



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

**LUIS ALBERTO CONTRERAS ALVAREZ**

**PROPOSIÇÃO DE UMA ROTA DE SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS  
DE OURO REDUZIDAS COM RESINA DE *Virola oleifera* ATRAVÉS DO  
PLANEJAMENTO FATORIAL**

VITÓRIA

2018

**LUIS ALBERTO CONTRERAS ALVAREZ**

**PROPOSIÇÃO DE UMA ROTA DE SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS  
DE OURO REDUZIDAS COM RESINA DE *Virola oleífera* ATRAVÉS DO  
PLANEJAMENTO FATORIAL**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães.

Co-orientador: Dr. Jairo Pinto de Oliveira.

VITÓRIA

2018

Luis Alberto Contreras Alvarez

**“Proposição de uma rota de síntese verde de nanopartículas de ouro reduzidas com resina de Virola oleifera através do planejamento fatorial”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

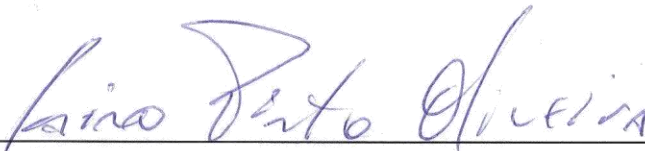
Aprovado(a) em 15 de fevereiro de 2018.

**BANCA EXAMINADORA:**



---

**Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães – Orientador**



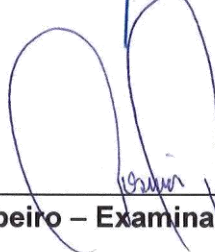
---

**Prof. Dr. Jairo Pinto de Oliveira – Coorientador**



---

**Prof. Dr. André Romero da Silva – Examinador Interno**



---

**Prof. Dr. Josimar Ribeiro – Examinador Externo**

**Vitória/ES  
2018**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)  
Bibliotecária: Maria Aparecida da Costa Pereira Akabassi–CRB6/ES-430

---

C764p Contreras Alvarez, Luis Alberto, 1985-  
Proposição de uma rota de síntese verde de nanopartículas de ouro reduzidas com resina de *Virola oleífera* através do planejamento fatorial / Luis Alberto Contreras Alvarez. – 2018.  
81 f. : il.

Orientador: Marco Cesar 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 de ouro. 2. Miristicácea. 3. Biossíntese. 4. Síntese orgânica. 5. Antioxidantes. I. Guimarães, Marco Cesar Cunegundes. II. Oliveira, Jairo Pinto de. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

---

## **Agradecimentos**

Agradecimentos especiais ao meu diretor de tese, o Professor Marco, por sua valiosa e excepcional orientação e pelo tempo investido no meu trabalho. Gostaria também de agradecer ao meu co-orientador, Jairo, por sua amizade, apoio e colaboração inestimável.

A todas as pessoas do laboratório LUCAR, especialmente para o professor Breno, Wanderson, Gabriel, Rayssa, Danilo, Tadeu, Afranio, Mateus, Natalia, Valmara, Larissa, Fernanda, Rafaela, Sueli, Flavio, Giseli, Helio, Gabriela, por sua amizade e apoio em todos os momentos.

A os professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia.

**OBRIGADO**

## DEDICATORIA

### ***A Daniela.***

*Por tu comprensión, apoyo y ayuda. Te amo.*

***A mi familia.*** *Luis Alberto, Bertha, Paul, Jheimy, Soraya, Dayana, Juan, Ruth, Joel, Juan Diego, Martina y Bebe.*

*Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante pero más que nada, por su amor.*

## RESUMO

A síntese de nanopartículas metálicas utilizando extratos vegetais e biomoléculas como agentes redutores vem ganhando um espaço considerável na literatura recente. No entanto, a baixa reprodutibilidade e a dificuldade no controle do tamanho, forma e estabilidade têm dificultado a produção em larga escala desses nanomateriais, e em consequência, suas aplicações. A resina liofilizada de *Virola oleífera* foi utilizada como modelo de agente de redução. Neste trabalho é proposto uma metodologia utilizando a análise pre-fatorial e planejamento fatorial  $2^{(5-1)}$  e  $3^2$  para determinação da melhor condição de síntese de nanopartículas de ouro monodispersas e estáveis. Assim foi o pH e tempo foram as variáveis que influenciam a síntese de nanopartículas. Os nanomateriais sintetizados foram caracterizados por diferentes técnicas, tais como: Espectroscopia de UV-Vis, Microscopia eletrônica de transmissão (TEM), Difração de raios X, Potencial Zeta e a Dispersão dinâmica de luz. A superfície metálica foi investigada utilizando Infravermelho e espalhamento Raman. A atividade antioxidante e a citotoxicidade também foram avaliadas visando possíveis aplicações em sistemas biológicos. Os resultados apontaram que o planejamento experimental utilizado proporcionou processos de síntese de nanomateriais com controle de tamanho, monodispersos e estável. As nanopartículas obtidas apresentam atividade antioxidante e baixa citotoxicidade em função do pH.

Palavras chave: Planejamento fatorial, síntese verde, nanopartículas, *Virola oleífera*.

## ABSTRACT

The synthesis of metal nanoparticles using plant extracts and biomolecules as reducing agents has gained considerable space in recent literature. However, the low reproducibility and difficulty in controlling the size, shape and stability have hampered the large-scale production of these nanomaterials, and consequently their applications. This work proposes a methodology using factorial design to determine the best reaction conditions for the synthesis of monodispersed and stable gold nanoparticles. The lyophilized *Virola oleifera* resin was used as the reducing agent model. The nanomaterials synthesized were characterized by different techniques, such as: UV-Vis spectroscopy, Transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction, Zeta potential and Dynamic light scattering. The metal surface was investigated using Infrared and Raman scattering. Antioxidant activity and cytotoxicity were also evaluated for possible applications in biological systems. The results indicated that the experimental design used provided processes for the synthesis of nanomaterials with size control, monodisperse and stable. The obtained nanoparticles have antioxidant activity and low cytotoxicity as a function of pH.

Keywords: Factorial design, Green synthesis, Nanoparticles, *Virola oleifera*.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Processo de crescimento das partículas de ouro. Fonte: Elaborado pelo autor.....	4
<b>Figura 2.</b> Esquema de espectros UV-Vis de nanopartículas monodispersas e polidispersas. Fonte: Oliveira et al., 2017. ....	5
<b>Figura 3.</b> Fotografia de árvore de <i>Virola oleifera</i> (A), folhas de <i>Virola oleifera</i> (B). Fonte: Lorenzi, 1998. ....	6
<b>Figura 4.</b> Variáveis que fornecem informações sobre as nanopartículas. Fonte. Elaborado pelo autor.....	12
<b>Figura 5.</b> Deslocamento do variável lambda (Delta Lambda). Fonte. Elaborado pelo autor.....	12
<b>Figura 6.</b> Espectros de absorção de uma solução de AuNPs que limita a região espectral entre 600 e 800 nm em que a integração é realizada, facilitando a medição do grau de floculação. A área sombreada corresponde a essa magnitude. Fonte. Viudez Navarro, 2011.....	15
<b>Figura 7.</b> UV-Vis, das sínteses feitas com intervalos de estudo e gráfico da variável resposta utilizada Delta Lambda ( $\Delta\lambda$ ). Concentração (A. B.), Temperatura (C. D.), Agitação (E. F.), Tempo (G. H.), pH (I. J.).....	27
<b>Figura 8.</b> UV-Vis, das 16 sínteses de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de <i>Virola oleifera</i> .....	28
<b>Figura 9.</b> ANOVA e Diagrama de Pareto identificando as variáveis que foram significativas no experimento ( $p < 0,05$ ), das diferentes variáveis respostas testadas Área da curva, FWHM, Absorbância máxima (Abs. Máx.), Lambda máxima ( $\lambda$ máx.), e Delta Lambda ( $\Delta\lambda$ ). ....	30
<b>Figura 10.</b> UV-Vis, das 16 sínteses de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de <i>Virola oleifera</i> .....	31
<b>Figura 11.</b> Diagrama de Pareto identificando as variáveis que foram significativas no experimento ( $p < 0,05$ ).....	33
<b>Figura 12.</b> Espectroscopia de absorção no UV-Visível da síntese de nanopartículas de ouro partir do planejamento fatorial fracionado utilizando extrato de <i>Virola oleifera</i> como agente redutor.....	34
<b>Figura 13.</b> Influência do pH em relação a variável resposta Delta Lambda (A). Influência do Tempo em relação a variável resposta Delta Lambda (B). Gráfico de superfície resposta apresentando interação das variáveis pH e Tempo (C).....	36
<b>Figura 14.</b> Nanopartículas de ouro sintetizadas utilizando extrato de <i>Virola oleifera</i> como agente redutor com diferentes pHs. ....	38
<b>Figura 15.</b> Difratograma de raios-X das AuNPs. ....	39
<b>Figura 16.</b> Imagens de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de <i>V. oleifera</i> de pH 4,7 (A, B, C). Diagrama de distribuição do tamanho (D). Razão de aspecto (E). ....	40
<b>Figura 17.</b> Imagens de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de <i>V. oleifera</i> de pH 7,7 (A, B, C). Diagrama de distribuição do tamanho (D). Razão de aspecto (E). ....	41

<b>Figura 18.</b> <i>Imagens de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de V. oleifera de pH 10,7 (A, B, C). Diagrama de distribuição do tamanho (D). Razão de aspecto (E).</i>	41
<b>Figura 19.</b> <i>Gráficos de DLS para AuNPs sintetizadas com Virola oleifera pH 4,7; 7,7 e 10,7.</i>	43
<b>Figura 20.</b> <i>Potencial zeta de nanopartículas de ouro sintetizadas com Virola oleifera com pHs diferentes (4,7; 7,7; 10,7).</i>	44
<b>Figura 21.</b> <i>Grau de floculação em função da variação do pH (A), Espectro de absorção UV-visível dos coloides AuNPs – pH4,7, AuNPs – pH7,7, AuNPs – pH10,7, após de 30 minutos de reação (B, C, D).</i>	45
<b>Figura 22.</b> <i>Grau de floculação em função da variação da concentração de sal (A), Espectro de absorção UV-visível dos coloides AuNPs – pH4,7, AuNPs – pH7,7, AuNPs – pH10,7, após de 30 minutos de reação (B, C, D).</i>	46
<b>Figura 23.</b> <i>Espectro infravermelho de nanopartículas de ouro sintetizadas com Virola oleifera com pH diferentes (4,7; 7,7; 10,7) e extrato de Virola oleifera.</i>	47
<b>Figura 24.</b> <i>Espectro Raman de nanopartículas de ouro sintetizadas com Virola oleifera com pHs diferentes (4,7; 7,7; 10,7) e extrato de Virola oleifera.</i>	48
<b>Figura 25.</b> <i>Curva padrão da concentração de Virola oleifera.</i>	50
<b>Figura 26.</b> <i>Atividade Antioxidante e Citotoxicidade das AuNPs sintetizadas com Virola oleifera, com pH 4,7.</i>	51
<b>Figura 27.</b> <i>Atividade Antioxidante e Citotoxicidade das AuNPs sintetizadas com Virola oleifera, com pH 7,7.</i>	52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Variáveis e parâmetros estudados. ....	20
<b>Tabela 2.</b> Variáveis e valores assumidos pelos níveis do planejamento fatorial fracionado. ....	20
<b>Tabela 3.</b> Tabela do planejamento fatorial fracionado das 16 sínteses de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de <i>Virola oleifera</i> . ....	21
<b>Tabela 4.</b> Intervalos de estudo das variáveis do planejamento fatorial completo. ....	22
<b>Tabela 5.</b> Matriz do planejamento fatorial completo das 11 sínteses de nanopartículas de ouro com extrato de <i>Virola oleifera</i> . ....	22
<b>Tabela 6.</b> Matriz dos parâmetros para a análise de grau de floculação. ....	24
<b>Tabela 7.</b> Tabela do planejamento fatorial fracionado das 16 sínteses de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de <i>Virola oleifera</i> . E as variáveis respostas utilizadas. ....	29
<b>Tabela 8.</b> Tabela do planejamento fatorial fracionado das 16 sínteses de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de <i>Virola oleifera</i> . A variável resposta utilizada foi o delta $\lambda$ . ....	32
<b>Tabela 9.</b> ANOVA para síntese de nanopartículas de ouro utilizando planejamento fatorial fracionado. ....	32
<b>Tabela 10.</b> Intervalos de estudo das variáveis do planejamento fatorial completo. ....	33
<b>Tabela 11.</b> Matriz do planejamento fatorial completo das 11 sínteses de nanopartículas de ouro com extrato de <i>Virola oleifera</i> . ....	34
<b>Tabela 12.</b> Matriz do planejamento fatorial completo das 11 sínteses de nanopartículas de ouro com extrato de <i>Virola oleifera</i> e a variável resposta delta lambda. ....	35
<b>Tabela 13.</b> Matriz de resposta variável das 9 sínteses realizadas para escolher as melhores condições de síntese. ....	37
<b>Tabela 14.</b> Diferença entre o diâmetro das AuNPs por MET e DLS. ....	42
<b>Tabela 15.</b> Tabela de critérios e seleção de nanopartículas. ....	49
<b>Tabela 16.</b> Concentração de <i>V. oleifera</i> ligada às AuNPs. ....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

**°C.** Graus celsius.

**Abs máx.** Absorbância máxima.

**ABTS+.** Ácido 2,2'-azino-bis- (3-etil-benzotiazolona-6-sulfônico).

**ANOVA.** Análise de Variância.

**ARN.** Ácido ribonucleico.

**AUC.** Área sob a curva.

**AuNPs.** Nanopartículas de Ouro.

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

**DMPD.** Dicloridrato de N,N-Dimetil-p-fenilendiamina.

**DNA.** Ácido desoxirribonucleico.

**DPPH.** 2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo.

**FRAP.** Do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*.

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

**FWHM.** Largura media (do inglês *Full Width at Half Maximum*).

**IR.** Infravermelho.

**L.** Litro.

**MET.** Microscopia Eletrônica de Transmissão.

**mg.** Miligrama.

**min.** Minutos.

**mL.** Mililitro.

**mM.** Milimoles.

**mV.** Milivolts.

**nm.** Nanometros.

**NPs.** Nanopartículas.

**PZ.** Potencial zeta.

**rpm.** Rotações por minuto.

**RPSL.** Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada.

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

**SPR.** Ressonância Plasmônica de Superfície.

**UFES.** Universidade Federal do Espírito Santo.

**UV.** Ultravioleta.

**UVV.** Universidade Vila Velha.

**XRD.** Difração de raios X (do inglês *X-Ray Diffraction*).

**$\Delta\lambda$ .** Delta Lambda.

**$\lambda$  máx.** Lambda máxima.

**$\lambda$ .** Lambda.

**$\mu\text{L}$ .** Microlitro.

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	VIII
LISTA DE TABELAS .....	X
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XI
SUMÁRIO .....	XIII
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	2
2.1. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS .....	2
2.2. SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS.....	3
2.3. EXTRATO DE <i>Virola oleífera</i> .....	5
2.4. NANOPARTÍCULAS DE OURO .....	7
<b>2.4.1. Citotoxicidade das nanopartículas de ouro</b> .....	8
2.5. OTIMIZAÇÃO DE SÍNTESES QUÍMICAS.....	9
<b>2.5.1. Planejamento fatorial fracionado</b> .....	9
<b>2.5.2. Planejamento fatorial completo</b> .....	10
2.6. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS .....	10
<b>2.6.1. Caracterização da forma, a concentração e estado de agregação por espectroscopia UV-vis</b> .....	10
<b>2.6.2. Caracterização estrutural de nanopartículas</b> .....	12
<b>2.6.3. Caracterização da forma, tamanho e distribuição por microscopia eletrônica de transmissão</b> .....	13
<b>2.6.4. Caracterização do tamanho hidrodinâmico e estabilidade</b> .....	13
<b>2.6.5. Análise de superfície</b> .....	15
2.7. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTOXICIDADE .....	16
<b>2.7.1. Determinação da atividade antioxidante das nanopartículas de ouro</b> .....	16
<b>2.7.2. Determinação da citotoxicidade das nanopartículas de ouro</b> .....	17
3. OBJETIVOS .....	18
3.1. GERAL .....	18
3.2. ESPECÍFICOS .....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
4.1. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES DE <i>Virola oleífera</i> E HAuCl <sub>4</sub> .....	19
4.2. OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS COM <i>V. oleífera</i> .....	19
<b>4.2.1. Pré-fatorial</b> .....	19

4.2.2.	<b>Planejamento fatorial fracionado</b> .....	20
4.2.3.	<b>Análise estatística e definição da variável resposta</b> .....	21
4.2.4.	<b>Planejamento fatorial completo</b> .....	21
4.3.	<b>CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FÍSICO-QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE OURO</b> .....	22
4.3.1.	<b>Espectroscopia de absorção no UV-vis</b> .....	22
4.3.2.	<b>Difração de raios X</b> .....	23
4.3.3.	<b>Microscopia Eletrônica de Transmissão</b> .....	23
4.3.4.	<b>Espectroscopia no Infravermelho</b> .....	23
4.3.5.	<b>Espectroscopia Raman</b> .....	23
4.3.6.	<b>Potencial Zeta e Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)</b> .....	24
4.3.7.	<b>Grau de Floculação</b> .....	24
4.4.	<b>DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTOCICIDADE</b> 24	
4.4.1.	<b>Método do radical DPPH - (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)</b> .....	25
4.4.2.	<b>Método ABTS+</b> .....	25
4.4.3.	<b>Cultivo de células J774A.1</b> .....	25
4.4.4.	<b>Avaliação da Citotoxicidade celular</b> .....	25
5.	<b>RESULTADO E DISCUSSÃO</b> .....	26
5.1.	<b>OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS COM <i>V. oleifera</i></b> .....	26
5.1.1.	<b>Pré-fatorial</b> .....	26
5.1.2.	<b>Análise estatística</b> .....	28
5.1.3.	<b>Planejamento Fatorial Fracionado</b> .....	31
5.1.4.	<b>Planejamento Fatorial Completo</b> .....	33
5.2.	<b>CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTICULAS DE OURO</b> .....	37
5.2.1.	<b>Caracterização da estrutura das nanopartículas de ouro</b> .....	38
5.2.2.	<b>Caracterização da forma, tamanho e distribuição</b> .....	39
5.2.3.	<b>Caracterização do tamanho hidrodinâmico e estabilidade</b> .....	42
5.2.4.	<b>Análise de superfície</b> .....	46
5.3.	<b>DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTOXICIDADE</b> 48	
5.3.1.	<b>Determinação da capacidade antioxidante e Citotoxicidade</b> .....	50
6.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	53
7.	<b>REFERENCIAS</b> .....	54
8.	<b>APÊNDICES</b> .....	61

8.1. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS.....	61
9. ANEXOS.....	65
9.1. ANEXO I.....	65



# 1. INTRODUÇÃO

Os métodos químicos para a produção de nanopartículas metálicas têm sido amplamente utilizados devido ao seu potencial para controlar adequadamente o tamanho, a distribuição de tamanho e a forma das nanopartículas [1]. No entanto, estes métodos químicos tradicionais utilizam agentes redutores e estabilizadores durante a síntese, que em certa medida, são tóxicos e contaminantes [2, 3]. A tendência nos últimos anos tem-se centrado no desenvolvimento de métodos de síntese sob o conceito de "Química Verde", que é aquele que utiliza extratos vegetais (com a possibilidade) que reduzem, estabilizam e muitas vezes funcionalizam as nanopartículas obtidas, com a vantagem destes métodos serem amigáveis ao meio ambiente [4, 5].

Numerosos métodos de síntese verde projetados para a obtenção de nanopartículas têm permitido sintetizar nanopartículas de ouro (AuNPs) (diferentes em forma e tamanho) com um elevado potencial para a funcionalização da superfície, que junto com suas propriedades ópticas interessantes, tornam-se um dos materiais com grande potencial para a sua aplicabilidade [6, 7]. Muitas vezes, estes métodos de síntese verde produzem partículas com uma série de problemas fundamentais no cumprimento dos requisitos para a sua utilização. Entre estes estão o efeito de polidispersividade de tamanhos, fraca estabilidade ou a sua capacidade limitada para a sua compatibilidade as sistema fisiológico humano[8].

Por estas razões, a padronização de um método que permite a síntese de nanopartículas monodispersas, estáveis, não tóxicas e bioativas permanecem um desafio. Assim, o objetivo deste trabalho é padronizar um método de biossíntese de nanopartículas de ouro com *Virola oleifera* (AuNPs) considerando diferentes variáveis que influenciam o tamanho e a forma destes, além disso se pretende avaliar a capacidade antioxidante e determinar a citotoxicidade em uma linhagem celular, a fim de compreender e avaliar os riscos que podem apresentar as AuNPs sintetizados com *Virola oleifera*.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS

A síntese das nanopartículas (NPs) tornou-se uma área de pesquisa particularmente importante, devido às múltiplas aplicações das nanopartículas, como biomédica, comunicação, engenharia, transporte, entre outras [9 ,10]. As NPs podem ser produzidas por dois métodos: métodos físicos consistindo na divisão de materiais, também conhecida em inglês como *top down*, e métodos químicos consistindo no crescimento de NPs partindo de precursores moleculares, que também são conhecidos em inglês como *bottom up* [11 ,12 13].

Os métodos físicos são baseados na subdivisão de metais em massa. Embora esses métodos sejam usados para preparar vários tipos de NPs [1], eles têm a desvantagem de serem ineficazes no controle de tamanho, forma estrutural e composição. Entre os métodos físicos mais utilizados são: Moagem mecânica, condensação de gás inerte, entre outros [14].

Os métodos químicos são possivelmente os mais utilizados para o desenvolvimento de NPs. Em geral, esses métodos são baseados na precipitação de um núcleo constituído por alguns átomos metálicos e seu crescimento subsequente. Se o processo de crescimento pode ser adequadamente controlado, é possível obter uma distribuição monodispersa do tamanho das NPs [15, 16, 17, 18].

O procedimento geral é realizado pela solução de sais contendo o metal específico. Na presença de um reagente com um pH adequado, os sais são decompostos, liberando os íons metálicos. Esses íons tendem a se unir formando partículas, e se o crescimento dessas partículas é bloqueado quando são pequenas (na faixa de nanômetros), as NPs são obtidas [14, 16, 17, 18].

Para bloquear o crescimento das partículas, estes métodos podem incluir agentes de revestimento (tensoativos) que aderem aos átomos de metal ou à superfície da partícula, impedindo a união de outros átomos, controlando assim o crescimento das NPs [19, 20]. Em outros casos, esses agentes interagem

fortemente com os átomos da superfície de NPs, modificando a carga eléctrica e, portanto, suas propriedades [21, 22].

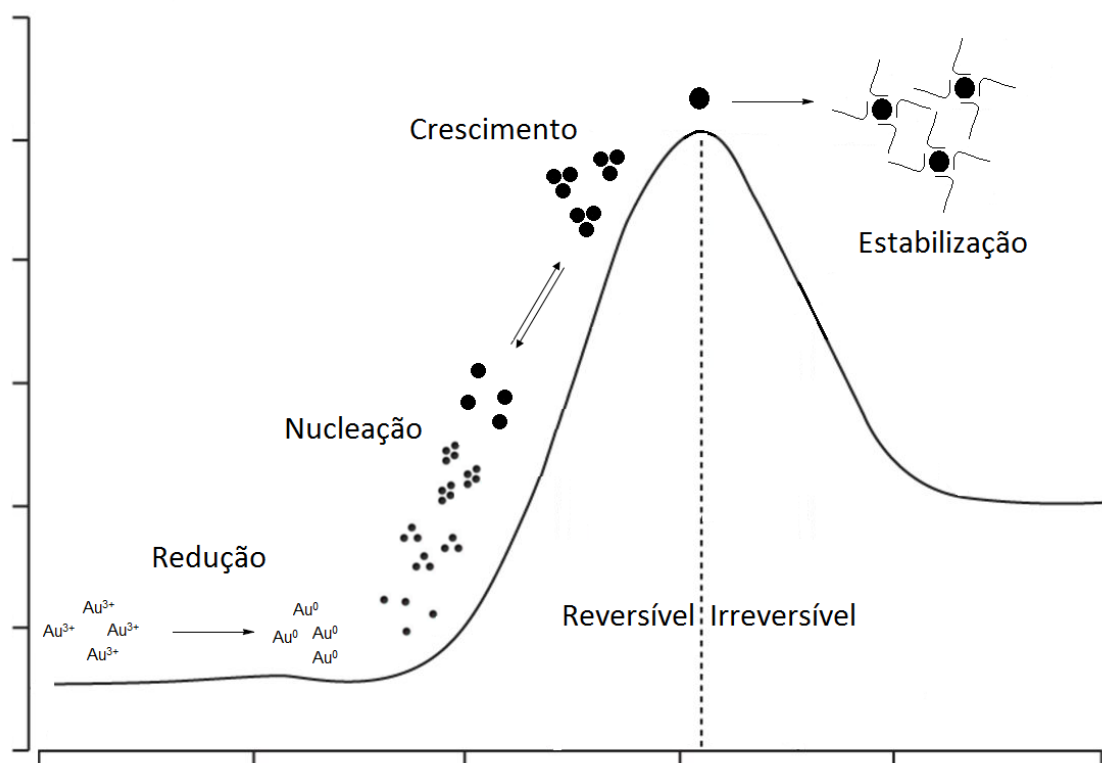
Existem alguns métodos químicos para a síntese de NPs entre eles são: Processos de Sol-Gel, Reação de Oxidação-redução, Processo de co-precipitação, Técnica de poliol, entre outros. Uma alternativa à utilização de agentes redutores químicos para a síntese de nanopartículas é o uso de materiais naturais, tais como plantas ou extratos dos mesmos [20, 21, 22, 23].

## 2.2. SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS

Um dos pilares de síntese verde é a utilização de plantas para obter extratos que são capazes de reduzir os cátions de uma solução de sal metálica. Estes materiais contêm compostos fenólicos, os taninos ou terpenos nas suas estruturas, que podem atuar como agentes de redução para a síntese de NPs de metal, As proteínas e aminoácidos serão os compostos estabilizantes e os fenóis ou partes de polifenóis os funcionalizadores [23, 24]. A utilização destes materiais vegetais representa uma alternativa muito interessante quando se sintetiza NPs, não só por ser um método alternativo para a utilização de reagentes químicos, mais por ser muito vantajoso de um ponto de vista ambiental; considerando que esses materiais são um recurso renovável, o uso de extratos de plantas é interessante para a sua atratividade econômica e sustentável [4, 5].

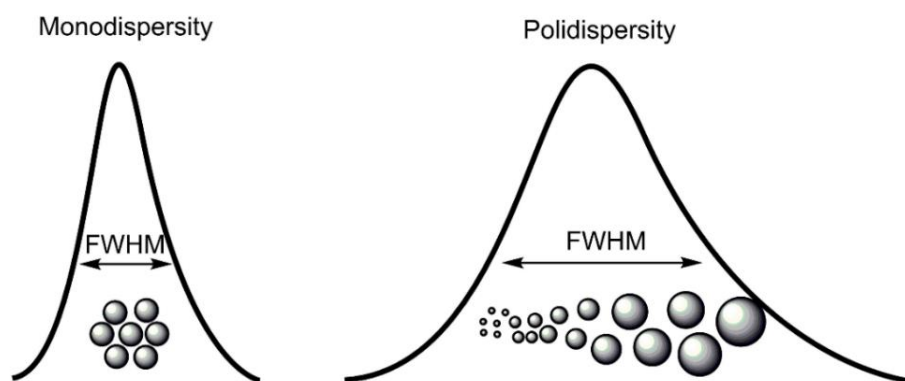
A teoria LaMer [25, 26] explica o mecanismo de nucleação e de crescimento na formação de nanopartículas na síntese química em quatro etapas (redução, nucleação, crescimento e estabilização). Na redução: os íons  $Au^{3+}$  são reduzidos a átomos  $Au^0$ , aumentando a concentração de  $Au^0$  até sua saturação. A nucleação ocorre por colisões entre átomos  $Au^0$  formando núcleos ou *clusters*. O crescimento das nanopartículas ocorre através de ligações dos átomos de ouro à superfície dos núcleos previamente formados, processo que pode ser reversível. Na estabilização o tamanho da partícula final é conseguido quando é consumido todo o reagente precursor e quando o tamanho das nanopartículas é termodinamicamente estável; a presença de estabilizantes é necessário para controlar o crescimento das nanopartículas. O resumo dos

mecanismos de síntese propostos por LaMer podem ser observados na Figura 1. [27, 28, 29, 30, 31].



**Figura 1.** Processo de crescimento das partículas de ouro. Fonte: Elaborado pelo autor.

A monodispersidade das nanopartículas é favorecida por nucleação rápida, ou seja, a formação simultânea dos núcleos antes de seu crescimento, por outro lado, quando os processos de nucleação e de crescimento ocorre no mesmo tempo as nanopartículas são polidispersas, ou seja, de tamanho e forma diferentes [23]. Em geral, quando o crescimento é uniforme o tamanho de partícula do núcleo de ouro é favorecido para formar nanoesferas, no entanto, o crescimento anisotrópico dos núcleos, em diferentes direções, favorece outras formas (Figura 2) [32].



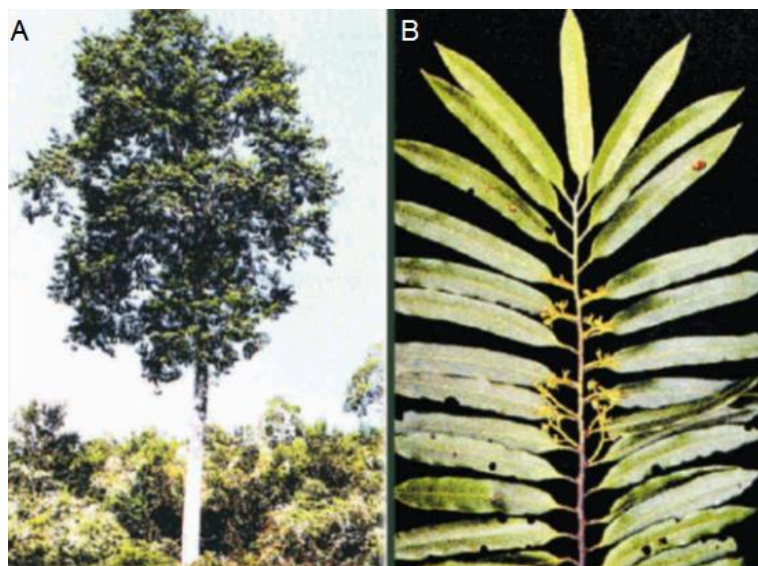
**Figura 2.** Esquema de espectros UV-Vis de nanopartículas monodispersas e polidispersas. Fonte: Oliveira et al., 2017.

Outra grande vantagem do uso de métodos de química verde é a capacidade para controlar o tamanho das nanopartículas por variação da concentração de extrato de planta utilizada sem o uso de agentes tensoativos, estabilizadores, entre outros [33, 34].

Neste contexto, a síntese verde de nanopartículas está sujeita a muitos aspectos flutuantes, tais como as condições de operação (temperatura, tempo, concentração, pH, agitação, entre outros) e a grande variabilidade dos extratos presentes nas plantas utilizadas para as sínteses [35]. Por isso é necessário estabelecer procedimentos padronizados para obter nanopartículas homogêneas em forma e tamanho, por métodos reprodutíveis. Sendo assim, a síntese de nanopartículas metálicas com extratos vegetais foi pesquisada e desenvolvida a nível laboratorial, mais apresenta grandes oportunidades de industrialização, graças aos seus processos ecológicos e de baixo custo [13, 14].

### 2.3. EXTRATO DE *Virola oleífera*

A *Virola oleífera* pertence à família Myristicaceae de ordem Magnoliales, é composta por 18 gêneros e cerca de 300 espécies de árvores e arbustos, especialmente encontrados em florestas tropicais [36, 37]. Na América esta espécie é encontrada da Costa Rica ao Peru e Brasil. No Brasil, encontra-se especialmente na região amazônica, com vários nomes comuns tais como: ucuúbas, bocuva, candeia de caboclo entre outros [38].



**Figura 3.** Fotografia de árvore de *Virola oleifera* (A), folhas de *Virola oleifera* (B).  
Fonte: Lorenzi, 1998.

As plantas da família Myristicaceae e especialmente algumas virolas têm sido estudadas desde meados do século XX, devido a crenças populares sobre a sua utilização, destacando-se como cicatrizante, estimulante cerebral, antibiótico, para o tratamento de reumatismo, tumores, erisipela e doenças respiratórias [37, 38].

*Virola oleifera* têm propriedades antioxidantes por causa de diversos compostos fenólicos e flavonóides que são parte dela, o que foi mostrado no trabalho de Bôa, *et al.*, 2015 [39, 40], que determinou que o extrato de *Virola oleifera* têm uma alta atividade antioxidante e contém ácido ferúlico, ácido gálico e quercetina, o que o torna o candidato ideal para a síntese de nanopartículas, uma vez que, como foi estabelecido na literatura, os polifenóis presentes em plantas desempenham um papel-chave na síntese de nanopartículas como agentes redutores e estabilizadores [39, 40].

Os antioxidantes são compostos que podem inibir ou retardar a oxidação de outras moléculas que inibem a iniciação e / ou propagação de reações em cadeia de radicais livres. Os antioxidantes são divididos principalmente em duas categorias que são: natural e sintética. Em geral os antioxidantes sintéticos são compostos de estruturas fenólicas com vários graus de substituição de grupos alquílicos, enquanto que os antioxidantes naturais incluem: compostos fenólicos (tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos),

compostos nitrogenados (derivados de clorofila, alcalóides, aminoácidos e aminas) ou carotenóides, bem como ácido ascórbico [27, 28].

Muitos antioxidantes naturais, especialmente os flavonóides, mostram uma grande variedade de efeitos biológicos, incluindo funções de antibacterianos, antivirais, anti-inflamatórios, antialérgicos, anti-trombótico e vasodilatador [28]. Uma terapia antioxidante fornece uma alternativa barata para o tratamento de doenças relacionadas com o stress oxidativo já que tem sido demonstrado o efeito antioxidante de produtos naturais a partir de plantas. A atividade antioxidante e a sua relação com as propriedades de cura de um grande número de plantas foram relatadas em várias investigações [28].

#### 2.4. NANOPARTÍCULAS DE OURO

As nanopartículas de metais nobres, especificamente, as nanopartículas de ouro (AuNPs), apresentam excelentes propriedades físicas, químicas e biológicas, (interação com luz, fototérmicas, solubilidade, catálise, etc.) intrínsecas ao seu tamanho nanométrico [31, 33]. As AuNPs podem ser produzidas em diferentes tamanhos e formas e podem ser facilmente funcionalizadas com uma ampla gama de ligantes (anticorpos, polímeros, sondas diagnósticas, medicamentos, material genético) [42].

As AuNPs têm grande interesse por sua fácil síntese, sendo inertes, não tóxicas e biocompatíveis. O tamanho das AuNPs variam de 1 a 150 nm, sendo suas propriedades ópticas e catalíticas que são dependentes do tamanho das partículas. As AuNPs esféricas exibem uma gama de cores (marrom, laranja, vermelho e púrpura) em solução aquosa à medida que o tamanho do núcleo aumenta de 1 a 100 nm e geralmente exibe uma faixa de absorção de 500 a 550 nm no visível [32, 33, 34]. Destacamse também suas propriedades fototérmicas, que, quando são ativadas na presença de um laser, liberam calor, atuando como autênticos "nano-aquecedores". O interesse na sua utilização tem aumentado por ser um candidato atraente no transporte específico de fármacos, de moléculas pequenas ou biomoléculas, tais como proteínas, ou ácidos nucleicos [35, 36].

As AuNPs apresentam um potencial extraordinário como agentes fototerapêuticos no tratamento do câncer. Estes absorvem na região do infravermelho próximo (NIR) (nanopartículas de ouro e nanorods) produzindo calor quando e permitindo excitados pela luz em comprimentos de onda de 500 a 800 nm. Isso permite que essas nanopartículas erradiquem tumores direcionados [36].

As nanopartículas de ouro também são usadas na fabricação de sensores graças às suas propriedades físico-químicas únicas, que são muito úteis para criar processos para o reconhecimento e transdução de sensores biológicos [43, 44].

Outros métodos, como a espectroscopia Raman de superfície melhorada, exploram nanopartículas de ouro como substratos para permitir a medição de energias vibratórias de ligações químicas. Esta estratégia também pode ser utilizada para a detecção de proteínas não marcadas, contaminantes e outras moléculas [45]. As nanopartículas de ouro também são usadas para detectar biomarcadores no diagnóstico de doenças cardíacas, cânceres e agentes infecciosos [46].

#### **2.4.1. Citotoxicidade das nanopartículas de ouro**

A citotoxicidade é um aspecto muito importante quando se pensa em aplicações biológicas das nanopartículas de ouro, havendo necessidade de se avaliar a toxicidade da nanopartícula sozinha e do agente estabilizador e / ou funcionalizador ligado à nanopartícula [44]. Em geral, as nanopartículas de ouro (com ou sem revestimento) mostram ser adequados para aplicações terapêuticas devido à sua absorção celular apropriada e baixa toxicidade [44, 46].

O grau de citotoxicidade das nanopartículas de ouro depende de seu tamanho, como relatado por Pan, *et al.*, 2007 [47], que avaliaram a citotoxicidade das nanopartículas de ouro de diferentes tamanhos; os resultados mostraram que os tamanhos das AuNPs influenciam seu comportamento, de modo que os menores apresentaram distribuição generalizada nos tecidos e maior toxicidade [44]. Resultados sobre toxicidade das AuNPs *in vivo* publicados até o momento



mostram que a citotoxicidade é fortemente determinada pelo tamanho de partícula [44, 48, 49].

Alguns estudos corroboram o fato de que a linhagem celular utilizada é um fator determinante na avaliação da citotoxicidade induzida pelas AuNPs [44, 49].

Os estudos disponíveis sobre a toxicidade de AuNPs são muito escassos e às vezes contraditórias. Por estas razões, é necessário desenvolver um maior número de estudos sobre os efeitos tóxicos das AuNPs, a fim de estabelecer condições seguras para seu uso nos diferentes campos de aplicação.

## 2.5. OTIMIZAÇÃO DE SÍNTESES QUÍMICAS

Para otimizar processos de síntese, condições de reação e métodos de análise entre outros, é necessário saber quais variáveis (fatores) influenciam significativamente o sistema e como eles o afetam, muitas vezes, esta informação não está disponível e é gerada pela experimentação [50, 51, 52]. O alto custo de experimentação e restrições de tempo tornam necessário executar apenas os experimentos essenciais. O método tradicional de variar um fator a cada vez não é geralmente a melhor opção, podendo envolver mais experimentos do que o necessário e, apesar disso, fornece apenas informações parciais. Por esta razão, o planejamento estatístico de experimentos contempla uma ampla variedade de estratégias experimentais permitem otimizar os parâmetros das variáveis envolvidas na síntese das nanopartículas[50, 51, 52].

### 2.5.1. Planejamento fatorial fracionado

O planejamento fatorial fracionado é um planejamento em que apenas se executam um subconjunto ou "fração" selecionado dos experimentos que estão incluídos no planejamento fatorial completo. Este tipo de planejamento é uma opção apropriada quando os recursos são limitados ou o número de fatores incluídos é grande, porque se usam menos experimentos que no planejamento fatorial completo. Ele tem o propósito de identificar efeitos significativos dos fatores utilizando experimentos pilotos [50, 51].

### **2.5.2. Planejamento fatorial completo**

O planejamento fatorial completo descreve as experiências mais adequadas para conhecer simultaneamente que efeito têm os fatores em uma resposta e descobrir se eles interagem uns com os outros. Os experimentos são planejados de tal forma que vários fatores são variados simultaneamente, evitando-se experimentos redundantes. Além disso, a informação procurada é obtida combinando as respostas de todos os experimentos. Isso permite obter a informação com o número mínimo de experimentos e com a menor incerteza possível, ou seja, permite conhecer a melhor relação entre a resposta e os fatores importantes [48, 49, 50].

## **2.6. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS**

A caracterização das nanopartículas fornece informações sobre as nanopartículas sintetizadas, informações tais como a forma, o tamanho, a concentração, estado de distribuição, os grupos funcionais dos compostos que estão estabilizando e / ou funcionalizando as nanopartículas, entre outros. Existem diferentes técnicas para caracterizar os coloides, tais como: espectroscopia de absorção ultravioleta visível (UV-visível), espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR), espectroscopia Raman, potencial zeta (PZ), espalhamento dinâmico de luz (DLS) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

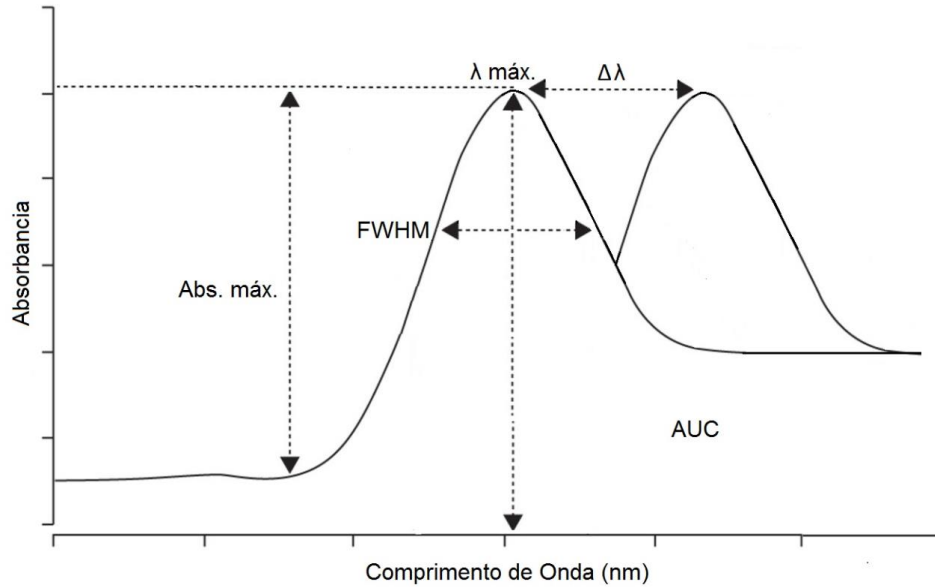
### **2.6.1. Caracterização da forma, a concentração e estado de agregação por espectroscopia UV-vis**

A espectroscopia UV-Vis, é talvez a caracterização primária mais simples ao avaliar os produtos da síntese de nanopartículas. A técnica pode ser utilizada para vários sistemas, sendo especialmente útil para caracterizar nanopartículas metálicas, uma vez que possuem um espectro de absorção diferente dependendo da natureza do material, da forma e do tamanho da partícula, o que pode ser explicado de acordo com o conceito de plasmon de superfície [53, 54].

As nanopartículas de metal nobre, também conhecidos como nanopartículas plasmônicas, apresentam a ressonância de plasmon de superfície (SPR,

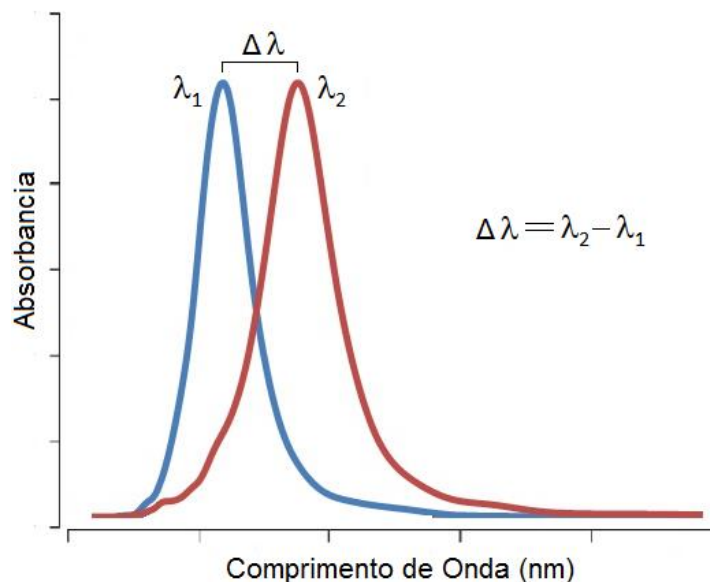
Surface Plasmon Resonance), que é o resultado da exposição de uma partícula do metal por um feixe de luz, gerando um campo eletromagnético oscilante da radiação incidente indutor de uma oscilação coletiva de elétrons livres (elétrons da banda de condução) do metal. Esta oscilação eletrostática em torno da superfície da partícula provoca uma separação de carga resultando numa oscilação dipolar na direção do campo eletromagnético da radiação. A amplitude da oscilação alcança um pico máximo a uma frequência específica, chamado a Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR). A oscilação dipolar está em ressonância com a radiação incidente a uma frequência específica, dependendo do tamanho e forma da nanopartícula. A banda SPR induz uma forte absorção da radiação incidente e, portanto, pode ser medida utilizando um espectrômetro de absorção UV-Visível. A banda SPR em nanopartículas (de metais nobres, em especial Au e Ag) está localizado na região do visível e é muito mais elevada do que em outros metais, com bandas menos intensas na região do UV. A intensidade e comprimento de onda da banda SPR depende de fatores que afetam a densidade dos elétrons na superfície da nanopartícula, como o tipo de metal, tamanho e forma da nanopartículas, estrutura, composição e a constante dielétrica do meio, tal como foi descrito na teoria do Mie. As AuNPs mostram uma SPR cerca de 520 nm na região do visível. Com o aumento do tamanho das partículas, o comprimento de onda da banda SPR se desloca para comprimentos de onda mais longos e intensidade também aumenta [53, 54].

O estudo do espectro de UV-visível de uma solução de nanopartículas podem fornecer informações sobre a sua concentração, o estado de agregação, o tamanho, a estabilidade entre os outros. Esta informação é obtida pelos valores da: Absorbância máxima (Abs máx.), Largura à meia altura (FWHM, por suas siglas em Inglês Full Width at Half Maximum), Lambda máxima ( $\lambda$  máx.), Área sob a curva (AUC), Delta Lambda ( $\Delta\lambda$ ), como é mostrado na Figura 4 [54, 55].



**Figura 4.** Variáveis que fornecem informações sobre as nanopartículas. Fonte. Elaborado pelo autor.

A variável resposta que foi utilizada neste trabalho foi Delta Lambda ( $\Delta\lambda$ ) que nos permite conhecer o deslocamento batocrômico (deslocamento de Lambda ( $\lambda$ ) para a direita), mostrando o crescimento das nanopartículas como pode ser observado na Figura 5 [56].



**Figura 5.** Deslocamento do variável lambda (Delta Lambda). Fonte. Elaborado pelo autor.

### 2.6.2. Caracterização estrutural de nanopartículas

A difratometria de raios X (XRD) é uma técnica versátil aplicada principalmente à determinação das estruturas moleculares e geometrias de compostos

químicos e à identificação de substâncias, a partir de padrões de difração característicos que podem ser usados como "impressões digitais" [57, 58].

Esta técnica baseia-se nas interações entre o feixe de raios X e o material, dando origem a uma série de raios difratados cujo padrão de interferência contém informações sobre as posições relativas dos átomos que compõem o material em estudo. Em outras palavras, se o padrão de difração resultante for conhecido, em princípio, podemos construir o caminho inverso para as estruturas periódicas das moléculas que definem as substâncias químicas. Para isso, é necessário ter cristais bem definidos, onde as posições relativas dos átomos que compõem o cristal são fixas, de modo que o padrão de difração resultante é característico da substância do estudo [59, 60].

### **2.6.3. Caracterização da forma, tamanho e distribuição por microscopia eletrônica de transmissão**

Uma das técnicas mais comuns para a caracterização de nanopartículas metálicas é a microscopia eletrônica de transmissão (MET). O que nos dá informações sobre a estrutura, forma, tamanho e distribuição das partículas por imagem.

### **2.6.4. Caracterização do tamanho hidrodinâmico e estabilidade**

A técnica de dispersão de luz dinâmica (DLS) fornece informação sobre o tamanho hidrodinâmico das nanopartículas, e está baseada no movimento browniano (movimento de partículas devido à colisão aleatória com as moléculas do líquido ao seu redor e entre as próprias partículas que estão no meio) relacionando isto ao tamanho das partículas [61].

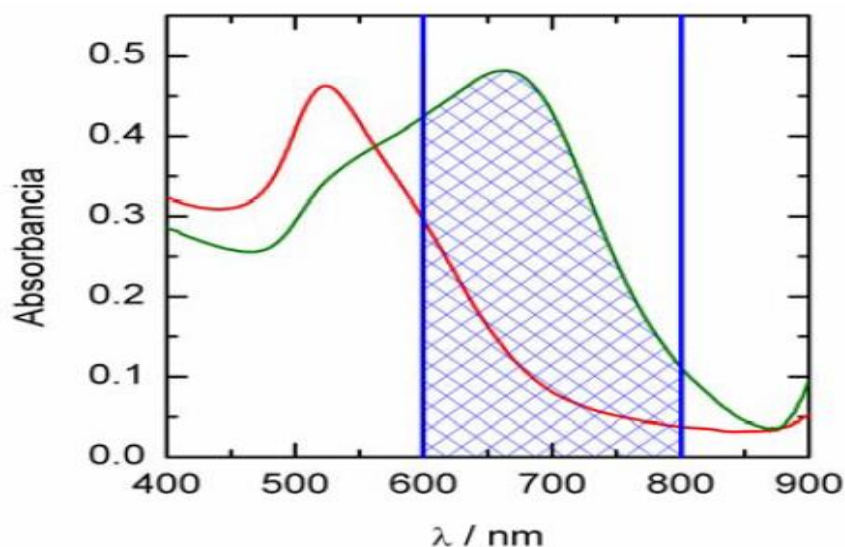
Medindo o movimento de nanopartículas carregadas em solução, na presença de um campo elétrico se determina o potencial zeta, que é definido como o potencial elétrico devido aos íons na camada difusa e a solução. Os valores absolutos de potencial zeta superior a 30 mV indicam que as nanopartículas possuem uma elevada estabilidade e aqueles com valores absolutos menores do que 10 mV pode ser considerar neutra [62]. Como as nanopartículas com um alto potencial zeta se repelem umas com outras, a sua interação não é favorável. Em vez disso, as nanopartículas com baixo valor de potencial zeta

são mais propensas a agregação porque não há força repulsiva significativa. Entre os fatores que influenciam o potencial zeta são o pH e a condutividade [63, 64, 30].

Outra maneira de avaliar a estabilidade das nanopartículas é conhecendo o grau de floculação das nanopartículas, já que os sistemas coloidais são pouco estáveis. Existem vários agentes, físicos e químicos, capazes de desestabilizar os coloides. O objetivo de alcançar a floculação das partículas é superar as forças repulsivas, que podem ser conseguidas mecanicamente, como no caso de centrifugações e / ou liofilizações, diminuindo as distâncias entre as partículas ou por métodos físico-químicos, que envolvem todos aqueles capazes de modificar o tamanho da dupla camada eléctrica. Exemplos destes últimos são a adição de um sal, alterações no pH ou a adição de qualquer molécula capaz de modificar a superfície da nanopartícula [65, 66, 67].

A possibilidade de caracterizar a estabilidade das nanopartículas metálicas por esta técnica baseia-se na observação de que a banda plasmons de superfície destas nanopartículas é deslocada para maiores comprimentos de onda quando ocorre o fenómeno da aglomeração. O efeito observado foi descrito como uma consequência do acoplamento dos plasmons de superfície quando as partículas entram em contato. Além disso, quanto maior o número de partículas em contato, maior o acoplamento e consequentemente maior o deslocamento da banda [68, 69, 70].

A determinação da extensão da agregação ou floculação que ocorre nas partículas em solução pode ser realizada por um método proposto por Whitesides *et al.*, 1996 [68], que consiste na integração da região espectral entre 600 e 800 nm (Figura 6), ou seja, a região sensível deste fenómeno. Esta medida normalizada é tomada como um parâmetro indicativo do grau de floculação.



**Figura 6.** Espectros de absorção de uma solução de AuNPs que limita a região espectral entre 600 e 800 nm em que a integração é realizada, facilitando a medição do grau de floculação. A área sombreada corresponde a essa magnitude. Fonte: Viudez Navarro, 2011.

### 2.6.5. Análise de superfície

A identificação das biomoléculas que estão ligadas as nanopartículas é realizada por meio de duas técnicas complementares que são: FTIR e Raman; já que o espectro infravermelho verifica as características dos estiramentos e das deformações provocadas pela radiação em uma determinada substância química, sendo assim, o espectro resultante apresenta as características de todo o ambiente onde as nanopartículas estão inseridas, por outro lado o espectro Raman pode identificar o grupo químico estabilizador ou funcionalizador sem captar os demais grupos presentes no meio [71, 72, 73].

A espectroscopia na região do infravermelho não fornece a informação do tamanho ou a estrutura de nanopartículas de metal. A informação fornecida é a interação dos grupos funcionais dos compostos que estão estabilizando as nanopartículas. Baseia-se no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibrações específicas, as quais correspondem a níveis de energia das moléculas (chamados de níveis vibracionais) [74, 41, 75, 76]. Os níveis de vibração das moléculas dependem de vários fatores, como geometria molecular, massas dos átomos e acoplamento de vibrações. Se a molécula receber radiação eletromagnética com a mesma energia de uma

dessas vibrações, a luz será absorvida somente se a molécula sofrer uma vibração no seu momento dipolar resultante [77].

A espectroscopia Raman ocupa hoje uma posição destacada dentre as técnicas usadas na investigação das estruturas presentes na superfície das nanopartículas, com base à energia vibracional dos átomos, representado a “impressão digital” das moléculas [78, 79, 80, 81]. Esta frequência de vibração permite descobrir como os átomos estão ligados, ter informação sobre a geometria molecular, sobre como as espécies químicas presentes interagem entre si e com o ambiente [81].

## 2.7. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTOXICIDADE

### 2.7.1. Determinação da atividade antioxidante das nanopartículas de ouro

Vários compostos cromogênicos (ABTS, DPPH, DMPD, DMPO e FRAP) são usados para determinar a capacidade dos compostos fenólicos de capturar os radicais livres gerados, operando assim contra os efeitos prejudiciais dos processos de oxidação, que envolvem espécies reativas de oxigênio (EROS) [82, 83].

A molécula de 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH) é conhecida como um radical livre estável devido a deslocalização de um elétron desemparelhado em a molécula completa, em que a molécula não é dimerizada, como é o caso de a maioria dos radicais livres. A deslocalização de elétron também intensifica a cor violeta profundo típico do radical, que absorve a 517 nm em metanol. Quando a solução de DPPH reage com o substrato antioxidante pode doar um átomo de hidrogênio. A mudança de cor é monitorada espectrofotometricamente e é usado para determinar os parâmetros das propriedades do antioxidantes [42, 84, 85].

O ensaio de ABTS+, consiste em uma técnica de branqueamento, em que o radical é gerado diretamente de uma forma estável antes da reação com os antioxidantes [86, 87, 88]. A geração do radical ABTS+, envolve a produção



directa do cromóforo ABTS + verde-azul através da reação entre o ABTS e persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ). Isto tem três máximos de absorção em comprimentos de onda de 645 nm, 734 nm e 815 nm . A adição de antioxidantes ao radical pré-formado reduz a ABTS. Assim, o grau de descoloração como o percentual de inibição de radical ABTS+ é determinado em função da concentração e do tempo; assim como o valor correspondente, utilizando o Trolox como padrão, sob as mesmas condições. [89].

### **2.7.2. Determinação da citotoxicidade das nanopartículas de ouro**

Os ensaios de citotoxicidade celular são um componente importante de qualquer bateria de ensaios utilizados para prever a toxicidade de substâncias em vários tecidos e para determinar doses iniciais de toxicidade; Além disso, a capacidade de um produto provocar uma resposta corrosiva ou tóxica pode ser predita com sucesso usando os marcadores apropriados que mostram o grau de dano causado pela substância avaliada [90, 91, 92].

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. GERAL

- Desenvolver uma rota de síntese verde de nanopartículas de ouro usando resina *Virola oleifera* através do planejamento fatorial.

#### 3.2. ESPECÍFICOS

- Conhecer as variáveis que influenciam a síntese verde de nanopartículas de ouro com resina de *Virola oleifera*.
- Caracterizar as nanopartículas de ouro com respeito ao tamanho, forma, a estabilidade e os grupos funcionais presentes na superfície das nanopartículas de ouro.
- Determinar as propriedades antioxidantes da resina de *Virola oleifera* e das nanopartículas de ouro.
- Avaliar a atividade citotóxica de nanopartículas de ouro.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

A síntese padrão de nanopartículas foi realizada a temperatura ambiente com uma proporção de 1/3, ou seja, uma parte de sal de ouro e três partes de extrato de planta.

Todas as vidrarias utilizadas para a síntese foram previamente lavadas com água régia (HNO<sub>3</sub>/ HCl, na proporção 1/3), depois com água destilada várias vezes para remover as impurezas que possam afetar a formação das AuNPs. Os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico e a água ultrapura que foi utilizado para preparar as soluções foi obtida pelo sistema Milli-Q da Millipore 18cm.

### 4.1. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES DE *Virola oleifera* E HAuCl<sub>4</sub>

O extrato de *V. oleifera* foi obtido tal como é descrito no Anexo I. O NaOH 0,1 mol/L, foi utilizado para a preparação das soluções com diferentes pHs da *V. oleifera*. A concentração das soluções de *V. oleifera* utilizado para a síntese foi de 5mg.ml<sup>-1</sup> [48].

O reagente precursor das nanopartículas de ouro utilizado foi uma solução aquosa padrão de HAuCl<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) em uma concentração de 2,5 x10<sup>-4</sup> mmol/L determinada por estudos anteriores do grupo de pesquisa [93]. As medições dos espectros UV-Visível foram realizadas com água ultrapura como branco em todos os casos.

### 4.2. OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS COM *V. oleifera*

#### 4.2.1. Pré-fatorial

Com base nos parâmetros revistos na literatura estabeleceu-se as variáveis de análise para o pré-fatorial, conforme pode ser observado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Variáveis e parâmetros estudados.

Variáveis	Níveis Estudados	Referencias
Concentração do extrato (mg/ml)	0,5; 1; 3; 5; 8; 10.	[11, 93, 104, 105, ]
Tempo de reação (min)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20.	[8, 15, 93, 104, 105, ]
Temperatura (°C)	25 (ambiente), 30, 50, 70, 90.	[8, 15, 22, 93, 104, 105, ]
pH do extrato	2,5; 3; 3,5; 4,7 (normal); 6,5; 7; 7,5; 8; 9; 10; 10,5; 11; 11,5.	[11, 22, 93, 104, 105, ]
Agitação (rpm)	150, 250, 400, 800, 1000.	[93, 104, 105, ]

A síntese de nanopartículas de ouro foi feito usando extrato *Virola oleifera*, a uma concentração constante de ácido tetracloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>) 2,5 x10<sup>-4</sup> mM. Após a síntese de nanopartículas de ouro foi realizada espectroscopia de UV-visível com a finalidade de conhecer individualmente a influência de cada uma das variáveis estudadas, sendo a variável resposta utilizada o Delta Lambda.

#### 4.2.2. Planejamento fatorial fracionado

Para estabelecer uma via de síntese confiável e reproduzível de nanopartículas de ouro usando *V. oleifera* foi realizada um Planejamento fatorial 2<sup>(5-1)</sup>, para o qual anteriormente foi feito a análise da influência de cada variável separadamente (pre-fatorial) para conhecer de modo mais adequado os parâmetros do estudo como é apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Variáveis e valores assumidos pelos níveis do planejamento fatorial fracionado.

Fatores	Níveis Estudados	
	Baixo (-)	Alto (+)
Tempo (min)	1	20
Temperatura (°C)	25	80
pH	4,7	8
Concentração (mg.mL <sup>-1</sup> )	5	10
Agitação (rpm)	50	200

A matriz do planejamento fatorial fracionado 2<sup>5-1</sup> com os respectivos valores estudados são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Tabela do planejamento fatorial fracionado das 16 sínteses de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de *Virola oleifera*.

# de ensaio	Fatores estudados				
	Tempo (min)	Concentração (mg/ml)	pH	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)
1	(-) 1	(-) 5	(-) 4,7	(-) 25	(+) 200
2	(+) 20	(-) 5	(-) 4,7	(-) 25	(-) 50
3	(-) 1	(+) 10	(-) 4,7	(-) 25	(-) 50
4	(+) 20	(+) 10	(-) 4,7	(-) 25	(+) 200
5	(-) 1	(-) 5	(+) 8	(-) 25	(-) 50
6	(+) 20	(-) 5	(+) 8	(-) 25	(+) 200
7	(-) 1	(+) 10	(+) 8	(-) 25	(+) 200
8	(+) 20	(+) 10	(+) 8	(-) 25	(-) 50
9	(-) 1	(-) 5	(-) 4,7	(+) 80	(-) 50
10	(+) 20	(-) 5	(-) 4,7	(+) 80	(+) 200
11	(-) 1	(+) 10	(-) 4,7	(+) 80	(+) 200
12	(+) 20	(+) 10	(-) 4,7	(+) 80	(-) 50
13	(-) 1	(-) 5	(+) 8	(+) 80	(+) 200
14	(+) 20	(-) 5	(+) 8	(+) 80	(-) 50
15	(-) 1	(+) 10	(+) 8	(+) 80	(-) 50
16	(+) 20	(+) 10	(+) 8	(+) 80	(+) 200

#### 4.2.3. Análise estatística e definição da variável resposta

A análise estatística foi realizada utilizando o software STATISTICA 10.0, (versão gratuita) no qual se fez a análise de variância (ANOVA) e Diagrama de Pareto, com um 95% de confiança ( $p < 0,05$ ) a cada uma das variáveis respostas (Área da curva, FWHM, Lambda máxima, Absorbância máxima, Delta Lambda) com a finalidade de escolher e trabalhar com a variável resposta que fornece informação estatisticamente significativa.

#### 4.2.4. Planejamento fatorial completo

Con base na informação proporcionada no planejamento fatorial fracionado e na análise estatística foram definidas as variáveis mais significativas no processo de síntese, as que foram escolhidas para a otimização. A Tabela 4 apresenta os intervalos de estudo das variáveis.

**Tabela 4.** Intervalos de estudo das variáveis do planejamento fatorial completo.

Variável	Intervalo de Estudo		
	Baixo (-)	Central (0)	Alto (+)
pH	4,7	7,7	10,7
Tempo (min)	1	6	11

O planejamento fatorial completo, foi feito com 11 sínteses e suas respectivas condições se apresenta na Tabela 5.

**Tabela 5.** Matriz do planejamento fatorial completo das 11 sínteses de nanopartículas de ouro com extrato de *Virola oleifera*.

Ensaio	pH	Tempo (min)
1	(-) 4,7	(-) 1
2	(-) 4,7	(o) 6
3	(-) 4,7	(+) 11
4	(o) 7,7	(-) 1
5	(o) 7,7	(o) 6
6	(o) 7,7	(+) 11
7	(+) 10,7	(-) 1
8	(+) 10,7	(o) 6
9	(+) 10,7	(+) 11
10	(o) 7,7	(o) 6
11	(o) 7,7	(o) 6

### 4.3. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FÍSICO-QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

Para a caracterização físico-química das nanopartículas foram utilizadas diferentes técnicas e equipamentos mesmo são descritos abaixo.

#### 4.3.1. Espectroscopia de absorção no UV-vis

O espectrofotômetro Evolution® 300 ThermoScientific do Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares da Universidade Federal do Espírito Santo – LABIOM/UFES, foi utilizado para obtenção dos dados de absorbância das nanopartículas de ouro entre 200 a 800 nm com intervalo de 1nm e velocidade de varredura de 240 nm/min, como branco foi utilizado água ultrapura. O resultado foi expresso por meio de gráficos de absorbância por comprimento de onda (nm) obtidos pelo software OriginPro 8.0 (versão gratuita).

#### **4.3.2. Difração de raios X**

Para a análise de raios X, o coloide de ouro sintetizado com o extrato vegetal foi concentrado por centrifugação (10.000 rpm, 20 min) e dessecado na estufa a 50 °C. Um filme da amostra foi colocado em uma lâmina de vidro e a varredura foi realizada na região  $2\theta$ , de 30° a 90°, sendo 0.01° por minuto, com uma constante de tempo de 2 segundos utilizando o difratômetro de Burke PW 1710 (Cu  $k\alpha$  radiação). As medidas foram realizadas no Laboratório de Instrumentação do LabPetro da UFES.

#### **4.3.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Foi utilizado para analisar forma e tamanho das nanopartículas um microscópio eletrônico de transmissão JEM-1400, JEOL, USA inc. operado a 120kv com filamento de hexaboreto de lantânio (LaB<sub>6</sub>).

Aproximadamente 50µL da amostra foi gotejada sobre uma lâmina de vidro até a desidratação parcial. Uma grade de cobre de 400 mesh contendo um filme de polímero Formvar foi passada lentamente sobre a amostra. A grade foi seca a temperatura ambiente por 30 minutos e posteriormente foi realizada a contrastação negativa com acetato de uranila. Esta etapa foi realizada para a observação dos compostos orgânicos aderidos à superfície do metal. As imagens foram obtidas em diferentes aumentos (50.000X, 300.000X, 1.000.000X) com o objetivo de obter informações sobre a forma, o tamanho e aglomerações. Para determinação do diâmetro médio das partículas, 500 partículas foram analisadas no software Image J. (versão livre).

#### **4.3.4. Espectroscopia no Infravermelho**

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 o coloide metálico sintetizado e uma amostra do extrato vegetal de *Virola oleifera* foram secos na estufa a 50 °C.

#### **4.3.5. Espectroscopia Raman**

Para a análise em Espectroscopia Raman (ALPHA 300R Confocal Raman Spectrometer) utilizando fonte de laser de 532 nm, medidas foram realizadas

varrimento na região do número de onda de 500 - 3500  $\text{cm}^{-1}$ . O extrato vegetal de *Virola oleifera* foi utilizado como controle. As amostras das nanopartículas de ouro y *Virola oleifera* (controle) foram preparadas através de uma gota sobre a superfície de vidro e foram secos na estufa a 50 °C.

#### 4.3.6. Potencial Zeta e Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

As amostras foram analisadas no instrumento analisador de partículas Microtrac Zetatrac no Instituto Federal do Espírito Santo – IFES, de Aracruz/ES utilizando cerca de 2mL da superfície coloidal. Os valores foram expressos em mV.

#### 4.3.7. Grau de Floclulação

A influência da força iônica sobre a estabilidade da suspensão de AuNPs foi feita da seguinte maneira: Foram adicionadas diferentes soluções de NaCl (500  $\mu\text{L}$ ) em diferentes concentrações e soluções (500  $\mu\text{L}$ ) de pH diferentes, para um volume fixo de AuNPs (500  $\mu\text{L}$ ), conforme é observado na Tabela 6, finalmente, foi feito espectros de absorção das soluções, registradas após 30 minutos de reação da adição das soluções de sal e pH.

**Tabela 6.** Matriz dos parâmetros para a análise de grau de floclulação.

	NaCl (mmol/ml)										
<b>AuNPs-pH4,4</b>	0,05	0,1	0,5	1	2,5	5	10	25	50	100	200
<b>AuNPs-pH7,7</b>	0,05	0,1	0,5	1	2,5	5	10	25	50	100	200
<b>AuNPs-pH10,7</b>	0,05	0,1	0,5	1	2,5	5	10	25	50	100	200
	pH										
<b>AuNPs-pH4,4</b>	1	3	5	7	9	11	13				
<b>AuNPs-pH7,7</b>	1	3	5	7	9	11	13				
<b>AuNPs-pH10,7</b>	1	3	5	7	9	11	13				

#### 4.4. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTOCICIDADE



#### 4.4.1. Método do radical DPPH · (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)

Baseia-se na redução do radical por absorção de um átomo de hidrogénio presente na molécula antioxidante. O método é baseado na quantificação da diminuição da absorvância a 515 nm. Esta metodologia é, principalmente, utilizada na determinação do antiradical de compostos fenólicos.

#### 4.4.2. Método ABTS+

Mede a capacidade de um composto para reduzir o radical catiónico ABTS · + (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato) avaliando a diminuição da absorvância a 734 nm expressa em relação à atividade do padrão Trolox.

#### 4.4.3. Cultivo de células J774A.1

A linhagem celular J774A.1 de macrófagos de camundongos cultivado em garrafas de cultura celular de plástico, com o tamanho de 125 cm<sup>2</sup>, com meio RPMI 1640, sem antibiótico, suplementado com 10% de soro fetal bovino, L-glutamina e NaCO<sub>3</sub>. As células foram mantidas em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, para crescimento. A remoção das células, para serem utilizadas nos testes, foi feito com *cell scraper*, seguindo da contagem das mesmas em câmara de Neubauer com a coloração pelo corante azul de Trypan.

#### 4.4.4. Avaliação da Citotoxicidade celular

Para se avaliar os efeitos citotóxicos das AuNPs, foi feito testes *in vitro* foram realizada a linhagem celular J774A.1. Foi colocado 100µL de células, com a concentração de 5x10<sup>4</sup> 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, após isso foi colocado as AuNPs a diferentes concentrações. Após a incubação por 48 horas, a viabilidade celular foi verificada através do corante alamarBlue®. As amostras foram lidas no aparelho espectrofotômetro Varioskan® Flash. Os dados foram analisados através do programa Microsoft® Excel®, através da fórmula:

$$\text{Intensidade} = \text{Fluorescência média}_{\text{Amostra}} - \text{Fluorescência média}_{\text{Branco}}$$

$$\% \text{ Inibição} = \left[ \left( \frac{\text{Intensidade}_{\text{Amostra}}}{\text{Intensidade}_{\text{Controle}}} \right) - 1 \right] \times 100$$

Após a obtenção das porcentagens de inibição, os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 7 (Versão gratuita), para análise de regressão não-

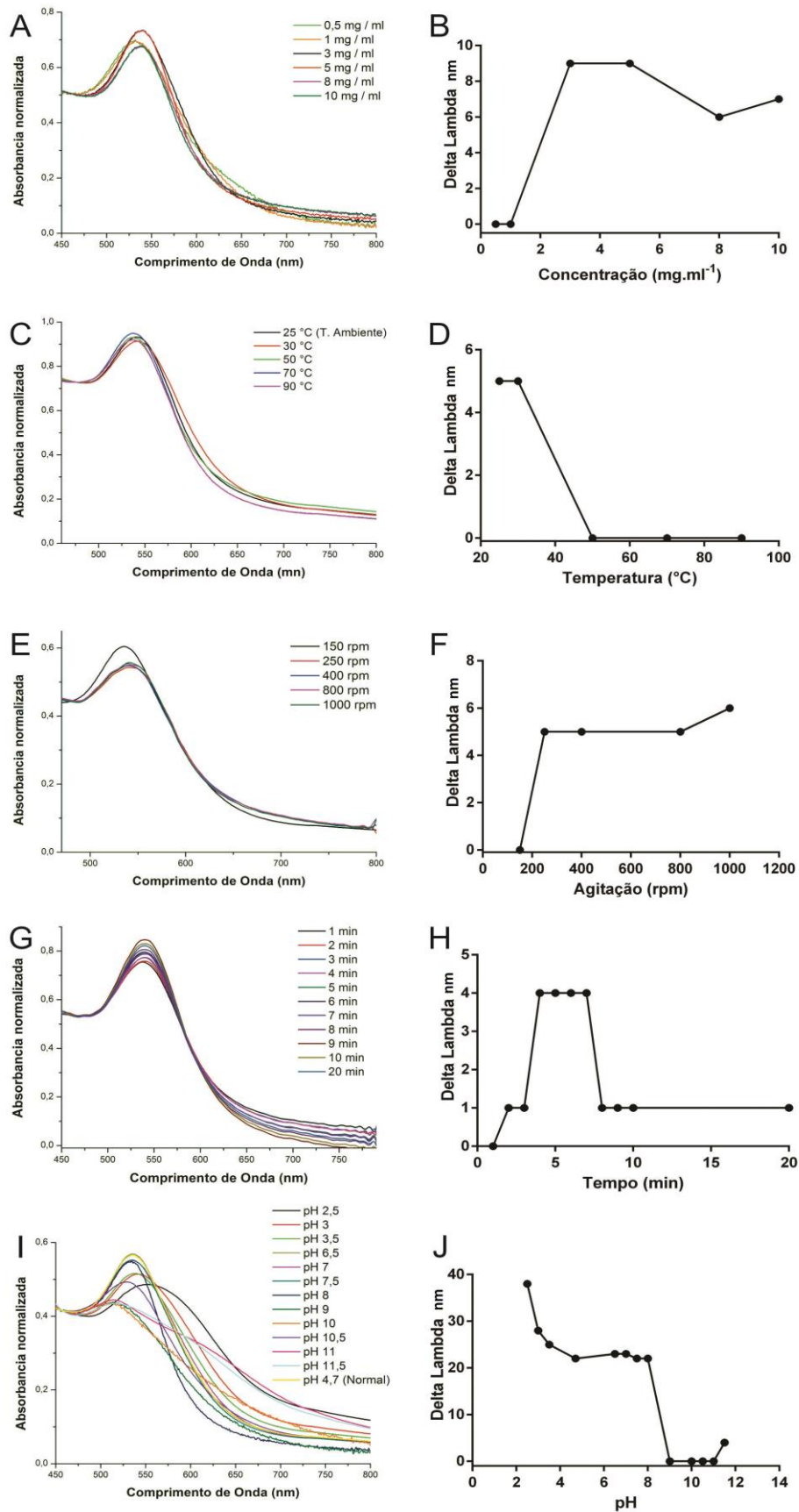
linear, onde foi possível se chegar ao IC50 (media de inibição da substância) das AuNPs nas diferentes concentrações testadas. Os dados foram expressos como media  $\pm$  desvio padrão.

## 5. RESULTADO E DISCUSSÃO

### 5.1. OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS COM *V. oleifera*

#### 5.1.1. Pré-fatorial

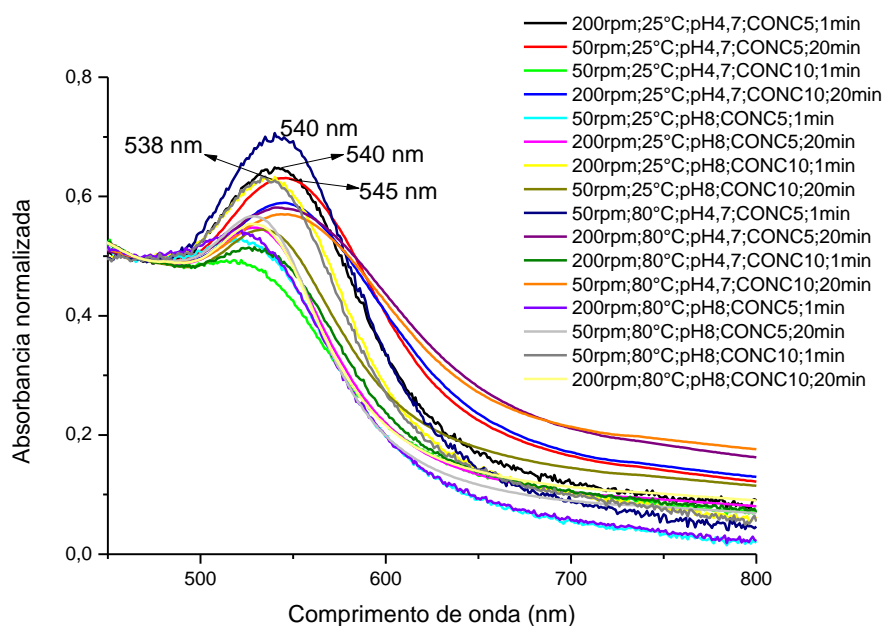
Com o intuito de definir as variáveis a serem estudadas, uma investigação inicial detalhada (pré-fatorial) foi realizada conforme seção 4.2.1 abrangendo diversas variáveis em diferentes níveis descritos na literatura. O espectro de absorção UV-Visível foi utilizado para conhecer de maneira prévia a influência de cada variável no processo de síntese. A Figura 7 apresenta os espectros de absorção na região do UV-visível e os gráficos mostrando a influência de cada variável no Delta lambda ( $\Delta\lambda$ ). Na variável concentração (7A e 7B) foi possível perceber que acima de 3 mg/ml não apresenta muita variação na síntese de nanopartículas de ouro. Na variável Temperatura (7C e 7D), foi observado que a 25 °C os espectros UV-Vis apresentam um maior comprimento de onda e que acima de 50 °C, a temperatura não altera a síntese. Na variável Agitação (7E e 7F) notou-se que acima de 200rpm não existe maior variação na síntese (usando um balão Erlenmeyer de 50 ml). Na variável Tempo (7G e 7H) não influencia a síntese. Finalmente para a variável pH (7I e 7J), pode ser observado que entre o pH 4 e 8 não existe muita variação no processo de síntese e acontece a mesma coisa entre o pH de 9 a 11.



**Figura 7.** UV-Vis, das sínteses feitas com intervalos de estudo e gráfico da variável resposta utilizada Delta Lambda ( $\Delta\lambda$ ). Concentração (A. B.), Temperatura (C. D.), Agitação (E. F.), Tempo (G. H.), pH (I. J.).

### 5.1.2. Análise estatística

O planejamento fatorial fracionado  $2^{5-1}$  foi utilizado para definir quais variáveis são as mais significativas no processo de síntese de nanopartículas metálicas monodispersas. A Figura 8 apresenta os espectros de absorção evidenciando os deslocamentos do pico de absorção máxima de cada experimento de acordo a matriz experimental mostrado na tabela 3.



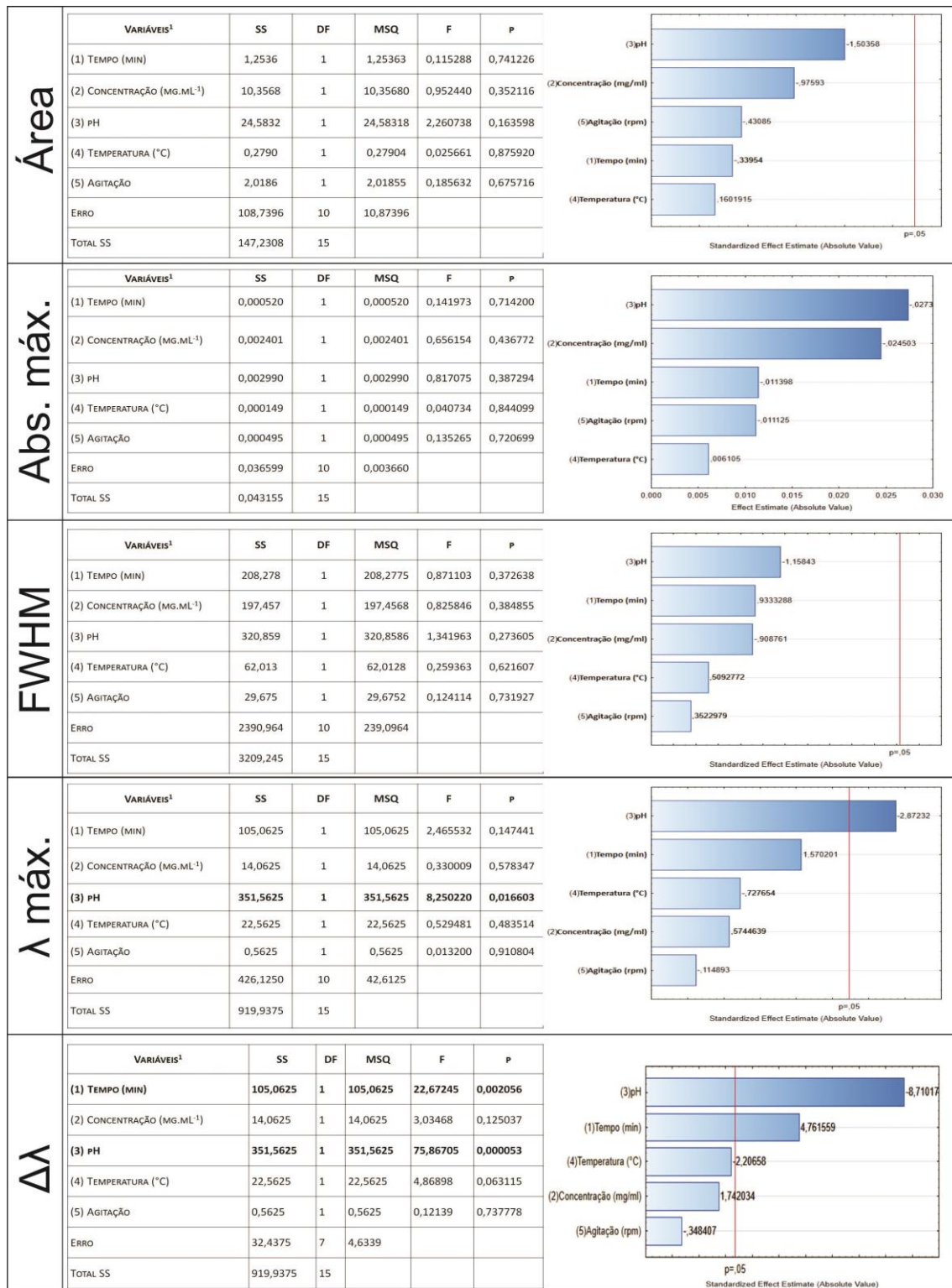
**Figura 8.** UV-Vis, das 16 sínteses de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de *Virola oleifera*.

A análise estatística de todas as variáveis respostas (Área da curva, FWHM, Absorbância máxima, Lambda máxima e Delta lambda) foi feito com base nas condições experimentais que foram: tempo (min), concentração do extrato ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), pH, temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e agitação (rpm) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Tabela do planejamento fatorial fracionado das 16 sínteses de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de *Virola oleifera*. E as variáveis respostas utilizadas.

# de ensaio	Variáveis estudadas						Variáveis Respostas			
	Tempo (min)	Concentração (mg/ml)	pH	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Área	FWHM	Abs. máx.	$\lambda$ máx.	$\Delta\lambda$
1	1	5	4,7	25	200	7,89515	52,45592	0,15511	540	18
2	20	5	4,7	25	50	7,59821	55,63638	0,13921	546	24
3	1	10	4,7	25	50	0,21482	0,97767	0,01305	529	7
4	20	10	4,7	25	200	4,84706	50,82811	0,09817	545	23
5	1	5	8	25	50	0,88017	29,96065	0,03391	522	0
6	20	5	8	25	200	1,77641	31,25382	0,05818	529	7
7	1	10	8	25	200	5,50553	44,66378	0,12712	540	18
8	20	10	8	25	50	2,27896	35,68406	0,06532	534	12
9	1	5	4,7	80	50	11,55077	54,43279	0,21618	540	18
10	20	5	4,7	80	200	4,9187	56,70348	0,08966	540	18
11	1	10	4,7	80	200	0,95985	29,98581	0,03368	529	7
12	20	10	4,7	80	50	3,98452	52,01493	0,0788	544	22
13	1	5	8	80	200	1,38437	31,56603	0,04438	522	0
14	20	5	8	80	50	2,48541	33,30483	0,07587	529	7
15	1	10	8	80	50	5,90145	44,30374	0,13665	533	11
16	20	10	8	80	200	1,92421	30,64807	0,06369	529	7

Para escolher a variável estatisticamente mais significativa se levou em conta ANOVA e Diagrama de Pareto das variáveis respostas testadas, observando-se que Delta Lambda ( $\Delta\lambda$ ) apresenta um maior número de variáveis significativas ( $p < 0,05$ ) e mesmas que são: pH e Tempo (Figura 9). Estabelecendo-se a variável Delta Lambda ( $\Delta\lambda$ ) como nossa variável de trabalho.



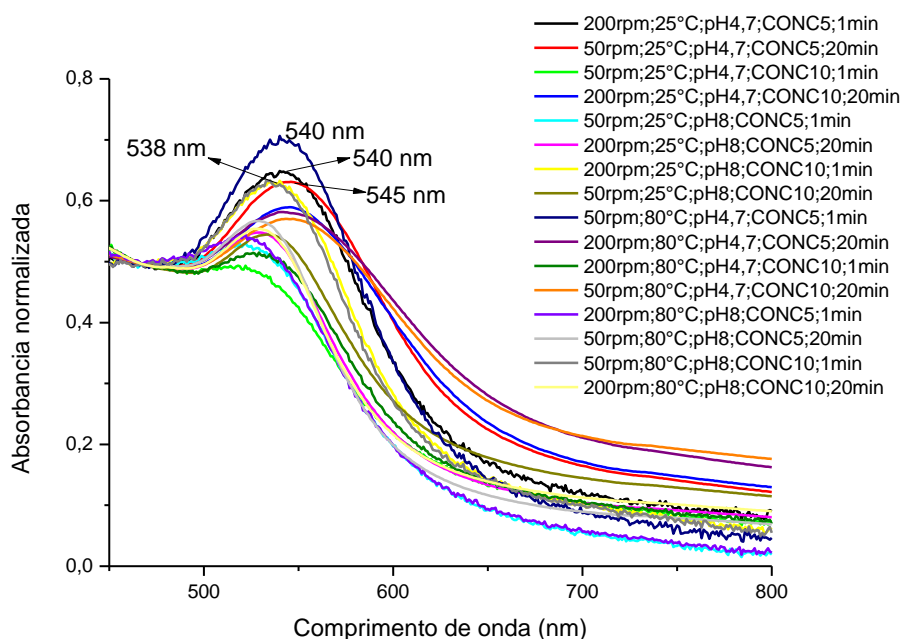
1- As variáveis significativas são apresentadas em negrito; SS – Soma dos quadrados; DF – Grau de Liberdade; MSQ – Quadrados das Médias; F – Teste F; P – Valor de p.

**Figura 9.** ANOVA e Diagrama de Pareto identificando as variáveis que foram significativas no experimento ( $p < 0,05$ ), das diferentes variáveis respostas testadas Área da curva, FWHM, Absorbância máxima (Abs. Máx.), Lambda máxima ( $\lambda$  máx.), e Delta Lambda ( $\Delta\lambda$ ).

### 5.1.3. Planejamento Fatorial Fracionado

As sínteses foram realizadas conforme seção 4.1. e o espectro de absorção UV-Vis, foram realizados para caracterização prévia da amostra. O deslocamento para direita (delta lambda) foi utilizado como variável resposta, visto que para nanopartículas metálicas, este parâmetro está relacionado com a mudança no tamanho das partículas [18, 21, 29]. Sendo que o tamanho das partículas é diretamente proporcional ao lambda máximo. Além disso, para o nosso experimento delta lambda foi a variável resposta com maior número de variáveis estatisticamente significativas, como foi demonstrado na seção 5.1.2.

Os espectros da absorção de UV-Visível das 16 sínteses químicas de acordo o planejamento fatorial fracionado é apresentado na Figura 10, mesma que indica a formação das nanopartículas e é possível notam-se diferenças na absorção que estão relacionados com a concentração final e deslocamentos laterais indicando a produção de nanopartículas com tamanhos diferenciados.



**Figura 10.** UV-Vis, das 16 sínteses de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de *Virola oleifera*.

As condições experimentais foram tempo (min), concentração do extrato ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), pH, temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e agitação (rpm) e a variável resposta foi delta lambda ( $\Delta\lambda$ ) (Tabela 8).

**Tabela 8.** Tabela do planejamento fatorial fracionado das 16 sínteses de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de *Virola oleifera*. A variável resposta utilizada foi o delta  $\lambda$ .

# de ensaio	Variáveis estudadas					Resposta
	Tempo (min)	Concentração (mg/ml)	pH	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	$\Delta\lambda$
1	1	5	4,7	25	200	18
2	20	5	4,7	25	50	24
3	1	10	4,7	25	50	7
4	20	10	4,7	25	200	23
5	1	5	8	25	50	0
6	20	5	8	25	200	7
7	1	10	8	25	200	18
8	20	10	8	25	50	12
9	1	5	4,7	80	50	18
10	20	5	4,7	80	200	18
11	1	10	4,7	80	200	7
12	20	10	4,7	80	50	22
13	1	5	8	80	200	0
14	20	5	8	80	50	7
15	1	10	8	80	50	11
16	20	10	8	80	200	7

A fim de verificar a influência das variáveis apresentadas na Tabela 8, a análise de variância (ANOVA) pode-se verificar que a 95% de confiança as variáveis estatisticamente significativas foram o Tempo (min) e o pH, para o menor nível de significância em que os efeitos são significantes ( $p < 0,05$ ) ficando a concentração ( $\text{mg. mL}^{-1}$ ), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e a agitação (rpm) abaixo desse nível de confiança com relação a resposta comprimento de onda máximo ( $\Delta\lambda$ ) (Tabela 9).

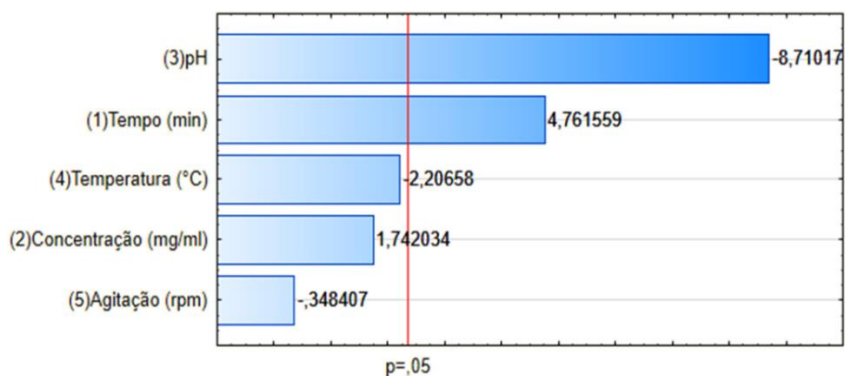
**Tabela 9.** ANOVA para síntese de nanopartículas de ouro utilizando planejamento fatorial fracionado.

Variáveis <sup>1</sup>	SS	DF	MSQ	F	p
<b>(1) Tempo (min)</b>	<b>105,0625</b>	<b>1</b>	<b>105,0625</b>	<b>22,67245</b>	<b>0,002056</b>
<b>(2) Concentração (<math>\text{mg.mL}^{-1}</math>)</b>	14,0625	1	14,0625	3,03468	0,125037
<b>(3) pH</b>	<b>351,5625</b>	<b>1</b>	<b>351,5625</b>	<b>75,86705</b>	<b>0,000053</b>
<b>(4) Temperatura (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>	22,5625	1	22,5625	4,86898	0,063115
<b>(5) Agitação</b>	0,5625	1	0,5625	0,12139	0,737778
<b>Erro</b>	32,4375	7	4,6339		
<b>Total SS</b>	<b>919,9375</b>	<b>15</b>			

1- 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.



O diagrama de Pareto permite uma fácil visualização e identificação das variáveis que afetaram a síntese de AuNPs ( $p < 0,05$ ). As demais variáveis podem ser desprezadas, uma vez que o efeito calculado pode ser negligenciado com 95 % de confiança (Figura 11).



**Figura 11.** Diagrama de Pareto identificando as variáveis que foram significativas no experimento ( $p < 0,05$ ).

#### 5.1.4. Planejamento Fatorial Completo

Assim os parâmetros: Tempo (min) e pH foram significativos na etapa de triagem. Por conseguinte, foram selecionados para otimização utilizando o planejamento fatorial completo. A Tabela 10, apresenta os intervalos de estudo das variáveis.

**Tabela 10.** Intervalos de estudo das variáveis do planejamento fatorial completo.

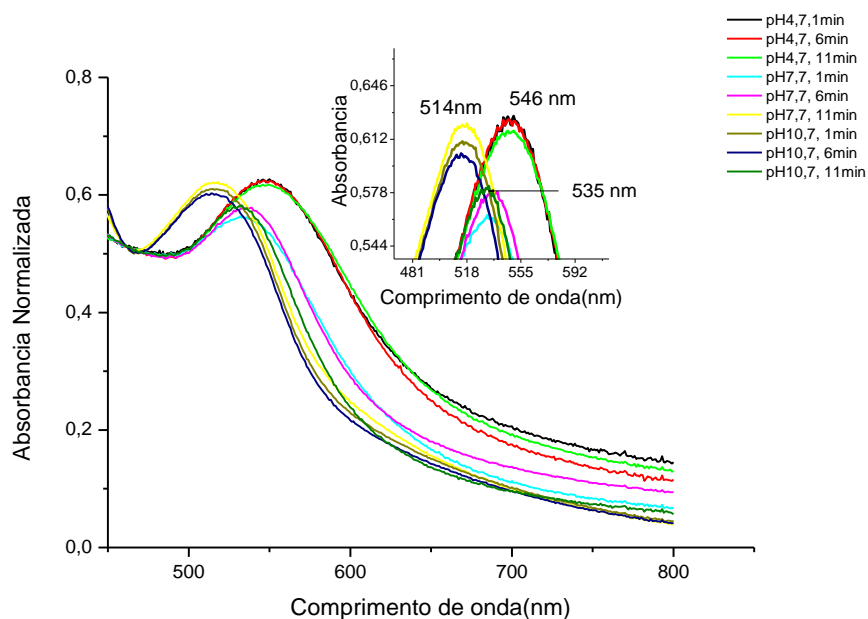
Variável	Intervalo de Estudo		
	Baixo (-)	Central (0)	Alto (+)
pH	4,7	7,7	10,7
Tempo (min)	1	6	11

O planejamento fatorial completo, foi feito com 11 sínteses e suas respectivas condições se apresenta na Tabela 11.

**Tabela 11.** Matriz do planejamento fatorial completo das 11 sínteses de nanopartículas de ouro com extrato de *Virola oleifera*.

Ensaio	pH	Tempo (min)
1	(-) 4,7	(-) 1
2	(0) 4,7	(0) 6
3	(+) 4,7	(+) 11
4	(0) 7,7	(-) 1
5	(0) 7,7	(0) 6
6	(0) 7,7	(+) 11
7	(+) 10,7	(-) 1
8	(+) 10,7	(0) 6
9	(+) 10,7	(+) 11
10	(0) 7,7	(-) 6
11	(0) 7,7	(-) 6

Os espectros de absorção de UV-Visível das 11 sínteses de acordo o planejamento fatorial completo indica a formação de nanopartículas de ouro com uma variação no comprimento de onda, pois se observa deslocamentos laterais, em particular, são observados três picos, que estão relacionados ao pH de cada uma das sínteses. As sínteses que foram feitas a um pH de 4,7 têm um pico a 546nm, as feitas a um pH de 7,7 têm um pico a 535nm e, finalmente, as que foram feitas a um pH de 10,7 têm um pico em 514nm, indicando a produção de nanopartículas com diferentes tamanhos (Figura 12).



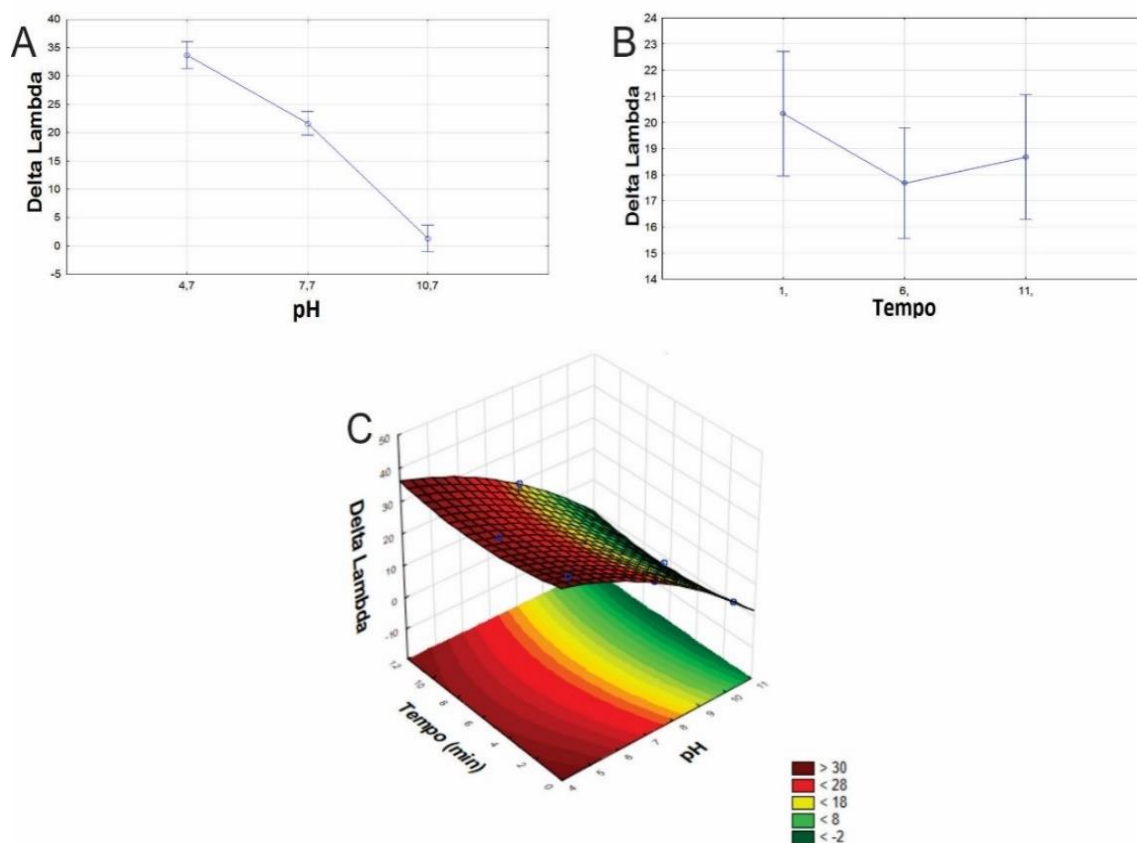
**Figura 12.** Espectroscopia de absorção no UV-Visível da síntese de nanopartículas de ouro partir do planejamento fatorial fracionado utilizando extrato de *Virola oleifera* como agente redutor.

As variáveis estudadas foram pH e tempo, tendo como resposta delta lambda para cada síntese feita (Tabela 12).

**Tabela 12.** Matriz do planejamento fatorial completo das 11 sínteses de nanopartículas de ouro com extrato de *Virola oleifera* e a variável resposta delta lambda.

Ensaio	pH	Tempo (min)	Delta Lambda
1	4,7	1	36
2	4,7	6	33
3	4,7	11	32
4	7,7	1	22
5	7,7	6	19
6	7,7	11	24
7	10,7	1	3
8	10,7	6	1
9	10,7	11	0
10	7,7	6	19
11	7,7	6	19

Ao analisarmos a influência do pH verificamos que a medida que o pH muda de ácido para básico ocorre uma evidente diminuição de delta lambda, o que resulta em uma diminuição do tamanho das nanopartículas (Figura 13A), e em relação a tempo observamos que quando alteramos o tempo de 1 min para 6 min ou 11min ocorre uma pouca variação de delta lambda (Figura 13B). A partir desses dados podemos inferir que, para esse sistema, a variação do pH, influencia diretamente na variação do delta lambda, isto é, na variação de tamanho das nanopartículas, o que poderia ser pôr a protonação dos grupos orgânicos COOH presentes na *Virola oleifera*, em pH básico prevalece a forma desprotonada do ácido carboxílico (COO<sup>-</sup>) e em pH mais ácidos prevalece a forma protonada do ácido carboxílico (COOH). Assim o COO<sup>-</sup> (desprotonado) tem maior interação com os átomos de ouro, estabilizando os núcleos mais rapidamente e conseqüentemente evitando o crescimento e a coalescência com outros núcleos menores. Em pH ácido os ácidos carboxílicos estão protonados e interagem mais fracamente e lentamente com a superfície metálica, assim, favorece a o crescimento das nanopartículas metálicas [100]. Em relação há o tempo pode perceber que a redução, nucleação, crescimento e estabilização das nanopartículas acontece muito rápido na síntese verde, O que pode ser visto no gráfico de superfície resposta da interação entre as duas variáveis analisadas (Figura 13C).



**Figura 13.** Influência do pH em relação a variável resposta Delta Lambda (A). Influência do Tempo em relação a variável resposta Delta Lambda (B). Gráfico de superfície resposta apresentando interação das variáveis pH e Tempo (C).

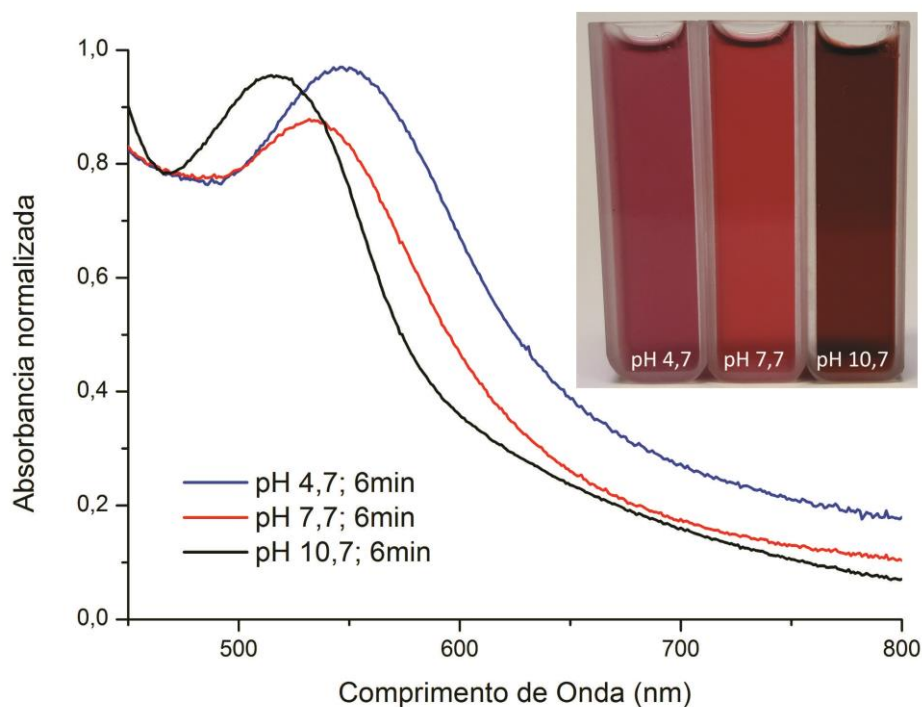
Das 11 sínteses (9 ensaios e 2 repetições do ponto central), foi escolhida a melhor síntese de cada um dos grupos ou picos, os parâmetros que foram utilizados para determinar a melhor síntese foram: Área da curva, FWHM, Lambda máxima e Absorbância máxima. (Tabela 13). Encolhendo os ensaios 2, 5 e 8, por apresentar principalmente nanopartículas monodispersas (FWHM), um tamanho médio ( $\lambda$  máx.) e uma concentração media (Ab. máx.) entre cada grupo avaliado, os que serão caracterizados. Assim, as nanopartículas de cada um dos ensaios selecionados serão caracterizadas.

**Tabela 13.** Matriz de resposta variável das 9 sínteses realizadas para escolher as melhores condições de síntese.

Ensaio	Variável		Variável resposta			
	pH	Tempo (min)	Área	FWHM	$\lambda$ máx.	Ab. máx.
1	4,7	1	6,63301	53,7481	550	0,12679
2	<b>4,7</b>	<b>6</b>	<b>6,70494</b>	<b>56,3634</b>	<b>547</b>	<b>0,1246</b>
3	4,7	11	6,7705	57,638	546	0,12046
4	7,7	1	2,76162	33,539	533	0,08315
5	<b>7,7</b>	<b>6</b>	<b>2,76815</b>	<b>33,539</b>	<b>533</b>	<b>0,08315</b>
6	7,7	11	3,16475	38,6193	539	0,08362
7	10,7	1	5,09095	47,545	518	0,11221
8	<b>10,7</b>	<b>6</b>	<b>5,1071</b>	<b>47,9727</b>	<b>515</b>	<b>0,11052</b>
9	10,7	11	4,57175	45,8979	514	0,10293

## 5.2. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

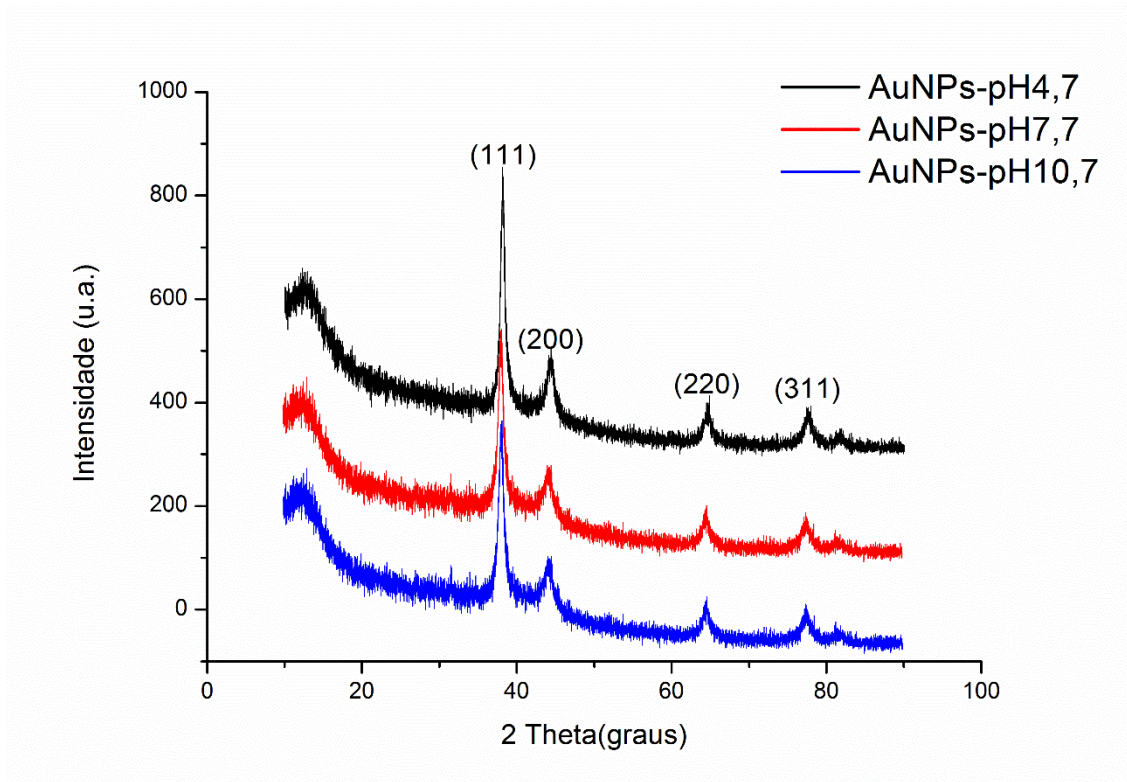
Três ensaios foram escolhidos para a caracterização de acordo com a seção 5.4.1., os mesmos que apresentam diferente comprimento de onda, o que pode ser interpretado como nanopartículas de ouro com diferentes tamanhos, assim as nanopartículas de ouro, menores, apresentarão uma cor mais avermelhada. As nanopartículas menores absorvem a luz do comprimento de onda (azul), chegando aos nossos olhos o resto (vermelho) e, por isso, parecem avermelhados [103]. Portanto, quanto menores forem as nanopartículas, mais avermelhadas as veremos (Figura 14).



**Figura 14.** Nanopartículas de ouro sintetizadas utilizando extrato de *Virola oleifera* como agente redutor com diferentes pHs.

### 5.2.1. Caracterização da estrutura das nanopartículas de ouro

Foi realizado um estudo de difração de raios-X das amostras de AuNPs (pH 4,7; 7,7; 10,7). Observado um pico largo a  $38,3^\circ$ , pode-se dizer que o pico correspondente ao plano de reflexão (111) do ouro (Joint Committee on Powder Diffraction Standards [JCPDS No.04-0784]) [62]. Esse fato está de acordo com o espectro XRD do ouro octaédrico que apresenta uma orientação preferencial das partículas ao longo dos planos (111) paralelo ao substrato. [91, 92]. No entanto, um exame mais aprofundado do espectro permite observar um pico em ângulo de reflexão mais alto,  $43,5^\circ$ , o que coincide com a linha de reflexão (200) para ouro fcc (face-centered cubic) e dois picos pequenos em torno de  $65^\circ$  e  $77,7^\circ$  correspondentes às reflexões (220) e (311). Assim, considerando o padrão de difração, a forma mais provável das AuNPs é o octaedro [93, 94, 95]. (Figura 15).



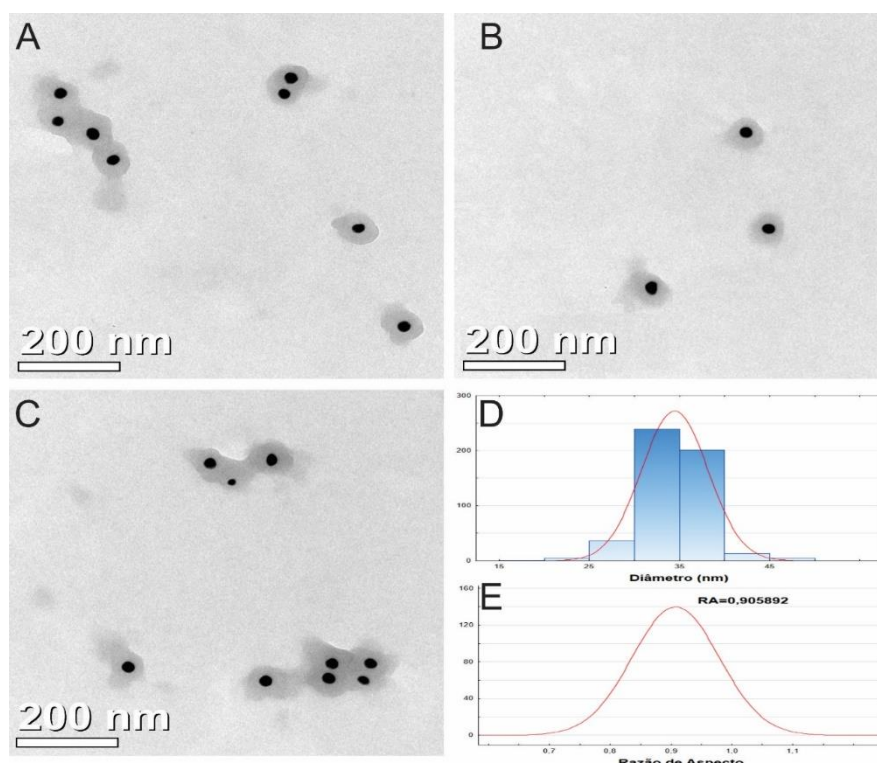
**Figura 15.** Difratograma de raios-X das AuNPs.

### 5.2.2. Caracterização da forma, tamanho e distribuição

As imagens apresentadas foram obtidas das três condições ótimas de síntese com diferentes pHs (4,4, 7,7, 10,7) de *V. oleifera*, observa-se principalmente AuNPs esféricas e não aglomeradas, mais também observou, em quantidades menores, AuNPs com outras geometrias, como, triangular, elipsoidal, e alguma agregação entre as nanopartículas. Nas imagens também é possível observar o extrato em torno das nanopartículas, graças ao contraste negativo realizado com acetato de uranila, verificando assim a presença do extrato ligado às nanopartículas (Figuras 16A-B-C; 17A-B-C; 18A-B-C).

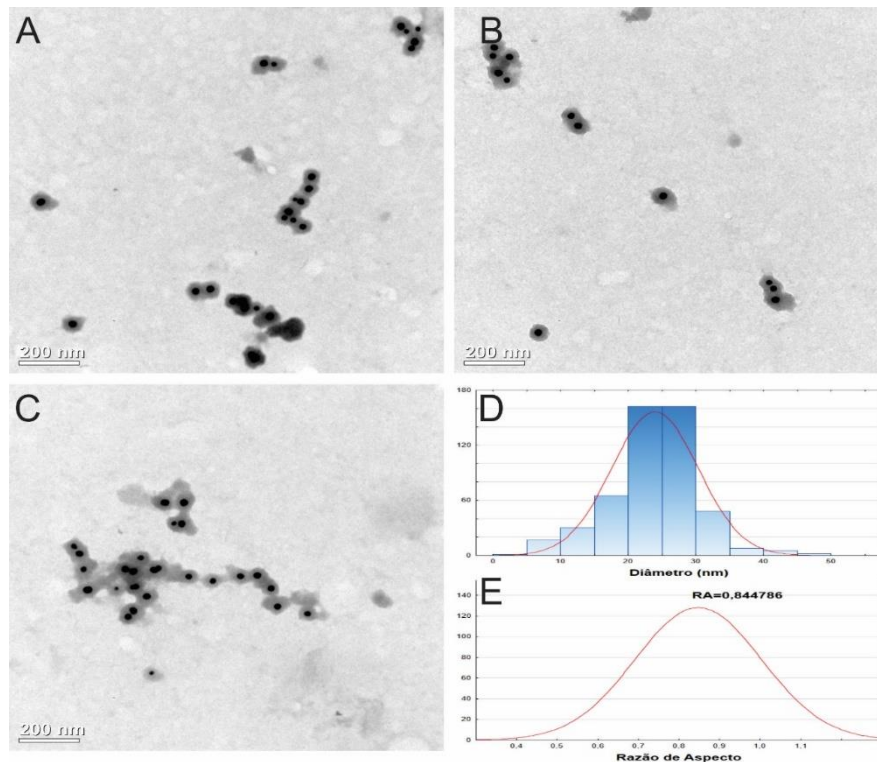
Nos histogramas de distribuição de tamanho de partícula para cada amostra obtida a partir das imagens TEM, se observa que as nanopartículas sintetizadas com *V. oleifera* com um pH ácido (4,7), tem um tamanho médio de 35nm, naquelas que foi usado *V. oleifera* com um pH neutro (7,7), tem um tamanho médio de 22nm, e as nanopartículas sintetizadas com *V. oleifera* com um pH básico (10,7), tem um tamanho médio de 9nm (Figuras 16D; 17D; 18D).

A Razão de aspecto também foi calculada a fim de conhecer a forma predominante do coloide sintetizado, o cálculo é feito dividindo o diâmetro maior pelo diâmetro menor de 500 nanopartículas. Assim a os resultados permitem inferir que as nanopartículas sintetizadas com *V. oleifera* com um pH 4,7, apresentam maior esfericidade por apresentar um valor de 0,905892, coisa que não acontece com as nanopartículas sintetizadas com pH 7,7, e 10,7, apresentado valores de 0,844786 e 0,710228, respectivamente, entendendo-se que apresentam menor esfericidade por apresentar valores distantes de 1 (Figuras 16E; 17E; 18E) [100].

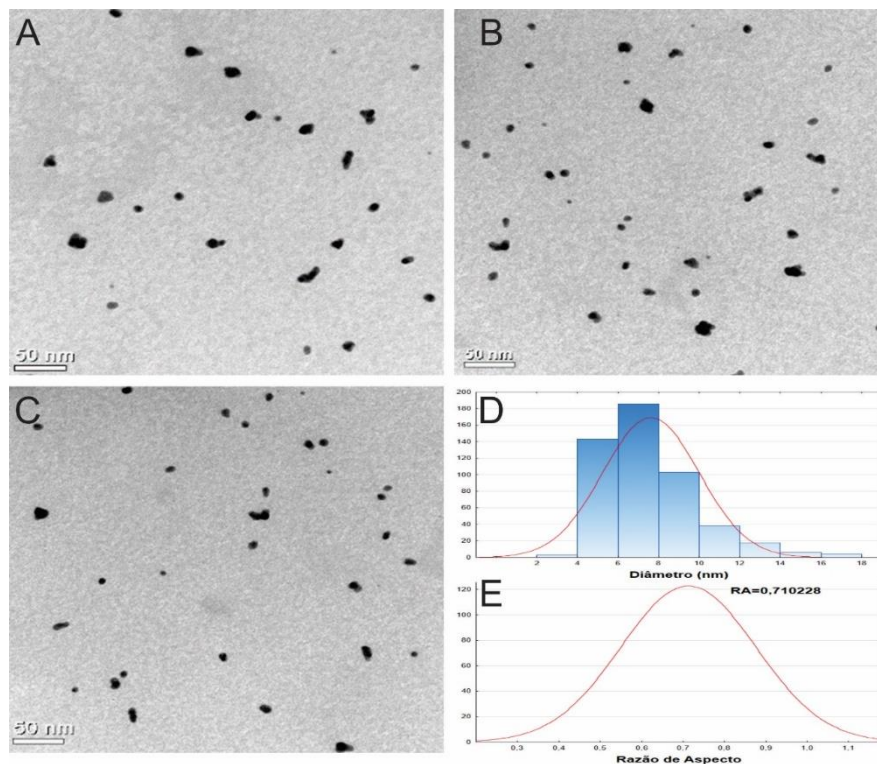


**Figura 16.** Imagens de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de *V. oleifera* de pH 4,7 (A, B, C). Diagrama de distribuição do tamanho (D). Razão de aspecto (E).





**Figura 17.** Imagens de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de *V. oleifera* de pH 7,7 (A, B, C). Diagrama de distribuição do tamanho (D). Razão de aspecto (E).



**Figura 18.** Imagens de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de *V. oleifera* de pH 10,7 (A, B, C). Diagrama de distribuição do tamanho (D). Razão de aspecto (E).

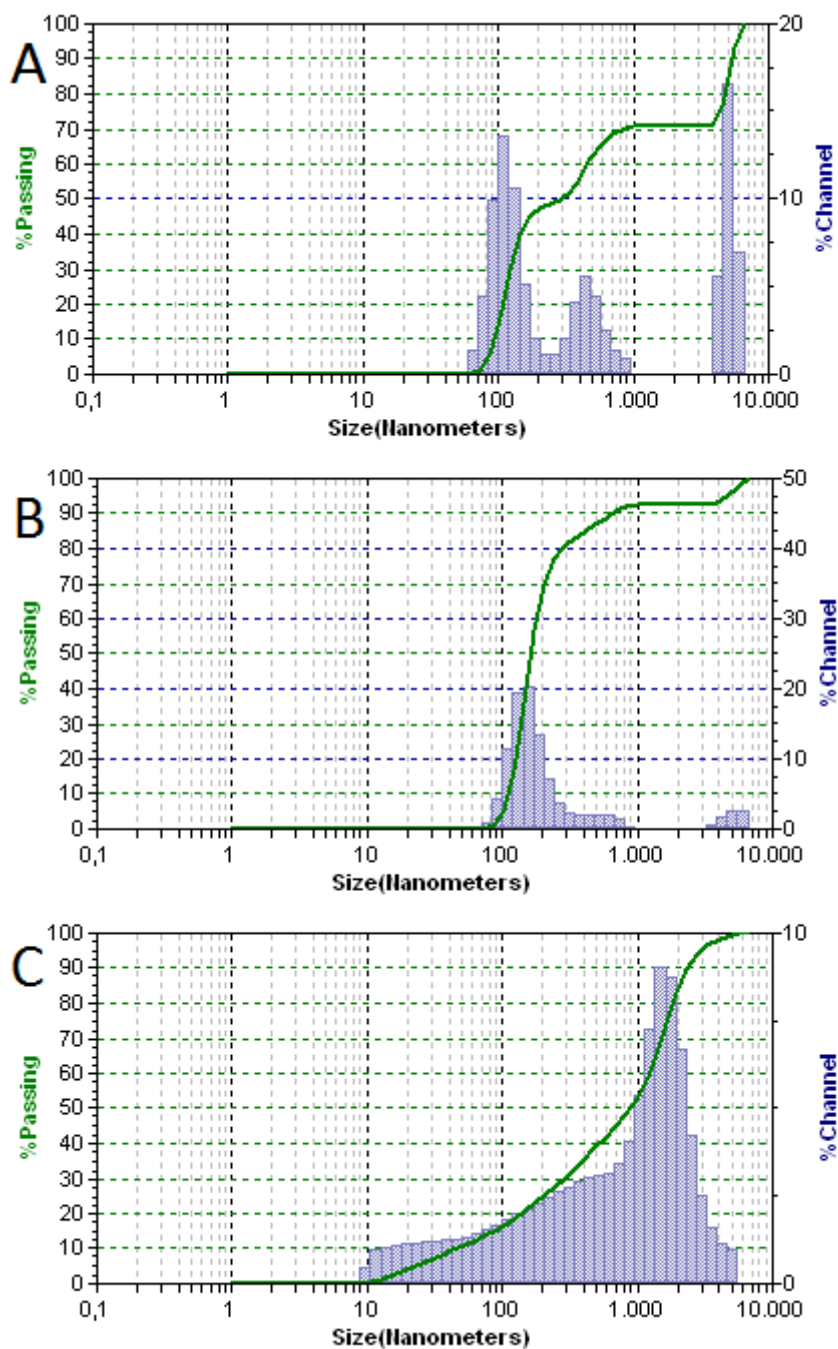
### 5.2.3. Caracterização do tamanho hidrodinâmico e estabilidade

O tamanho hidrodinâmico das nanopartículas de ouro, conforme DLS, pode nos ajudar a confirmar a presença de biomoléculas na superfície das nanopartículas sintetizadas com *V. oleifera*, em comparação com o tamanho das nanopartículas de ouro medidas por MET, já que as biomoléculas que ficam estabilizando as AuNPs, influenciam nos valores do diâmetro hidrodinâmico, o que leva à confirmação da adsorção de biomoléculas nas AuNPs. (Tabela 14).

**Tabela 14.** Diferença entre o diâmetro das AuNPs por MET e DLS.

<b>Nanopartículas</b>	<b>Tamanho MET</b>	<b>Tamanho DLS</b>
<b>AuNPs-pH 4,7</b>	35 nm	≈100 nm
<b>AuNPs-pH 7,7</b>	22 nm	≈100 nm
<b>AuNPs-pH 10,7</b>	9 nm	≈1000 nm

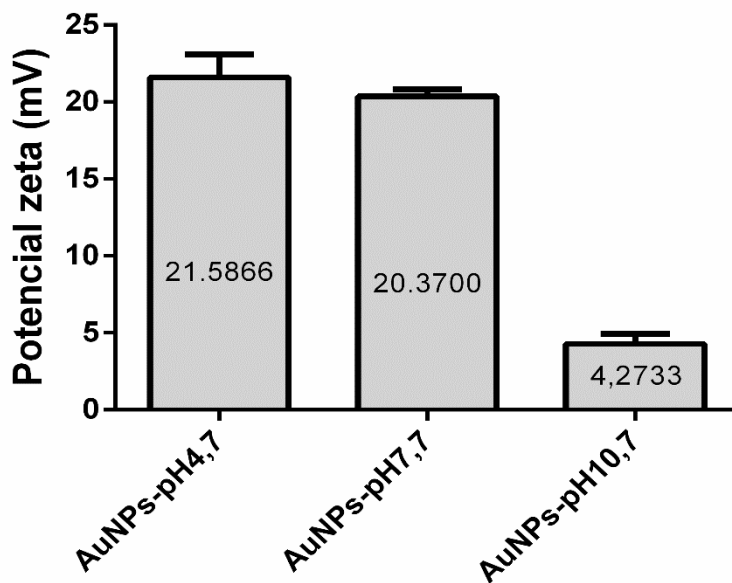
Pode-se observar que AuNPs-pH4,7 e AuNPs-pH7,7 têm tamanhos hidrodinâmicos principalmente próximos de 100 nm, AuNPs-pH10,7 apresenta um tamanho hidrodinâmico próximo de 1000 nm, o que poderia ser explicado pela possível agregação das partículas, devido a sua instabilidade, o que indicaria que as AuNPs sintetizadas com pHs diferentes teriam biomoléculas aderidas na sua superfície (Figuras 19) [98].



**Figura 19.** Gráficos de DLS para AuNPs sintetizadas com *Virola oleifera* pH 4,7; 7,7 e 10,7.

Em quanto à estabilidade das AuNPs sintetizadas com *Virola oleifera* com pHs diferentes (4,7; 7,7; 10,7) testados, mostram que as nanopartículas possuem diferentes estabilidades. As AuNPs sintetizadas com *Virola oleifera* com pH 4,7 e pH 7,7 apresentam um valor de 21,5866 mV, e 20,3700 mV, respectivamente, apresentando uma instabilidade incipiente, por outro lado as nanopartículas sintetizadas com *Virola oleifera* com pH 10,7 apresenta um valor de 4,2733 mV,

fato que justifica a maior agregação, exibindo uma rápida coagulação [50] (Figura 20). Pode-se inferir que as moléculas presentes na superfície das AuNPs são compostas em sua maioria de grupos com carga negativa responsáveis pela boa estabilidade das nanopartículas. Isso pode ser atribuído à presença de polifenóis, flavonoides e proteínas provenientes do extrato vegetal [66, 67].

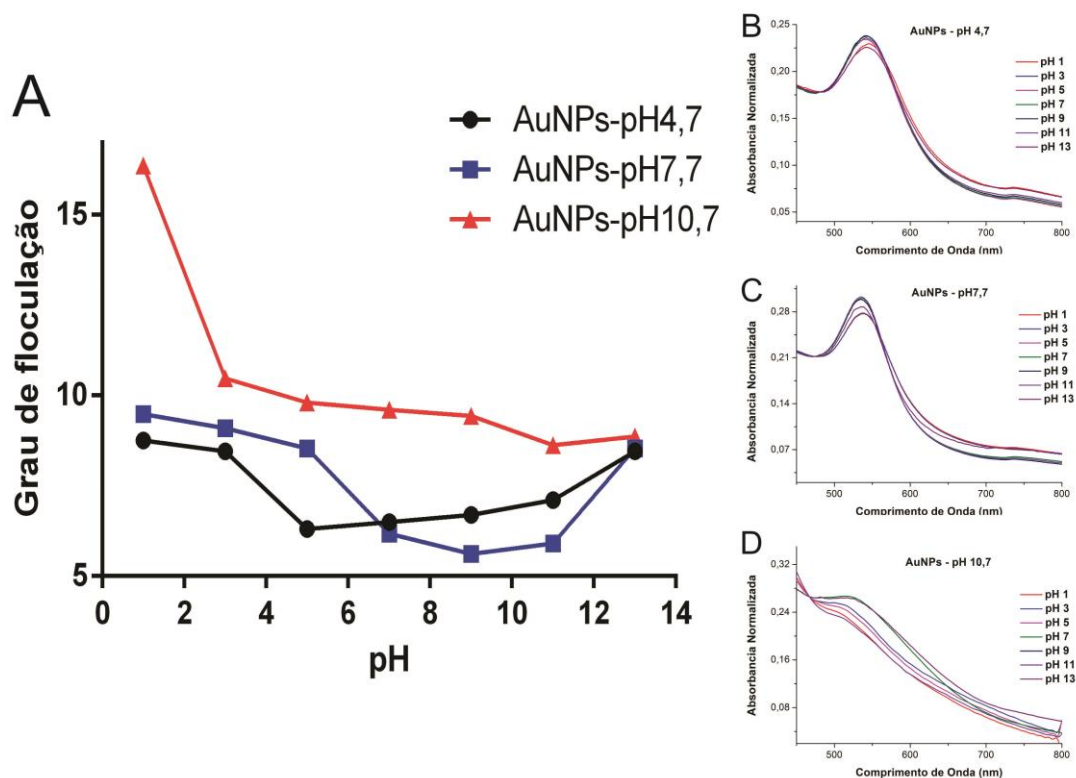


**Figura 20.** Potencial zeta de nanopartículas de ouro sintetizadas com *Virola oleifera* com pHs diferentes (4,7; 7,7; 10,7).

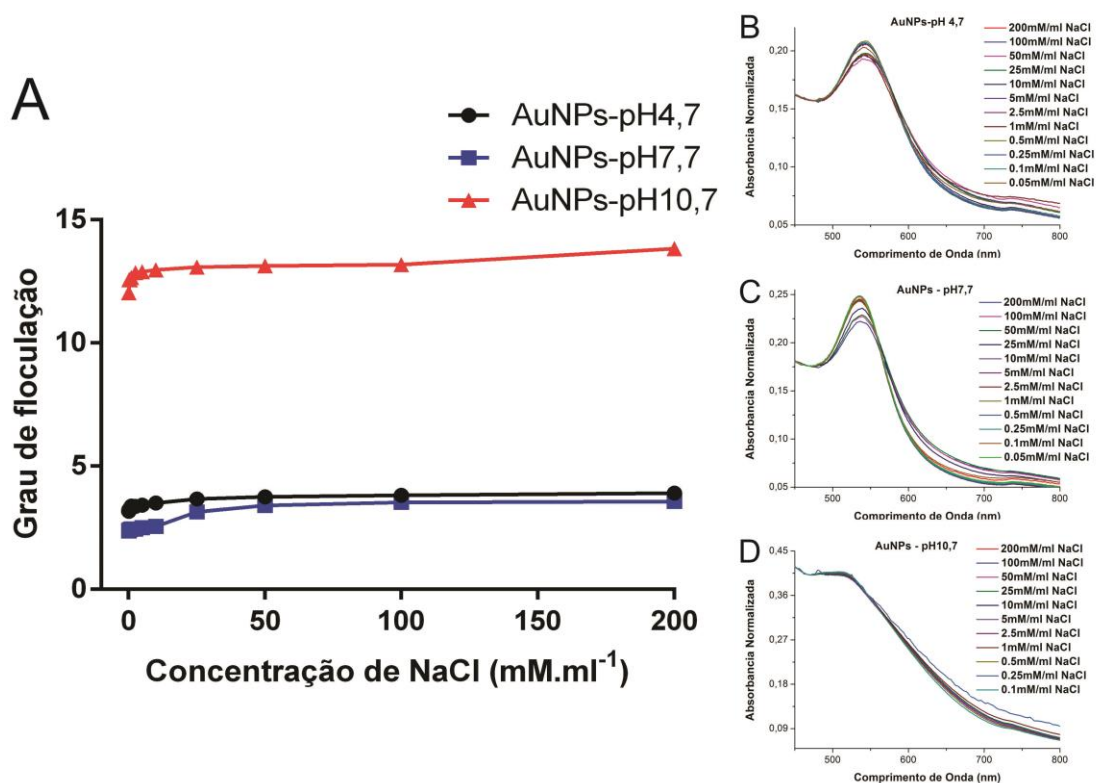
A importância de se estudar a estabilidade frente a diferentes condições eletrolíticas e de pH permite conhecer de alguma forma o que acontece com as nanopartículas em sistemas biológicos. Sabe-se que um aumento na concentração de íons em uma suspensão coloidal tende a causar sua desestabilização. A influência da força iônica sobre a estabilidade das suspensões de AuNPs foi estudada neste trabalho por espectroscopia de absorção, usando o procedimento na seção 4.3.8. para determinar o grau de floculação.

O grau de floculação das AuNPs sintetizadas com *Virola oleifera* com pHs diferentes (4,7; 7,7; 10,7), para a variação do pH nesses coloides, mostram que as nanopartículas sintetizadas a 4,7, e 7,7, apresentam uma relativa estabilidade no pH fisiológico, comparado com as nanopartículas sintetizadas a

10,7, que apresentam um maior grau de floculação como pode ser visto na Figura 21. Para a variação da concentração de sais nos coloides, pode-se observar que o grau de floculação é maior nas nanopartículas sintetizadas a pH 10,7, comparado com os outros coloides, mostrando que as nanopartículas sintetizadas a pH 4,7, e 7,7, apresentam uma relativa estabilidade a uma baixa concentração de sais como pode ser visto na Figura 22.



**Figura 21.** Grau de floculação em função da variação do pH (A), Espectro de absorção UV-visível dos coloides AuNPs – pH4,7, AuNPs – pH7,7, AuNPs – pH10,7, após de 30 minutos de reação (B, C, D).

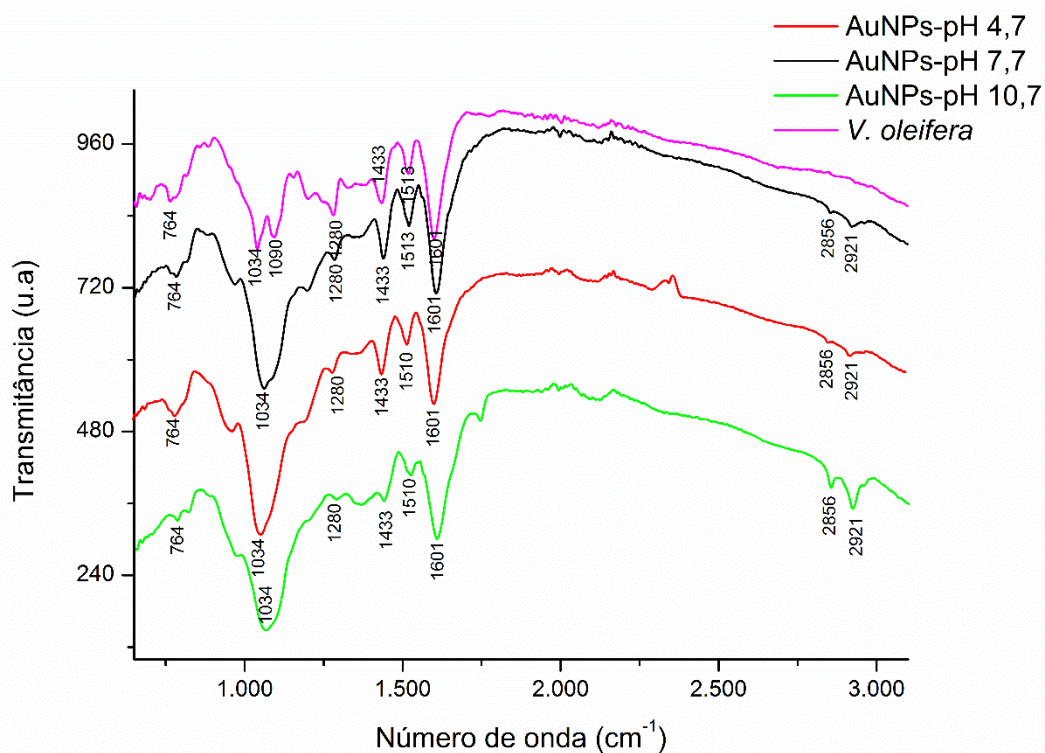


**Figura 22.** Grau de floculação em função da variação da concentração de sal (A), Espectro de absorção UV-visível dos coloides AuNPs – pH4,7, AuNPs – pH7,7, AuNPs – pH10,7, após de 30 minutos de reação (B, C, D).

#### 5.2.4. Análise de superfície

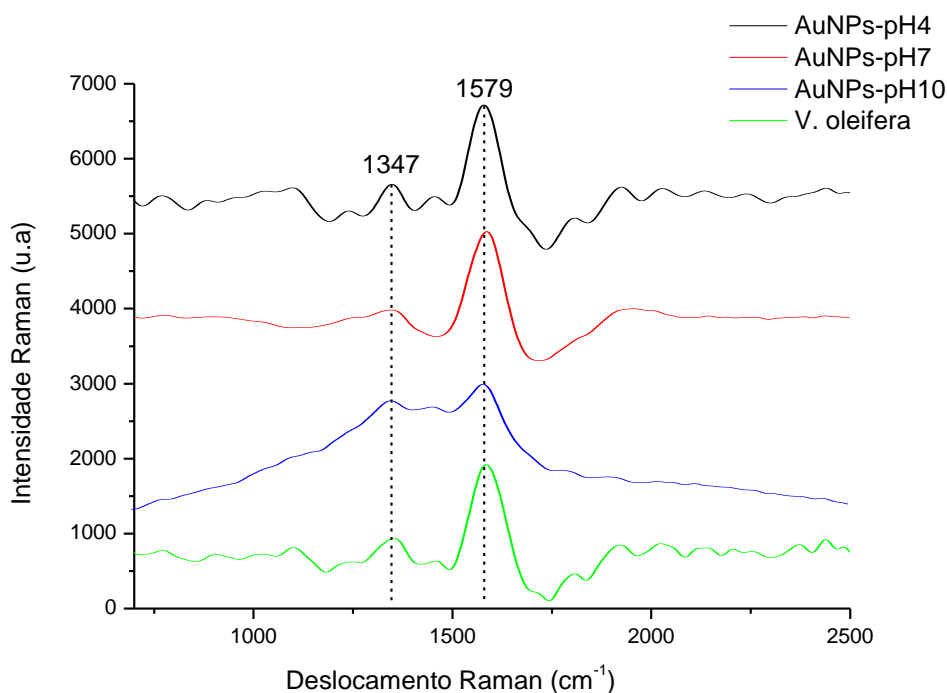
Para se investigar as possíveis interações entre as nanopartículas e o extrato de *Virola oleifera* foram realizadas a análise de infravermelho e Raman antes e após a redução do HAuCl<sub>4</sub>.

No espectro infravermelho é possível observar uma banda a 1601 cm<sup>-1</sup> que é atribuída ao estiramento C=O, grupo carbonila [68], e a banda em 1433 cm<sup>-1</sup> pode ser atribuída a deformação axial dos grupos C-H alifáticos [69]; a banda em 1510 cm<sup>-1</sup> e 1513 cm<sup>-1</sup> é atribuída a presença de estruturas aromáticas C=C [70, 69]. A banda em 1280 cm<sup>-1</sup> está relacionada ao estiramento vibracional C-O das ligações de álcoois [71]. A presença da absorção em 1090 cm<sup>-1</sup> se relaciona ao grupamento éster [72, 73]. A banda de absorção em 1034 cm<sup>-1</sup> está relacionada com vibrações de flexão C-H [68] (Figura 23).



**Figura 23.** Espectro infravermelho de nanopartículas de ouro sintetizadas com *Virola oleifera* com pH diferentes (4,7; 7,7; 10,7) e extrato de *Virola oleifera*.

No espectro Raman foram observados os seguintes picos  $1347\text{ cm}^{-1}$  e  $1579\text{ cm}^{-1}$  tanto no extrato de *V. oleifera* como em cada uma das AuNPs sintetizadas a diferentes pHs. O pico de vibração a  $1347\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuído ao estiramento simétrico do grupo carboxilato ( $\text{COO}^-$ ) e  $1579\text{ cm}^{-1}$  distensão assimétrica. A distância entre os modos de alongamento também fornece informações. Neste caso, a distância de  $220\text{ cm}^{-1}$ , indica que os grupos carboxila são complexos mono-dentado com o metal [74, 75] (Figura 24). O espectro Raman apresentou alta intensidade para o complexo AuNPs. Isso se deve ao fato das moléculas do complexo estabilizador terem sido excitadas pelo campo elétrico intensificado da radiação emitida pela superfície metálica [76].



**Figura 24.** Espectro Raman de nanopartículas de ouro sintetizadas com *Virola oleifera* com pHs diferentes (4,7; 7,7; 10,7) e extrato de *Virola oleifera*.

Pode-se concluir que a similaridade no perfil dos espectros entre o extrato e as AuNPs do Infravermelho e Raman, indicam a possibilidade de que os polifenóis, os grupos hidroxila, ácidos carboxílicos das biomoléculas presentes no extrato de *V. oleifera* são responsáveis pela redução e estabilização de nanopartículas de ouro. Poderia também inferir-se que poderia haver alguns flavonóides e terpenos ligados às nanopartículas alterando a posição da banda de vários grupos funcionais nos espectros, o que indicaria a presença de terpenóides, compostos fundamentais na redução de íons metálicos [66, 67, 77, 78, 79].

### 5.3. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTOXICIDADE

Com base nas informações fornecidas pelas seções 5.1., e 5.2., foram estabelecidos alguns critérios de seleção (Pico LSPR entre 500nm e 600 nm, Dispersão (Forma, Tamanho), Presença de compostos na superfície das AuNPs, Estabilidade Geral, (Relativa estabilidade a uma baixa concentração de sal, Relativa estabilidade ao pH fisiológico) para determinar qual dos coloides será escolhido para seu estudo biológico. Assim, os coloides AuNPs - pH 4,7, e AuNPs – pH 7,7, foram escolhidos para o estudo de atividade antioxidante e



citotoxicidade, o coloide AuNPs - pH 10,7, foi descartado, devido à sua baixa estabilidade, como é mostrado na tabela 15.

**Tabela 15.** Tabela de critérios e seleção de nanopartículas.

Critérios de seleção	Amostras		
	AuNPs-pH 4,7	AuNPs-pH 7,7	AuNPs-pH 10,7
Pico LSPR entre 500nm e 600 nm (UV-Visível)	⊙	⊙	⊙
Dispersão (Forma, Tamanho) (MET)	⊙	⊙	⊙
Presença de compostos na superfície das AuNPs (RAMAN, FT-MIR)	⊙	⊙	⊙
Estabilidade General (Potencial Zeta)	⊙	⊙	x
Relativa estabilidade a uma baixa concentração de sal (Grau de Floculação)	⊙	⊙	x
Relativa estabilidade ao pH fisiológico (Grau de Floculação)	⊙	⊙	x
<b>Resultado</b>	⊙	⊙	x
Bom ⊙ Ruim x			

### 5.3.1. Determinação da capacidade antioxidante e Citotoxicidade

Antes da determinação da capacidade antioxidante e da citotoxicidade, determinou-se a concentração de *V. oleifera* presente na superfície da nanopartícula, 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 *V. oleifera*. Isso foi possível pelo fato de seu pico característico de absorbância ocorrer em 280 nm. Figura 25.

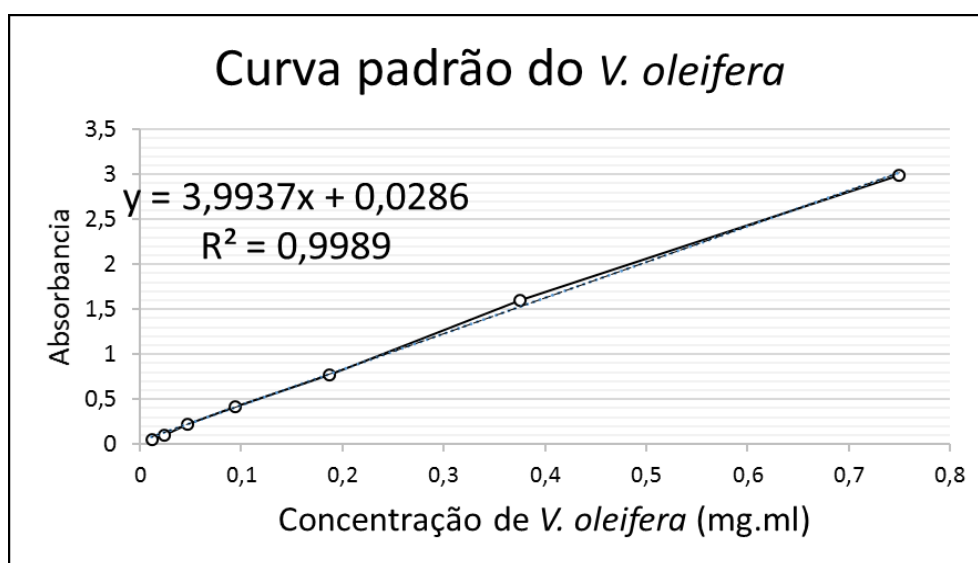


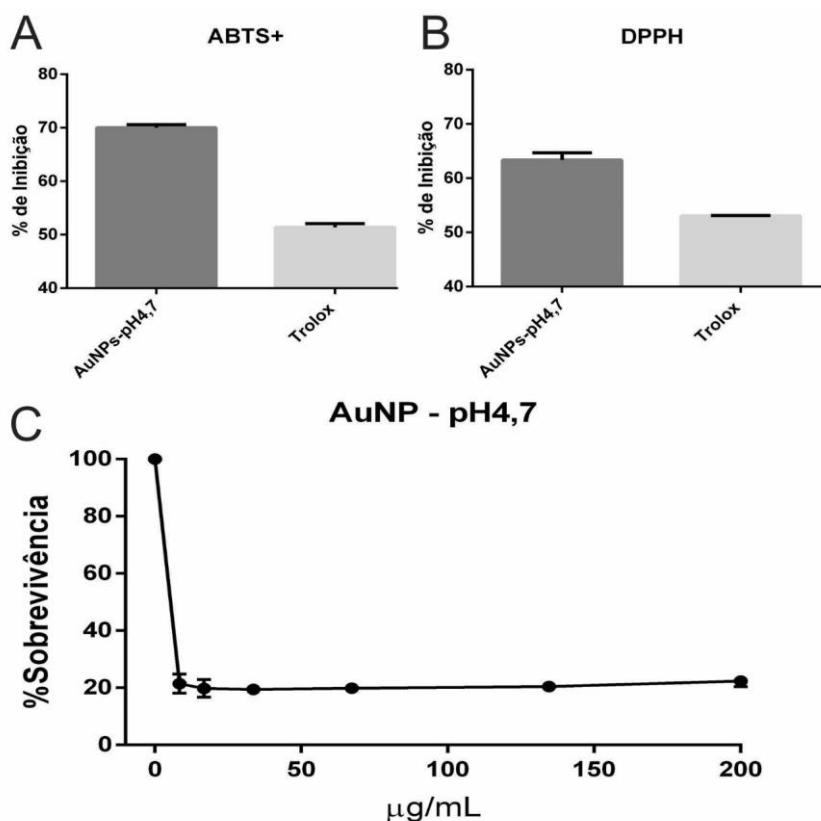
Figura 25. Curva padrão da concentração de *Virola oleifera*.

Tabela 16. Concentração de *V. oleifera* ligada às AuNPs.

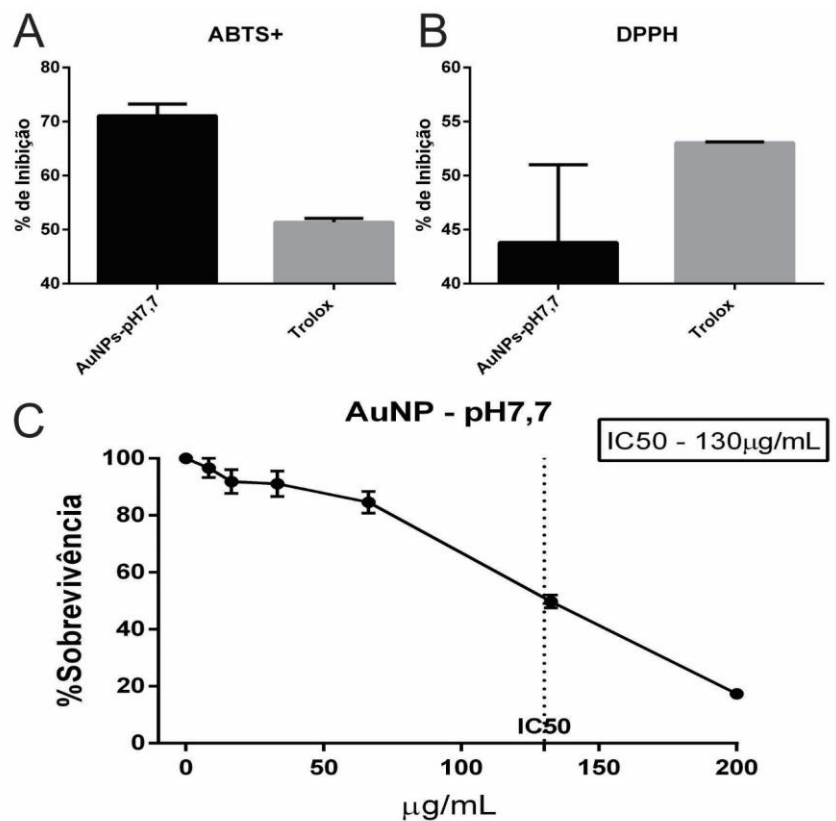
Amostras	Concentração de <i>V. oleifera</i> ligada às AuNPs (mg/ml)
AuNPs-pH4,7	0,793
AuNPs-pH7,7	0,790

As AuNPs mostram grande atividade a ponto de assemelhar-se ao observado pelo padrão Trolox ®, devido à amplificação da atividade antioxidante de biomoléculas por adsorção à superfície de AuNPs, fato que foi mostrado por outros estudos [81, 82]. É possível observar que os colóides de nanopartículas de ouro sintetizadas a pH 4,7 e 7,7 apresentam uma alta porcentagem de

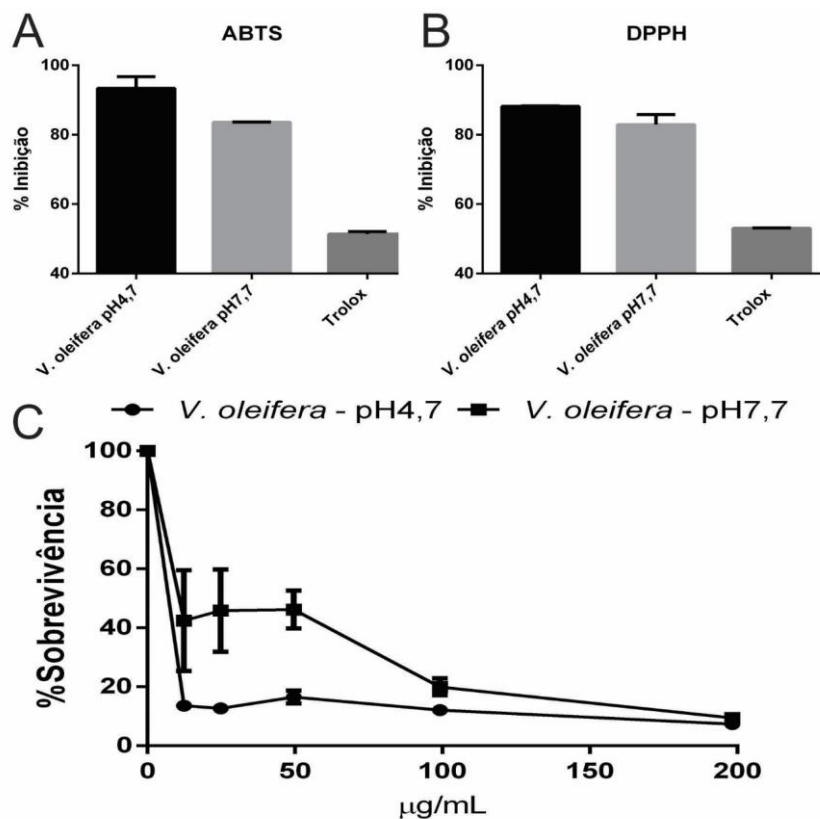
inibição (atividade antioxidante), ainda maior do que o controle. A citotoxicidade das nanopartículas de ouro foi estabelecida por meio de um ensaio de toxicidade *in vitro*, utilizando a linhagem celular manner: J774A.1 (ATCC® TIB67TM). Observando que as AuNPs-pH 4,7, são ligeiramente menos tóxicas que o extrato de *V. oleifera* com o mesmo pH, em todas as concentrações, por outro lado, a toxicidade das AuNPs-pH 7,7, evidentemente diminuiu quando é comparada com as AuNPs-pH 4,7, fato que poderia ser explicado pela alteração do pH do meio, uma vez que o pH ótimo da cultura de células é perto de 7 [83, 84], o que poderia aumentar a toxicidade das AuNPs-pH 4.7 em todas as concentrações testadas, coisa que também pode-se observar no extrato de *V. oleifera* pH 4,7 e extrato de *V. oleifera* pH 7,7. Figura 26. 27, 28.



**Figura 26.** Atividade Antioxidante e Citotoxicidade das AuNPs sintetizadas com *Virola oleifera*, com pH 4,7.



**Figura 27.** Atividade Antioxidante e Citotoxicidade das AuNPs sintetizadas com *Virola oleifera*, com pH 7,7.



**Figura 28.** Atividade Antioxidante e Citotoxicidade da *Virola oleifera*.

## 6. CONCLUSÕES

O planejamento fatorial utilizado, permitiu conhecer que as variáveis que influenciam a síntese de AuNPs que são o pH e o tempo, estabelecendo uma rota de síntese de nanopartículas de ouro usando um extrato vegetal

Os métodos de síntese verde usando extrato *Virola oleifera* propostos provaram ser reproduzíveis, apresentando AuNPs de diferentes tamanhos, monodispersos e com relativa estabilidade em função do pH.

Foi possível comprovar a adsorção do extrato de *Virola oleifera* na superfície das AuNPs, utilizando diferentes técnicas como microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espectroscopia de infravermelho (FRTI) e Raman.

Os testes para demonstrar a atividade antioxidante mostraram que as nanopartículas de ouro em qualquer pH apresentam alta porcentagem de inibição, além de isso, o teste de citotoxicidade, mostrou que as nanopartículas de ouro sintetizadas a pH 7,7 apresentam baixa toxicidade.

## 7. REFERENCIAS

1. Bakir, G, A Kaygisiz and H Ulker, (2004). Estimates of Genetic Parameters of Milk Yield in Brown Swiss and Holstein Friesian Cattle. *Pak J of Bio Sci*, 7 (7): 1198-1201.
2. Cilek, S. and E Sahin, (2009). Estimation of some genetic parameters (heritability and repeatability) for milk yield in the Anatolian population of Holstein cows. *Archiva Zootechnica*, 12(1): 57- 64
3. Usman T, Guo G, Suhail S. M, Ahmed S, Qiaoxiang L, Qureshi M. S, Wang Y. Performance traits study of holstein friesian cattle under Subtropical conditions. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 22(2 Suppl.): 2012, Page: 92-95 ISSN: 1018-7081
4. Allemann E, Leroux JC, Gurny R, Doelker E. *In vitro* extended-release properties of drug-loaded poly(DL-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure. *Pharm Res*. 1993;10 1732–7.
5. Alves TM. Síntese e caracterização de nanopartículas de óxido de ferro para aplicações biomédicas. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física, Universidade Estadual de Campinas, 2007.
6. Avdeev MV, Mucha B, Lamszus Z, Vékas L, Garamus VM, Feokzystov AV, Marinica O, Turcu R, Willumet R. Structure and *in vitro* biological testing of water-based ferrofluids stabilized by monocarboxylic acids. *Langmuir*. 2010;26(11):8503-9.
7. Bedê PM. Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para utilização biomedical. Dissertação (Mestrado) - Ciência dos Materiais Instituto Militar de Engenharia. Rio de Janeiro, 2010.
8. Berryl CC, Curtis ASG. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J Phys D Appl Phys*. 2003;36:R198–R206.
9. Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Del Rev*. 2002;54:631–51.
10. Cabuil V, Dupuis V, Talbot D, Neveu S. Ionic magnetic fluid based on cobalt ferrite nanoparticles: Influence of hydrothermal treatment on the nanoparticle size. *J Magnetism Magnetic Materials*. 2011;323(10):1238-41.
11. Chan DCF, Kirpotin DB, Bunn Jr., PA. Synthesis and evaluation of colloidal magnetic iron oxides for the site specific radio- frequency-induced hyperthermia of cancer. *J Magn Magn Mater*. 1993;122:374–8,
12. Chouly C, Pouliquen D, Lucet I, Jeune P, Pellet JJ. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particles size, charge and surface nature on biodistribution. *J Micro-Encapsul*. 1996;13:245–55.
13. Cotica LF, Zanatta SC, Medeiros SN, Santos IA, Paesano A, Cunha JBM. Mechanical milling of the (alpha-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (x)(alpha-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)(1-x) system: an X-ray diffraction and Mossbauer spectral study. *Solid State Ionics*. 2004;171:283-8.
14. Dias BL. Síntese, caracterização e nanoestruturação de esferas funcionais submicrométricas. Dissertação (Mestrado) – Física. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2011.
15. Dormann JL, Fiorani D, Tronc E. Magnetic relaxation in fine particle systems. *Adv Chem Phys*. 1997;98:283–494.

16. Ferguson RM, Minard KR, Krishnan KM. Optimization of nanoparticle core size for magnetic particle imaging. *J Magn Magn Mater.* 2009;321:1548-51.
17. Mittal, A. K.; Christi, Y.; Banerjee, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances* Volume 31, Issue 2, March–April 2013, 346–356p. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975013000050>>. Acesso em: 29 mar. 2015.
18. Pierre, A. *Introduction to sol-gel processing.* Kluwer Academic Publishers: Norwell, 2002, pp 101-156.
19. Pong, K. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: therapeutic Implications for superoxide dismutase mimetics. *Expert Opin. Biol. Ther.*, v. 3, p. 127-139, 2003.
20. Zhu, R.; Chung, Ch.; Cha, Kc.; Yang, W.; Zheng, Yb.; Zhou, H.; Fused silver nanowires with metal oxide nanoparticles and organic polymers for highly transparent conductors. *ACS Nano*; 5:9877 e 82; 2011.
21. Tran, T.; Nguyen, T. *Controlled growth of uniform noble metal nanocrystals: Aqueous-based synthesis and some applications in biomedicine.* *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011, 88, 1-22.
22. Burda C, Chen X, Narayanan R, El-Sayed M.A, Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical Reviews*, v. 105, n.4. p. 1025 -102, 2005
23. Ferri P. Neolignanas e arilpropanoide das folhas de *Virola pavanis* (A.DC.) A.C. Smith. 1989. [134]f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000036666>> . Acesso em: 13 mar. 2017.
24. Bôa I.S.F; Porto, M.L; Pereira, A.C.H; Ramos, J.P.L; Scherer, R., Oliveira, J.P., et al., Resin from *V. oleifera* Protects Against Radiocontrast-Induced Nephropathy in Mice. *Journal PLoS ONE*, v.10, n.12, p.1-15, 2015.
25. Kuroshima k, Estudos químicos e farmacológicos das plantas *virola oleifera* e *hyeronima alchrneoides*. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química. 2002).
26. Veliloglu, Y.S.; Mazza, G.; Gao, L.; Oomah, B.D. Antioxidant Activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agricult. Food Chem.*, v. 46, n.10, p. 4113 -4117, 1998.
27. Velloso, J.C.R.; Barbosa, V.F.; Oliveira, O.M.M.F. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. *Rev. Eletr. Farm.*, vol. IV, n. 2, 119-130, 2007.
28. Hwu, J.R. Lin, Y.S. Josephrajan, T. Hsu, M.H. Cheng, F.Y. Yeh, C.S. Su, W.C. Shieh. D.B. *Targeted paclitaxel by conjugation to iron oxide and gold nanoparticles.* *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2008) 66-68.
29. Dhar, S. Daniel, W.L. Giljohann, D.A. Mirkin, C.A. Lippard, S.J. *Polyvalent oligonucleotide gold nanoparticle conjugates as delivery vehicles for platinum (IV) washheads.* *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 14652-14653.

30. Dreaden, E.C. Mwakwari, S.C. Sodji, Q.H. Oyelere, A.K. El-Sayed, M.A. *Tamoxifen poly(ethylene glycol) thiol gold nanoparticle conjugates: enhanced potency and selective delivery for breast cancer treatment.* Bioconjugate Chem. 20 (2009).
31. Templeton, A. C., Pietron, J. J., Murray, R. W., & Mulvaney, P. (2000). Solvent refractive index and core charge influences on the surface plasmon absorbance of alkanethiolate monolayer-protected gold clusters. *The Journal of Physical Chemistry B*, 104(3), 564-570.
32. Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Soc Rev.* 2009 Jun;38(6):1759-82.
33. Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, et al. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part Fibre Toxicol.* 2006; 3:11.
34. Brust M, Walker M, Bethell D, Schiffrin DJ, Whyman R. Synthesis of thiol-derivatized gold nanoparticles in a 2-phase liquid-liquid system. *J Chem Soc, Chem Commun.* 1994:801-802.
35. Brewer SH, Glomm WR, Johnson MC, Knag MK, Franzen S. Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces. *Langmuir.* 2005 Sep 27; 21(20):9303-7.
36. Chen PC, Mwakwari SC, Oyelere AK. Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing (Review). *Nanotechnology, science and applications.* 2008; 1:45-66.
37. Chithrani BD, Chan WC. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.* 2007 Jun; 7(6):1542-50.
38. Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small.* 2005 Mar; 1(3):325-7.
39. Derfus AM, Chan WCW, Bhatia SN. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Lett.* 2004; 4(1):11-8.
40. Dumortier H, Lacotte S, Pastorin G, Marega R, Wu W, Bonifazi D, et al. Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells. *Nano Lett.* 2006 Jul; 6(7):1522-8.
41. Fadeel B, Garcia-Bennett AE. Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* Mar 8; 62(3):362-74.
42. Dumortier H, Lacotte S, Pastorin G, Marega R, Wu W, Bonifazi D, et al. Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells. *Nano Lett.* 2006 Jul; 6(7):1522-8.
43. Choi S.Y, Jeong S., Jang S.H., Park J., Park J.H., Ock K.S., Lee S.Y., Joo S. In vitro toxicity of serum protein-adsorbed citrate-reduced gold nanoparticles in human lung adenocarcinoma cells. *Toxicol In Vitro.* 2012;26(2):229-237.
44. Carlson R, Design and optimization in organic synthesis. Elsevier. Amsterdam, 1992.
45. Ferré J, Rius F.X. *Técnicas de Laboratorio* 274 (2002) 648-652.
46. Pan Y., Neuss S., Leifert A., Fischler M., Wen F., Simon U., Schmid G., Brandau W., Jahnen- Dechent W. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small.* 2007;3(11):1941-1949.



47. Calado V., Montgomery D., *Planejamento de Experimentos usando o Statistica*. Rio de Janeiro. E-Papers Serviços Editoriais, 2003.
48. Lara Porras, A.M. "Diseño Estadístico de Experimentos, Análisis de la Varianza y Temas Relacionados: Tratamiento Informático mediante SPSS." Proyecto Sur de Ediciones. 2000.
49. Montgomery D.C. (1998). Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica.
50. Sanchez L, Mitjans M, Infente MR, Vinardell MP, 2004. Assessment of the potential skin irritation of lysine-derivative anionic surfactants using mouse fibroblast and human keratinocytes as an alternative to animal testing. *Pharmac Res* 21, 1637-1641.
51. Lui RH, Finley J. 2005 Potential cell culture models for antioxidant research. *J agric food chem* 53, 4311-4314.
52. Gille JJ, Joenje H. 1992. Cell culture models for oxidative stress: superoxide and hydrogen peroxide versus normobaric hyperoxia *Matat res* 2755 (3-6), 405 – 414
53. Ali, M. E.; Hashim, U.; Mustafa, S.; Che Man, Y. B.; Islam, Kh. N. *Journal of Nanomaterials* 2012, 2012, Article ID 103607.
54. Al-Qadi S., Remuñán-López C. Nanopartículas metálicas: oro. En: Real Academia Nacional de Farmacia. Nanotecnología farmacéutica. Madrid; 2009. pp. 223-248.
55. Amanda J. Haes, Shengli Zou, George C. Schatz, and Richard P. Van Duyne. A Nanoscale Optical Biosensor: The Long Range Distance Dependence of the Localized Surface Plasmon Resonance of Noble Metal Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2004, 108 (1), pp. 109–116. DOI: 10.1021/jp0361327.
56. Barrientos F, Cahuana K, Pajares A, Rodrigues JdD. Blog Solventes Industriales. [Online]. 2009 [cited 2012 Abril 19. Available from: <http://solventesindustrialesuni.blogspot.com>.
57. Bayliss, P. Mineral Powder Diffraction File Data Book, JCPDSSwarthmore, PA, 1986.
58. Boisselier, E., & Astruc, D. (2009). Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chemical society reviews*, 38(6), 1759-1782.
59. Calado V., Montgomery D., *Planejamento de Experimentos usando o Statistica*. Rio de Janeiro. E-Papers Serviços Editoriais, 2003.
60. Chen P.C., Mwakwari S.C., Oyelere A.K. Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing. *Nanotechnol Sci Applications*. 2008;1(1): 45-66.
61. Choi S.Y, Jeong S., Jang S.H., Park J., Park J.H., Ock K.S., Lee S.Y., Joo S. In vitro toxicity of serum protein-adsorbed citrate-reduced gold nanoparticles in human lung adenocarcinoma cells. *Toxicol In Vitro*. 2012;26 (2):229-237.
62. Clogston, J.; Patri, A. Zeta Potential measurement, Grobelny, J. et al., Size measurement of nanoparticles using Atomic Force Microscopy en Characterization of nanoparticles intended for drug delivery, *Methods in Molecular Biology*, vol. 697, McNeil, S. Humana Press: New York, 2011, pp 35-51, 61-73.
63. De Jong W.H., Hagens W.I., Krystek P., Burger M.C., Sips A.J., Geertsma R.E. Particle sizedependent organ distribution of gold

- nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials*. 2008;29(12):1912-1919.
64. Dhar, S. Daniel, W.L. Giljohann, D.A. Mirkin, C.A. Lippard, S.J. Polyvalent oligonucleotide gold nanoparticle conjugates as delivery vehicles for platinum (IV) washheads. *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 14652-14653.
  65. Di Guglielmo, C. J. De Lapuente, C. Porredon, D. Ramos-López, J. Sendra, M. Borràs. In vitro safety toxicology data for evaluation of gold nanoparticles-chronic cytotoxicity, genotoxicity and uptake. *J Nanosci Nanotechnol.* 12(8) (2012) 6185-6191.
  66. Dreaden, E.C. Mwakwari, S.C. Sodji, Q.H. Oyelere, A.K. El-Sayed, M.A. *Tamoxifen poly(ethylene glycol) thiol gold nanoparticle conjugates: enhanced potency and selective delivery for breast cancer treatment.* *Bioconjugate Chem.* 20 (2009).
  67. Haiss, W.; Thanh, N.; Aveyard, J.; Fernig, D. *Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis Spectra.* *Analytical Chemistry*, 2007, 79, 4215-4221.
  68. Hernando, A. Crespo, P. and García M.A.; "Metallic Magnetic Nanoparticles" Review Article. *The Scientific World JOURNAL*; DOI 10.1100/tsw.2005.121, (2005).
  69. Hwu, J.R. Lin, Y.S. Josephrajan, T. Hsu, M.H. Cheng, F.Y. Yeh, C.S. Su, W.C. Shieh. D.B. *Targeted paclitaxel by conjugation to iron oxide and gold nanoparticles.* *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2008) 66-68.
  70. Nilda B. Reinaudi, Lic. Gloria Cardozo; "Gravimetría", Cátedra de Química III, (2004).
  71. James T. Nurmi, Paul G. Tratnyek, Vaishnavi Sarathy, Donald R. Baer, James E. Amonette, Klaus Pecher, Chongmin Wang, John C. Linehan, Dean W. Matson, R. Lee Penn, And Michelled D. Driessen; "Characterization and Properties of Metallic Iron Nanoparticles: Spectroscopy, Electrochemistry, and Kinetics"; *Environ. Sci. Technol* 39, 1221-1230, (2005).
  72. Jacqueline Corredor Acuña, Félix Echeverría Echeverría; "Nanoparticled iron oxides synthesis; *Scientia et Technica*", (2007).
  73. Jenkins, R. & L.Snyder, R. *Introduction to X-Ray Powder Diffractometry.* (John Wiley & Sons, 1996).
  74. Basit L, Nepijko S.A, Shukoor I, Ksenofontov V, Klimenkov M, Fecher G.H, Schonhense G, Tremel H, Felser C. "Structure and magnetic properties of iron-platinum particles with  $\gamma$ -ferric-oxide shell", *Appl Phys A* 94: 619-625, (2009).
  75. Lock, J.A. G. Gouesbet. *Generalized Lorenz-Mie theory and applications.* *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 110 (2009) 800-807.
  76. Marc R. Knecht and Richard M. Crooks; "Magnetic properties of dendrimer-encapsulated iron nanoparticles containing an average of 55 and 147 atoms"; *New J. Chem.* ,2007, 31,1349–1353;DOI:10.1039/b616471b,(2007).
  77. Mie. G. *Beiträge zur Optik trüben Medien speziell kolloidaler Metalösungen.* *Annalen der Physik* 25 (1908) 377– 452.
  78. Ferré J, Rius F X, *Técnicas de Laboratorio* 274 (2002) 648-652.

79. Carlson R, Design and optimization in organic síntesis. Elsevier. Amsterdam, 1992.
80. Nagarajan, R. *Nanoparticles: Building blocks for nanotechnology en Nanoparticles: Synthesis, stabilization, passivation and functionalization*, R. Nagarajan, T. Hatton. American Chemical Society, ACS Symp. Series No. 996: Washington DC, 2008, pp 2-14, 16-30.
81. Nguyen, D.; Kim, D.; Kim, K. Controlled synthesis and biomolecular probe application of gold nanoparticles. *Micron*, 2011, 42, 207-227.
82. Niidome, T. M. Yamagata, Y. Okamoto, Y. Akiyama, H. Takahashi, T. Kawano, Y. Katayama, Y. Niidome. *PEGmodified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications*. *J. Control. Release* 114 (2006) 343–347.
83. Lloret P.E, Moina C. A, Ybarra G. O.: “Síntesis, funcionalización y caracterización de nanopartículas magnéticas con estructura núcleo-cáscara”; congreso SAM/ CONAMET,( 2007).
84. Patra H.K., Banerjee S., Chaudhuri U., Lahiri P., Dasgupta A.K. Cell selective response to gold nanoparticles. *Nanomedicine*. 2007;3(2):111-119.
85. Peng, G.; Tisch, U.; Adams, O.; Hakim, M.; Shehada, N.; Broza, Y. Y.; Bilan, S.; Abdah-Bortnyak, R.; Kuten, A.; Haick, H. *Nature Nanotech.*, 2009, 4, 669-673
86. Tartaj P, Morales M, Veintemillas-Verdaguer S, González-Carreño T and Serna C. J; “*The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine*”; *J.Phys. D: Appl. Phys.* 36 R182–R197,(2003)
87. Pierre, A. *Introduction to sol-gel processing*. Kluwer Academic Publishers: Norwell, 2002, pp 101-156.
88. Polte, J.; Ahner, T.; Delissen, F.; Sokolov, S.; Emmerling, F.; Thunemann, A.; Kraehnert, R. *Mechanism of gold nanoparticle formation in the classical citrate synthesis method derived from coupled in situ XANES and SAXS evaluation*. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132, 1296-1301.
89. Pong, B.; Elim, H.; Chong, J.; Ji, W.; Trout, B.; Lee, J. Y. *New insights on the nanoparticle growth mechanism in the citrate reduction of gold (III) salt: formation of the Au nanowire intermediate and its nonlinear optical properties*. *Journal of Physical Chemistry C*, 2007, 111, 6281-6287.
90. Poole, C. P. & Owens, F. J. in *Introduction to nanotechnology* Ch. 1-8, (John wiley & Sons 2003).
91. Milaneze B, Oliveira J, Augusto I, Keijok W, Côrrea A, Ferreira D, Facile Synthesis of Monodisperse Gold Nanocrystals Using *Virola oleifera*. *Nanoscale Research Letters* 2016;11:465. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1683-3>- 2016
92. “Precipitación: Pureza de los precipitados”, [www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/r12354.DOC](http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/r12354.DOC). (Mayo 2011)
93. Rana, S. Bajaj, A. Mout, R. Rotello, V. *Monolayer coated gold nanoparticles for delivery applications*. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (2012) 200-216.
94. Rui Hao, Ruijun Xing, Zhichuan Xu, Yanglong Hou, Song Gao and Shouheng Sun; “Synthesis, Functionalization and Biomedical Applications of Multifunctional Magnetic Nanoparticle”. *Advanced Material*, XX, 1-14,( 2010).

95. Saifuddin N, Wong CW, Nur-Yasumira AA. Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of bacteria with microwave irradiation. *E-Journal of Chemistry*. 2009; 6(1): p. 61-70.
96. Seo, D.; Park, J. C.; Song, H. J. *Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 14863.
97. Stuchinskaya, T.; Moreno, M.; Cook, M. J.; Edwards, D. R.; Russell, D. A. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2011, 10, 822-831
98. Oliveira J. Estudo da síntese de nanopartículas de ouro e bioconjugação com proteínas para desenvolvimento de nanosensores. Rede Nordeste de Biotecnologia – Renorbio Universidade Federal Do Espírito Santo – UFES. Programa de Pós-Graduação Em Biotecnologia. 2016
99. Templeton, A. C., Pietron, J. J., Murray, R. W., & Mulvaney, P. (2000). Solvent refractive index and core charge influences on the surface plasmon absorbance of alkanethiolate monolayer-protected gold clusters. *The Journal of Physical Chemistry B*, 104(3), 564-570.
100. Tran, T.; Nguyen, T. *Controlled growth of uniform noble metal nanocrystals: Aqueous-based synthesis and some applications in biomedicine*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011, 88, 1-22.
101. UPV/EHU OCW-2016: Nanotecnología en Alimentos. Ruiz de Larramendi Idoia.
102. Singh, A. K.; Srivastava, O.N. One-Step Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Black Cardamom and Effect of pH on Its Synthesis. *Nanoscale Research Letters*, n.10, p.353, 2015.
103. Armendariz, V.; Herrera, I.; Peralta-Videa, J.R.; Jose-Yacaman, M.; Troiani, H.; Santiago, P.; Gardea-Torresdey, J.L. Size controlled gold nanoparticle formation by Avena sativa biomass: Use of plants in nanobiotechnology. *Journal of Nanoparticle Research*, 2004, 6, 377–382, 2004.
104. Boruah, S. K.; Boruah, P. K.; Sarma, P.; Medhi, C.; Medhi, O. K. Green synthesis of gold nanoparticles using Camellia sinensis and kinetics of the reaction. *Advanced Materials Letters*, v.3, n.6, p.481-486, 2012.
105. Huang, J. et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried Cinnamomum camphora leaf. *Nanotechnology*, v. 18, n. 10, p. 105104, 2007.
106. Mishra, A. et al. Biocatalytic and antimicrobial activities of gold nanoparticles synthesized by Trichoderma sp. *Bioresource Technology*, v. 166, p. 235-242, 2014.
107. Zhou, Y. et al. Biosynthesis of Gold Nanoparticles by Foliar Broths: Roles of Biocompounds and Other Attributes of the Extracts. *Nanoscale Research Letters*, n.5, p.1351–1359, 2010.

## 8. APÊNDICES

### 8.1. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

1º Simpósio Sudeste Brasileiro de Microscopia e Microanálise e 1st International Multidisciplinary Microscopy School and Exhibition realizado em Vitória - ES

#### **BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO USANDO EXTRATO DE *Virola oleifera***

Luis Alberto Contreras<sup>1</sup>, Jairo Pinto de Oliveira<sup>1</sup>, Marco Cesar Cunegundes Guimarães<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, Universidade Federal do Espírito Santo - Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, E.S. 29.042-755 – Brasil, Tel: +55 (27) 3335-7365, email: marco.guimaraes@ufes.br

A síntese verde de nanopartículas surge em resposta aos processos convencionais de síntese de nanomateriais que são processos complexos e freqüentemente exige um elevado consumo de reagentes químicos, além de exigir custos elevados e danos ambientais associados. A síntese verde de nanopartículas utiliza plantas para a obtenção de extratos, que são capazes de reduzir os cátions de uma solução de sal de metal, os extratos podem às vezes, estabilizar estas partículas nanométricas e impedi-las de serem adicionadas porque elas estão associadas com moléculas orgânicas de extratos de plantas. Outra grande vantagem do uso deste método é o de controlar o tamanho das nanopartículas por variação da concentração de extrato de planta usada sem o uso de agentes tensoativos, estabilizadores ou palmilhas. Em vez disso, uma das desvantagens da síntese verde de nanopartículas, é a fraca reprodutibilidade principalmente em relação à estabilidade da dispersão dos colóides.

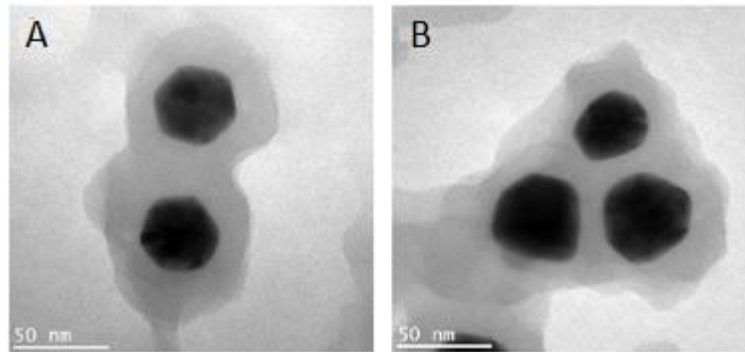
Tomando como ponto de partida a pesquisa “BIOSSÍNTESE OTIMIZADA DE NANOPARTÍCULAS DE OURO COM EXTRATO DE *Virola oleifera*<sup>1</sup>” realizada no Laboratório LUCCAR da UFES, os melhores e piores resultados do planejamento fatorial e potencial zeta deste trabalho foram reproduzidos para compara-los entre si. Assim levando em conta os parâmetros obtidos acima, foi realizada a reprodução da síntese de nanopartículas de ouro com extrato de *Virola oleifera* de 6 ensaios (concentração do extrato: 0,5 mg.ml<sup>-1</sup>, pH 3, 5, 7, e Concentração do extrato: 3,5 mg.ml<sup>-1</sup>, pH 3, 5, 7); recebendo a melhor formação de nanopartículas de ouro sob as seguintes condições (concentração do extrato: 0,5 mg.ml<sup>-1</sup>, pH 5, 7).

Finalmente, pode ser estabelecido que o melhor fatorial para obter nanopartículas de ouro é diminuir a concentração de extrato de planta (0,5

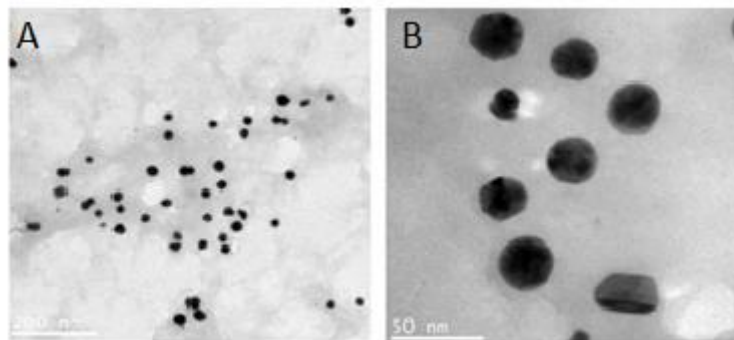
mg.mL<sup>-1</sup>), e o pH influencia diretamente o tamanho das partículas, quanto maior pH, menor é tamanho de partícula.

Referencias.

[1] Ferreira D. Biossíntese otimizada de nanopartículas de ouro com extrato de *virola oleífera*. Universidade Federal do Espírito Santo. 2016.



**Figura 1.** Microscopia eletrônica de transmissão do ensaio (pH5 – 0,5 mg. mL<sup>-1</sup> de extrato). Aumentos: A. B. 150000X.



**Figura 2.** Microscopia eletrônica de transmissão do ensaio (pH7 – 0,5 mg. mL<sup>-1</sup> de extrato). Aumentos: A. 600000X; B. 150000X.

26º Congresso Brasileiro de Microscopia realizado em Armação dos Búzios, Rio de Janeiro - Brasil.

## **Influence of pH on the size of gold nanoparticles synthesized using *Virola oleifera* extract**

Luis Alberto Contreras<sup>1</sup>, Jairo Pinto de Oliveira<sup>1</sup>, Marco Cesar Cunegundes Guimarães<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, Universidade Federal do Espírito Santo - Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, E.S. 29.042-755 – Brasil, Tel: +55 (27) 3335-7365, email: marco.guimaraes@ufes.br

In this study, we investigated the pH effects on the size of gold nanoparticles (AuNPs). AuNPs synthesized from *Virola oleifera* (Schott) A. C. Smith, which has antioxidant properties, extract was characterized using UV-Vis spectroscopy and Transmission Electron Microscopy (TEM). The pH of the starting solution varied from 3 to 7. It was found that pH influenced inversely on the nanoparticles sizes. As we increase the pH, the AuNPs size becomes smaller. Moreover, we observed that the best extract concentration was 0,5 mg.ml<sup>-1</sup>. Growth of gold nanoparticles was confirmed in all conditions used by UV-Vis absorption spectroscopy (Fig. 1). Peak wavelength was observed between 530 and 540 nm. We achieved size variations between 9 nm and 16 nm. The morphology was confirmed by TEM, observing at pH 5 hexagonal nanoparticles and at pH 7 mostly spherical nanoparticles. (Figures 2 and 3). Concluding that the pH variation of the *Virola oleifera* solution in the AuNPs synthesis allows obtaining nanoparticles of different sizes and shapes. [1] [2]

References:

- [1] BÔA I.S.F; PORTO, M.L; PEREIRA, A.C.H; RAMOS, J.P.L; SCHERER, R., OLIVEIRA, J.P., et al., Resin from *V. oleifera* Protects Against Radiocontrast-Induced Nephropathy in Mice. Journal PLoS ONE, v.10, n.12, p.1-15, 2015.
- [2] IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. Green Chemistry, v. 13, n. 10, p. 2638, 2011.

Acknowledgements

This work was supported by the Laboratory of Cellular Ultrastructure Carlos Alberto Redins (LUCCAR), CAPES, FINEP and LABIOM.

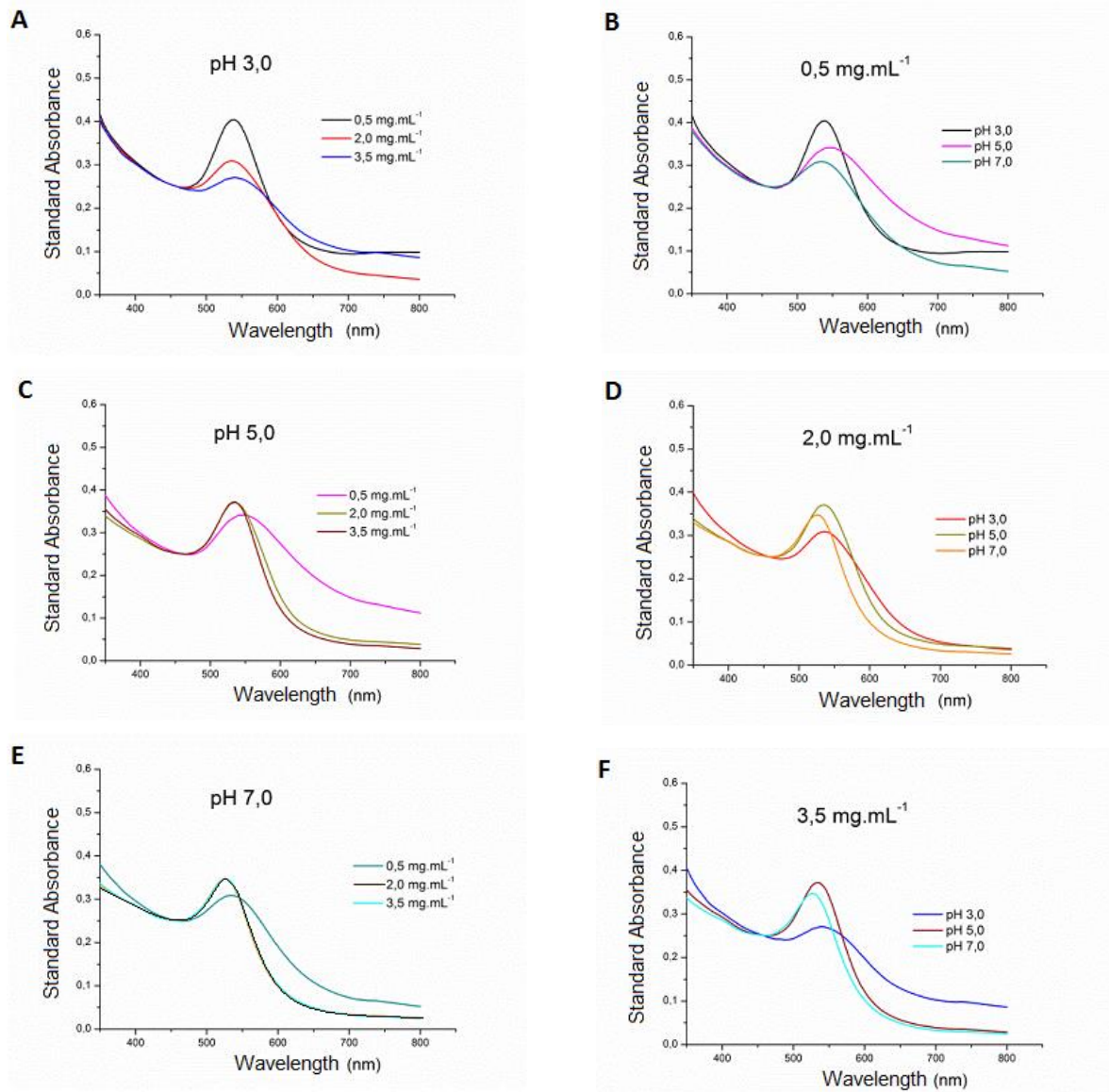


Figure 1. UV-Visible absorption spectroscopy. Comparison of different pH (A - C - E). Comparison of different concentrations of *V. oleifera* extract (B - D - F).

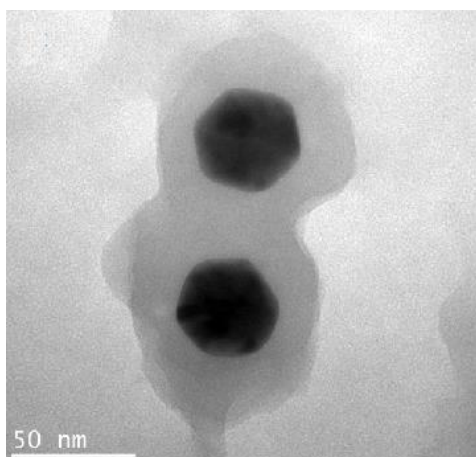


Figure 2. Transmission electron microscopy assay (pH 5 - 0.5 mg ml<sup>-1</sup> extract).

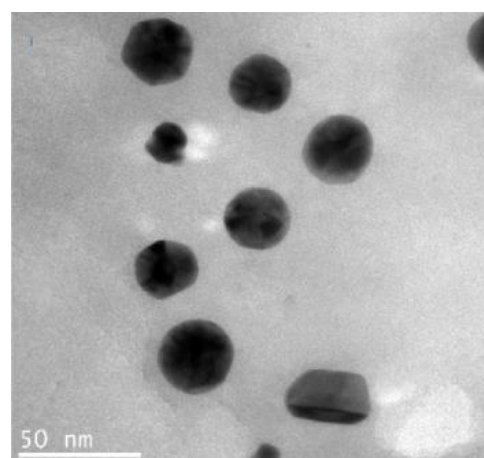


Figure 3. Transmission electron microscopy assay (pH 7 - 0.5 mg ml<sup>-1</sup> extract).



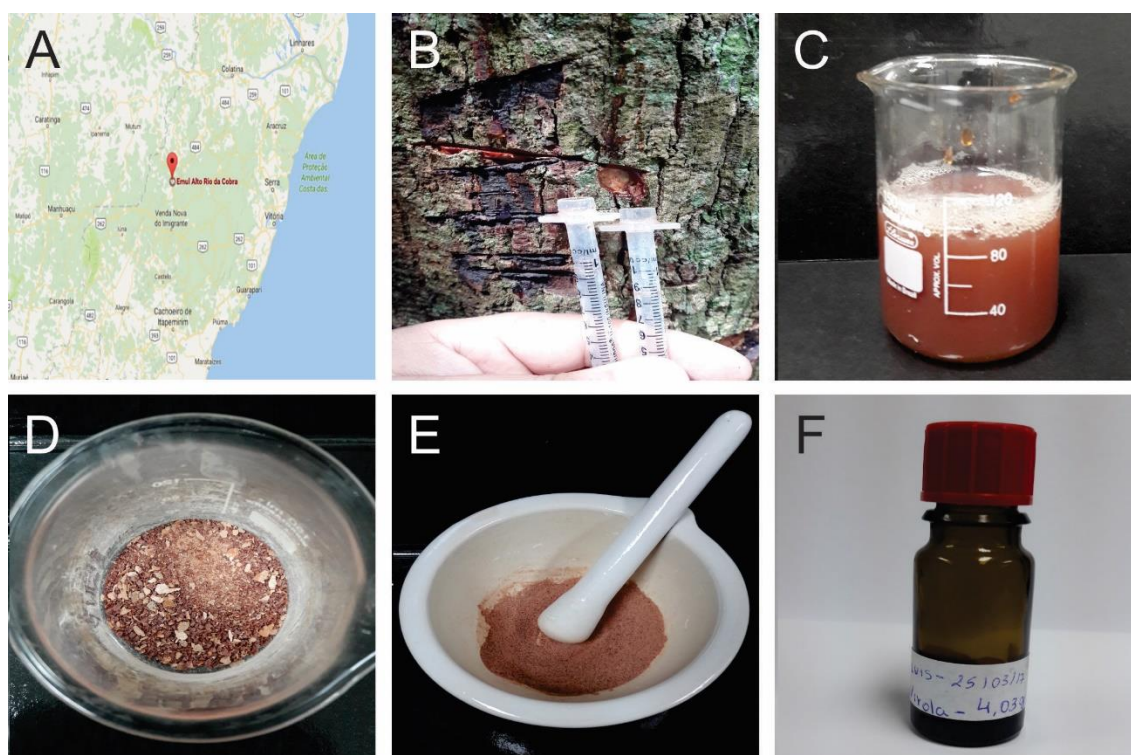
## 9. ANEXOS

### 9.1. ANEXO I

#### Coleção e preparação do extrato de *Virola oleifera*.

A resina *Virola oleifera* foi coletada durante o mês de março de 2017 na região de Alfonso Claudio / Rio da Cobra, no estado do Espírito Santo - Brasil. A resina foi retirada de uma árvore previamente identificada pelo Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Vila Velha.

Para coletar a resina, foram feitos alguns cortes na casca da árvore e, em seguida, com o auxílio de seringas procedem a recolher a seiva da árvore, esta seiva foi armazenada a 4 ° C e no escuro para transporte ao laboratório. Uma vez no laboratório, a seiva foi filtrada para evitar contaminantes externos e seca a 50 ° C durante 24 horas, este resíduo foi triturado e armazenado em uma garrafa âmbar a 4 ° C para uso posterior, como é mostrado em as Figuras abaixo.



**Figura 1.** Site de coleta de *V. oleifera* (A). Coleção de seiva de *V. oleifera* (B). *V. oleifera* antes da dessecação (C). *V. oleifera* depois da dessecação a 50°C (D). *V. oleifera* triturada (E). Extrato de *V. oleifera* em garrafa âmbar para armazenamento a 4 ° C (F).