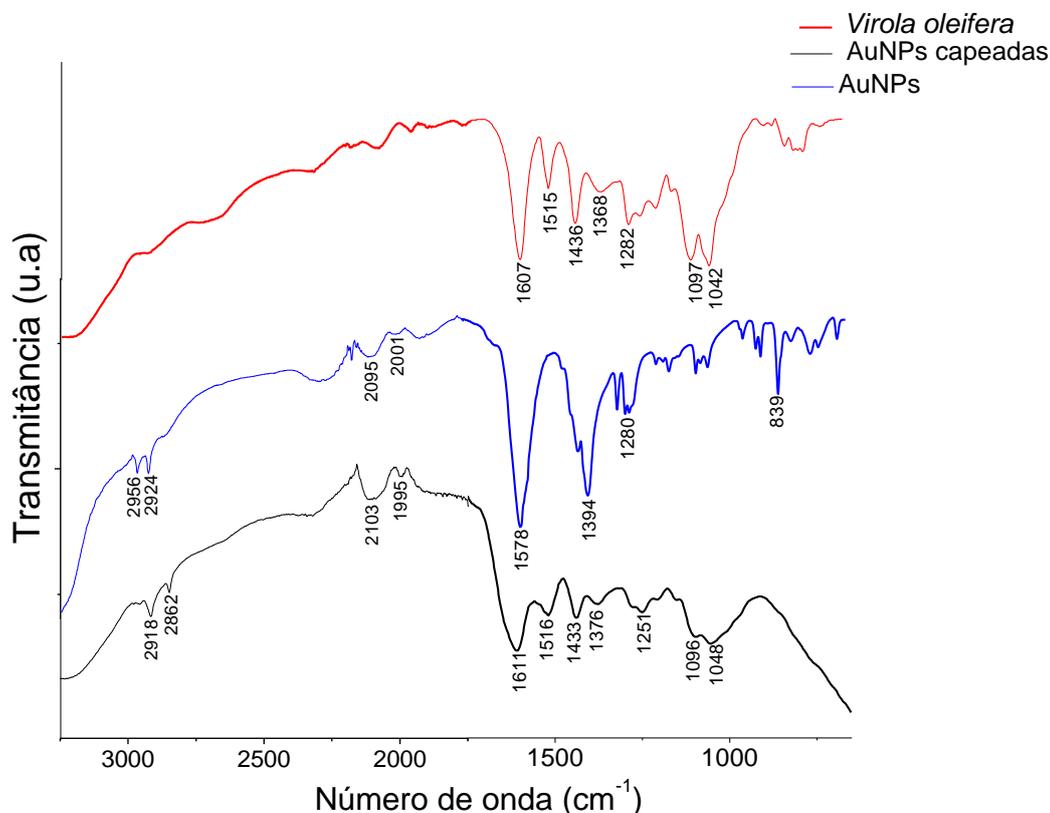


Figura 17. Comparação entre os espectros de FTIR das AuNPs sintetizadas com citrato, da *Virola oleifera* e das AuNPs capeadas.

No espectro das AuNPs capeadas os picos de 2918 cm^{-1} e 2862 cm^{-1} (correspondentes aos picos 2953 cm^{-1} e 2862 cm^{-1} das AuNPs sintetizadas com citrato após deslocamento, respectivamente), são característicos de estiramento de ligações C-H de alcanos (SILVERSTEIN, 2007). A similaridade no perfil do espectro indica a presença de polifenóis, pois a banda 1517 cm^{-1} confirma a presença de estruturas aromáticas C=C (LOPES; FASCIO, 2004). A presença de grupos hidroxila (a banda em 1611 cm^{-1} , característica de flexão do grupo hidroxila ROEGES, 1994; VIEN, Lin D *et al.*, 1991) indicando a presença de grupos quelados das biomoléculas presentes no extrato de *Virola oleifera* são responsáveis pela redução e estabilização de nanopartículas de ouro. A banda em 1096 cm^{-1} relaciona-se com o grupamento éster (ALBUQUERQUE *et al.*, 2003; MUTHUVEL *et al.*, 2014).

Além disso, existe uma ligeira alteração na posição da banda de vários grupos funcionais no espectro das nanopartículas de ouro sintetizadas e estabilizadas com extrato que indica a presença de algumas proteínas e seus metabólitos, tais como

terpenóides (MORAES, 2008). A adsorção na superfície das nanopartículas de metal é uma característica das flavanonas e terpenóides que possivelmente podem ser capazes de interagir através de grupos carbonila, na ausência de outros agentes de ligação fortes em concentração suficiente. É também possível que os terpenóides desempenham um papel na redução de íons metálicos, por oxidação de grupos aldeídos em moléculas de ácidos carboxílicos (IRAVANI, 2011; MITTAL *et al.*, 2013; BÔA *et al.*, 2015; ISLAM *et al.*, 2015).

A presença de estruturas aromáticas pode ser confirmada pela banda observada a 1516 cm^{-1} , situada entre $1400\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, e característica de ligações C=C (SILVERSTEIN, 2007). Isso reafirma a presença do extrato de *Virola oleifera*, pela presença de anéis aromáticos em estruturas como a da molécula de quercetina, constituinte majoritário no extrato, em caracterização realizada no estudo prévio. E os picos de $1096,57\text{ cm}^{-1}$ e $1048,73$ (correspondentes aos picos $1097,31\text{ cm}^{-1}$ e $1042,23\text{ cm}^{-1}$ do extrato de *Virola*) correspondem ao estiramento vibracional de éster, que apresentam como característica o aparecimento de duas ou mais bandas, entre as frequências de $1000\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ (SILVERSTEIN, 2007).

5.5.2 Espectroscopia Raman

Quando um fóton de radiação eletromagnética incide sobre a molécula, pode ser espalhado com energia maior, menor ou igual à sua de origem. Isso significa que, sua energia posterior dependerá do estado energético da molécula no instante da colisão. Estando a molécula excitada, o fóton é espalhado com energia maior caracteriza um deslocamento Anti-Stokes. O oposto corre no deslocamento Stokes, onde o espalhamento ocorre com a diminuição de energia, menos frequente que os espalhamentos Rayleigh.

Comparando-se os espectros Raman para o extrato e AuNPs capeadas com *Virola oleifera*, observamos a existência de dois picos, um situado em $664,57\text{ cm}^{-1}$ e o outro a $1575,96\text{ cm}^{-1}$, como pode ser visto na Figura 18. A intensificação da intensidade dos picos nas AuNPs capeadas, indica a adsorção do extrato de *Virola* à superfície das AuNPs sintetizadas com citrato, pelo efeito de intensificação de superfície, SERS. A banda localizada em 1109 cm^{-1} é indicativa de estiramento de uma ligação C-OH, presente na molécula de citrato. Portanto, a redução na

intensidade dessa banda no espectro das AuNPs capeadas pode ser indicativa de deslocamento do citrato pelo extrato de *Virola* ou da adsorção da *Virola* sobre as moléculas de citrato adsorvidas à superfície das AuNPs.

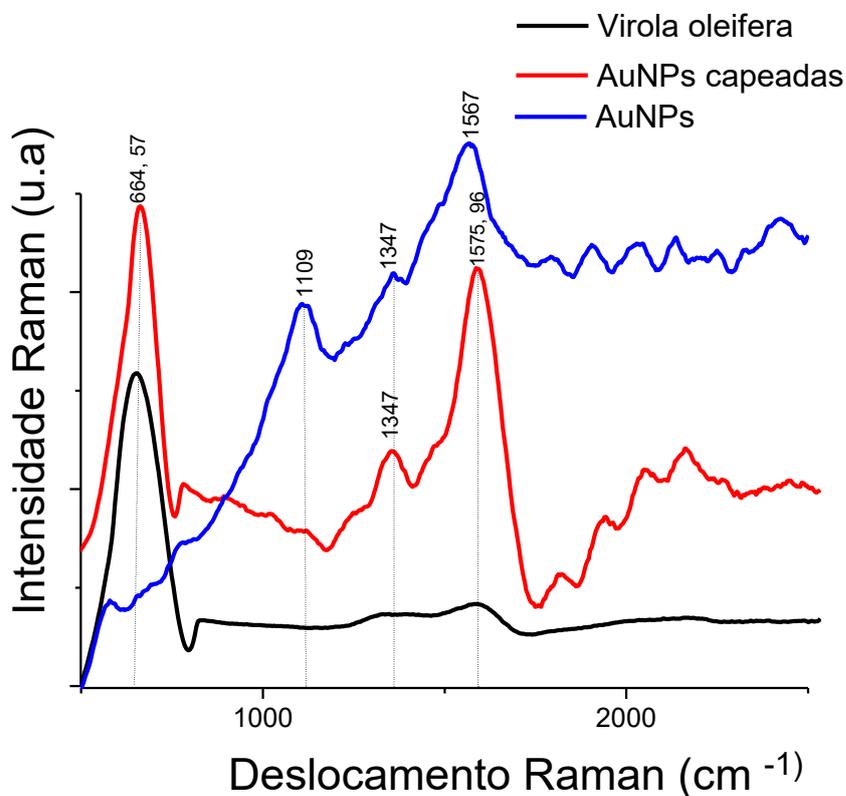


Figura 18. Comparação entre os espectros Raman das AuNPs capeadas, AuNPs sintetizadas com citrato de sódio e extrato de *Virola oleifera*.

5.6 Microscopia eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão é uma técnica cuja importância reside na determinação do diâmetro das nanopartículas e também de sua forma. As imagens mostradas na figura 19 são da condição ótima determinada a partir do resultado do planejamento fatorial (0,1 mg/mL e pH 4) e das nanopartículas sintetizadas com citrato. É possível visualizar o extrato no entorno das partículas, como resultado da contrastação prévia com acetato de uranila. Esse procedimento foi realizado com o intuito de comprovar visualmente a adsorção do extrato. Já a imagem 20 compara as AuNPs capeadas e não capeadas.

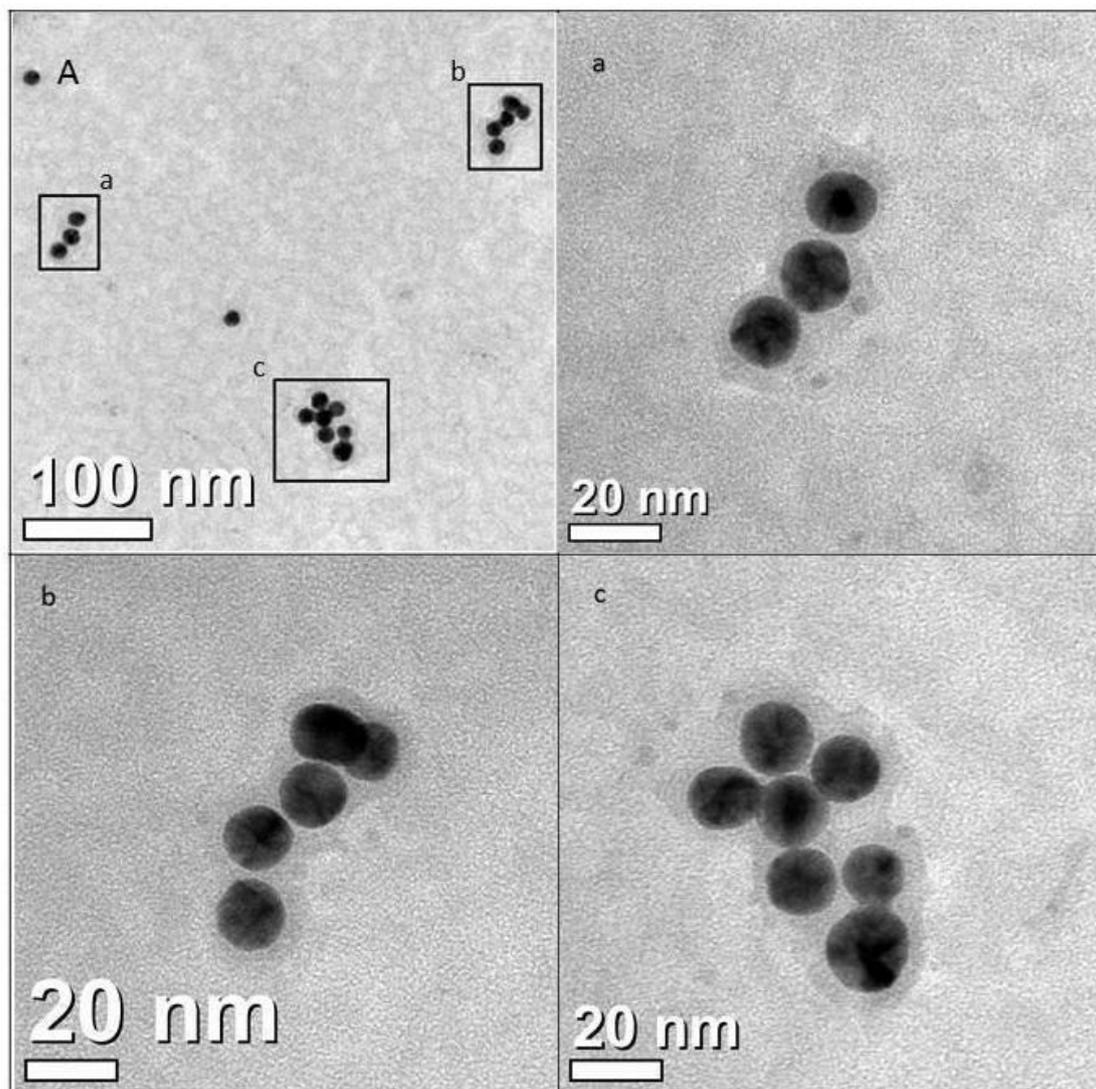


Figura 19. Nanopartículas capeadas contrastadas com acetato de uranila para visualização da parte orgânica (extrato de *Viola*), com magnificação de 200.000x (a) e 800.000x (b, c e d).

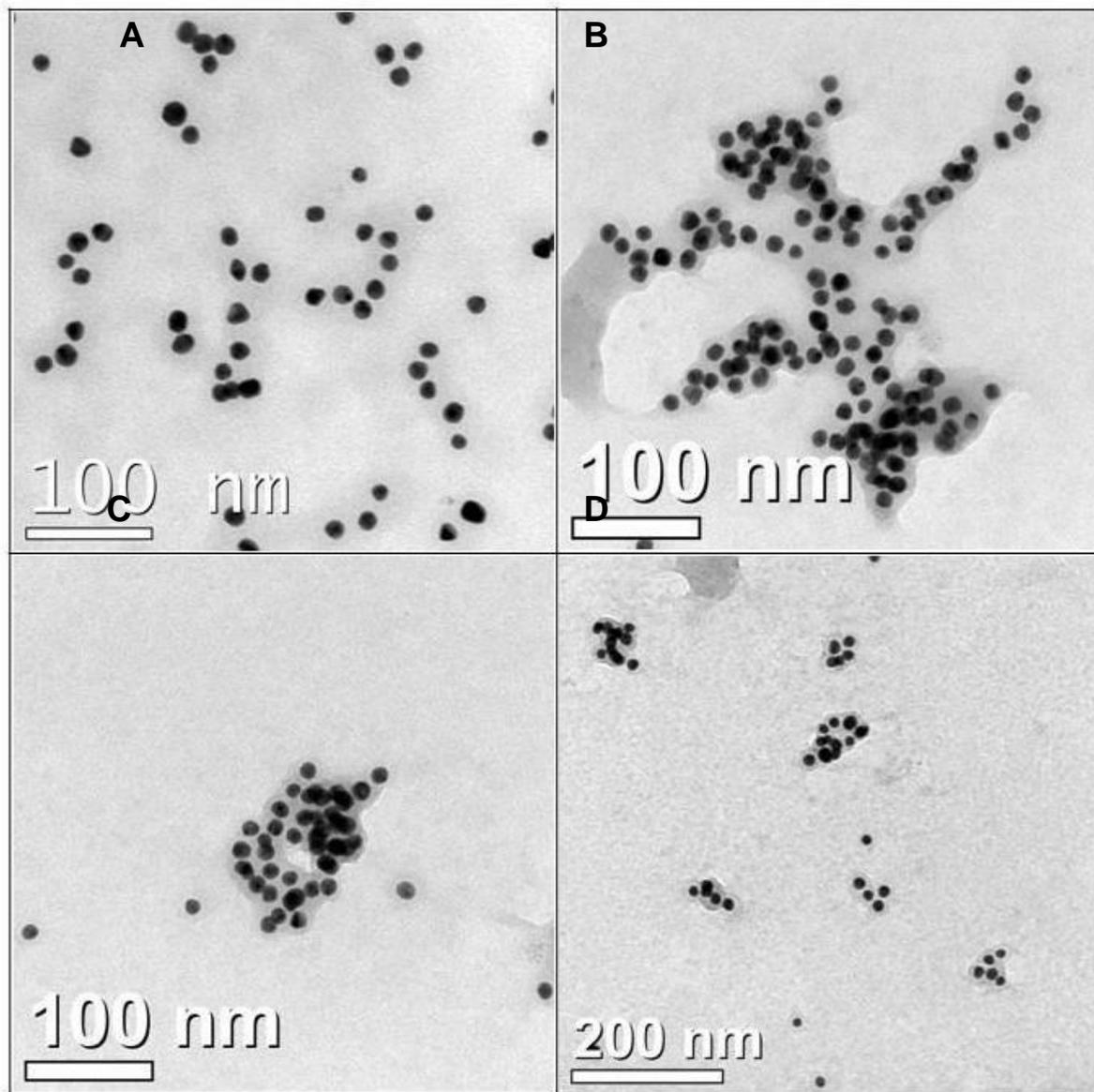


Figura 20. AuNPs sintetizadas com citrato (A) e capeadas com *Virola oleifera* da condição ótima, 0,1 mg/mL (magnificação de 500.000x) (B e C) e 200.000x, D. Abaixo imagens obtidas após contrastação do material com acetato de uranila, sendo possível observar a presença do extrato no entorno das partículas.

5.7 Espalhamento de luz dinâmico (DLS).

Por meio da correlação entre intensidade do espalhamento de luz e tamanho de partículas, o DLS fornece informações também a respeito da distribuição de tamanho das mesmas. No caso de nanopartículas capeadas, a diferença entre o diâmetro médio obtido por microscopia eletrônica de transmissão ($14 \pm 2,12$ nm) e por DLS (em torno de 100 nm) leva à confirmação da adsorção, visto as diferenças devido ao raio hidrodinâmico, como pode ser visto no gráfico da Figura 21:

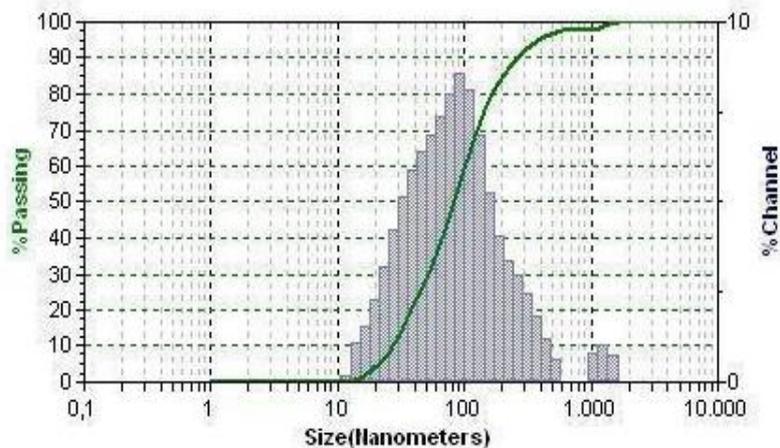


Figura 21: Gráficos de DLS para AuNPs capeadas com *Virola oleifera* (0,1 mg/mL e pH 4).

Foi observado que a maior parte das AuNPs capeadas apresentou diâmetros de cerca de 100 nm de diâmetro, com padrão de distribuição normal. A diferença entre os diâmetros observados majoritariamente para as AuNPs por microscopia eletrônica de transmissão e os obtidos por DLS se deve ao raio hidrodinâmico das partículas. Esse é um indicativo importante da adsorção dos flavonoides e demais constituintes do extrato à superfície das AuNPs (WANG *et al.*, 2007; CHAKRABORTI, 2013). Além disso, o pico adicional em torno de 1000 nm sugere a formação de pequenos agregados pela interação entre as moléculas do substrato que estariam adsorvidas à superfície das AuNPs.

Os resultados da análise de DLS para as demais condições mostrou maiores diâmetros para o pH 3, para o qual as análises de UV-visível e potencial zeta indicavam maior instabilidade coloidal e, portanto, maior tendência à agregação, conforme a Figura 22:

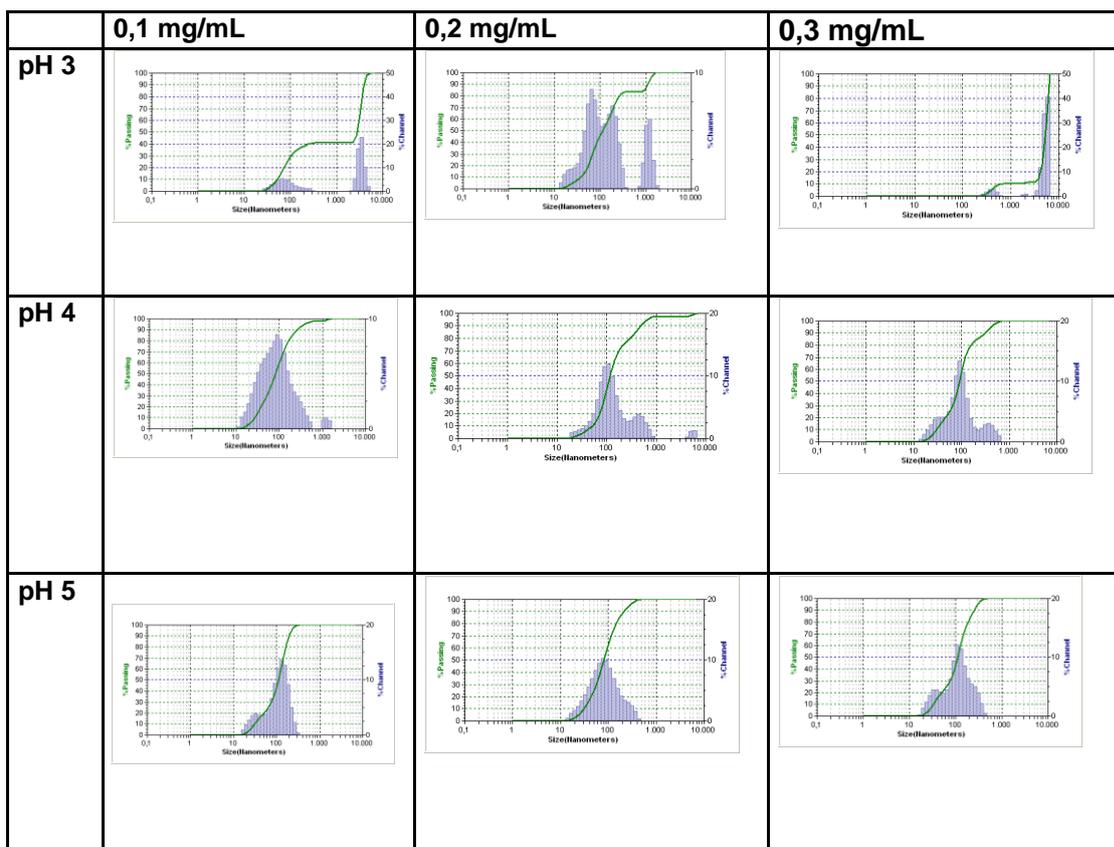


Figura 22. Gráficos de DLS para todas as condições avaliadas no planejamento fatorial.

5.8 Atividade antioxidante

Os resultados mostram intensificação da atividade antioxidante da resina de *Virola oleifera*, apresentando grande atividade a ponto de assemelhar-se ao observado pelo padrão Trolox®. A amplificação da atividade antioxidante de biomoléculas por adsorção à superfície de AuNPs foi constatada em alguns estudos (NIE *et al.*, 2007; KRISHNAIAH *et al.*, 2015). Tal fato pode estar diretamente relacionado a modificações na densidade eletrônica das moléculas pela interação, seja covalente ou eletrostática com a nanopartícula metálica (NIE *et al.*, 2007).

A Figura 23 ilustra a relação de inibição dos radicais por concentração de nanopartícula ou resina de *Virola oleifera*. Com o aumento na concentração observa-se aumento na atividade antioxidante. Após o capeamento o material vegetal apresentou aumento de sua atividade antioxidante (AA%), apresentando atividade antioxidante maior que as AuNPs não capeadas e do que o controle positivo, trolox.

Isso foi observado tanto para os ensaios de DPPH quanto para o de FRAP.

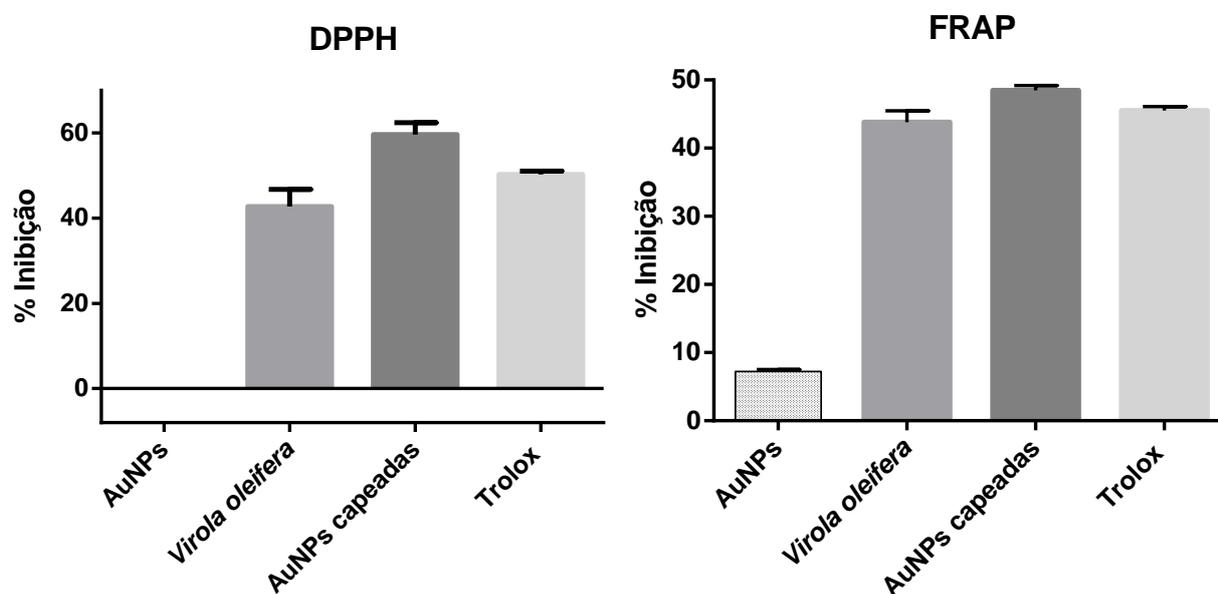


Figura 23. Atividade Antioxidante (AA%) das AuNP's sintetizadas com resina de *Virola oleifera* em comparação ao material vegetal puro. Ensaio de DPPH e FRAP.

5.9 Atividade citotóxica

Os efeitos citotóxicos das AuNPs sintetizadas com citrato e as capeadas foram comparados por meio de um ensaio de toxicidade *in vitro*, utilizando a linhagem celular manner: J774A.1 (ATCC® TIB-67TM). Essa linhagem de células é proveniente de sarcoma de camundongo, sendo de macrófagos de fêmeas.

Após incubação por 48 h, observou-se que, apesar da baixa toxicidade de ambas, as AuNPs capeadas mostraram uma maior toxicidade sobre as células utilizadas, como mostra o gráfico da figura 24, que mostra essa tendência. Visto que tais células são originadas de sarcoma de camundongos, e que a atividade antioxidante das AuNPs capeadas se apresentou consideravelmente maior que a das AuNPs não capeadas, pode-se esperar uma possível atividade anticancerígena das AuNPs capeadas e atribuir tal atividade à sua maior atividade antioxidante, conforme a figura 23.

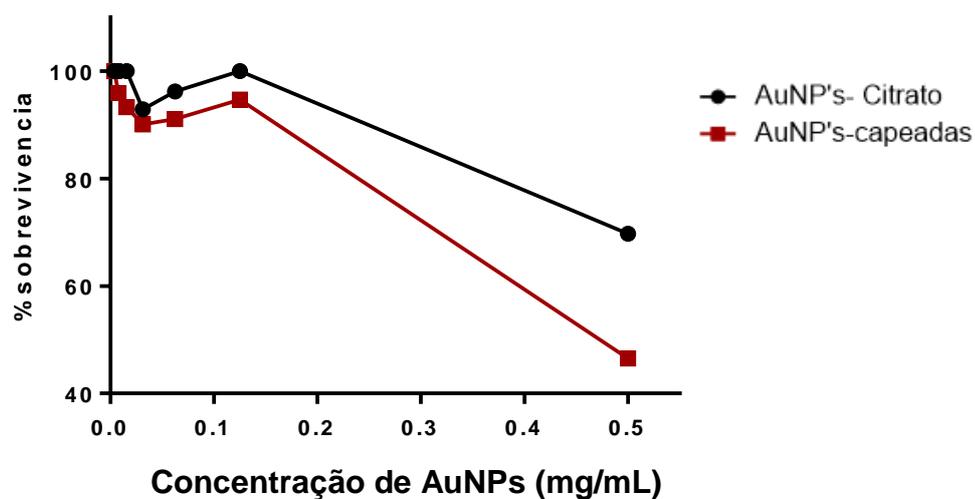


Figura 24. Comparação entre os resultados do ensaio de citotoxicidade para as AuNPs capeadas e não-capeadas com *Virola oleífera*.

O aumento da toxicidade pode ser devido a densidade de carga superficial positiva das AuNPs capeadas, pois conforme alguns estudos sugerem, a densidade de carga positiva favorece a internalização das partículas pelas células (TATUR *et al.*, 2013; PAN *et al.*, 2007).

6 CONCLUSÃO

A formulação otimizada de AuNPs capeadas com *Virola oleifera* obtida pelo planejamento fatorial 3^2 apresentou partículas monodispersas e com relativa estabilidade, comprovada por potencial zeta. Além disso, foi possível comprovar a adsorção do extrato de *Virola* à superfície das AuNPs por meio das imagens de microscopia eletrônica de transmissão bem como pelas bandas características encontradas nos espectros de infravermelho (FTIR) e Raman. Outro dado importante para confirmação da adsorção foi o deslocamento de banda no espectro de absorção em relação ao controle, AuNPs sintetizadas com citrato de sódio. As nanopartículas de ouro sintetizadas com citrato apresentaram uniformidade de tamanho e forma, com esfericidade comprovada pelo cálculo da razão de aspecto, de 0,9369. O planejamento fatorial permitiu determinar a condição que apresentou maior concentração de partículas, sendo obtida com concentração final de 0,1 mg/mL de *Virola oleifera*, e pH 4. O planejamento fatorial revelou que o pH foi um parâmetro que influenciou no capeamento das AuNPs, enquanto que o aumento da concentração de *Virola* não provocou nenhuma alteração. O resultado dos ensaios para verificação da atividade antioxidante mostrou um aumento expressivo desta propriedade com o capeamento das AuNPs. Além disso, o ensaio de atividade citotóxica mostrou baixa toxicidade das AuNPs capeadas.

7 PERSPECTIVAS

- Estudos de capeamento de AuNPs com constituintes isolados do extrato de *Virola oleífera*.
- Verificação da natureza das interações existentes entre moléculas isoladas e as de citrato desprotonadas na superfície das AuNPs e realização de estudos teóricos de tais interações.
- Estudo da cinética de adsorção das moléculas à superfície das AuNPs, considerando a influência da temperatura nesse processo.
- Estudo completo da toxicidade das AuNPs capeadas com realização de novos ensaios de citotoxicidade, além de verificação da mesma frente a outras linhagens de células.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNIHOTRI, Sagar M. *et al.* Electrophoretic mobility of colloidal gold particles in electrolyte solutions. **Langmuir**, v. 25, n. 8, p. 4804-4807, 2009.
- AHMAD, A.; SENAPATI, S.; KHAN, M.I.; KUMAR, R.; SASTRY, M. Extracellular biosynthesis of monodisperse gold nanoparticles by a novel extremophilic actinomycete, *Thermomonospora* sp. **Langmuir** 2003, 19, 3550–3553.
- AHMAD, A.; SENAPATI, S.; KHAN, M.I.; KUMAR, R.; SASTRY, M. Extra-/intracellular, biosynthesis of gold nanoparticles by an alkalotolerant fungus, *Trichothecium* sp. **J. Biomed. Nanotechnol.** 2005, 1, 47–53.
- AHMAD, A.; SENAPATI, S.; KHAN, M.I.; KUMAR, R.; RAMANI, R.; SRINIVAS, V.; SASTRY, M. Intracellular synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycete *Rhodococcus* species. **Nanotechnology** 2003, 14, 824–828.
- AHMAD, N.; SHARMA, S. Green synthesis of silver nanoparticles using extracts of *Ananas comosus*. **Gr. Sustain. Chem.** 2012, 2, 141–147.
- AI, J.; BIAZAR, E.; JAFARPOUR, M.; MONTAZERI, M.; MAJDI, A.; AMINIFARD, S.; ZAFARI, M.; AKBARI, H.R.; RAD, H.G. Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. *Int. J. Nanomed.* 2011, 6, 1117–1127.
- ALIVISATOS, A.P. *Journal of Physical Chemistry*, vol. 100, p. 13226 (1996).
- ALMEIDA DE MATOS, R. *et al.* Green synthesis of stable silver nanoparticles using *Euphorbia milli* latex. **Colloids Surf. A. Physicochem. Eng. Aspects** 2011, 38, 134–137
- AKHTAR, M.S.; PANWAR, J.; YUN, Y.S. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. **ACS Sustain. Chem. Eng.** 2013, 1, 591–602.
- ALEXANDRIDIS, P. Gold nanoparticle synthesis, morphology control, and stabilization by functional polymers. **Chem. Eng. Technol.** 2011, 14, 15–38.
- ALEXANDRIDIS, P. Gold nanoparticle synthesis, morphology control, and stabilization facilitated by functional polymers. **Chemical Engineering & Technology**, vol. 34, no. 1, pp. 15–28, 2011.
- ANKER, J.N.; HALL, P.; LYANDRES, O.; SHAH, N.C.; ZHAO, J.; VAN DUYNE, R.P. Biosensing with plasmonic nanosensors. **Nature Materials**, 2008, v.7, 442.
- AO, Y.; XU, J.; FU, D.; YUAN, C. Preparation of Ag-doped mesoporous titania and its enhanced photocatalytic activity under UV light irradiation. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, 69, 2660 – 2664, 2008.
- ARRUEBO M, FERNÁNDEZ-PACHECO R, IBARRA, MR, SANTAMARÍA J: Magnetic nanoparticles for drug delivery. **Nano Today**. 2007, 2, 22.
- ASHA-RANI, P.V.; MUN, G.L.K.; HANDE, M.P.; VALIYAVEETIL, S. Cytotoxicity and

genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. **ACS Nano** 2009, 3, 279–290.

ATKINS, P., **Físico-química**; 8ª edição, Vol. 2; Editora LTC: São Paulo, 2008.

AYAZ AHMED, K. B. *et al.* Preparation of gold nanoparticles using *Salicornia brachiata* plant extract and evaluation of catalytic and antibacterial activity. **Spectrochimica Acta – Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 130, p. 54-58, 2014.

BALASUBRAMANI, G., RAMKUMAR, R., KRISHNAVENI, N., *et al.*, “Structural characterization, antioxidant and anticancer properties of gold nanoparticles synthesized from leaf extract (decoction) of *Antigonon leptopus* Hook. & Arn,” **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, vol. 30, pp. 83–89, 2015.

BAR H.; BHUI, D.K.; SAHOO, G.P.; SARKAR, P.; DE SANKAR, P.; MISRA, A. Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*. **Colloids Surf. A** 2009, 339, 134–139.

BARATA, L.E.S.; BAKER, P.M.; GOTTIEB, O.R.; RÚVEDA, E.A., 1978. **Phytochemistry**. 17(4), 783-786.

BARATHMANIKANTH, S., KALISHWARALAL, K., SRIRAM, M. *et al.*, “Antioxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice,” **Journal of Nanobiotechnology**, vol.8, article 16, 15 pages, 2010.

BARROS, H.R. Aplicação de goma arábica na estabilização e no controle de tamanho de nanopartículas de ouro em meio aquoso. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2014.

BEGUM NA1, MONDAL S, BASU S, LASKAR RA, MANDAL D. Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts. **Colloids**. Jun 1; 71(1):113-8, 2009.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**. v.239, p.70-76, 1996.

BHATTACHARYA, R.; MURKHERJEE, P. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 2008, 60, 1284–130.

BIGGS, S.; MULVANEY, P.; ZUKOSKI, C. F.; GRIESER, F. Study of Anion Adsorption at the Gold-Aqueous Solution Interface by Atomic Force Microscopy. **J. Am. Chem. Soc.** 1994, 116

BINDHU, M. R.; UMADEVI, M. Antibacterial activities of green synthesized gold nanoparticles. **Materials Letters**, v. 120, p. 122–125, 2014.

BRAYNER, R.; FERRARI-ILIOU, R.; BRIVOIS, N.; DJEDIAT, S.; BENEDETTI, M.; FIÉVET, F. Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. **Nano Lett.** 2006, 6, 866–870.

CHANG WS¹, SWANGLAP P, SOBHANI H, KHATUA S, NORDLANDER P, HALAS

NJ, LINK S *Nano Lett.* A Lassiter JB plasmonic Fano switch. 2012, 12(9):4977-82.

CHEN, W.; CAI, W.; ZHANG, L.; WANG, G.; ZHANG, L. Sonochemical processes and formation of gold nanoparticles within pores of mesoporous silica. **J. Colloid Interface Sci.** 2001, 238, 291–295.

CHEN, Z.H.; JIE, J.S.; LUO, L.B.; WANG, H.; LEE, C.S.; LEE, S.T. Applications of silicon nanowires functionalized with palladium nanoparticles in hydrogen sensors. **Nanotechnology** 2007, 18, 1–5.

COCCIA, F.; TONUCCI, L.; BOSCO, D.; BRESSAN, M.; d'Alessandro, N. One pot synthesis of lignin-stabilized platinum and palladium nanoparticles and their catalytic behaviours in oxidation and reduction reactions. **Green Chem.** 2012, 14, 1073–1078.

CONNOR, E.E., MWAMUKA, J., GOLE, A., MURPHY, C.J., WYATT, M.D., **Small** 2005, 1, 325.

COURCHESNE, N.M.D.; KLUG, M.; CHEN, P.Y.; KOOI, S.E.; YUN, D.S.; HONG, N.; FANG, N.X.; BELCHER, A.M. Assembly of a bacteriophage-based template for the organization of materials into nanoporous networks. **Adv. Mater.** 2014, 26, 3398–3404.

DAHL, J.A., MADDUX, B.L.S, HUTCHISON, J.E. Toward greener nanosynthesis. **Chem Rev.** 2007, 107, pp. 2228–2269.

DAMERON, C.T.; REESER, R.N.; MEHRA, R.K.; KORTAN, A.R.; CARROLL, P.J.; STEIGERWALD, M.L.; BRUS, L.E.; WINGE, D.R. Biosynthesis of cadmium sulphide quantum semiconductor crystallites. **Nature** 1989, 338, 596–597.

DANIEL, M.C.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. **J. Chem. Rev.** 2004, 104, 293–346.

DHILLON, G.S., BRAR, S.K, KAUR, S., VERMA, M Green approach for nanoparticle biosynthesis by fungi: current trends and applications **Crit Rev Biotechnol.** 2012, 32 pp. 49–73.

DIMMELER, Stefanie *et al.* Translational strategies and challenges in regenerative medicine. **Nature medicine**, v. 20, n. 8, p. 814-821, 2014.

DWIVEDI, A.D, GOPAL K. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract. **Colloids Surf A**, 369 (2010), pp. 27–33

DU, M. *et al.* Ionic liquid-enhanced immobilization of biosynthesized Au nanoparticles on TS-1 toward efficient catalysts for propylene epoxidation. **J. Catal.** 2011, 283, 192–201.

DUBEY, S.P.; Lahtinen, M.; Sillanpaa, M. Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles. **Process Biochem.** 2010, 45, 1065–1071.

DURÁN, N.; SEABRA, A.B. Nanotoxicology of Metal Oxide Nanoparticles. **Metals** 2015, 5, 934-975.

DURÁN, N.; SEABRA, A.B. Metallic oxide nanoparticles: State of the art in biogenic syntheses and their mechanisms. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 2012, 95, 275–288.

DUTTA, P., PAL, M. SEEHRA, M. ANAND, M., ROBERTS, C. **Appl. Phys. Lett.** 90 (2007) 213102.

EUSTIS, S.; HSU, H.Y.; EL-SAYED, M.A. Gold nanoparticle formation from photochemical reduction of Au³⁺ by continuous excitation in colloidal solutions: A proposed molecular mechanism. **J. Phys. Chem. B** 2005, 109, 4811–4815.

EUSTIS, Susie; EL-SAYED, Mostafa A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 3, p. 209-217, 2006.

EL-SAYED IH1, HUANG X, EL-SAYED MA. Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. **Cancer Lett.** 2006 Jul 28; 239(1):129-35.

FAN, X.; ZHENG, W.; SINGH, D. J.; **Light: Sci Appl.** 2014, 3, 179

FANG, D.; HUANG, K.; LIU, S.; LI, Z. Electrochemical properties of ordered TiO₂ nanotube loaded with Ag nanoparticles for lithium anode material. **Journal of Alloys and Compounds**, 464, L5 – L9, 2008.

FRANK ALEXIS, ERIC PRIDGEN, LINDA K. MOLNAR, AND OMID C. FAROKHZAD. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles *Mol Pharm.* 2008 Aug 4; 5(4): 505–515.

FRATTINI, A.; PELLEGGRI, N.; NICASTRO, D.; DE SANCTIS, O. Effect of amine groups in the synthesis of Ag nanoparticles using aminosilanes. **Mater. Chem. Phys.** 2005, 94, 148–152.

GREENBERG, J. M.; WANG, R. T.; BANGS, L.; **Nature Phys. Sci.** 1971, 230, 110.

GHOSH, S. K.; PAL, T.; **Chem. Rev.** 2007, 107, 4797.

GIOVANNOZZI, A.M.; ROLLE, F.; SEGA, M.; ABETE, M.C.; MARCHIS, D.; ROSSI, A.M. Rapid and sensitive detection of melamine in milk with gold nanoparticles by Surface Enhanced Raman scattering. **Food Chemistry.** 2014, 159, 250.

GOODSELL, D.S. Bionanomedicine in action. In **Bionanotechnology: Lessons from Nature**; John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2004

GOPIDAS, K.R.; WHITESELL, J.K.; FOX, M.A. Synthesis, characterization and catalytic activity of a palladium nanoparticle cored dendrimer. **Nano Lett.** 2003, 3, 1757–1760.

GRACE NA, PADIAM K., Antibacterial efficacy of aminoglycosidic antibiotics protected gold nanoparticles—A brief study: **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.** 2007, 297: 63–70.

HAISS, W., THANH, N.T.K., AVEYARD, J., FERERNI, D.G. Determination of size

and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra **Anal. Chem.** 2007, 79 pp. 4215–422.

HAN G, WU S, WANG J, GENG X, LIU G. Poly-L-Lysine Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles and Biological Effects. **J Nanosci Nanotechnol.** 2015 Sep; 15(9):6503-8

HAN G1, GHOSH P, ROTELLO VM. Functionalized gold nanoparticles for drug delivery. **Nanomedicine** (Lond). 2007 Feb; 2(1):113-23.

HE, F., LIU, J., ROBERTS, C.B. AND ZHAO, D., “One-step ‘green’ synthesis of Pd nanoparticles of controlled size and their catalytic activity for trichloroethene hydrodechlorination,” **Industrial and Engineering Chemistry Research**, vol. 48, no. 14, pp. 6550–6557, 2009.

A G. HAN, P. GHOSH, M. DE, V. M. ROTELLO. Drug and gene delivery using gold nanoparticles. **NanoBiotechnology** March 2007, Volume 3, Issue 1, pp 40–45

HONG, H.; ZHANG, Y.; SUN, J.; CAI, W. Molecular imaging and therapy of cancer with radiolabeled nanoparticles. **Nano Today.** 2009, V4, 399.

HÖVEL, H.; FRITZ, S.; HILGER, A.; KREIBIG, U.; Vollmer, M.; **Phys. Rev. B** 1993, 48, 18178

HRAPOVIC, S.; LIU, Y.; MALE, K.B.; LUONG, J.H.T. Electrochemical biosensing platform using platinum nanoparticles and carbon nanotubes. **Anal. Chem.** 2004, 76, 1083–1088.

HUANG, J. *et al.* Biogenic silver nanoparticles by *Cacumen Platycladi* extract: synthesis, formation mechanism, and antibacterial activity. **Eng. Chem. Res.** 2011, 50, 9095–9106

HUANG, J.; LI, Q.; SUN, D.; LU, Y.; SU, Y.; YANG, X.; WANG, H.; WANG, Y.; SHAO, W.; HE, N.; *et al.* Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. **Nanotechnology** 2007, 18, 1–11.

HUANG, C., BONROY, K., REEKMAN, G., VERSTREKEN, K., LAGAE, L., BORGHS, G. An On-Chip Localized Surface Plasmon Resonance-Based Biosensor for label-free Monitoring of Antigen-Antibody Reaction. **Microelectronic Engineering.** 2009, 86, 2437-2441.

HUSSEINY, M.I.; EL-AZIZ, M.A.; BADR, Y.; MAHMOUD, M.A. Biosynthesis of gold nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa*. **Spectrochim. Acta A** 2007, 67, 1003–1006.

INGALE, A.G.; CHAUDHARI, A.N. Biogenic synthesis of nanoparticles and potential applications: An eco-friendly approach. **J. Nanomed. Nanotechnol.** 2013, 4, 1–7.

IRAVANI, S. “Green synthesis of metal nanoparticles using plants,” **Green Chemistry**, vol. 13, no. 10, pp. 2638–2650, 2011.

JADZINSKY PD1, CALERO G, ACKERSON CJ, BUSHNELL DA, KORNBERG RD.

Structure of a thiol monolayer-protected gold nanoparticle at 1.1 Å resolution. *Science* 2007 Oct 19; 318(5849):430-3.

JAIN, N.; BHARGAVA, A.; MAJUMDAR, S.; PANWAR, J. Extracellular biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Aspergillus flavus* NJP08: A mechanism prospective. **Nanoscale** 2011, 3, 635–641.

JANARDHANANAN, S.K.; NARAYAN, S.; ABBINENI, G.; HAYHURST, A.; MAO, C. Architectonics of phage-liposome nanowebs as optimized photosensitizer vehicles for photodynamic cancer therapy. **Mol. Cancer Ther.** 2010, 9, 2524–2535.

JHA, A.K.; PRASAD, K.; KULKARNI, A.R. Plant system: Nature's nanofactory. **Colloids Surf. B** 2009, 73, 219–223.

JI, X.; SONG, X.; LI, J.; BAI, Y.; YANG, W.; PENG, X. Size Control of Gold Nanocrystals in Citrate Reduction: The Third Role of Citrate. **J. Am. Chem. Soc.** 2007, 129, 13939–13948.

JOERGER, T.K.; JOERGER, R.; OLSSON, E.; GRANQVIST, C.G. Bacteria as workers in the living factor: Metal accumulating bacteria and their potential for materials science. **Trends Biotechnol.** 2001, 19, 15–20.

KALAIARASI, R. *et al.* Phytosynthesis of nanoparticles and its applications. **Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol.** 2010, 11, 1–16

KALE, A.; BAO, Y.; ZHOU, Z.; PREVELIGE, P.E.; GUPTA, A. Directed self-assembly of CdS quantum dots on bacteriophage P22 coat protein templates. **Nanotechnology** 2013, 24, 045603.

KHARISSOVA, O.V.; DIAS, H.V.R.; KHARISOV, B.I.; PÉREZ, B.O.; PÉREZ, V.M.J. The greener synthesis of nanoparticles, **Trends in Biotechnology**, vol. 31, no. 4, pp. 240–248, 2013.

KIMLING, M.J., Maier, OKENVE, B., KOTAIDIS, V., BALLOT, A.H. Plech Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited **J. Phys. Chem. B.** 2006, 110, pp. 15700–15707

KONYA, K.; VARGAS, Zs.; ANTUS, S., 2001. **Phytomedicine.** 8(6), 454-459.

KORBKANDI, H., IRAVANI, S., ABBASI, S. Production of nanoparticles using organisms **Crit Rev Biotechnol**, 2009, 29, pp. 279–306

KOLWAS, K; DERKACHOVA, A.; SHOPA, M.; **J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer.** 2009, 110, 1490.

KOWSHIK, M.; ARHTAPUTRE, S.; KHARRAZI, S.; VOGEL, W.; URBAN, J.; KULKARNI, S.K.; PAKNIKAR, K.M. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3. **Nanotechnology** 2003, 14, 95–100.

KREIBIG, U.; BOUR, G.; HILGER, A.; GARTZ, M.; **Phys. Status Solidi A** 1999, 175, 351

KUMAR, A.; MANDAL, S.; SELVAKANNAN, P.R.; PARISCHA, R.; MANDALE, A.B.; SASTRY, M. Investigation into the interaction between surface-bound alkylamines and gold nanoparticles. **Langmuir** 2003, 19, 6277–6282.

KULKARNI, N.; MUDDAPUR, U. Biosynthesis of metal nanoparticles: A review. **J. Nanotechnol.** 2014, 2014, 510246.

KUMAR, P.; SINGH, P.; KUMARI, K.; MOZUMDAR, S.; CHANDRA, R. A green approach for the synthesis of gold nanotriangles using aqueous leaf extract of *Callistemon viminalis*. **Mater. Lett.** 2011, 65, 595–597.

LEE, H.J.; LEE, G.; JANG, N.R.; YUN, J.H.; SONG, J.Y.; KIM, B.S. Biological synthesis of copper nanoparticles using plants extract. **Nanotechnology** 2011, 1, 371–374.

LEE, S.W.; MAO, C.; FLYNN, C.; BELCHER, A.M. Ordering of quantum dots using genetically engineered viruses. **Science** 2002, 296, 892–895.

LEU, J. G., CHEN, S.A., CHEN, H. M. *et al.*, “The effects of gold nanoparticles in wound healing with antioxidant epigallocatechin gallate and alpha-lipoic acid,” **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, vol. 8, no. 5, pp. 767–775, 2012.

LI, Q.; MAHMOOD, N.; ZHU, J.; HOU, Y.; SUN, S. Graphene and its composites with nanoparticles for electrochemical energy applications. **Nano Today**. 2014, v.9, 668.

LI, W. *et al.* Gold Nanoparticle–Mediated Targeted Delivery of Recombinant Human Endostatin Normalizes Tumour Vasculature and Improves Cancer Therapy. **Scientific Report**. 2016.

LINK, S.; EL-SAYED, M. A.; **Int. Rev. Phys. Chem.** 2000, 19, 409.

LOCK, J. A.; GOUESBET, G.; **J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer.** 2009, 110, 800.

MAFUNE, F.; KOHNO, J.; TAKEDA, Y.; KONDOW, T.J. Dissociation and aggregation of gold nanoparticles under laser irradiation. **J. Phys. Chem. B** 2001, 105, 9050–9056.

MAHMOUDI, M.; LYNCH, I.; EJTEHADI, M. R.; MONOPOLI, M. P.; BOMBELLI, F. B.; LAURENT, S. Protein-nanoparticles interactions: opportunities and challenges. **Chemical Reviews**, v.111, n.9, p.5610-5637, 2011.

MARTINEZ, J.C., CHEQUER, N.A., GINZALÉZ, J.L., CORDOVA, T. Alternative methodology for gold nanoparticles diameter characterization using PCA technique and UV–VIS spectrophotometry **J. Nanosci. Nanotechnol.** 2012, 2, pp. 184–189

MEDINA-RAMIREZ, I. M.; GARCIA, M. G.; LIU, J. L. Nanostructure characterization of polymer stabilized gold nanoparticles and nanofilms derived from green synthesis. **Journal of Material Science**, 44, 6325–6332, 2009.

MERZLYAK, A.; LEE, S.W. Phage as template for hybrid materials and mediators for nanomaterials synthesis. **Curr. Opin. Chem. Biol.** 2006, 10, 246–252.

MIE G., **Ann. Phys.**, 1908, 25, 377.

MIESZAWSKA, ANETA J.; MULDER, WILLEM J.M.; FAYAD, ZAHY A.; AND DAVID P. CORMODE, DAVID P. Multifunctional Gold Nanoparticles for Diagnosis and Therapy of Disease. **Mol. Pharmaceutics**, 2013, 10 (3), pp 831–847.

MIKAMI, YUSUKE; DHAKSHINAMOORTHY, AMARAJOTHI; ALVARO, MERCEDES; GARCÍA, HERMENEGILDO. Catalytic activity of unsupported gold nanoparticles. **Catal. Sci. Technol.**, 2013, 3, 58.

MILANEZE B, KEIJOK W, OLIVEIRA J, PERUCH B, BARTOCHEVIS J, LIQUI L, *et al.* **BMC Proceedings** 2014; 8 (Suppl 4):P29. doi: 10.1186/1753-6561-8-s4-p29.

MOHANPURIA, P.; RANA, N.K.; YADAV, S.K. Biosynthesis of nanoparticles: Technological concepts and future applications. **J. Nanopart. Res.** 2008, 10, 507–517. .

MUKHERJEE, P.; AHMAD, A.; MANDAL, D.; SENAPATI, S.; SAINKAR, S.R.; KHAN, M.I.; PARISHCHA, R.; AIYUMAR, P.V.; ALAM, M.; KUMAR, R.; *et al.* Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelia matrix: A novel biological approach to nanoparticles synthesis. **Nano Lett.** 2001, 1, 515–519.

MULLIN, J. W. In Crystallization; MULLIN, J. W., Ed.; ButterworthHeinemann: Boston, 1997.

MURRAY, C.; NORRIS, D; BAWENDI, M.G. **J. Am. Chem. Soc.** 1993, 115, 8706–8715

NADAGOUDA, M. N.; VARMA, R. S. Green synthesis of silver and palladium nanoparticles at room temperature using coffee and tea extract. **Green Chem.** 2008, 10, 859–862.

N. NADAGOUDA, NIDHI IYANNA, JACOB LALLEY, CHANGSEOK HAN, DIONYSIOS D. DIONYSIOU, AND RAJENDER S. VARMA. Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles Using Antioxidants from Blackberry, Blueberry, Pomegranate, and Turmeric Extracts Mallikarjuna **ACS Sustainable Chem. Eng.** 2014, 2, 1717–1723

NARAYANAN, K.B.; SAKTHIVEL, N. PHYTOSYNTHESIS of gold nanoparticles using leaf extract of *Coleus amboinicus* Lour. **Mater. Character.** 2010, 61, 1232–1238.

NGWENIFORM, P.; ABBINENI, G.; CAO, B.; MAO, C. Self-assembly of drug-loaded liposomes on genetically engineered target-recognizing M13 phage: A novel nanocarrier for targeted drug delivery. **Small** 2009, 5, 1963–1969.

NGWENIFORM, P.; LI, D.; MAO, C. Self-assembly of drug-loaded liposomes on genetically engineered protein nanotubes: A potential anti-cancer drug delivery vector. **Soft Matter** 2009, 5, 954–956.

NJAGI, E.C.; HUANG, H.; STAFFORD, L.; GENUINO, H.; GALINDO, H.M.; COLLINS, J.B. Biosynthesis of iron and silver nanoparticles at room temperature using aqueous sorghum bran extracts. **Langmuir** 2011, 27, 264–271.

OLSON, J.; DOMINGUEZ-MEDINA, S.; HOGGARD, A.; WANG, L. Y.; CHANG, W. S.; LINK, S.; **Chem. Soc. Rev.** 2015, 44, 40.

ORENDORFF, C.J.; GOLE, A.; SAU, T.K.; MURPHY, C.J. "Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Self-Assembled Monolayers: Sandwich Architecture and Nanoparticle Shape Dependence". **Analytical Chemistry**, 77, 3261-3266, 2005.

PAL, R., CHAKRABORTI, A.S., **AIP Conf. Proc.** 2010, 1276, 283–287.

PANKHURST, Q.A.; CONNOLLY, J.; JONES, S.K.; DOBSON, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **J. Phys. D Appl. Phys.** 2003, 36, R167–R181.

PARK, Y., HONG, Y.N., WEYERS, A., KIM, Y.S. AND R. J. LINHARDT, Polysaccharides and phytochemicals: a natural reservoir for the green synthesis of gold and silver nanoparticles, **IET Nanobiotechnology**, vol. 5, no. 3, pp. 69–78, 2011.

PARSONS, J.G. *et al.* Use of plants in biotechnology: synthesis of metal nanoparticles by inactivated plant tissues, plant extracts, and living plants. **Dev. Environ. Sci.** 2007, 5, 463–485

PATTY, F. **Industrial Hygiene and Toxicology: Volume II: Toxicology.** 2nd Ed. New York: Interscience Publishers, 1963, p. 1839.

Penders, J. *et al.* Shape-dependent antibacterial effects of noncytotoxic gold nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine** v.12 2457–2468, 2017.

PEREZ, J.; BAX, L.; ESCOLANO, C. **Roadmap Report on Nanoparticles**; Willems & Van Den Wildenberg: Barcelona, Spain, 2005.

PHILIP, D. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus rosa sinensis*. **Phys. E** 2010, 42, 1417–1424.

PRABAHARAN, MANI; GRAILER, JAMISON J.; PILLA, SRIKANTH; DOUGLAS A. STEEBER, DOUGLAS A., GONG, SHAOQIN. Gold nanoparticles with a monolayer of doxorubicin-conjugated amphiphilic block copolymer for tumor-targeted drug delivery. **Biomaterials** 2009, 30, 6065–6075.

PRASAD, K.S.; PATEL, H.; PATEL, T.; PATEL, K.; SELVARAJ, K. Biosynthesis of Se nanoparticles and its effect on UV-induced DNA damage. **Colloids Surf. B Biointerfaces** 2012, 103, 261–266.

PRATHNA, T.C.; CHANDRASEKARAN, N.; RAICHUR, A.M.; MUKHERJEE, A.

Kinetic evolution studies of silver nanoparticles in a bio-based green synthesis process. **Colloids Surf. A** 2011, 377, 212–216

PRIYANKA SINGH, YU-JIN KIM, DABING ZHANG, AND DEOK-CHUN YANG,. Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. **Trends in Biotechnology**, July 2016, Vol. 34, No. 7.

PUNTES, V. F.; ZANCHET, D.; ERDONMEZ, C. K.; ALIVISATOS, A. P. **J. Am. Chem. Soc.** 2002, 124 (43), 12874.

PURREZA, N., GOLMOHAMMADI, H., NAGHDI, T., YOUSEFI, H. Green in-situ synthesized silver nanoparticles embedded in bacterial cellulose nanopaper as a bionanocomposite plasmonic sensor, **Biosens. Bioelectron.** 2015, 74, 353–359.

RAI, M.; KON, K.; INGLE, A.; DURÁN, N.; GALDIERO, S.; GALDIERO M. Broad-spectrum Bioactivities of Silver Nanoparticles: The emerging trends and future prospects. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 2014, 98, 1951–1961.

RAI, M.; BIRLA, S.; GUPTA, I.; INGLE, A.; GADE, A.; ABD-ELSALAM, K.; MARCATO, P.D.; DURÁN, N. Diversity in synthesis and bioactivity of inorganic nanoparticles: Progress and pitfalls. **Nanotechnol. Rev.** 2014, 3, 281–309

RANGEL, Renato N. Colóides: um estudo introdutório. LCTE Editora: São Paulo, 2006.

RAVEENDRAN, P., FU, J. AND WALLEN, S.L. Completely 'green' synthesis and stabilization of metal nanoparticles, **Journal of the American Chemical Society**, vol. 125, no. 46, pp. 13940–13941, 2003.

RAZZAQ H, SAIRA F, YAQUB A, QURESHI R, MUMTAZ M, SALEEMI S. Interaction of gold nanoparticles with free radicals and their role in enhancing the scavenging activity of ascorbic acid. **J. Photochem Photobiol B.** 2016, 161: 266-72.

ROBINSON, I.; ZACCHINI, S.; TUNG, L. D.; MAENOSONO, S.; THANH, N. T. K. **Chem. Mater.** 2009, 21 (13), 3021.

RODRÍGUEZ-SANCHEZ, L.; BLANCO, M.C.; LOPEZ-QUINTELA, M.A. Electrochemical synthesis of silver nanoparticles. **J. Phys. Chem. B** 2002, 104, 9683–9688.

ROITT, Ivan M. Fundamentos de Imunologia - 12ª Ed. 2013. **Guanabara Koogan.**

ROY N, MONDAL S, LASKAR RA, BASU S, MANDAL D, BEGUM NA. Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles by Indian propolis and its constituents. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces.** 2010, 76(1):317-325.

ROY, N., GAUR, A., JAIN, A., BHATTACHARYA, S., AND RANI, V. Green synthesis of silver nanoparticles: an approach to overcome toxicity, **Environmental Toxicology and Pharmacology**, vol. 36, no. 3, pp. 807–812, 2013.

RUBILAR, O.; RAI, M.; TORTELLA, G.; DIEZ, M.C.; SEABRA, A.B.; DURÁN, N. Biogenic nanoparticles: Copper, copper oxides, copper sulfides, complex copper

nanostructures and their applications. **Biotechnol. Lett.** 2013, 35, 1365–1375.

RUGE O., C.; CUCA S., L.E.; MARTINEZ V., J.C., 1998. **Revista Colombiana Ciências Químicas Farmacêuticas.** 27, 25-29.

SANGHI, R., VERMA, P. Microbes as green and eco-friendly nanofactories. **Green Chem Environ Sustainable.** 2010, 15, pp. 315–339.

SARDAR, R., FUNSTON, A. M., MULVANEY, P. AND MURRAY, R.W. Gold nanoparticles: past, present, and future, **Langmuir**, vol. 25, no. 24, pp. 13840–13851, 2009.

SATHISHKUMAR, M.; KRISHNAMURTHY, S.; YUN, Y.S. Immobilization of silver nanoparticles synthesized using the *Curcuma longa* tuber powder extract on cotton cloth for bactericidal activity. **Biores. Technol.** 2010, 101, 7958–7965.

SHIBATA, H.; OHKUBO, T.; KOHNO, H.; RANGSUNVIGIT, P.; SAKAI, H. Preparation and photocatalytic activity of titania particulate film with mesostructure sílica as binder. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, 181, 357-362, 2006.

BSATHISHKUMAR, M.; SNEHA, K.; WON, S.W.; CHO, C.W.; KIM, S.; YUN, Y.S. Cinnamon zeylanicum bark extracted and powder mediated green synthesis of nanocrystalline silver particles and its bacterial activity. **Colloids Surf. B Biointerfaces** 2009, 73, 332–338.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry.** v. 112, p. 654-658, 2009.

SEABRA, A.B.; HADDAD, P.S.; DURAN N. Biogenic synthesis of nanostructured iron compounds: Applications and perspectives. **IET Nanobiotechnol.** 2013, 7, 90–99.

SELVAKANNAN, PR., MANDAL, Saikat, PHADTARE, Sumant, PASRICHA, Renu, SASTRY, Murali. Capping of Gold Nanoparticles by the Amino Acid Lysine Renders Them Water-Dispersible. **Langmuir**, 2003, 19 (8), pp 3545–3549

SERJEANT EP, DEMPSEY B; Ionisation constants of organic acids in aqueous solution. **IUPAC Chem Data Ser** No.23. NY, NY: Pergamon pp. 989 (1979)

SHABESTARIANA, HODA., , MASOUD HOMAYOUNI-TABRIZIB , MOZHGAN SOLTANIC , FARIDEH NAMVARD,E, SUSAN AZIZIF *, ROSFARIZAN MOHAMADD,F, HANIEH SHABESTARIANB, Synthesis of Gold Nanoparticles Using Sumac Aqueous Extract and Their Antioxidant Activity. **Materials Research.** 2017; 20(1): 264-270.

SHANKAR, S. SHIV; RAI, AKHILESH, BALAPRASAD ANKAMWAR2, AMIT SINGH1,ABSAR AHMAD3 AND MURALI SASTRY1Biological synthesis of triangular gold nanoprisms. **Nature materials** | VOL 3 | JULY 2004 – lemongrass extract

SHANKAR, S.S.; RAI, A.; AHMAD, A.; SASTRY, M. Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth.

J. Colloid Interface Sci. 2004, 275, 496–502

SHARMA, N.C. *et al.* Synthesis of plant-mediated gold nanoparticles and catalytic role of biomatrix-embedded nanomaterials. **Environ. Sci. Technol.** 2007, 41, 5137–5142

SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X; KIEMLE, David J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. In: **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. LTC, 2007.

SINGH, Priyanka; KIM, Yu-Jin; ZHANG, Dabing; YANG, Deok-Chun. Review Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms, **Trends in Biotechnology**, 2016, Vol. 34, Nº. 7.

SPARC; pKa/property server. Ver 3. Jan 2006. Available from, as of Nov 17, 2008: <http://ibmlc2.chem.uga.edu/sparc/> from HSDB

SPARC; pKa/property server. Ver 3. Jan 2006. Available from, as of Feb 14, 2008: <http://ibmlc2.chem.uga.edu/sparc/>

SPERLING, R.A.; GIL, P.R.; ZHANG, F.; ZANELLA, M.; PARAK, W.J. Biological applications of gold nanoparticles. **Chem. Soc. Rev.** 2008, 37, 1896–1908.

STAROWIICZ, M.; STYPULA, B.; BANAS, J. Electrochemical synthesis of silver nanoparticles. **Electrochem. Commun.** 2006, 8, 227–230.

SURI SS, FENNIRI H, SINGH B. Nanotechnology-based drug delivery systems. **J Occup Med Toxicol.** 2007, 2, 16.

SWAMI, A.; SELVAKANNAN, P.R.; PASRICHA, R.; SASTRY, M. One-step synthesis of ordered two-dimensional assemblies of silver nanoparticles by the spontaneous reduction of silver ions by pentadecylphenol Langmuir monolayers. **J. Phys. Chem. B** 2004, 108, 19269–19275.

TANG, S.; MAO, C.; LIU, Y.; KELLY, D.Q.; BANERJEE, S.K. Protein-mediated nanocrystal assembly for flash memory fabrication. *IEEE Trans. Electron. Devices* 2007, 54, 433–438.

TENNYNSON, L. DOANE, Chi-Hung Chuang, REGHAN, J. Hill, e CLEMENS, Burda. Nanoparticle ζ –Potentials. **Accounts of Chemical Research**, v.3, n.45, p.317-326, 2012.

THAKKAR, K.N.; MHATRE, S.S.; PARIKH, R.Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanotechnol. Biol. Med. Nanomed.** 2010, 6, 257–262.

THAN, N.T.K., MACLEAN, N., MAHIDDINE, S. Mechanisms nucleation and growth of nanoparticles in solution **Chem. Rev.** 2014, 114, pp. 7610–7630.

TORRES-CHAVOLLA, E.; RANASINGHE, R.J.; ALOCILJA, E.C. Characterization and functionalization of biogenic gold nanoparticles for biosensing enhancement.

IEEE **Trans. Nanobiotechnol.** 2010, 9, 533–538

TREGUER, M.; COINTET, C.; REMITA, H.; KHATOURI, J.; MOSTAFAVI, M.; AMBLARD, J.; BELLONI, J.J. Dose rate effect on radiolytic synthesis of gold-silver bimetallic clusters in solution. **J. Phys. Chem. B** 1998, 102, 4310–4321.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. Discuss. **Faraday Soc.** 1951, 11, 55–75.

WANG, L.; CHEN, X.; ZHAN, J.; CHAI, Y.; YANG, C.; XU, L.; ZHUANG, W.; JING, B. Synthesis of gold nano and microplates in hexagonal liquid crystals. **J. Phys. Chem. B** 2005, 109, 3189–3194.

WARE, A. J.; GODIN, B.; SINGH, N.; MAJITHIA, R.; SHAMSUDEEN, S.; SERDA, R.E.; MEISSNER, K.E.; REES, P.; SUMMERS, H.D. Analysis of the Influence of Cell Heterogeneity on Nanoparticle Dose Response. **ACS Nano**, 2014.

WEST, P.R.; ISHII, S.; NAIK, G.V.; EMANI, N.K.; SHALAEV, V.M.; BOLTASSEVA, A. Searching for better plasmonic materials. **Laser Photonics Res.** 2010, 4, 795–808.

WILCZEWSKA, A.Z.; NIEMIROWICZ, K.; MARKIEWICZ, K.H.; CAR, H. Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacological Reports.** 2012, 64, 1020.

VILCHIS-NESTOR, A.R. *et al.* Alternative bio-reduction synthesis method for the preparation of Au (AgAu)/SiO₂–Al₂O₃ catalysts: oxidation and hydrogenation of CO. **Appl. Catal. B: Environ.** 2009, 90, 64–73

XIE, J. *et al.* Identification of active biomolecules in the high-yield synthesis of single-crystalline gold nanoplates in algal solutions. **Small** 2007, 3, 672–682.

YU SH¹, CÖLFEN H, MASTAI Y. Formation and optical properties of gold nanoparticles synthesized in the presence of double-hydrophilic block copolymers. **J Nanosci Nanotechnol.** 2004 Mar; 4(3):291-8.

YU, SHU-HONG; CÖLFEN, HELMUT; MASTAIC, YITZHAK. Formation and Optical Properties of Gold Nanoparticles Synthesized in the Presence of Double-Hydrophilic Block Copolymers. **J. Nanosci. Nanotech.** 2004, Vol. 4, No. 3

YALLAPPA, S., MANJANNA, J., DHANANJAYA, B.L., VISHWANATHA, U., RAVISHANKAR, B, GURURAJ, H., Phytosynthesis of gold nanoparticles using *Mappia foetida* leaves extract and their conjugation with folic acid for delivery of doxorubicin to cancer cells, **J. Mater. Sci. Mater. Med.** 2015, 26, 235.

WANG, J., ZHOU, N., ZHU, Z., HUANG, J., LI, G., **Anal. Bioanal. Chem.** 2007, 388, 1199– 1205.

YEO, DAVID, *et al.* & quot; A Nanoparticle-based Sensor Platform for Cell Tracking and Status/Function Assessment. & quot; **Scientific reports** 5 (2015).

YOU, H.; YANG, S.; DING, B.; YANG, H. Synthesis of colloidal metal and metal alloy nanoparticles for electrochemical energy applications. **Chem. Soc. Rev.** 2013, 42,

2880–2904.

ZACCHINO, S.; RODRIGUEZ, G.; SANTECCHIA, C.; PEZZENATI, G.; GIANNINI, F.; ENRIZ, R., 1998. **Journal of Ethnopharmacology**. 62, 35-41.

ZHAN, G. *et al.* Liquid phase oxidation of benzyl alcohol to benzaldehyde with novel uncalcined bioreduction Au catalysts: high activity and durability. **Chem. Eng. J.** 2012, 187, 232–238

ZHANG, G.; WANG, D.J. Fabrication of heterogeneous binary arrays of nanoparticles via colloidal lithography. **J. Am. Chem. Soc.** 2008, 130, 5616–5617.

ZHAROV, V.P.; KIM, J.W.; CURIEL, D.T.; EVERTS, M. Self-assembling nanoclusters in living systems: Application for integrated photothermal nanodiagnostics and nanotherapy. **Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.** 2005, 1, 326–345.

ZHOU, XIAOCHUN, XU, WEILIN, LIU, GUOKUN, PANDA, DEBASHIS, CHEN, PENG. Size-Dependent Catalytic Activity and Dynamics of Gold Nanoparticles at the Single-Molecule Level. **J. Am. Chem. Soc.**, 2010, 132 (1), pp 138–146.

ZHOU, Y. *et al.* Biosynthesis of gold nanoparticles by foliar broths: roles of biocompounds and other attributes of the extracts. **Nanoscale Res. Lett.** 2010, 5, 1351–1359.

ANEXO I

Estudo da funcionalização de nanopartículas de ouro com extrato de *Virola oleifera*

Corrêa AS¹, Guimarães MCC¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES

A *Virola oleifera* é uma espécie vegetal da família *Myristicaceae* e a resina da sua casca apresenta uma série de componentes fenólicos e flavonoides que possuem elevadas propriedades antioxidantes [1]. Em razão disso, várias pesquisas tem relatado a aplicação do exsudato deste vegetal em uma série de aplicações biológicas, como atividade antimicrobiana [2], neuroprotetora, anti- Leishmania [3], antifúngica [4], antioxidante [5], etc. A utilização de extratos vegetais para a redução e funcionalização de nanopartículas metálicas tem sido vastamente explorada, embora a grande maioria dos trabalhos não trazem protocolos reprodutíveis de síntese e conjugação e as discussões acerca das etapas de funcionalização são na maioria das vezes pouco exploradas. O objetivo deste trabalho foi determinar as condições ótimas de conjugação do extrato de *Virola oleifera* com nanopartículas de ouro sintetizadas pelo método de redução química tradicional com o citrato. Para determinação dessas condições ótimas foi realizada uma curva padrão da resina de *Virola oleifera* a partir dos valores de absorvância em 280 nm. Em seguida, os ensaios de funcionalização foram realizados variando as condições experimentais (tempo, concentração e pH) em função da quantidade remanescente de *Virola oleifera* avaliada pelo decaimento da absorção óptica na região do ultravioleta (280nm) no sobrenadante após a centrifugação (14000 rpm, 10 min). Os resultados apontaram que os componentes químicos do extrato de *Virola oleifera* foram adsorvidos na superfície do metal e as condições ótimas experimentais para esta funcionalização foram no tempo de 5 min, concentração de 0,2 mg.mL⁻¹ e pH 3. As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão confirmaram a presença do extrato vegetal na superfície metálica e indicaram um certo guiamento das nanopartículas de ouro. Este fato pode estar relacionado a presença de ligações covalentes entre grupos químicos dos componentes do extrato e à superfície metálica. O presente trabalho apresenta-se como uma fonte potencial de informações para funcionalização de nanomateriais metálicos utilizando extratos vegetais, possibilitando o emprego para várias aplicações em sistemas biológicos.

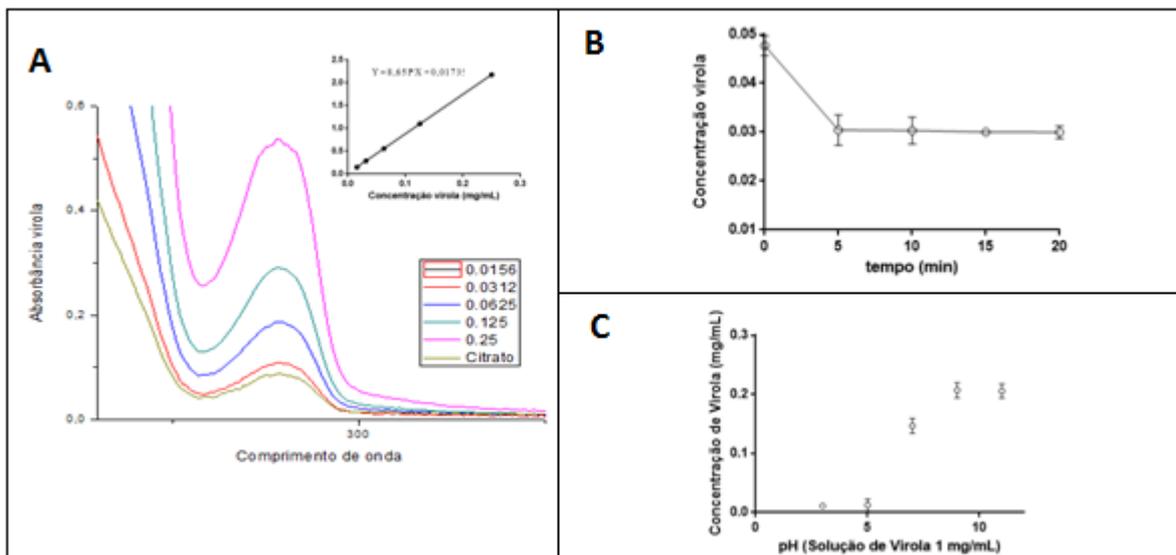


Figura 1: Espectros de absorção na região do ultravioleta do extrato de virola oleífera em diferentes concentração para obtenção da curva padrão e espectro de absorção óptica das nanopartículas de ouro sintetizadas pelo método de redução com o citrato; à esquerda, no canto superior, curva padrão do extrato de virola oleífera (A); Gráfico mostrando a variação do tempo para funcionalização das AuNP's (B); Gráfico mostrando a variação do pH para funcionalização das AuNP's (C).

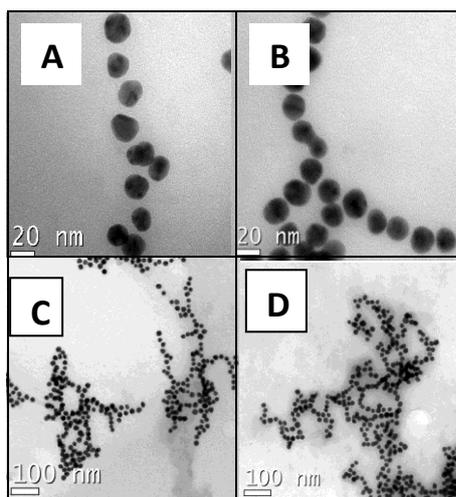


Figura 2: Nanopartículas de virola sintetizadas com citrato e funcionalizadas com virola na concentração de 0,2 mg/mL (A e C) e pH 3 e 0,2 mg/mL de virola (B e D).

[1] Milaneze B, Keijok W, Oliveira J, Peruch B, Bartochevis J, Liqui L, et al. *BMC Proceedings* 2014; 8 (Suppl 4):P29. doi: 10.1186/1753-6561-8-s4-p29

[2] Ruge O., C.; Cuca S., L.E.; Martinez V., J.C., 1998. *Revista Colombiana Ciências Químicas Farmacêuticas*. 27, 25-29.

[3] Barata, L.E.S.; Baker, P.M.; Gottlieb, O.R.; Rúveda, E.A., 1978. *Phytochemistry*. 17(4), 783-786.

[4] Zacchino, S.; Rodriguez, G.; Santecchia, C.; Pezzenati, G.; Giannini, F.; Enriz, R., 1998. *Journal of Ethnopharmacology*. 62, 35-41.

[5] Konya, K.; Vargas, Zs.; Antus, S., 2001. *Phytomedicine*. 8(6), 454-459.

Quasi-spherical and monodisperse synthesis of *Virola oleifera*-capped gold nanoparticles

Andressa dos Santos Corrêa¹, Jairo Pinto de Oliveira² and Marco C C Guimarães^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Espírito Santo

² Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Maruípe, s/n, 29053-360 Vitória, ES.

marco.guimaraes@ufes.br

The greener synthesis of gold nanoparticles using plant extracts are usually non-reproducible [1-3]. For this reason, we choose to synthesize capped citrate gold nanoparticles using *Virola oleifera* extract. The extract, rich in phenolic and flavonoid compounds, exhibits high inherent antioxidant property [4, 5]. Here, we report the interaction between gold nanoparticles and *Virola oleifera* extract and the optimal capping conditions. The synthesized AuNPs were characterized by UV-Vis spectroscopy, transmission electron microscopy (TEM), x-ray diffraction (XDR), and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, RAMAN spectroscopy and zeta potential measurements. The best capping time was 5 minutes, because no significant changes were observed in absorbance of supernatant from that time before the nanoparticles were centrifuged at 14000 rpm for 10 minutes (Figure 1A). Subsequently, the optimum pH range was determined, evaluating the adsorption of *Virola* extract on the nanoparticles surfaces at pH 3, 5, 7, 9 and 11. As can be seen in Figure 1B, the adsorption was most intense between pH 3 and 5. Based on this information, we use a 3² factorial design with 3 levels and 2 variables (pH and extract concentration) to verify the optimal capping conditions. The UV absorption spectra of each capping condition was assessed, and 0,1 mg/mL and pH 4 shows higher concentration of nanoparticles (Figure 1C). The capping of flavonoids on the citrate gold nanoparticles surface was confirmed by charge inversion (Figure 1D). The TEM images shows the citrate gold nanoparticles with the mean size 14, 92 ± 2,12. Furthermore, the aspect ratio was 0,936 confirmed quasi spherical aspects (TEM). The interaction is confirmed by different biophysical techniques, such as Fourier-Transform InfraRed (FTIR) and RAMAN. This study indicates that gold clusters are covered by organic compounds present in the extract by the aromatic characteristic bands (664,57 and 1575, 96 cm⁻¹, Raman and 1516 cm⁻¹, FTIR in Figure 2E)[6], as well as the TEM images (Figure 2: A, B, C e D). The DRX confirmed the face-centered cubic structure of citrate AuNPs (Figure 2F). The result of this study shows the synthesis of monodisperse AuNPs, with potential biological activities by confirmed adsorption of flavonoids and other biocompounds. Furthermore, we show a reproducible and simple methodology of synthesis and capping.

[1] DURÁN, N.; SEABRA, A.B. Metallic oxide nanoparticles: State of the art in biogenic syntheses and their mechanisms. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 2012, 95, 275–288.

[2]SEABRA, A.B.; HADDAD, P.S.; DURAN N. Biogenic synthesis of nanostructured iron compounds: Applications and perspectives. **IET Nanobiotechnol.** 2013, 7, 90–99.

[3]RAI, M. *et al.* Diversity in synthesis and bioactivity of inorganic nanoparticles: Progress and pitfalls. **Nanotechnol. Rev.** 2014, 3, 281–309.

[4] Barata, L.E.S.; Baker, P.M.; Gottlieb, O.R.; Rúveda, E.A., 1978. **Phytochemistry.** 17(4), 783-786.

[5] Konya, K.; Vargas, Zs.; Antus, S., 2001. **Phytomedicine.** 8(6), 454-459.

[6] SILVERSTEIN, Robert M *et al.* Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.

In: Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. LTC, 2007.

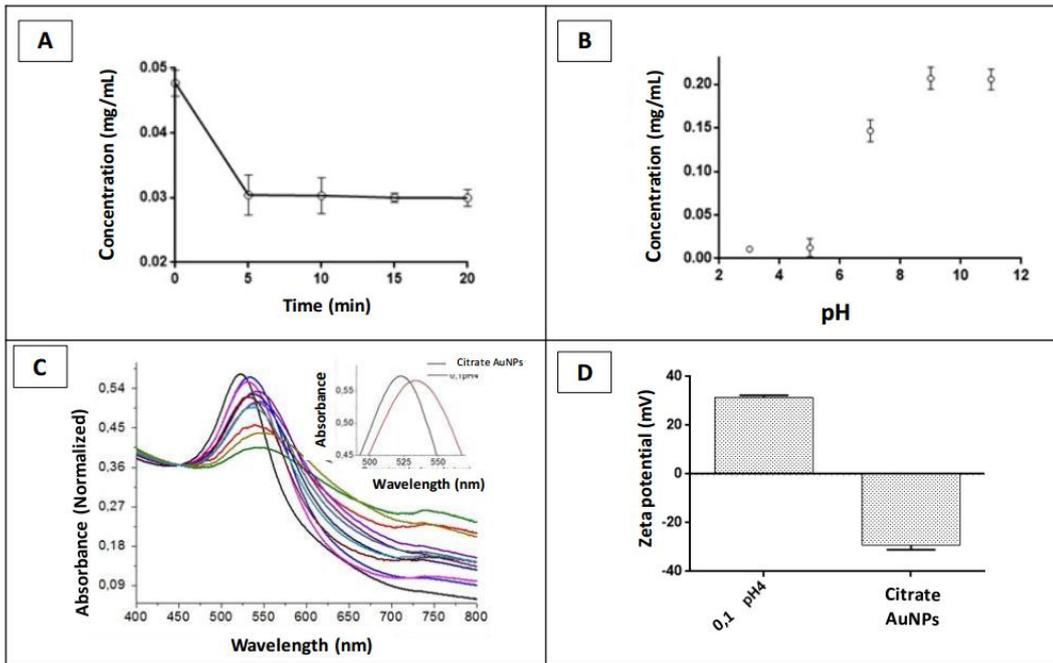


Figure 1. Time and pH in *Virola* adsorption (A and B), UV-Vis spectra of capped AuNPs under different conditions (C), and AuNPs and *Virola* capped AuNPs zeta potential (D).

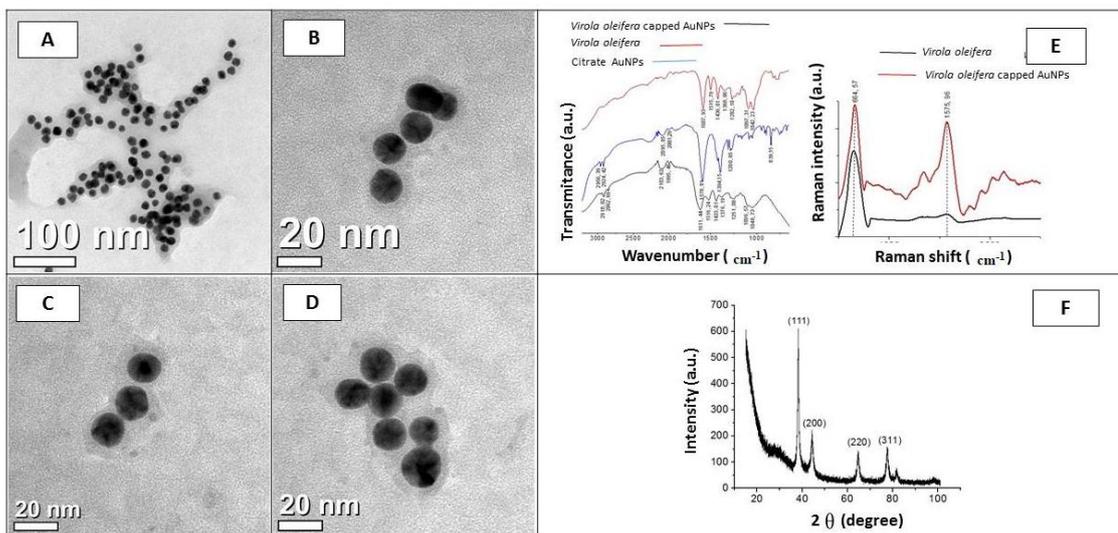


Figure 2. TEM images of AuNPs used to determine the monodispersity of *Virola oleifera* capped AuNPs (A, B, C and D). FTIR spectra of the citrate gold nanoparticles in blue, *Virola oleifera* extract in red and *Virola oleifera* capped AuNPs (0,1 mg.mL⁻¹ and pH 4). Raman spectra of *V. oleifera* is in black, and the *Virola oleifera* capped AuNPs are in red (E), and XDR patterns confirmed the face-centered cubic structure (F).

ANEXO II

NANO EXPRESS

Open Access



Facile Synthesis of Monodisperse Gold Nanocrystals Using *Virola oleifera*

Bárbara A. Milaneze¹, Jairo P. Oliveira¹, Ingrid Augusto¹, Wanderson J. Kejjok¹, Andressa S. Côrrea¹, Débora M. Ferreira¹, Otálbio C. Nunes¹, Rita de Cássia R. Gonçalves¹, Rodrigo R. Kitagawa¹, Vinícius G. Celante², André Romero da Silva², Ana Claudia H. Pereira³, Denise C. Endringer^{2,3}, Ricardo P. Schuenck¹ and Marco C. C. Guimarães^{1*}

Abstract

The development of new routes and strategies for nanotechnology applications that only employ green synthesis has inspired investigators to devise natural systems. Among these systems, the synthesis of gold nanoparticles using plant extracts has been actively developed as an alternative, efficient, cost-effective, and environmentally safe method for producing nanoparticles, and this approach is also suitable for large-scale synthesis. This study reports reproducible and completely natural gold nanocrystals that were synthesized using *Virola oleifera* extract. *V. oleifera* resin is rich in epicatechin, ferulic acid, gallic acid, and flavonoids (i.e., quercetin and eriodictyol). These gold nanoparticles play three roles. First, these nanoparticles exhibit remarkable stability based on their zeta potential. Second, these nanoparticles are functionalized with flavonoids, and third, an efficient, economical, and environmentally friendly mechanism can be employed to produce green nanoparticles with organic compounds on the surface. Our model is capable of reducing the resin of *V. oleifera*, which creates stability and opens a new avenue for biological applications. This method does not require painstaking conditions or hazardous agents and is a rapid, efficient, and green approach for the fabrication of monodisperse gold nanoparticles.

Keywords: Gold nanoparticles, Green synthesis, *Virola oleifera*, Flavonoids

Background

The emergence of nanotechnology has significantly expanded the applications of nanoparticles by allowing intimate interfaces among materials science, chemistry, physics, and biology to better manipulate and utilize their properties [1, 2]. Several current studies have been devoted to the synthesis, stabilization, and functionalization of gold nanoparticles (AuNPs) [3, 4].

The interest in AuNPs is largely due to the relative ease of their synthesis, which offers good control of their sizes and shapes as well as their optical characteristics. Moreover, the versatile surface chemistry of gold nanoparticles allows them to be coated with a wide range of molecules [5, 6]. Therefore, various applications [7–12] have been integrated into different areas to enable the development of new manufacturing processes [13, 14].

Recently, structural studies of nanoparticles have indicated that chemical synthesis can be replaced by an environmentally friendly process using plant extracts [15–20], in which nanoparticles that are traditionally synthesized in a chemical process are attached to and subsequently released from rigid delivery substrates for biomedical applications [21, 22]. Therefore, the main roles of the plant extract are to act as reducing and capping agents during the synthesis process [23]. Moreover, plant extracts appear to be the best route for the large-scale synthesis of nanoparticles. The green growth of nanoparticles depends on many polyphenol quantities [24]. In this study, gold nanoparticles were synthesized using a *V. oleifera* extract.

V. oleifera offers numerous distinct advantages, such as biocompatibility, non-toxicity, aqueous solubility, and their beneficial composition that is rich in phenols (i.e., ferulic and gallic acid, epicatechin, tannins, and quercetin) [25].

* Correspondence: marco.guimaraes@ufes.br

¹Federal University of Espírito Santo, Av Marechal Campos 1468, Vitória, ES 29.040-090, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

Here, we have investigated the design of a new route for the production of gold nanoparticles using a vegetable extract, and the AuNPs produced in this study were distinct from those previously reported [26, 27]. Our method offers several advantages in terms of easy scale-up, environmental friendliness, and low cost. We believe that the broad application of this strategy will contribute to the development of the next generation of green nanotechnology.

Methods

Plant Material

Virola oleifera (Schott) A. C. Smith is grown in the Atlantic forest in the southeastern region of Brazil. The plant material was verified by D.Sc. Luciana Dias Thomaz from the Department of Botany, Federal University of Espírito Santo, where the voucher specimen was deposited (VIES 19648). The fluid exudate was obtained by creating a 0.5-m incision in the tree trunk and collecting the resin in an aseptic plastic container, and this resin was transferred to an amber glass vial that was stored at 4 °C prior to analysis. Then, the fluid exudate was subjected to drying at 40 °C followed by grinding to yield 24 g of dried resin.

Experimental Design and Statistical Analysis

Two variables that influence the nanoparticle size and concentration were evaluated in this study including the reducing agent concentration and synthesis time. To reduce the number of process variables, the concentration of the gold precursor agent was fixed. A 3² factorial design with 3 levels and 2 variables (Table 1) was assembled to verify its influence on the conversion of the reaction and to determine the optimal conditions for nanoparticle synthesis.

The effects of each selected variable on the nanoparticle size were analyzed using STATISTICA version 10.0. The inputs included the absorbance values of the as-prepared samples at 530 nm, and the corresponding diameters were calculated using a trial version of the ImageJ software. An analysis of variance (ANOVA) of the data was also performed, and the values were considered significant at *p* values <0.05. The optimal values of the independent variables were determined using a three-dimensional analysis of the response surface of the independent and dependent variables.

Table 1 Experimental design

Variables	Levels		
	Low	Medium	High
Volume of <i>Virola oleifera</i>	1 mL	2 mL	3 mL
Time of the synthesis	10 min	20 min	30 min

In this study, the following concentrations were employed: 1 g/L *Virola oleifera* and 2.5×10^{-4} mol/L tetrachloroauric acid trihydrate (HAuCl₄·3H₂O). Ten milliliters of a gold solution was used in all of the experiments

Gold Nanoparticles Synthesis

To produce AuNPs, we performed a 3² factorial design with 3 levels and 2 variables (Table 1) to investigate the cause and effect relationship between the reducing agent and the time. For the gold nanoparticle synthesis, a 2.5×10^{-4} M gold chloride solution (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was employed, and three percentages of the reducing agent (*V. oleifera*) were added according to the experimental plan. The plant extract was added to the gold precursor solution. The mixture was maintained at room temperature (25 °C) under stirring (200 rpm) for three time periods (Table 1) and protected from light. The AuNP formation was observed by the appropriate color change.

Electrochemical Measurements

The electrochemical measurements were carried out using a Metrohm Autolab PGSTAT 128n instrument. Three electrodes were employed. The working electrode was Pt (0.5 cm²), a leak-free saturated Ag/AgCl/KCl electrode was employed as the reference electrode, and the counter electrode consisted of a Pt plate (3.0 cm²).

Characterization of Gold Nanoparticles (UV-Vis, TEM, DLS, SEM, HR-SEM, FTIR, Raman, and X-ray)

A UV-visible spectrophotometer (UV-1800 Shimadzu, Japan) was used to determine the surface plasmon resonance absorption (SPR) by scanning from 400 to 700 nm. For transmission electron microscopy (TEM) visualization, AuNPs were mounted on formvar-coated 200 mesh grids (Ted Pella Inc., USA), negatively stained using a 5 % aqueous uranyl acetate solution (Sigma-Aldrich) and visualized using a transmission electron microscope JEM-1400 (JEOL, São Paulo-SP, Brazil) at 120 kV with lab6 filament. The particle size distribution and zeta potential were determined using dynamic light scattering (DLS) technology (NPA152 Zetatrak, Microtrac Instruments, York, USA) combined with the interaction of random Brownian motion and the driven electric field motion of the particle suspensions. The total mass of the recovered nanoparticles that were obtained after the washing step was suspended in 50 mL of deionized water and sonicated at 50 Hz for a period of 1 min. The zeta potential values represent the average standard deviations for three independent preparations of nanoparticles. The total AuNP concentration was determined using ICP-MS (Perkin Elmer, Optima 7000, USA). The surface, shape, and dispersity characteristics were determined by SEM (JEM 6610-LV, JEOL, São Paulo-SP, Brazil) and HRSEM (Auriga, Zeiss, German). The monodispersity of the AuNPs was determined based on the aspect ratio (length to diameter, L:D) using the ImageJ software (*N* = 200 nanoparticles). After the AuNP synthesis, the samples were centrifuged at 15,000 rpm for 30 min and freeze-dried using a speed vac. A Fourier

transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis was performed in ATR mode (FT-MIR FTLA 2000 Bomem) to investigate the interactions between the organic compounds of the *V. oleifera* extract and the nanoparticles, and the functionalized AuNPs were characterized by Raman spectrometry (ALPHA 300R Confocal Raman Spectrometer) in the 500–3500 cm^{-1} region at a laser power of 532 nm. Finally, the crystal structure was determined using X-ray diffraction (XRD). The AuNP samples were prepared by drop-coating the pelletized AuNPs on a glass slide and scanning in a 2θ region from 30° to 90° at 0.01° per minute with a time constant of 2 s using a D8 Advance (Bruker-axs) X-ray diffractometer.

Results and Discussion

Fabrication of Colloidal Gold Nanoparticles and Effects of Two Parameters on AuNP Formation

The influence of the volume of the *V. oleifera* extract and the reaction time on the formation of AuNPs was evaluated to determine the optimal conditions for this synthesis. We applied a 3^2 factorial design that was performed by varying the values of the studied parameters, as shown in Table 1. The details of the experimental procedures and characterizations are provided in the “Methods” section.

A three-dimensional plot and contour map for $-\log(N/N_0)$ of the absorbance for the AuNP synthesis as a function of time and the volume of the *V. oleifera* extract was obtained using response surface modeling (RSM). The results indicated that an increase in the volume of the *V. oleifera* extract caused an increase in the absorbance value, suggesting an increase in the

number of AuNPs (Fig. 1a). However, the same influence on the AuNP formation was not observed as the reaction time increased.

The relative contributions from the concentration and time to the AuNP growth are presented in a Pareto chart (Fig. 1b). When we independently analyzed the variables, only the concentration resulted in a significant effect (value 7.916) (Fig. 1b). No significant combined effect was observed for the preparation of the nanoparticles. The relative importance of the independent variables was specified by the standardized main effect of the Pareto chart (Fig. 1b). The significance was based on the F values and P values. A larger F value and a smaller P value indicate a more significant variable and corresponding coefficient.

Electrochemical Performance of AuNPs Versus *V. oleifera* Extract

To evaluate the role of *V. oleifera* in the AuNP synthesis, the electrooxidation of the *V. oleifera* extract was performed. We compared the cyclic voltammetry of the *V. oleifera* extract and the AuNPs at three different scanning speeds (i.e., 10, 50, and 100 mV/s) (Fig. 2). The current and potential reduction in the *V. Oleifera* system could not be accurately determined (Fig. 2a) because it had not been oxidized. The AuNPs that were synthesized using *V. oleifera* (Fig. 2b) exhibited more defined cathodic regions due to the system being previously oxidized. In addition, an oxidation peak was observed in the region close to -0.25 V.

This process may be related to the initial oxidation. To compare *V. oleifera* and AuNPs, we focus on the results

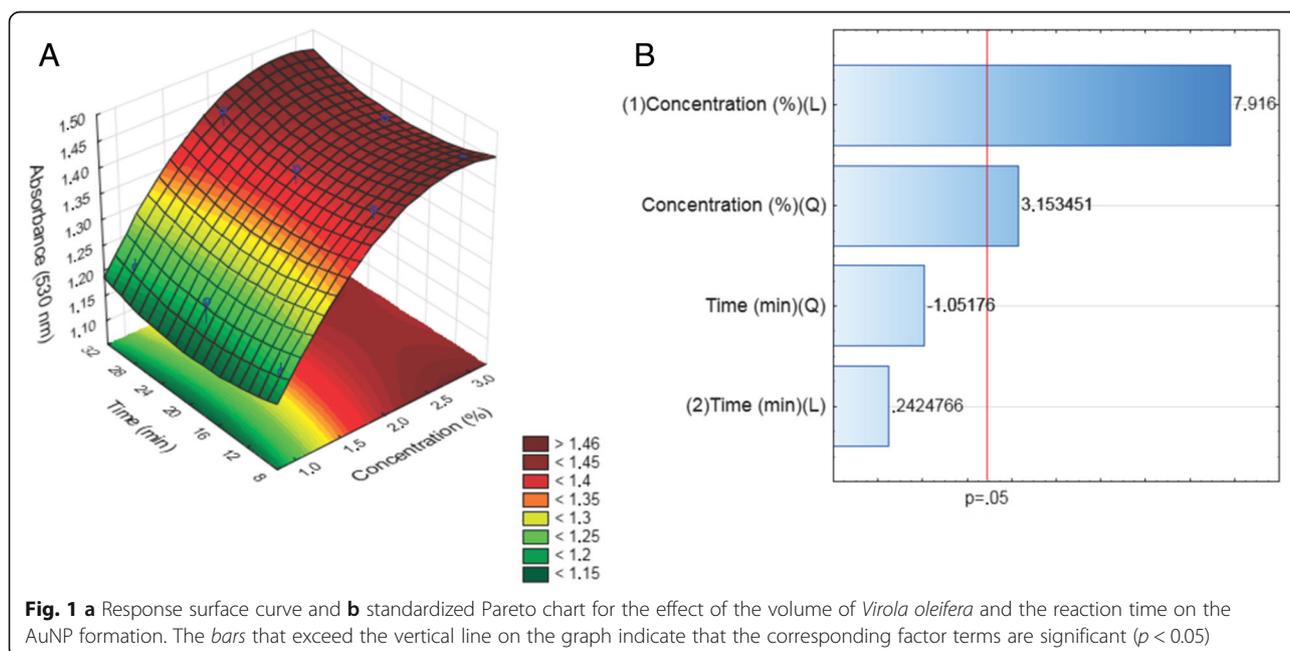


Fig. 1 a Response surface curve and b standardized Pareto chart for the effect of the volume of *Virola oleifera* and the reaction time on the AuNP formation. The bars that exceed the vertical line on the graph indicate that the corresponding factor terms are significant ($p < 0.05$)

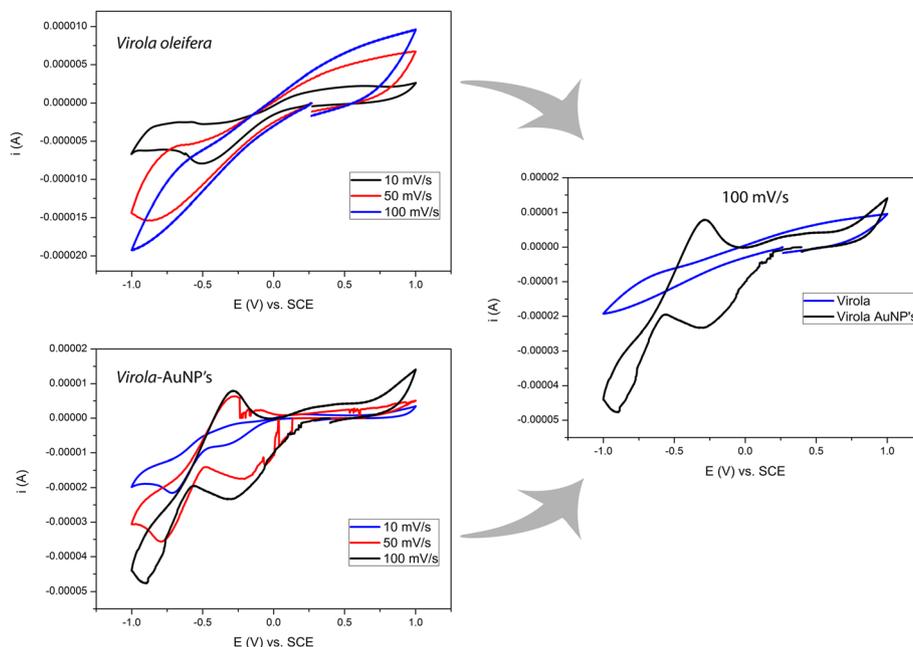


Fig. 2 Cyclic voltammograms of *Virola oleifera* (i.e., scan recorded at 10, 50, and 100 mV/s). Cyclic voltammetry of colloidal gold nanoparticles synthesized with *V. oleifera* at different scan rate (10, 50, and 100 mV/s). Comparison between *V. oleifera* and colloidal gold nanoparticles at 100 mV/s

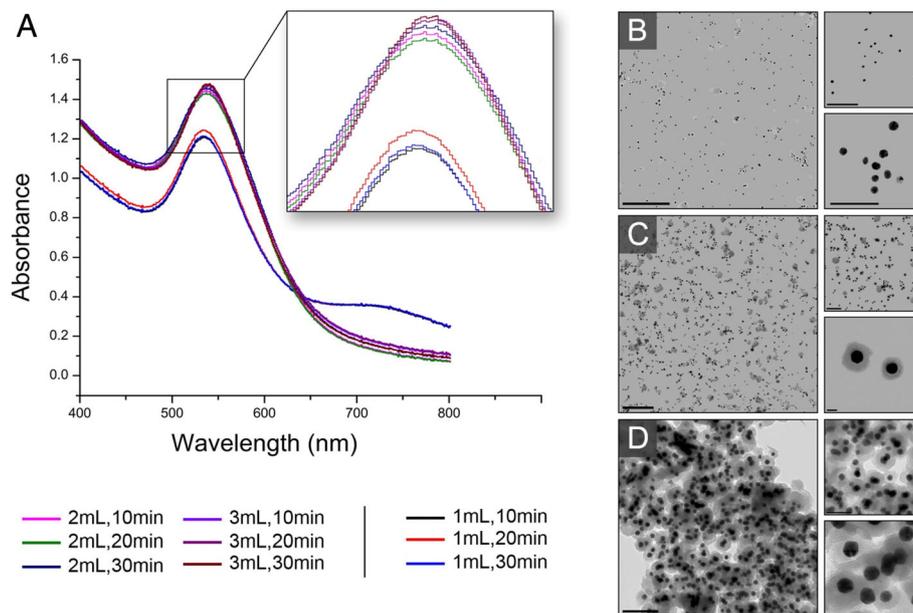


Fig. 3 a UV-visible spectra of gold nanoparticles (AuNPs) under different conditions. Note the plasmon peak in the inset. **b–d** TEM images of AuNPs produced using 1, 2, and 3 mL of *Virola oleifera*, respectively, and a reaction time of 20 min. **b** TEM images of AuNPs produced with 1 mL and 20 min. (The scale bars are 0.5 μ m for the enlarged image, 0.2 μ m for the top image, and 100 nm for the bottom image.) **c** TEM images of AuNPs produced with 2 mL and 20 min. (The scale bars are 0.5 μ m for the enlarged image, 0.2 μ m for the top image, and 20 nm for the bottom image.) **d** TEM images of AuNPs produced with 3 mL and 20 min. (The scale bars are 200 nm for the enlarged image, 100 nm for the top image, and 50 nm for the bottom image)

using a scan rate of 100 mV/s (Fig. 2c). Notably, the gold system undergoes a reduction process that is much more defined. However, the system containing only *V. oleifera* does not exhibit the same characteristic due to a lack of previous oxidation.

Characterization of Gold Nanoparticles

The transmission electron microscopy results indicate that the Au-synthesized nanoparticles were typically spherical in shape and monodisperse (Figs. 3b–d and 4). To examine the growth, size, and shape of the AuNPs in aqueous suspensions by surface plasmon resonance (SPR), a UV-visible spectrophotometer was employed. The UV-visible spectra of the reaction solutions exhibited a characteristic surface plasmon resonance band corresponding to the AuNPs at approximately 539 nm under all of the conditions (Fig. 3a). The sharpness of the UV peak also indicates that the sizes of the AuNPs in these samples were nearly monodisperse. The size of the nanoparticles can be monitored indirectly by the integrated area of the suspension absorbance spectra (AISAS) in the region where no AuNP absorbance was observed. Because the light scattering for a nanoparticle is proportional to the square of the particle volume, a suspension with smaller particles scatters less light, and its absorbance spectrum has a smaller integrated area

[28]. The AISAS increased from 49 to 55 and 58, and the volume of the *V. oleifera* extract increased from 1 to 2 and 3 mL, respectively, for a reaction time of 20 min. The same results were observed for the other reaction times. This result indicated that an increase in the extract volume resulted in an increase in the AuNP size, which was most likely due to the adsorption of a greater amount of *V. oleifera* on the AuNP surface, which increased the nanoparticle size. This result was confirmed by monitoring the average size of the nanoparticles using dynamic light scattering measurements because the average size increased from 1.1 to 43 and 73 nm when the volume changed from 1 mL to 2 mL and 3 mL, respectively.

Gold nanoparticle properties are dependent on their dimensions. Therefore, a monodispersity analysis is important for evaluating the nanoparticles' synthesis and application. The aspect ratio (D/L) was calculated. As observed in the TEM images (Fig. 4a–d) and confirmed by HR-SEM (Fig. 4e, f), the resulting particles are relatively monodisperse under these nucleation and growth conditions.

The amount of Au present in the AuNP nanoparticle was quantified using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The ICP-MS analysis indicated that the total amount of AuNPs changed from 60.0 to 49.9 and 42.8 mg/L when the synthesis was performed

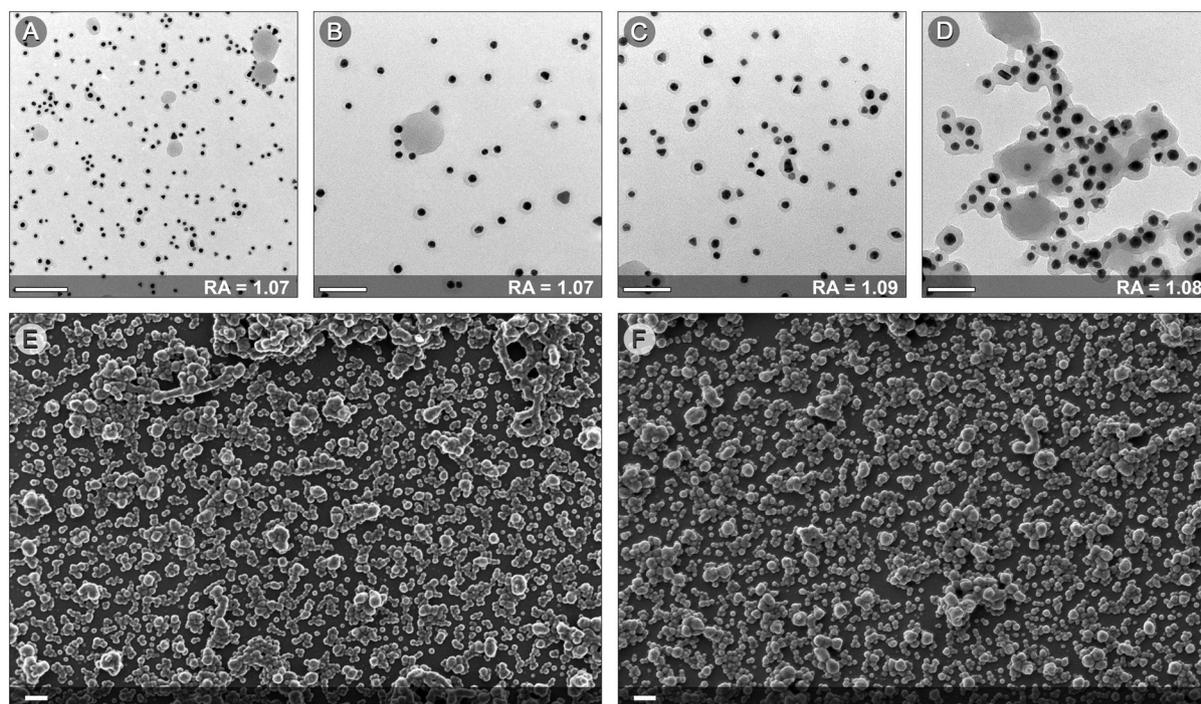
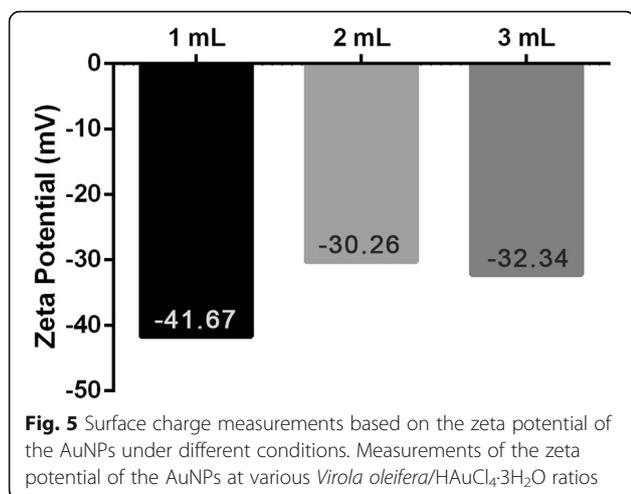


Fig. 4 TEM images of AuNPs used to determine the monodispersity (a–d) with the aspect ratio (AR) value inset. The scale bars represent a 200 nm and b–d 100 nm. HR-SEM images of the AuNPs (e, f), and the scale bars represent 200 nm



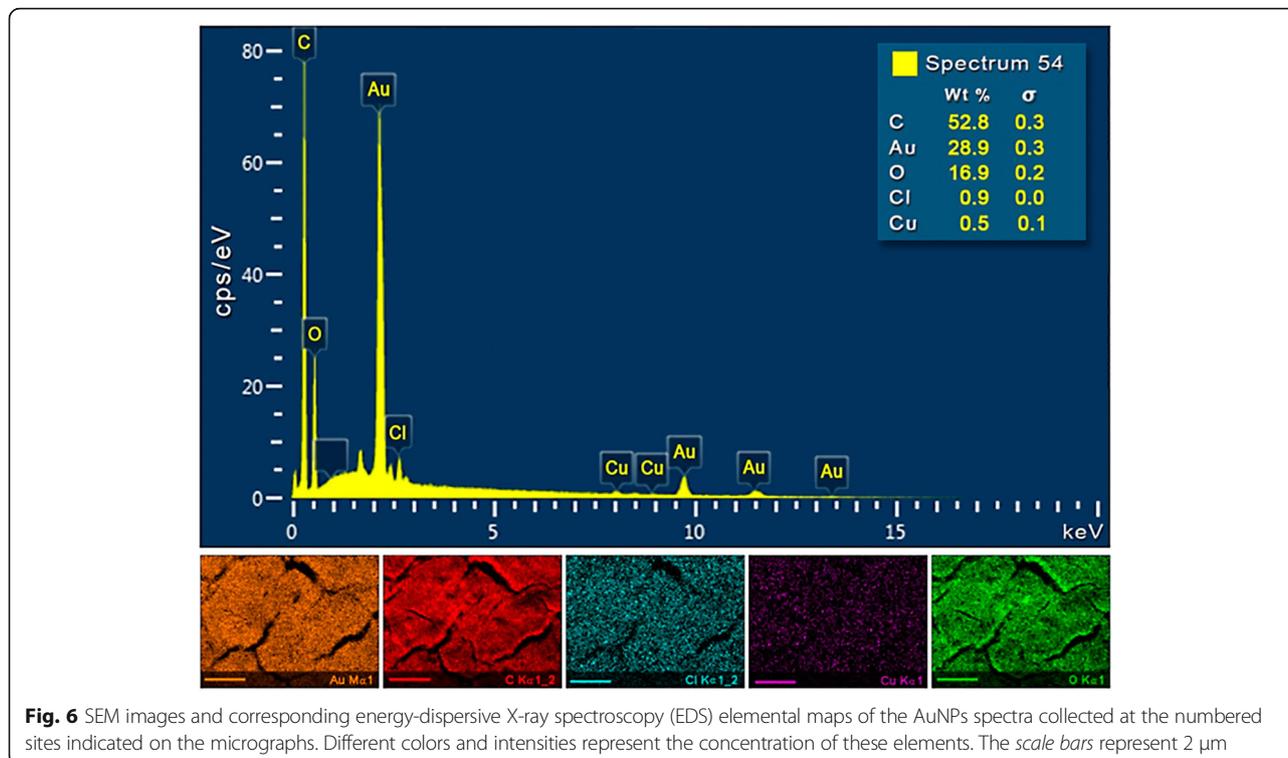
with 1, 2, and 3 mL of the *V. oleifera* extract, respectively. The adsorption of a larger amount of *V. oleifera* extract on the nanoparticle surface may limit the increase in the amount of Au in the nanoparticle.

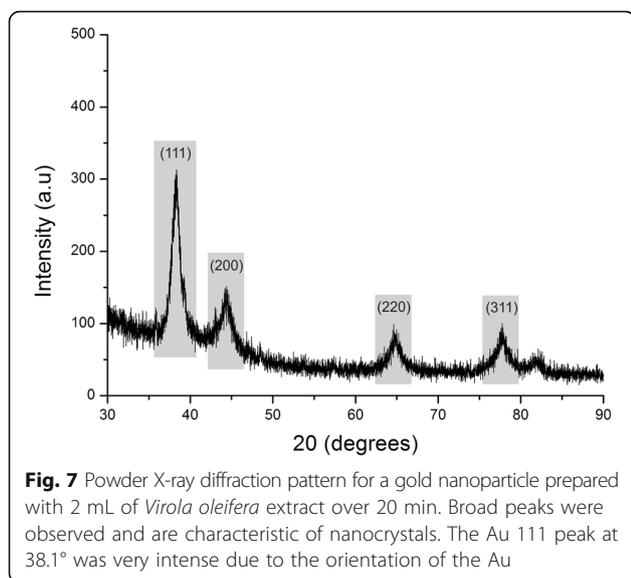
The colloidal stability of the AuNPs was initially confirmed by measuring the zeta potential to estimate the charge on the nanoparticle surface. The zeta potential analysis revealed that the charge on the AuNP surface decreased from -41.67 to -30.26 and -32.34 mV as the volume of the *V. oleifera* extract increased from 1 to 2 and 3 mL, respectively (Fig. 5). This result confirmed that the extract was adsorbed on the nanoparticle

surface, which decreased the zeta potential. The AuNPs synthesized with 1 and 2 mL of *V. oleifera* generated stable nanoparticles in distilled water. In general, nanoparticles with a zeta potential greater than $+25$ mV or less than -5 mV possess sufficient electrostatic repulsion to remain stable in solution [29]. A larger negative value may be due to the capping layer of the *V. oleifera* composition. The repulsive forces between negatively charged particles prevent agglomeration.

An aliquot of the sample synthesized with the intermediate conditions of the experimental design (i.e., synthesis time of 20 min and *V. oleifera* volume of 2 mL) were characterized to better understand the composition of the as-synthesized nanoparticles. Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) (Fig. 6) was performed to confirm the composition of the AuNPs and the presence of other elements. The more intense Au peaks were acquired at approximately 2.3 Kev for *Virola*-AuNPs. The elemental mapping was performed for a selected region ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) and indicated a high deposition of carbon (red), gold (orange), and oxygen (green) with the presence of other elements (i.e., copper (purple) and chlorine (cyan)).

Finally, the crystalline nature of the biosynthesized gold nanoparticles was further confirmed from XRD analysis. The XRD patterns of the synthesized gold nanoparticles are shown in Fig. 7. Four intense diffraction peaks were observed at 2θ values of 38.31° , 44.45° , 64.64° , and 77.73° , corresponding to the (111), (200), (220), and (311) reflections of metallic crystalline gold, respectively. A strong





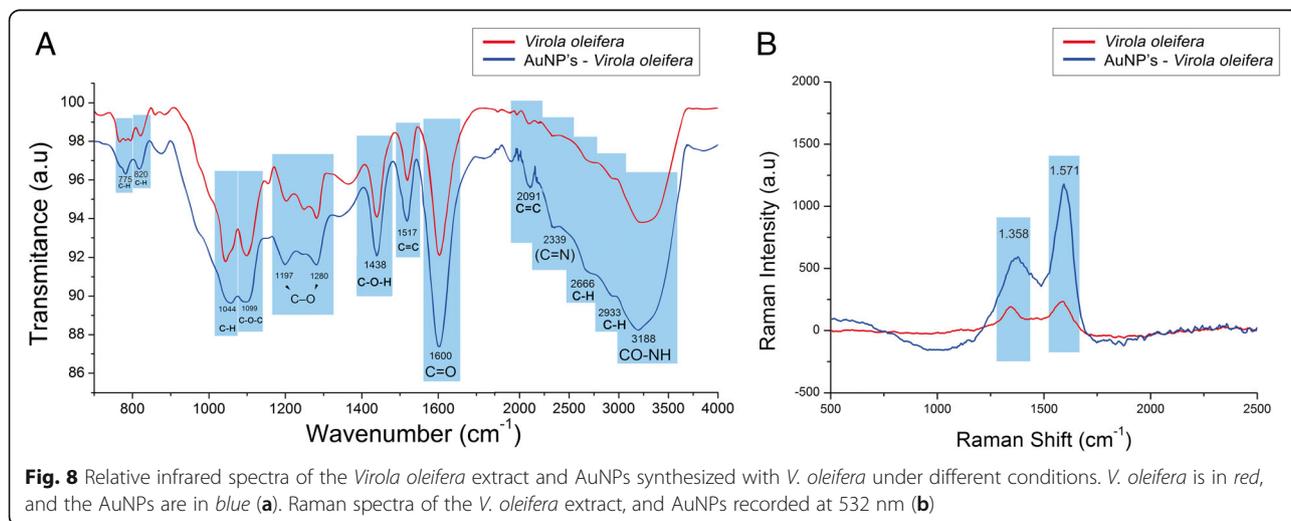
diffraction peak corresponding to the (111) facet was observed, and the peaks corresponding to the three other facets were less intense. This observation suggested that the (111) plane was the predominant orientation of the as-prepared AuNPs using the *V. oleifera* extract.

Presence of Phenolic Compounds on the Surface of the AuNPs Synthesized with *V. oleifera* Ace

Phenolic compounds possess biologically beneficial activities and are frequently utilized as antioxidants. To confirm the presence of macromolecules that play a key role in biological activity on the surface of the as-synthesized AuNPs, FTIR and RAMAN measurements were performed on both the nanoparticles and the pure extract. Infrared spectrometric analysis was applied to determine whether the nanoparticle modifies the chemical profile of

the *V. oleifera* resin (Fig. 8a). The pure *V. oleifera* extract (in red) exhibited two strong characteristic bands. The band at approximately 1600 cm^{-1} that corresponds to a C=O stretching vibration [30] is associated with carbonyl bonding from a component of the *V. oleifera* extract (e.g., ferulic and gallic acid, epicatechin, tannins, and quercetin). Its components are typically observed between 1590 and 1820 cm^{-1} or 3000 and 3400 cm^{-1} , which are characteristic of OH vibrational stretching [31, 32]. Moreover, less intense peaks were observed at 775 and 820 cm^{-1} (benzene ring vibrations) [30], 1044 cm^{-1} (C–H) [33], 1099 cm^{-1} (C–O–C) [34], 1197–1280 cm^{-1} (C–O) [35], 1438 cm^{-1} (C–O–H) [36], and 1517 cm^{-1} (C=C) [37]. The same spectral profile was observed for the AuNPs, suggesting that the *V. oleifera* resin was linked with the nanoparticles. Moreover, the shifts in peak positions between the extract and the AuNPs spectra may indicate bonding to the metal surface.

To investigate the Raman scattering performance, the signal of the AuNPs coated with organic compounds from *V. oleifera* was measured (with 633-nm laser excitation at 17 mW for 1 s) (Fig. 8b). To analyze the AuNP-associated biomolecules, two characteristics are extremely important: similarity and intensity. The *V. oleifera* and AuNPs-*V. oleifera* spectra were similar, and the spectrum of a molecule in contact with the nanocrystal was enhanced, which indicated that the compounds present in the plant extract functionalized the nanoparticles via irreversible electrostatic interactions. The Raman spectra for the HAuCl_4 incubation conditions contained two very strong peaks at 1358 and 1571 cm^{-1} . The position peaks corresponding to the symmetric and asymmetric stretching carboxylic groups (COO^{-1}) are related to the peaks observed at 1358 and 1571 cm^{-1} , respectively [38]. The observed vibrations have also been reported for free and Na ferulic acid salt [39].



Conclusions

The green synthesis of biofunctionalized AuNPs from *V. oleifera* was simple, environmentally friendly, and economical. Due to the reducing and capping nature of the bioactive compounds present in the aqueous extract of *V. oleifera*, a cap was formed around the gold ions of the stable biofunctionalized NPs. The presence of the functional group of the bioactive compounds was confirmed by FTIR and Raman spectroscopy. The particle size, quasi-spherical shape, and monodispersity of the AuNPs were determined by TEM, SEM, HRSEM, and XRD analyses. *V. oleifera* may serve as a source of biofunctionalized NPs for a wide range of in vitro assays. The results of this study are as follows: (i) the synthesis using *V. oleifera* allows for the preparation of monodisperse AuNPs that are homogenous in size and shape and stable in solution, (ii) the presence of organic compounds that can potentially offer important biological activity for these nanoparticles, and (iii) a new route for the production of bioactive gold nanoparticles.

Our studies provide an important basis for the application of the green synthesis of gold nanoparticles using *V. Oleifera*.

Acknowledgements

This work was partially supported by the Brazilian Ministry of Science and Technology (CNPq Grant 483036/2011-0), the Education Ministry (MEC-PROEXT Grant 04/2011), the Ministry of Science and Technology (MCTI/FINEP/CT-INFRA grant PROINFRA 01/2006), and Espírito Santo Research Foundation (FAPES). The authors wish to acknowledge the LABIOM at Universidade Federal do Espírito Santo for providing the equipment and technical support for the UV-vis experiments.

Authors' Contributions

MBA, who was the student responsible for the work, conceived and designed the experiments. OJP, AI, CAS, FDM, and KWJ provided support and performed the synthesis, physical characterization, and electron microscope experiments. NOC, GRGR, and KRR performed the analytical assays and co-wrote the paper. CVG performed cyclic voltammetry. RA measured the zeta potential. PACH and EDC performed the *V. oleifera* isolation and characterization and co-wrote the paper. SRP analyzed the data. GMCC supervised the project, and all of the authors contributed to data discussions. All of the authors commented on the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Federal University of Espírito Santo, Av Marechal Campos 1468, Vitória, ES 29.040-090, Brazil. ²Federal Institute of Espírito Santo, Av. Morobá, 248 - Morobá, Aracruz, ES 29192-733, Brazil. ³Vila Velha University, Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha, ES 29102-770, Brazil.

Received: 22 June 2016 Accepted: 8 October 2016

Published online: 18 October 2016

References

- Dreaden EC, Alkilany AM, Huang X, Murphy CJ, El-Sayed MA (2012) The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem Soc Rev* 41:2740–2779
- Kelly KL, Coronado E, Zhao LL, Schatz GC (2003) The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape and dielectric environment. *J Phys Chem B* 107:668–677
- Boruah SK, Boruah PK, Sarma P, Medhi C, Medhi OK (2012) Green synthesis of gold nanoparticles using *Camellia sinensis* and kinetics of the reaction. *Adv Mater Lett* 3:481–486
- Ganesan RM, Prabu HG (2015) Synthesis of gold nanoparticles using herbal *Acoruscalamus rhizome* extract and coating on cotton fabric for antibacterial and U blockin applications. *Arab J Chem*. doi:10.1016/j.arabjc.2014.12.017
- Nie Z, Petukhova A, Kumacheva E (2010) Properties and emerging applications of self-assembled structures made from inorganic nanoparticles. *Nat Nanotechnol* 5:15–25
- Khlebtsov NG, Dykman LA (2010) Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles. *J Quant Spectrosc Radiat Transf* 111:1–35
- Becheri A, Dürr M, Nostro PL, Baglioni P (2008) Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles: application to textiles as UV-absorbers. *J Nanopart Res* 10:679–689
- Sperling RA, Gil PR, Zhang F, Zanella M, Parak WJ (2008) Biological applications of gold nanoparticles. *Chem Soc Rev* 37:1896–1908
- Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM (2008) Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev* 60:1307–1315
- Dykman L, Khlebtsov N (2012) Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. *Chem Soc Rev* 41:2256–2282
- Pissuwan D, Niidome T, Cortie MB (2011) The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems. *J Control Release* 149:65–71
- Khlebtsov N, Bogatyrev V, Dykman L, Khlebtsov B, Staroverov S, Shirokov A, Matara L, Khanadeev V, Pylaev T, Tsyganova N, Terentyuk G (2013) Analytical and theranostic applications of gold nanoparticles and multifunctional nanocomposites. *Theranostics* 3:167–180
- Omidfar K, Khorsand F, Azizi MD (2013) New analytical applications of gold nanoparticles as label in antibody based sensors. *Biosens Bioelectron* 43:336–347
- Patel J, Němcová L, Maguire P, Graham WG, Mariotti D (2013) Synthesis of surfactant-free electrostatically stabilized gold nanoparticles by plasma-induced liquid chemistry. *Nanotechnology* 24:1–12
- Kumar V, Yadav SK (2009) Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. *J Chem Technol Biotechnol* 84:151–157
- Sujitha MV, Kannan S (2013) Green synthesis of gold nanoparticles using Citrus fruits (*Citrus limon*, *Citrus reticulata* and *Citrus sinensis*) aqueous extract and its characterization. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 102:15–23
- Elia P, Zach R, Hazan S, Kolusheva S, Porat Z, Zeiri Y (2014) Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as reducing agents. *Int J Nanomedicine* 9:4007–4021
- Daizy P (2010) Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus rosa sinensis*. *Physica E* 42:1417–1424
- Das RK, Gogoi N, Babu PJ, Sharma P, Mahanta C, Bora U (2012) The synthesis of gold nanoparticles using *Amaranthus spinosus* leaf extract and study of their optical properties. *Adv Mater Phys Chem* 2:275–281
- Gopinath K, Gowri S, Karthika V, Arumugam A (2014) Green synthesis of gold nanoparticles from fruit extract of *Terminalia arjuna*, for the enhanced seed germination activity of *Gloriosa superba*. *J Nanostruct Chem* 4:1–11
- Pal R, Panigrahi S, Bhattacharyya D, Chakraborti AS (2013) Characterization of citrate capped gold nanoparticle-querceetin complex: experimental and quantum chemical approach. *J Mol Struct* 1046:153–163
- Katti KK, Kattumuri V, Bhaskaran S, Katti KV, Kannan R (2009) Facile and general method for synthesis of sugar coated gold nanoparticles. *Int J Green Nanotechnol Biomed* 1:53–59
- Vadlapudi V, Kaladhar DSVGK (2014) Green synthesis of silver and gold nanoparticles. *Middle East J Sci Res* 19:834–842
- Kharisova OV, Dias HVR, Kharisov BI, Perez BO, Perez VMJ (2013) The greener synthesis of nanoparticles. *Trends Biotechnol* 31:240–248
- Baliano AP, Alves FS, Pereira ACH, Aquije GMFV, Lenz D, Andrade TU, Endringer DC (2015) Centennial knowledge of medicinal plants held in communities of Espírito Santo, Brazil. *Ethnobot Res Appl* 14:155–162
- Rao KJ, Paria S (2014) Green synthesis of gold nanoparticles using aqueous *Aegle marmelos* leaf extract and their application for thiamine detection. *RSC Adv* 4:28645–28652
- Isaac RSR, Sakthivel G, Murthy C (2013) Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Averrhoa bilimbi* fruit extract. *J Nanotechnol* 1:1–6
- Li K, Ma C, Liu Y, Zhao F, Tong S (2000) Rayleigh light scattering and its applications to biochemical analysis. *Chin Sci Bull* 45:386–387
- Kuznetsova YV, Rempela AA (2015) Size and zeta potential of CdS nanoparticles in stable aqueous solution of EDTA and NaCl. *Inorg Mater* 51:215–219