



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

Nanopartículas de ouro reduzidas com *Viola oleifera* inibem o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

RAFAELLA DE RESENDE MARQUES

VITÓRIA
2020

RAFAELLA DE RESENDE MARQUES

Nanopartículas de ouro reduzidas com *Viola oleifera* inibem o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.
Orientador: Prof^o Marco Cesar Cunegundes Guimarães.

VITÓRIA
2020

PPGBiotec

RAFAELLA DE RESENDE MARQUES

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

D278n de Resende Marques, Rafaella, 1990-
Nanopartículas de ouro reduzidas com Virola oleifera inibem o crescimento de Staphylococcus aureus e Pseudomonas aeruginosa / Rafaella de Resende Marques. - 2020.
53 f. : il.

Orientador: .
Coorientador: Marco César Cunegundes Guimarães.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Síntese verde. 2. Virola oleifera. 3. Nanopartículas. 4. Citotoxicidade. 5. Antibacteriano. 6. Antioxidante. I. , . II. Cunegundes Guimarães, Marco César. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

RAFAELLA DE RESENDE MARQUES

Nanopartículas de ouro reduzidas com *Viola oleífera* inibem o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 18 de novembro de 2020.

Prof. Marco Cesar Cunegundes Guimarães
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Adriana Madeira Alves da Silva
Universidade Federal do Espírito Santo

VITÓRIA, ES

2020

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pela dedicação para iniciar e pelo discernimento para finalizar;

Ao professor Marco Cesar Cunegundes por toda orientação necessária e pela compreensão durante os desafios enfrentados;

À equipe do LUCCAR por não só ter me proporcionado conhecimento e disciplina, como companheirismo e diversão resultando em uma família;

Aos amigos Sady e Natane, amigos fundamentais não só de pesquisa, mas que carregarei para a vida toda no meu coração.

À equipe da Nano: Flávio, Laryssa e Wanderson pelo excelente altruísmo e trabalho em grupo;

Aos técnicos do LABIOM pelo apoio nos equipamentos de leitura;

Ao Laboratório de Biologia Celular e Virulência Bacteriana (LaBCaS), em especial ao professor Ricardo Schuenk e mestrandos Nayara e Marcos pelo excelente apoio prestado no fornecimento de materiais para os ensaios antimicrobianos;

Ao Laboratório de Triagem técnica de Produtos Naturais, em especial ao professor Rodrigo e mestrandia Jéssica pelo excelente apoio prestado no fornecimento de materiais para testes com células;

Ao Laboratório de Cultura Celular da UVV, em especial ao professor Márcio e a técnica Lorena pelo excelente apoio prestado no fornecimento de materiais para os testes com células;

Aos professores Adriana Madeira Alves da Silva e Ricardo Pinto Schuenck por aceitarem o convite de participar da banca examinadora;

À Miriam pelo excelente profissionalismo nas documentações;

À CAPES, FAPES, FINEP e CNPq pelo financiamento da pesquisa;

Às minhas afilhadas Sophia e Lívia por toda diversão e amor;

Aos meus amigos: Bruno Magela, Carol, Elaine, Emmanuel (Maneel), Frederico, Filipe, Hildebrando, Jessica, Joseanne, Larissa (Lalaah), Livia, Natã, Natane, Nayara, Renann, Tatielle, Thaiza, Thalles, Thaiys e Vitor para me lembrarem sempre que tenho as melhores pessoas do meu lado;

O presente trabalho não teria sido concretizado sem o apoio de vocês. Muito obrigada!

"Não importa que seja pouco, o importante que o avanço de hoje seja maior que o de ontem. Que os nossos passos de amanhã sejam mais largos dos que de hoje."

Daisaku Ikeda

Resumo

O presente trabalho avaliou o potencial antimicrobiano de nanopartículas de ouro reduzida com resina de *Virola oleifera* (AuNPs-Vo). Foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (clínicas e ATCC). Após a síntese, as AuNPs-Vo foram caracterizadas em relação a ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR), estabilidade (ZETA), tamanho e dispersão (DLS e TEM). Além disso, avaliou-se a estabilidade, floculação, ressuspensão, atividade antioxidante (FRAP) e citotoxicidade. As AuNPs-Vo foram ressuspensas em diferentes meios (DMSO 5% e 10%, PBS e MH+) e em soluções aquosas com variação de pH (1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13) e concentração de NaCl (1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 e 200 mmol.mL⁻¹). Os efeitos de diferentes concentrações (900 450 225 112.5 62.5 µg/mL) de AuNPs-Vo no crescimento de células (HaCaT e L929) e nas bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* foi analisado. As recém sintetizadas AuNPs-Vo se apresentaram monodispersas com tamanho médio de 22 nm, estáveis 21,59 mv, e se mantiveram estáveis em diferentes meios e apresentaram condição ótima de para isolamento em 14000 rpm e 20 min. As AuNPs-Vo apresentaram ainda elevada atividade antioxidante e baixa toxicidade. Por fim, foram efetivas no controle do crescimento de ambas as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosas*, apresentando valores acima de 90% e 80% de inibição respectivamente. Os resultados sugerem que AuNPs-Vo possuem potencial para aplicações terapêuticas biocompatíveis contra bactérias MDRS.

Palavras-chave: antibacteriano, antioxidante, citotoxicidade, estabilidade, nanopartículas, síntese verde, *Virola oleifera*.

Abstract

The present work analyzed the antibacterial activity of gold nanoparticles reduced with *Vibrio oleifera* (AuNPs-Vo). Cells of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* (clinical and ATCC) are used for experiments. After synthesis, AuNPs-Vo were characterized in localized surface plasmon resonance (LSPR), stability (ZETA), height and dispersion (DLS e TEM). In them, stability, flocculation, resuspension, antioxidant activities are available. AuNPs-Vo were resuspended in different mediums (DMSO 5% e 10%, PBS, e MH+) and solutions variable pH (1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13) and concentration of NaCl (1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 e 200 mmol.mL⁻¹). Effects of different concentrations (900 450 225 112.5 62.5 µg/mL) of AuNPs-Vo in cells developed (HaCaT e L929) and bacteria *S. aureus* e *P. aeruginosa* were available. Recent synthesis of AuNPs-Vo showed height monodisperse 22 nm, stable in different mediums (21,59 mv) and showed optimal condition for insulation at 14000 rpm and 20 min.

AuNPs-Vo also showed high antioxidant activity and low toxicity. Finally, they were effective in controlling the growth of both *S. aureus* and *P. aeruginosa*, with values.

Keywords: antibacterial, antioxidant, cytotoxicity, stability, nanoparticles, green synthesis,

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do mecanismo generalizado dos passos para a formação de nanopartículas de ouro. Fonte: Keijok, 2018.

Figura 2 - Imagens da planta *Viola oleifera* representando a extração da resina e suas folhas e frutos. Fonte: autora.

Figura 3 – Etapas de obtenção e produção da resina de *Viola oleifera* para os experimentos do projeto. Fonte: autora.

Figura 4 - Ilustração de uma leitura de varredura resultante no UV-VIS com esquema representativo das áreas de interesse na nanossíntese. **Fonte:** Contreras (2017).

Figura 5 – Esquema representativo da reação de oxirredução que descreve a produção de Fe^{2+} (forma ferrosa – azul escura) a partir da redução de Fe^{3+} (forma férrica – azul claro) presente no complexo com TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina). **Fonte:** Salari (2019).

Figura 6 – Leitura da curva resultante da síntese de nanopartículas de ouro reduzidas com *Viola oleifera* com seus respectivos dados característicos. Fonte: autora.

Figura 7 - Leitura da curva resultante da síntese de nanopartículas de ouro reduzidas com *Viola oleifera* no pH 7.7 (A), raio-x (B), Raman (C), MET (D), potencial zeta (E) e DLS (F). Fonte: autora e Contreras (2016).

Figura 8 – Leituras de varredura no UV-VIS representando o sobrenadante (acima) e as ressuspensões das nanopartículas em água (abaixo), com tabela de dados comparativos. Legenda: NPC: nanopartícula controle, 6K5'S: condição 6000rpm, 5 minutos, sobrenadante. **Fonte:** autora, Origin 8.5.

Figura 9 – Leituras de varredura no UV-VIS representando as ressuspensões nos diferentes meios PBS, Mueller Hinton com cátion ajustado (MH+), DMSO 10%, DMSO 5%. Fonte: autora, Origin 8.5

Figura 10 - Leituras de varredura no UV-VIS representando as ressuspensões das nanopartículas em soluções aquosas com diferentes pHs. **Fonte:** autora, Origin 8.5.

Figura 11 - Leituras de varredura no UV-VIS representando as ressuspensões das nanopartículas em soluções com cloreto de sódio com diferentes concentrações. **Fonte:** autora, Origin 8.5

Figura 12 – Imagens das bactérias *S. áureus* (acima) e *P. aeruginosa* (abaixo) no MEV. Fonte: autora.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela representando as soluções produzidas em diferentes concentrações e pHs.

Tabela 2 – Valores referentes aos picos característicos das sínteses nos diferentes tempos e pH de acordo com as leituras de varredura no UV-VIS. Observa-se em destaque a melhor condição com seus respectivos valores.

Tabela 3 - Valores referentes aos picos característicos das ressuspensões da figura 12.

Tabela 4 – Comparativo entre os valores de concentração de Fe nas amostras analisadas.
Fonte: autora.

Tabela 5 – Valores das porcentagens de inibição das substâncias analisadas nas respectivas massas. **Fonte:** autora.

Tabela 6 –Comparativo entre as massas onde a porcentagem de inibição foi de 50%. **Fonte:** autora.

Tabela 7 – Comparativo entre IC 50 das amostras celulares em contato com o extrato, nanopartículas e ouro. **Fonte:** autora.

Tabela 8 – Comparativo entre as absorbâncias das amostras celulares em contato com o DMSO puro e tratadas apenas com o meio de cultura (controle negativo). **Fonte:** autora.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Comparativo das áreas compreendidas nos comprimentos de onda entre 600 e 700 (AUC) com os pHs e as concentrações de sal. **Fonte:** autora, GraphPad Prism.

Gráfico 2 – curva padrão resultante utilizando os valores de absorbância do sulfato ferroso ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$). **Fonte:** autora, GraphPad Prism.

Gráfico 3 – comparativo entre as porcentagens de inibição do Trolox®, extrato e nanopartículas nas respectivas concentrações em μg representadas. **Fonte:** autora, GraphPad Prism.

Gráfico 4 – comparativo entre as porcentagens de citotoxicidade entre HAuCl_4 (ouro) extrato e nanopartículas na ordem da menor para a maior diluição (1 a 4). **Fonte:** autora, GraphPad Prism.

Gráfico 5 – comparativo de densidade ótica entre diferentes concentrações de nanopartículas na ordem da menor para a maior diluição (1 a 5) nos diferentes tempos analisados. As densidades óticas formam curvas de tempo-morte. **Fonte:** autora, GraphPad Prism.

Gráfico 6 – comparativo entre as porcentagens de inibição entre extrato, nanopartículas e HAuCl_4 na ordem da menor para a maior diluição (1 a 5). **Fonte:** autora, GraphPad Prism.

LISTA DE SIGLAS/ABREVIATURAS

$\Delta\lambda$ - Delta Lambda

λ máx. - Lambda máxima

Abs máx. - Absorbância máxima

ATCC - American Type Culture Collection

AuNP – Nanopartículas de ouro

AuNP-Vo – Nanopartículas de ouro de *Viola oleifera*

AUC - Área sob a curva

Au^x – Íon de ouro

DMSO – Dimetilsulfóxido

DO – Densidade ótica

FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power

FWHM - Full Width at Half Maximum (Largura de banda à meia altura)

HAuCl₄ – Ácido cloroáurico

MET – Microscópio eletrônico de transmissão

MEV – Microscópio eletrônico de varredura

MH – Mueller Hington

MH+ - Mueller Hington com cátion ajustado

MIC (CIM) – Concentração inibitória mínima

NP – nanopartículas em geral

PBS – Phosphate buffered saline (tampão fosfato)

TPTZ - 2,4,6-Tri(2-pyridyl) s-triazine

UV-VIS –Ultravioleta visível

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. NANOMATERIAIS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO	3
2.2. SÍNTESE VERDE.....	5
2.2.1. <i>Virola oleífera</i>	7
2.3. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS	9
3. OBJETIVOS	10
3.1. GERAL	10
3.2. ESPECÍFICOS	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO	11
4.2. TESTE DE RESSUSPENSÃO	14
4.3. FLOCULAÇÃO	15
4.4. TESTE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO MÉTODO FRAP	15
4.5. AVALIAÇÃO DE CITOTOXIDADE	18
4.6. CEPAS E ENSAIOS ANTIMICROBIANOS	19
4.6.1. Análise morfológica das bactérias tratadas com AuNPs por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1. BIOSÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO	21
5.2. TESTE DE RESSUSPENSÃO	22
5.3. FLOCULAÇÃO	25
5.4. ENSAIOS ANTIOXIDANTES PELO MÉTODO DE FRAP	27
5.5. AVALIAÇÃO DE CITOTOXIDADE	30
5.6. CEPAS E ENSAIOS ANTIMICROBIANOS	32
5.6.1. Análise morfológica das bactérias tratadas com AuNPs por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	35
REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana (AMR) é reconhecida como um dos principais desafios de saúde global do século 21. O aumento da frequência da resistência aos antibióticos em muitos patógenos bacterianos com subsequente falha da antibioticoterapia tem levado a centenas de milhares de mortes anualmente. Apesar disso, há consenso de que a AMR não pode ser resolvida simplesmente estudando o problema nas instalações de saúde, uma vez que a maioria dos ecossistemas contribui para o surgimento, aquisição e propagação de AMR. Deste modo, o descobrimento de novos antibióticos e a modificação química de drogas antibacterianas existentes estão entre as estratégias mais utilizadas para enfrentar o desafio da AMR.

Em esforços recentes para enfrentar este desafio, nanopartículas de ouro (AuNPs) surgem como novos e significativos agentes antibacterianos. AuNPs são naturalmente estáveis, inertes, atóxicas e de fácil controle do tamanho e forma. Dentre as diversas características físico-químicas que as tornam interessantes, como as propriedades ópticas e elétricas, as AuNPs são facilmente funcionalizadas com diferentes biomoléculas, tais como, drogas, genes, peptídeos, entre outros. AuNPs conjugadas apresentam aumento da atividade antibacteriana. Efetivamente, as evidências sugerem que AuNPs conjugada com biomoléculas diminuem a taxa de crescimento bacteriano. No entanto, há algumas contradições na literatura que dificultam uma discussão mais efetiva e até mesmo um consenso sobre a utilização desses compostos como novos agentes antibacterianos.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano de nanopartículas de ouro sintetizada com resina da planta *Virola oleifera*. A resina escolhida é rica em compostos oxigenados e nitrogenados, como flavonoides e terpenoides, com alto poder antioxidante, com potencial para funcionalizar e estabilizar as AuNPs sintetizadas. A atividade antibacteriana foi testada em duas cepas diferentes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, uma clínica e outra oriunda da ATCC. As AuNPs se mostraram mais efetivas contra ambas as cepas de *Staphylococcus aureus* e apresentaram baixa toxicidade em linhagens de células HaCaT e

L929. Além disso, as AuNPs foram caracterizadas em relação a sua banda LSPR, tamanho e estabilidade, morfologia e cristalinidade. Deste modo, acreditamos que esse nanomaterial possa ser aplicado com potencial antimicrobiano para testes clínicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os nanomateriais são aqueles que possuem propriedades morfológicas com dimensões de diâmetro inferiores a 100 nm (10^{-9} metro). Dentro dos nanomateriais mais representativos e com maior campo de estudo estão as nanopartículas (RANA, 2012).

Uma solução formada por duas fases, sendo uma composta de partículas em tamanho extremamente reduzido e uma segunda composta por um dispersante, é conhecida como dispersão coloidal, e uma dispersão coloidal a olho nu aparenta ser uma solução homogênea (HWU, 2008). Portanto uma solução coloidal de nanopartícula é aquela formada por partículas manométricas suspensas em um dispersante.

Soluções coloidais de nanopartículas envolvem uma síntese por meio da redução de íons dos metais nobres como o cobre, prata e ouro. Tais soluções mostram uma coloração vermelho característico e muito intensa (CHENG, 2018). Devido ao seu tamanho em nanoescala e de sua elevada proporção entre área superficial e volume, elas também têm uma porcentagem consideravelmente mais alta de átomos em sua superfície quando comparadas com partículas maiores, o que pode torná-las mais reativas (AL QADI, 2009).

2.1. NANOMATERIAIS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO

Diversos trabalhos vêm confirmando que as NP's são uma boa alternativa no controle de microrganismos. Uma boa discussão sobre tais ações é descrita no trabalho de Wang (2017) e colaboradores:

“Nanopartículas (NPs) são cada vez mais usadas para atingir bactérias como uma alternativa aos antibióticos. A nanotecnologia pode ser particularmente vantajosa no tratamento de infecções bacterianas. Os exemplos incluem a utilização de NPs em revestimentos antibacterianos para dispositivos implantáveis e materiais medicinais para prevenir infecções e promover a cicatrização de feridas, em sistemas de administração de antibióticos para tratar doenças, em sistemas de detecção de bactérias para gerar diagnóstico microbiano e

em vacinas antibacterianas para controlar infecções bacterianas. Os mecanismos antibacterianos das PNs são pouco compreendidos, mas os mecanismos atualmente aceitos incluem indução de estresse oxidativo, liberação de íons metálicos e mecanismos não oxidativos. Os múltiplos mecanismos simultâneos de ação contra micróbios exigiriam múltiplas mutações genéticas simultâneas na mesma célula bacteriana para que a resistência antibacteriana se desenvolvesse; portanto, é difícil para as células bacterianas se tornarem resistentes aos NPs.” Pág 1.

Aquelas obtidas por síntese verde (extrato do fruto de *A. comosus* como agente redutor) foram capazes de reduzir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosas* no trabalho de Haes (2004).

O artigo de Shin (2019) trata da eficiência antibacteriana recentemente encontrada de nanoplacas Rh cristalinas do tipo coral com morfologia de superfície rugosa sintetizada por substituição galvânica inversa direcional exibiram eficiência antibacteriana altamente aprimorada. A eficiência antibacteriana observada foi comparável às nanoplacas Ag, um conhecido nanoagente anticâncer. Os resultados demonstram claramente que a composição e morfologia de uma nanoestrutura desempenham papéis significativos nos efeitos antibacterianos.

Martelli (2018) afirmou em seus estudos que existem moléculas naturais com alto potencial antioxidante que também desempenham excelentes funções antibacterianas, como compostos polifenólicos (presentes na resina de *Virola oleífera*) e esse potencial pode se dar por três vias: diminuição da permeabilidade da membrana, vazamento do citoplasma e inibição da síntese de DNA

Em 2012, Yan Cui e colaboradores realizaram um trabalho com atividade antimicrobiana de NP's de ouro e confirmaram a ação bactericida, com Concentração Inibitória Mínima (MIC) de $4\mu\text{g ml}^{-1}$ e Concentração Bacteriostática Mínima (MBC) de $12 - 16\mu\text{g ml}^{-1}$ contra *E. coli*. A combinação de nanopartículas de ouro sintetizadas por uma rota verde com ofloxacina foi capaz de potencializar o efeito antibacteriano do antibiótico (AL QADI, 2009).

O desenvolvimento de um curativo de nanopartículas de prata reduzida com proteína sericina presente nos tecidos de casulos *Bombyx mori* (SCWF-AgNPs) foi descrito em 2017 por Kun Yu e colaboradores, porque a função protetora do casulo do bicho-da-seda se assemelha à maneira pela qual a pele protege o corpo humano. O curativo SCWF-AgNP exibiu excelente biocompatibilidade, desempenho antibacteriano e boa extensibilidade indicando em experimentos in vivo a aceleração significativa na cicatrização de feridas infectadas em coelhos brancos da Nova Zelândia. O exame histológico revelou a reconstrução foi bem-sucedida da epiderme intacta.

Ibrahim (2015) realizou um estudo de um método ecológico, econômico, rápido e fácil para a síntese de nanopartículas de prata usando o extrato de casca de banana (BPE) como agente redutor e nivelador. Microrganismos representativos de bactérias Gram positivas (*Bacillus subtilis* ; isolado local, *Staphylococcus aureus* ; ATCC 6538) e bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* ; ATCC 9027, *P. aeruginosa* ; isolado local, *Escherichia coli* ; ATCC 8739), bem como levedura *Candida albicans* , ATCC 120231 foram usadas para avaliar a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata preparadas . As nanopartículas sintetizadas mostraram efeito sinérgico com o antibiótico levofloxacino (antibiótico padrão) e a atividade antimicrobiana aumentou de 1,16 a 1,32 vezes.

2.2. SÍNTESE VERDE

Nanopartículas podem ser obtidas por vários processos físicos, químicos ou mesmo biológicos e atualmente podem ser sintetizadas nos mais variados formatos como esferas, cubos, tubos, prismas, octaedros, e muitos outros (TREVISAN, 2011). Cada forma apresenta diferentes propriedades físicas – elétricas, magnéticas, catalíticas e ópticas – que podem ser ajustadas pela modificação, por exemplo, da razão entre comprimento e diâmetro da nanopartícula (KLAR, 1998).

Pesquisas relacionadas à síntese de nanomateriais utilizando extratos vegetais iniciou uma nova era de métodos rápidos e não tóxicos para a produção de

nanopartículas (IRAVANI, 2011). Esse método, também chamado de síntese verde, busca a utilização de compostos naturais como agentes redutores, proporcionando uma alternativa sustentável aos produtos tóxicos (BORM, 2006). Síntese verde também conhecida como síntese biológica tem sido efetuada, sobretudo, através do uso de bactérias, fungos, plantas, cianobactérias e actinomicetos (BRUST, 1994).

Dentre os mais variados tipos de sistemas biológicos utilizados nas sínteses de NPs, plantas podem atuar como agentes químicos redutores de sais metálicos devido à grande variedade de componentes. Além disso, possui grande vantagem em relação aos solventes tóxicos porque além de levar a formação do coloide, também estabilizam e em alguns casos funcionalizam as nanopartículas (MOGHIMI, 2005). Entre os vários compostos, se destacam: compostos fenólicos, flavonoides, aminoácidos, terpenóides, ácido cítrico, grupos funcionais (álcoois, aldeídos, aminas), compostos heterocíclicos, polissacarídeos e ácido tânico (BOA, 2015).

A síntese de nanopartículas em fase líquida é mostrada na literatura por meio de diversos métodos (CHENG, 2010). Sabendo que cada metodologia possui propriedades específicas, o coloide formado durante a síntese se resume em quatro componentes: agente redutor, precursor, estabilizante e meio reacional (DERFUS, 2004). A formação das nanopartículas ocorre através de dois passos, cujo primeiro é a redução do íon metálico proveniente de um sal do metal que será o precursor das nanopartículas. Para ocorrer a redução do cátion de ouro pode ser utilizado diversos tipos de agentes redutores, como o citrato de sódio, borohidreto de sódio (ROY, 2010), ácido ascórbico (RAVEERDRAN, 2003), entre outros. Quanto a estabilização e meio reacional, é necessário averiguar a otimização da concentração dos agentes redutores, pH, temperatura, tempo de reação e o tipo de dispersante (ROY, 2010).

A redução dos íons Au^{+3} por conjuntos de moléculas encontradas nos extratos de plantas, tem gerado um enorme volume de pesquisas bem-sucedidas utilizando estes compostos (MAYO, 2003) visto que tais compostos possuem algumas vantagens, como o baixo custo de cultivo, o tempo de produção curto, a segurança e a capacidade de aumentar os volumes de produção tornando as

plantas uma plataforma atraente para a síntese de nanopartículas (NJAGI, 2011).

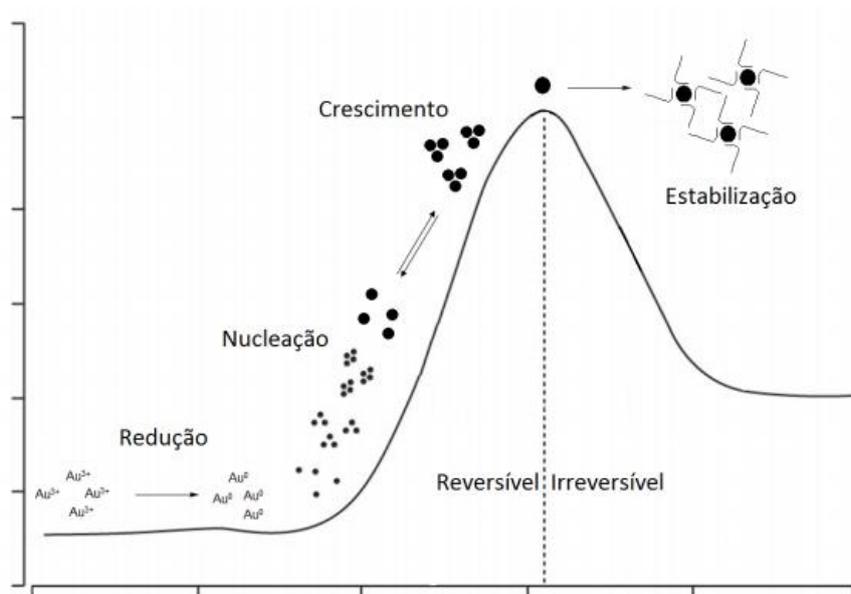


Figura 1 - Esquema do mecanismo generalizado dos passos para a formação de nanopartículas de ouro. Fonte: Keijok, 2018.

2.2.1. *Virola oleífera*

A *Virola oleífera* é uma espécie da família Myristicaceae com distribuição pantropical constituída por 18 gêneros e cerca de 500 espécies arbóreas ou raramente arbustiva encontradas especialmente em florestas úmidas de planície (YU, 2017). No Brasil essa família está concentrada na região amazônica onde são genericamente conhecidas como ucuúbas, bocuva, bicuíba, candeia de caboclo entre outros (YU, 2017).

Virola oleífera 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, que determinou que o extrato de *Virola oleífera* 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 (DERFUS, 2004; DUMORTIER, 2009). 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 (HWU, 2008). 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 (VELLOSA, 2007). 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 (HWU, 2008). 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 (KENNEDY, 2001).

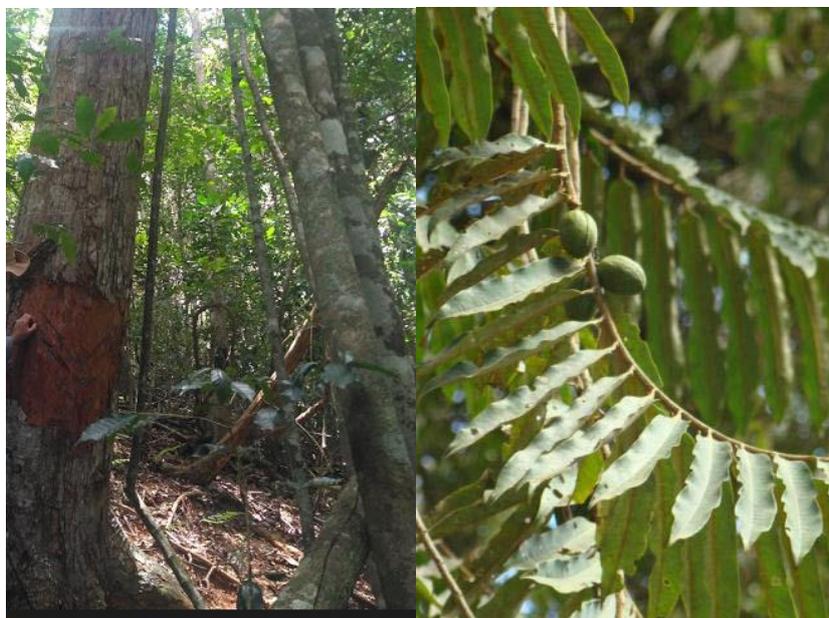


Figura 2 - Imagens da planta *Virola oleifera* representando a extração da resina e suas folhas e frutos. Fonte: autora.

2.3. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

As nanopartículas de ouro (AuNP's) têm atraído a atenção devido as suas propriedades. O ouro é um material inerte, resistente à oxidação, o que faz com que seu uso seja interessante em tecnologias e dispositivos em nanoescala; (BINDHU; UMADEVI, 2014). Em aplicações biológicas pode-se destacar: conjugação de anticorpos (CIENFUEGO, 2011), entrega de drogas (MOGHIMI, 2005), proteção contra raios UV (GANESAN, 2015), purificação de água (BINDHU; UMADEVI, 2014, como agente antimicrobiano (DREADEN, 2009). Possuem também interesse significativo na última década como material medicinal no tratamento de tumores por terem a capacidade de se acumular de forma passiva em tumores devido ao seu tamanho. Ademais, por causa das suas propriedades ópticas e químicas únicas, podem ser utilizadas em procedimentos de tratamento térmico (CIENFUEGO, 2011). Somado a isso, estudos têm demonstrado que as nanopartículas de ouro podem ser utilizadas com sucesso como plataformas transportadoras para a administração orientada de medicamentos anticâncer melhorando assim a entrega e minimizando a duração do tratamento e os efeitos colaterais (CAO, 2002; CHENG, 2010; HAO, 2010).

Além das aplicações na área terapêutica, nanopartículas podem ser utilizadas para desenvolvimento de nanobiossensores devido a facilidade de acoplamento a moléculas biológicas, possibilitando detecção rápida e fácil, por isso representa uma alternativa promissora aos métodos lentos e trabalhosos empregados atualmente (VELLOSA, 2007).

As nanopartículas de ouro têm atraído o interesse científico significativo como uma nova geração de agentes antimicrobianos por causa do aumento da resistência de bactérias em relação a antibióticos (MISHRA, 2014). Estudos mostram que as bactérias têm maior dificuldade para adquirir resistência a elas (CUI, 2012). O efeito antibacteriano das nanopartículas de ouro pode se dar por vários motivos: quando carregadas, podem ser atraídas pela carga negativa das bactérias; AuNP's menores são capazes alcançar o interior das bactérias, levando à morte celular (BINDHU; UMADEVI, 2014). A atividade antibacteriana das nanopartículas metálicas está determinada por três

importantes características: Tamanho, forma e carga superficial e em alguns casos pelo grau de agregação, composição superficial e concentração de NPs. Geralmente essas características são dependentes do agente redutor e estabilizante usado na síntese (MERZA et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Analisar o potencial antibacteriano em bactérias gram positivas e gram negativas e citotóxico de nanopartículas de ouro sintetizadas com resina de *Virola oleífera*.

3.2. ESPECÍFICOS

- Sintetizar nanopartículas de ouro sintetizadas com resina de *Virola oleífera*;
- Analisar a estabilidade de nanopartículas de ouro através de teste de floculação com diferentes pHs e concentrações de NaCl, bem como ressuspensão frente aos meios aquoso, DMSO 10%, DMSO 5%, Mueller Hington, PBS;
- Analisar o seu potencial antioxidante utilizando método FRAP;
- Realizar testes de citotoxicidade do nanomaterial em células L929 e HaCaT;
- Verificar o potencial antibacteriano do nanomaterial frente as bactérias *Pseudomonas aeruginosas* e *Staphylococcus aureus*;
- deAnalisar dos efeitos via imagens de microscopia eletrônica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO

A resina *Virola oleifera* foi coletada durante o mês de dezembro de 2018 na região de Afonso Claudio / Rio da Cobra, no estado do Espírito Santo – Brasil local em que se encontra a árvore-origem identificada pelo Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Vila Velha.

A extração contou com alguns cortes realizados na superfície do tronco da árvore resultando no escoamento da resina líquida (A). Esta, foi coletada com o auxílio de seringas (B) e armazenadas no frasco âmbar em isopor fechado contendo gelo para transporte ao laboratório (C). Uma vez no laboratório, a resina foi submetida à filtração à vácuo para evitar contaminantes externos. Em seguida, foram colocadas em placas de petri e levadas à estufa a 50 °C durante 24 horas a fim de secar (D). Seca, a resina foi triturada com o auxílio de um cadinho (E) e armazenada em uma garrafa âmbar na geladeira (F). As etapas de coleta e preparo para uso estão representadas na sequência de imagens abaixo.

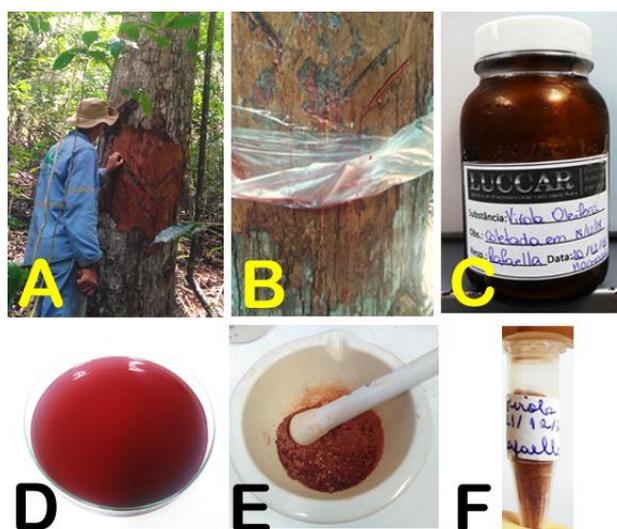


Figura 3 – Etapas de obtenção e produção da resina de *Virola oleifera* para os experimentos do projeto. Fonte: autora.

As condições para a síntese de nanopartículas de ouro utilizando resina de *Virola oleifera* feitas aqui foram baseadas em dados anteriores do grupo (CONTRERAS, 2016; FERREIRA, 2015). Das caracterizações, foram obtidas nanopartículas estáveis (Zeta), monodispersas (UV-vis e MET), quase esféricas (MET), além de possuírem compostos orgânicos presentes em sua superfície oriundos da resina de *Virola oleifera* (FTIR e RAMAN). Aqui utilizamos a condição previamente descrita e fizemos a caracterização do nanomaterial por UV-vis e microscopia eletrônica de transmissão conforme descrito abaixo.

Quanto à síntese nanopartículas de ouro foram sintetizadas utilizando as condições fixas de 400rpm de rotação, temperatura de 25°C e concentração de extrato de *Virola Oleifera* de 0,5mg mL⁻¹ variando as condições de pH e tempo. As sínteses foram analisadas por espectroscopia eletrônica UV-Visível (UV-VIS), no espectrofotômetro Evolution® 300 ThermoScientific do Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares da Universidade Federal do Espírito Santo – LABIOM/UFES.

Para caracterizar nanopartículas metálicas de 1 a 100nm foi utilizado o aparelho Híbrido Synergy H1 e utilizados comprimentos de onda de 300 a 800nm onde o pico de absorção máxima se dá no intervalo de 500 - 600nm, de modo que se desloca para a direita com o aumento do tamanho (PETRAYEVA, 2011). Suas propriedades ópticas e catalíticas que são dependentes do tamanho das partículas. Em solução aquosa à medida que o tamanho do núcleo aumenta de 1 a 100 nm, geralmente exibe uma faixa de absorção de 500 a 550 nm no visível (BOISSELER, 2009; BORN, 2006; CAO, 2002).

O estudo do espectro de UV-VIS de uma solução de nanopartículas pode 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 de banda à meia altura (FWHM, por suas siglas em Inglês Full Width at Half Maximum), Lambda máxima (λ máx.), Área sob a curva (AUC), Delta Lambda ($\Delta\lambda$), como é mostrado na Figura 4 (AL QADI, 2009; HAES, 2004). Tais valores podem correlacionar com os seguintes aspectos das nanopartículas:

Abs máx. – absorbância máxima: indica a concentração de nanopartículas existente na solução;

FWHM - largura de banda a meia altura: variável de dispersão cujo aumento de valor é diretamente proporcional à polidispersão;

λ máx. - comprimento de onda onde o valor de absorbância é máximo para o tipo de nanopartícula.

AUC - área abaixo da curva: Área característica de presença de agregações e turbidez.

$\Delta\lambda$ – Delta lâmbda: variável de tamanho cujo valor é diretamente proporcional ao tamanho.

A região da AUC também é responsável por detectar presença de micro-organismos e células, pois no intervalo de comprimentos de onda compreendidos entre 600 e 800 nm geralmente é calculada a densidade óptica das soluções.

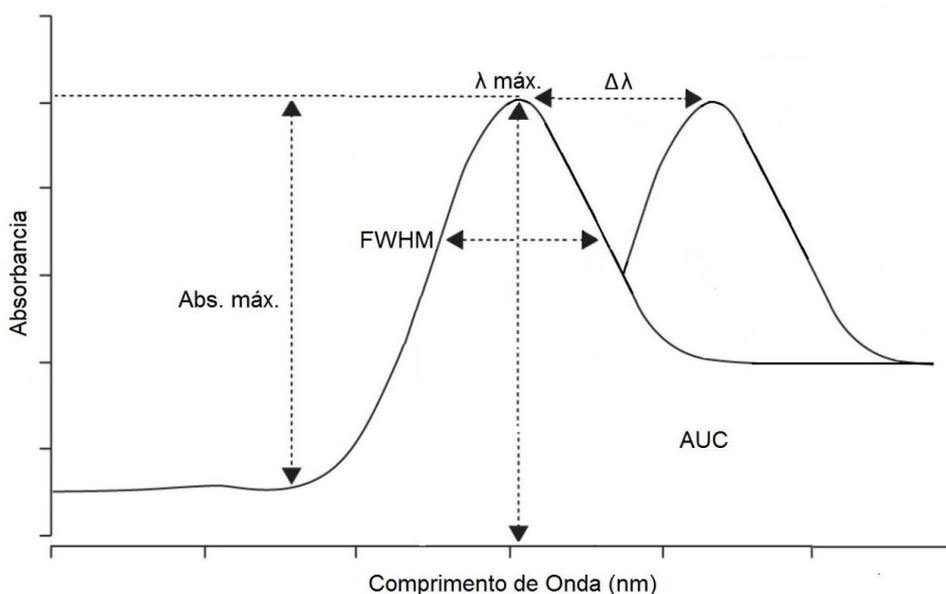


Figura 4 - Ilustração de uma leitura de varredura resultante no UV-VIS com esquema representativo das áreas de interesse na nanossíntese. **Fonte:** Contreras (2017).

4.2. TESTE DE SUSPENSÃO

O teste de suspensão tem como objetivo analisar o comportamento das nanopartículas frente a diferentes meios quanto a estabilidade, meios estes que foram trabalhados durante o presente projeto.

Foi adicionado 1,5 mL de solução de nanopartículas a microtúbulos de centrifugação (Eppendorf CRAL) previamente identificados de acordo com o estabelecimento de diferentes condições de rotação e tempo variando em:

ROTAÇÃO: 6.000 rpm, 8.000 rpm, 10.000 rpm, 12.000 rpm e 14.000 rpm (ou 7.231, 9.642, 12.052, 14.462 e 16.873 rcf)

TEMPO: 5 minutos, 10 minutos e 20 minutos

Após centrifugação, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se ao pellet resultante de nanopartículas 1,5mL de água ultrapura em cada microtúbulo de acordo com a identificação e homogeneizou-se.

Em seguida, adicionou-se 200µL das nanopartículas suspensas no novo meio aquoso na placa de 96 poços devidamente identificada de acordo com as soluções, tempos e rotações e realizou-se as leituras no espectrofotômetro UV-Vis integrado na faixa de comprimento de onda de 300nm a 700nm.

Com os resultados obtidos na leitura, foram construídos os gráficos das leituras no programa Origin 8.5® e foi realizada uma leitura de nanopartícula não suspensa para controle. As leituras foram feitas em triplicata e realizou-se o cálculo da média dos valores no programa Excel®.

A etapa anterior teve como objetivo avaliar em qual conjunto de rotação e tempo houve maior estabilidade das nanopartículas e menor perda de material. Após o resultado avaliado, adicionou-se 1,5 mL de solução de nanopartículas em microtúbulos identificados como: DMSO 10%, DMSO 5%, Mueller Hinton com cátion ajustado (MH⁺) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) e PBS, e esses foram submetidos à centrífuga com o tempo e rotação ótima encontrados na etapa anterior. Após a centrifuga, retirou-se o sobrenadante, suspendeu novamente o *pellet* com as soluções mencionadas e identificadas nos

microtúbulos, e as resultantes lidas no espectrofotômetro UV-Vis integrado na faixa de comprimento de onda de 300nm a 700nm em triplicata. As curvas resultantes foram confeccionadas através do Origin Pro® 8.5.

4.3. FLOCULAÇÃO

O parâmetro de floculação é de suma importância nos estudos de estabilidade de nanopartículas sintetizadas com metais e extrato natural, visto que o método avalia a condição de estabilidade das mesmas frente a materiais com carga. Dependendo, ocorre a agregação entre partículas. Weisbecker e Maya definiram como parâmetro de floculação o espectro de absorção entre 600 e 700 nm e a área situada abaixo da curva de leitura neste intervalo (AUC). Quanto maior a área, maior será a concentração de partículas agregadas.

Para a avaliação do grau de floculação das nanopartículas, foram preparadas amostras com um volume fixo de 500µL de solução de nanopartículas e centrifugou nas condições ótimas de rotação e tempo. Os sobrenadantes foram descartados e adicionou-se 500µL soluções de NaCl e de pH nas seguintes condições da tabela 2. Os ajustes de pHs foram realizados com soluções de ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH).

Tabela 1 – Tabela representando as soluções produzidas em diferentes concentrações e pHs.

Concentração NaCl (mmol.ml⁻¹)	1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 e 200
pH	1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13

Fonte: autora

4.4. TESTE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO MÉTODO FRAP

O teste antioxidante teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante das nanopartículas bem como compará-lo com o potencial do extrato, afim de posteriormente relacionar com a atividade antibacteriana. Compostos com elevada atividade antioxidante possuem efeito antibacteriano (MARTELLI, 2018).

O ensaio antioxidante utilizado no presente trabalho foi o conhecido em inglês por Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), ou seja, o ensaio antioxidante que tem como objetivo reduzir o íon ferro. O método FRAP baseia-se na capacidade dos antioxidantes em reduzir o Fe^{+3} a Fe^{+2} na presença do complexo TPTZ (2, 4, 6-tripiridyl-s-triazine), formando um intenso complexo azul de Fe^{+2} - TPTZ, ou seja, uma maior formação em mols de íons Fe^{2+} por quantidade em massa de amostra.

Quando a redução ocorre, há uma alteração na tonalidade da mistura de reação, passando de azul claro a um azul intenso (Figura 5), cuja absorbância pode ser medida no comprimento de onda de 595 nm (Benzie & Strain, 1999; Antolovich et al., 2002). Quanto maior a absorbância ou intensidade da coloração, maior será o potencial antioxidante da amostra.

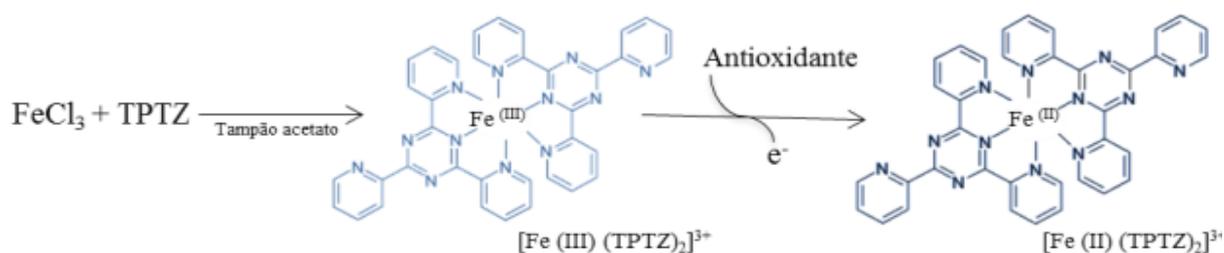


Figura 5 – Esquema representativo da reação de oxirredução que descreve a produção de Fe^{2+} (forma ferrosa – azul escura) a partir da redução de Fe^{3+} (forma férrica – azul claro) presente no complexo com TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina). **Fonte:** Salari (2019).

A metodologia para os ensaios por FRAP se baseou no protocolo da Embrapa e nos trabalhos de Victória (2016) e Salari (2019) com modificações. A solução FRAP foi preparada reagindo 25 mL de acetato de sódio em 2,5 mL de TPTZ (10 mmol.L^{-1}) e 2,5 mL de cloreto férrico (20 mmol.L^{-1}). Todas as soluções foram previamente preparadas, sendo a solução FRAP com seu preparo no dia do experimento.

Uma solução padrão de sulfato ferroso (FeSO_4) foi preparada a fim de se construir uma curva padrão adicionando-se aproximadamente 27,8mg do reagente em 50 mL de água ultrapura. Ademais, foram feitas diluições de modo

a obter soluções com as seguintes concentrações em micromols: 2000, 1500, 1000 e 500.

Em uma placa de 24 poços (Nest Biotech, Wuxi, China), adicionou-se em cada poço 1 mL de solução FRAP e uma alíquota de 33,4 uL de amostra de sulfato ferroso (FeSO₄) (SALARI, 2019). A placa foi incubada a 37°C em banho-maria por 10 minutos e realizou-se a leitura no Espectrofotômetro UV-VIS no comprimento de onda de 595 nm. Todas as reações foram feitas em duplicata e um branco foi preparado com água ultrapura nas mesmas proporções das amostras.

Com os resultados de absorvância encontrados para as diferentes diluições do FeSO₄, foi construída uma curva padrão no programa Microsoft Excel® e uma equação foi obtida. Esta equação foi utilizada para encontrar quantidades em μmol de ferro que uma possível amostra reduziria. No tocante do presente trabalho, as amostras analisadas foram: extrato de *Virola oleífera*, nanopartícula de ouro reduzida com o mencionado extrato e o Trolox® (utilizado como controle positivo). Para cada amostra foram feitas diluições em meio aquoso com diferentes concentrações (0,2, 0,4, 0,8 e 1 mg.mL⁻¹)¹ e essas submetidas aos mesmos procedimentos de reação do FeSO₄.

A fim de avaliar o resultado do FRAP, foi avaliar o valor de IC50, isto é, a quantidade de amostra necessária para reduzir 50% à concentração inicial de Fe³⁺. Quanto menor o valor de IC50, maior é a capacidade antioxidante da substância (SAIFUDDIN, 2009). Para tal fim, os resultados de absorvâncias do extrato de *Virola oleífera*, das nanopartículas e do Trolox® foram calculados pelo GraphPad Prism 8 e a razão de íons ferro reduzidos pela quantidade total de íons de ferro foram encontradas pela seguinte equação, onde Fe II corresponde ao íon ferro que reduziu e Fe, F a quantidade total de íons Fe na amostra:

$$\% = \frac{nFe(II)}{nFe(F)} * 100$$

¹ As concentrações tanto de extrato quanto de nanopartículas foram baseadas nos resultados dos cálculos de ICP que determina que em 1ml há 0,019 mg ou 9,9912×10⁻⁵ mmol de nanopartículas. Já a proporção de extrato foi calculada através da sua parte que reagiu na síntese.

4.5. AVALIAÇÃO DE CITOTOXIDADE

Os testes de citotoxicidade *in vitro* foram realizados através o teste MTT utilizando 2 linhagens celulares cedidas pelo Laboratório de Cultura Celular da Universidade de Vila Velha. São elas: células de fibroblastos murinos (L929) (ATCC® CRL-6364™) e queratinócitos não tumorigênicos humanos (HaCaT) (BCRJ código: 034) cultivados em garrafas de cultura com os meios de cultura DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com soro fetal bovino (Vitrocell, São Paulo, Brasil), L-glutamina (Sigma-Aldrich) e Na₂CO₃ (Dinâmica, São Paulo, Brasil). As células foram mantidas em estufa em uma incubadora umidificada contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂) (COM-19ICVU- Panasonic) a 37°C para crescimento. As células para serem utilizadas no teste foram removidas com *cell scraper*, seguido da contagem das mesmas em câmara de Neubauer com corante azul de Trypan (LGC, São Paulo, Brasil).

Para o ensaio, 150 µL de células, com a concentração de 5.10⁴ células/mL por poço, foram colocadas em uma placa de 96 poços, incubada por 24 horas, para que as células pudessem aderir. Em seguida, foram acrescentadas 50 µL das amostras a serem testadas (extrato, nanopartículas e ouro) com diferentes concentrações previamente diluídas no próprio meio de cultura. As concentrações foram baseadas no IC 50 encontrados no teste antioxidante descrito no item 4.5.1 levando em conta ademais as pesquisas de Martelli (2018). São as concentrações 900, 450 (valor aproximado do IC 50), 225, 112,5 e 56,25 µg/mL, e as mesmas foram denominadas respectivamente de D1, D2, D3, D4 e D5. Poços contendo apenas meio de cultura e células foram utilizados como controle negativo (crescimento de 100% ou inibição 0%), e poços contendo meio de cultura e DMSO serviram para confirmar que o solvente não foi responsável pelas mortes celulares. Após incubação por 24 horas, a viabilidade celular foi verificada através do MTT realizando-se leitura da placa no comprimento de onda de 595 nm. A avaliação de citotoxicidade foi realizada de acordo com a coloração resultante após as 2 horas de ação do MTT com as células. A coloração característica é azul-violeta que determina a redução mitocondrial-dependente do composto de MTT a formazan para conseguir medir a respiração celular como um indicador de sua viabilidade. Quanto mais azul a solução, maior a quantidade de células vivas e maior a

absorbância no comprimento de onda característico (595 nm). O 50% da concentração inibitória máxima (IC 50) de cada amostra foi calculado mediante o software Microsoft Excel para cada linhagem celular. Já a porcentagem de citotoxicidade dos materiais foram encontradas utilizando o programa GraphPad Prism 8 através da equação abaixo, onde A representa absorbância:

$$\% \text{ inibição} = \left(\frac{A_{\text{tratada}} - A_{\text{branco}}}{A_{\text{controle}} - A_{\text{branco}}} \right) \times 100$$

4.6. CEPAS E ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

As bactérias utilizadas nesse trabalho foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC) e do LABCAS gentilmente cedidas pelo prof. Ricardo Schuenck.

Para os ensaios antimicrobianos foram utilizadas as cepas *Staphylococcus aureus* (gram positivas) linhagens 10A e 25923 (ATCC) e *Pseudomonas aeruginosa* (gram negativas) linhagens 93B e 27853 (ATCC) previamente cultivadas em ágar Mueller Hinton a 37°C e 24h. Em tubos contendo caldo Mueller Hinton com cátion ajustado, foi feito o ajuste de densidade óptica a 0,5 McFarland (1.5×10^8 UFC.ml⁻¹). Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada através do método de microdiluição em caldo de acordo com a metodologia estabelecida pelo manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018). O experimento analisou os crescimentos quantitativos em caldo Mueller Hinton com cátion ajustado nos tempos: 0h, 2h, 4h, 6h, 12h e 24h analisando as densidades óticas (DO) através das leituras no UV-VIS no comprimento de onda de 600 nm. Alíquotas de 0,1 ml do caldo foram adicionadas em tubos contendo amostras de 1 ml de extrato e nanopartículas, cada uma com 5 diluições diferentes – suspensões diluídas em uma proporção de 1:10 de bactéria para amostra (JR.; CHAN; KRIEG, 1996). As concentrações também foram baseadas no IC 50 encontrados no teste antioxidante descrito no item 4.4 e seguiu os padrões de diluição semelhantes ao da citotoxicidade. Um tubo contendo apenas caldo Mueller Hinton e água foi utilizado como controle positivo e outro tubo contendo glutaraldeído foi utilizado

como controle negativo (GORMAN; SCOTT; RUSSELL, 1980). Depois de prontas, as amostras foram submetidas a agitações de 10 segundos e levadas à leitura no UV-VIS no comprimento de onda de 600 nm.

Com os valores da densidade ótica construiu-se um gráfico de dispersão com as curvas de crescimento, além de calcular a CIM e o IC 50 de cada bactéria. A CIM foi encontrada através da equação abaixo:

$$100 - \left(\frac{A_{tratada}}{A_{controle}} * 100 \right)$$

Onde a A corresponde a absorbância das respectivas amostras. Os gráficos foram confeccionados no GraphPad Prism 8.

4.6.1. Análise morfológica das bactérias tratadas com AuNPs por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para as análises morfológicas tratadas, as amostras foram submetidas a um Microscópio Eletrônico de Varredura (ZEISS, EVO MA10) com área de dispersão de energia espectroscopia de raios -X (Oxford Instruments - EDS).

Primeiramente a amostra foi lavada com tampão fosfato (PBS) para a retirada de meio de cultura e demais resíduos. Agitou-se e centrifugou a amostra na centrífuga utilizando a rotação e tempo característicos de cada bactéria. O segundo passo foi a fixação com glutaraldeído 2,5% (v/v) e tampão cacodilato de sódio onde então esperou-se 2 horas para então realizar-se outra lavagem em tampão cacodilato. Seguinte, as amostras foram tratadas com tetróxido de ósmio por 1 hora, lavadas e desidratadas por banhos sucessíveis de álcool etílico nas proporções 30%, 50%, 70% e 100%. Desidratadas, as amostras foram secas por ponto crítico utilizando evaporador centrífugo CentriVap® da LABCONCO, submetidas a um banho de ouro e analisadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. BIOCÍNTese E CARACTERIZAÇÃO

Como descrito no item Material e Métodos, esse trabalho se baseou em ensaios prévios que determinaram a melhor condição de síntese das nanopartículas de ouro utilizando resina de *Virola oleifera* utilizando um experimento fatorial completo de Contreras (2016). Conforme o resultado demonstrado na figura e na tabela abaixo, a melhor condição foi realizada no pH 7.7 e tempo 6 minutos, os quais demonstraram melhores valores de resultados das características da curva formada.

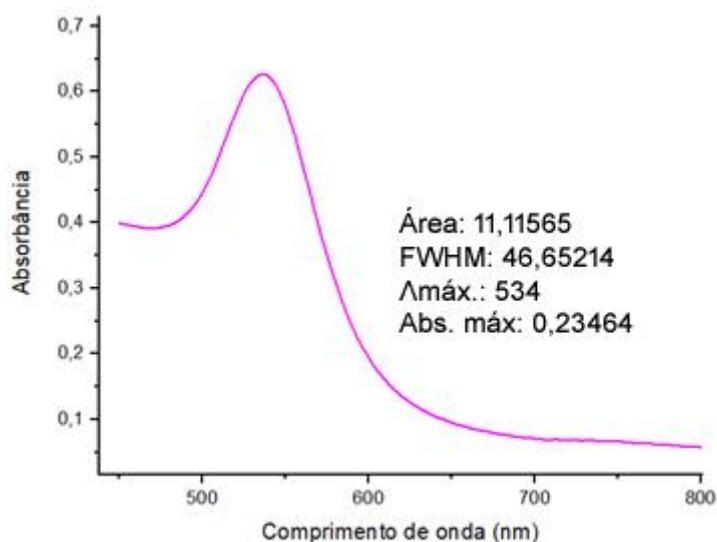


Figura 6 – Leitura da curva resultante da síntese de nanopartículas de ouro reduzidas com *Virola oleifera* com seus respectivos dados característicos. Fonte: autora.

Partindo desse pressuposto, as AuNPs recém sintetizadas se apresentaram monodispersas, com tamanho médio de 22nm e quasi-esféricas segundo a imagem de MET (FIGURA 7D).

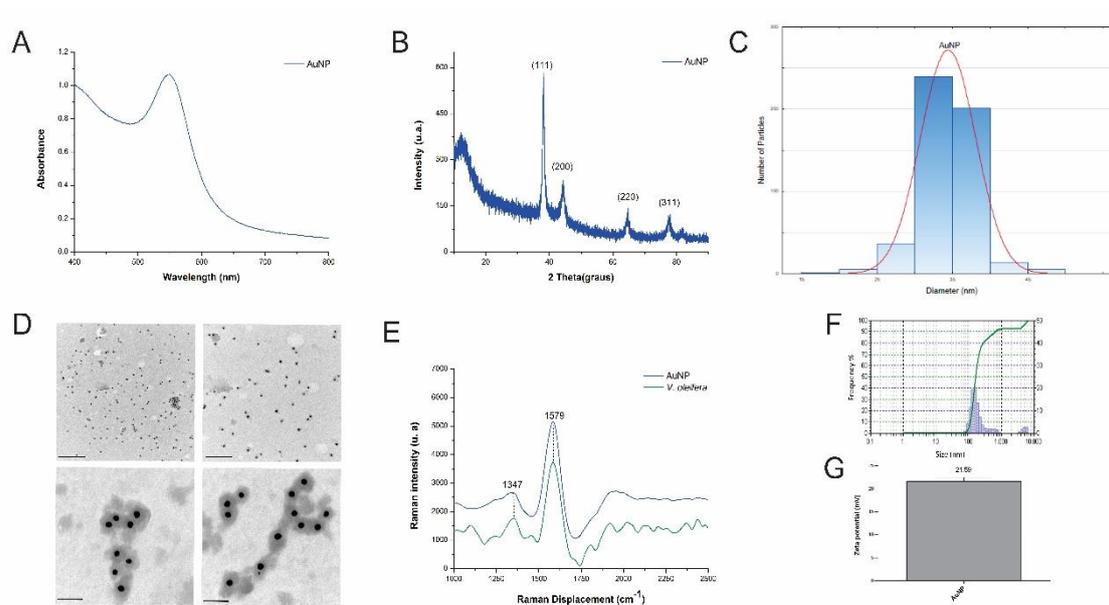
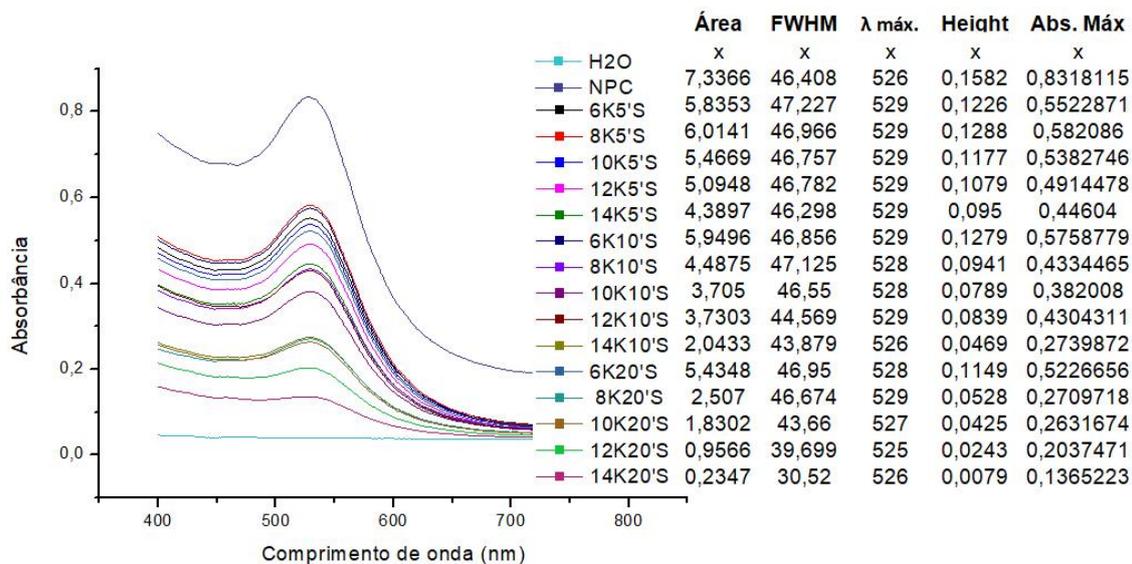


Figura 7 - Leitura da curva resultante da síntese de nanopartículas de ouro reduzidas com *Virola oleífera* no pH 7.7 (A), raio-x (B), Raman (C), MET (D), potencial zeta (E) e DLS (F).

Fonte: autora e Contreras (2016).

5.2. TESTE DE SUSPENSÃO

Os resultados da suspensão estão representados nos gráficos de leitura de UV-VIS na imagem a seguir separados por sobrenadantes (S) e *pellets* (P).



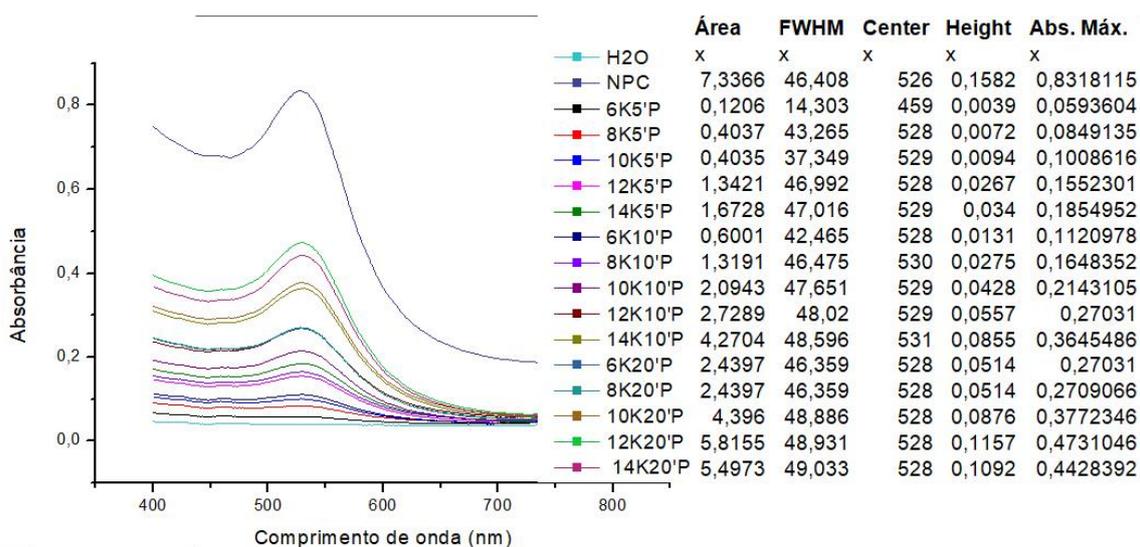


Figura 8 – Leituras de varredura no UV-VIS representando o sobrenadante (acima) e as suspensões das nanopartículas em água (abaixo), com tabela de dados comparativos.

Legenda: NPC: nanopartícula controle, 6K5'S: condição 6000rpm, 5 minutos, sobrenadante.

Fonte: autora, Origin 8.5.

De acordo com os resultados da tabela de comparativos dos sobrenadantes, foram obtidas como resultados variáveis decrescentes de pico máximo de absorbância (Abs. Máx.) com o aumento das rotações e do tempo de centrifugação. Já com os resultados dos *pellets* os resultados foram contrários onde os valores de pico máximo de absorbância foram crescentes com o aumento da rotação e do tempo de centrifugações. Tais fatos descritos são devido ao fato de que, quanto maior a rotação e o tempo de centrifugação, mais nanopartículas se decantam e menos nanopartículas permanecem no sobrenadante. O melhor resultado de suspensão foi obtido no tempo 20 minutos e em 14000rpm de rotação em que se obteve menor variação de área, FWHM, λ máxima e pico máximo de absorbância no comparativo com os valores do controle.

Os gráficos abaixo representam as curvas características das nanopartículas suspensas nos diferentes meios frente ao comparativo com o controle e com o branco dos meios, e a tabela representa as variáveis das curvas.

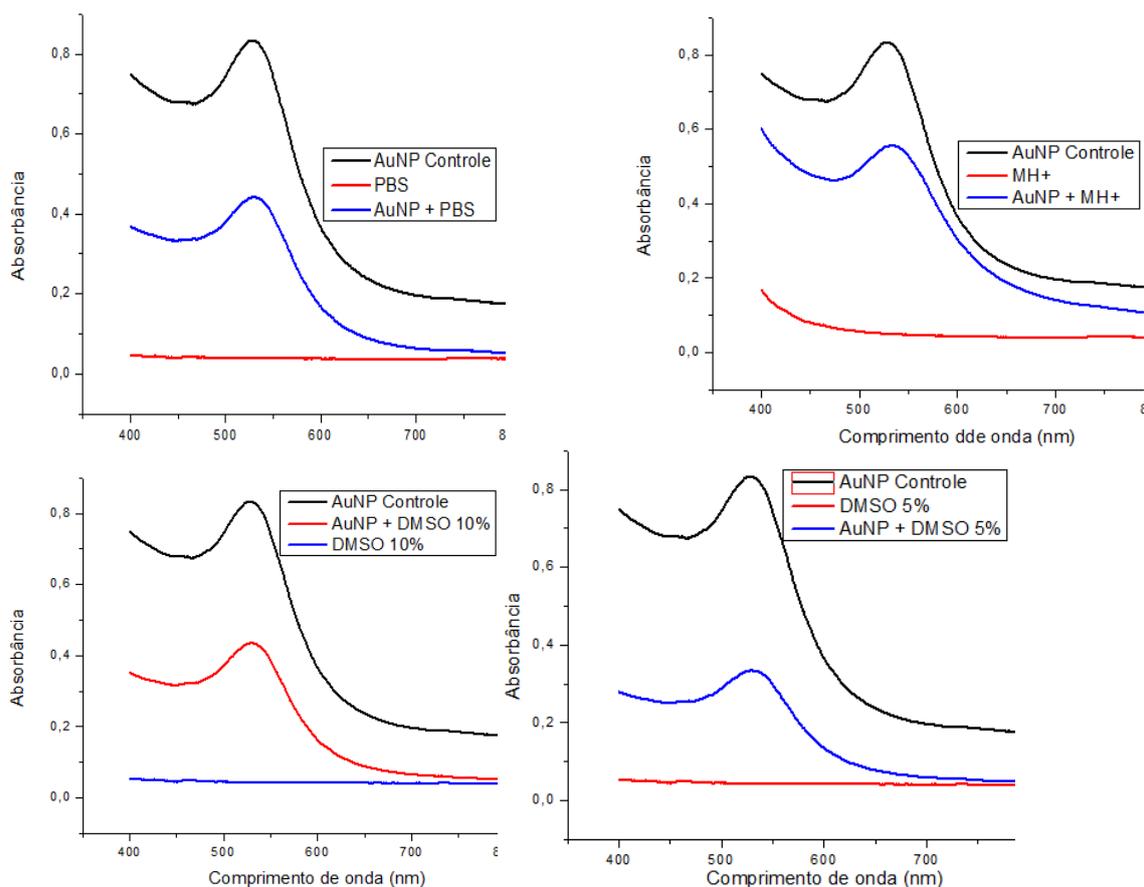


Figura 9 – Leituras de varredura no UV-VIS representando as suspensões nos diferentes meios PBS, Mueller Hington com cátion ajustado (MH+), DMSO 10%, DMSO 5%. Fonte: autora, Origin 8.5.

De acordo com as curvas resultantes das leituras e os dados da tabela, o comportamento das nanopartículas nos meios testados foi satisfatório, visto que não houve alteração significativa no valor do comprimento de onda onde pico de absorvância é máximo (λ máx) e no valor de banda meia altura (FWHM).

Tabela 2 - Valores referentes aos picos característicos das suspensões da figura 12.

Amostras	Área	FWHM	λ máx.	Abs max
Controle	7,33657	46,40817	526	0,15818
+ DMSO 10%	6,03106	49,6687	528	0,11761
+ DMSO 5%	4,39211	49,77183	529	0,08494
+ MH ⁺	4,542	48,4693	533	0,09439
+ PBS	5,57898	49,67749	529	0,10812

Em conclusão aos resultados, as nanopartículas não tiveram alterações significativas em sua estabilidade quando suspensa nos meios distintos variando apenas sua concentração conforme os valores de rotações e tempo foram alterados.

5.3. FLOCULAÇÃO

Estudos têm demonstrado que a variação do pH do meio de reação tende a produzir variabilidade na forma e tamanho de partículas sintetizadas com extrato vegetal (TREVISAN, 2011). Frente a isso, os resultados representados nos gráficos demonstram que há maior formação de partículas aglomeradas (floculação) quando o pH tende a ser mais ácido, resultados estes na análise da área compreendida no intervalo de comprimento de onda 600 a 700nm para as leituras de pH 1 e 3. Tal fato foi encontrado nos ensaios do trabalho de Keijok (2016) que explica o fato de que o pKa da superfície metálica quando alterado nesse intervalo de pH causa uma menor repulsão eletrostática entre partículas, além de a carga da nanopartícula ser negativa.

No entanto, à medida que o pH se tornou mais básico, houve a diminuição de sua concentração e, conseqüentemente, a diminuição gradativa do valor de sua absorvância máxima. A largura de banda também alterou significativamente, o que se pode concluir que houve diminuição da homogeneidade de tamanho das nanopartículas e possível degradação das mesmas (figura 10). A explicação se deve ao fato de que os pHs básicos trabalhados nos ensaios estão em valores distantes do pH normal cujo valor encontrado foi 5. Além disso, pHs básicos resultam em precipitações de metais o que pode ter ocorrido com o metal ouro provocando instabilidade.

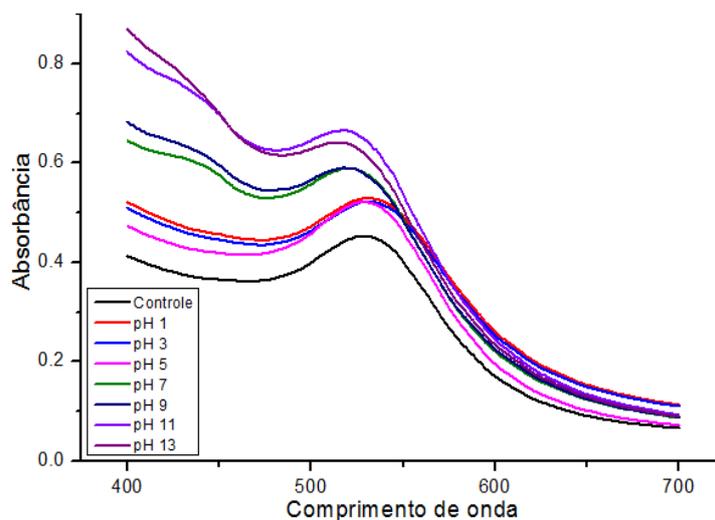


Figura 10 - Leituras de varredura no UV-VIS representando as suspensões das nanopartículas em soluções aquosas com diferentes pHs. **Fonte:** autora, Origin 8.5.

As resultantes representadas na figura 11 mostraram que não há alteração significativa da largura de banda, o que indicou que não houve alteração significativa no tamanho das nanopartículas. As alterações significativas ocorridas na área do intervalo de comprimento de onda compreendido entre 600 e 700nm demonstraram que o aumento gradativo da concentração de sal causa o aumento da área, o que se pode concluir que a presença do mesmo causou a formação de partículas agregadas (floculação). Em conclusão aos resultados encontrados nos experimentos, a presença de um sal é responsável por uma pequena instabilidade nas nanopartículas, o que corrobora com os resultados de Contreas (2016) que afirmou que um aumento na concentração de íons em uma suspensão coloidal tende a causar sua desestabilização.

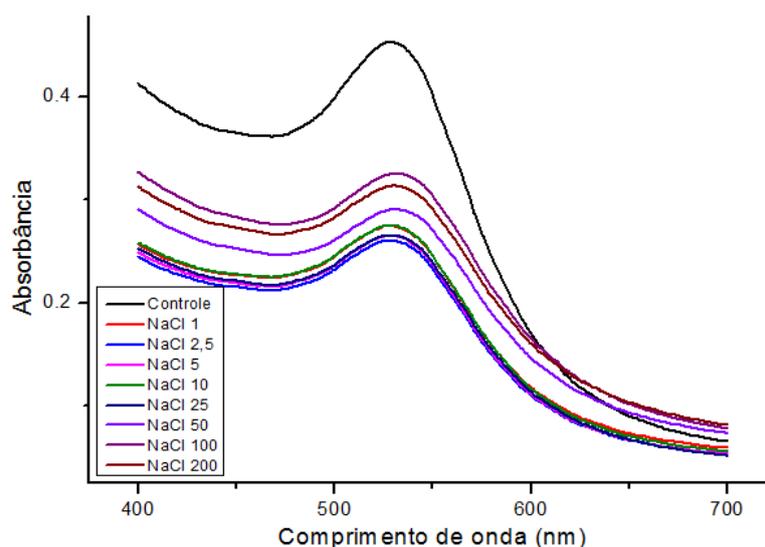
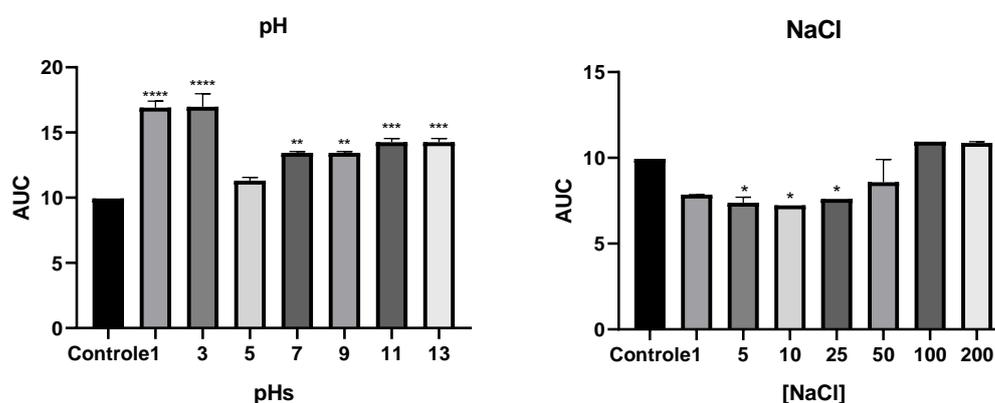


Figura 11 - Leituras de varredura no UV-VIS representando as suspensões das nanopartículas em soluções com cloreto de sódio com diferentes concentrações. **Fonte:** autora, Origin 8.5

No comparativo geral da estabilidade das nanopartículas, percebeu-se que a variação de pH provocou maior alteração do que a concentração de sal, incluindo nanopartículas de maior tamanho e heterogêneas. Os resultados podem ser observados nos gráficos abaixo. * $p < 0.1$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ vs. controle positivo.

Gráfico 1 – Comparativo das áreas compreendidas nos comprimentos de onda entre 600 e 700 (AUC) com os pHs e as concentrações de sal.

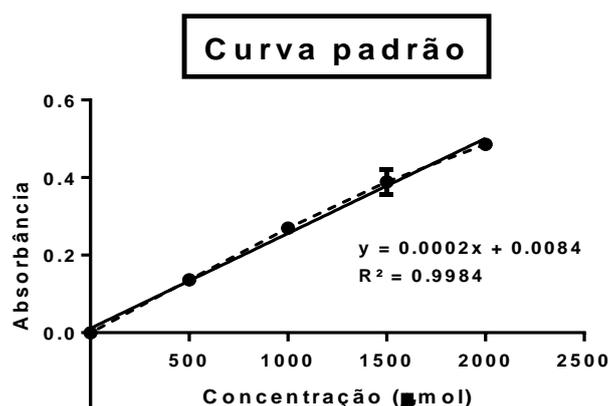


5.4. ENSAIOS ANTIOXIDANTES PELO MÉTODO DE FRAP

Considera-se positivo o teste quando há a mudança de coloração e essa mudança ocorra de forma decrescente conforme a concentração de amostra

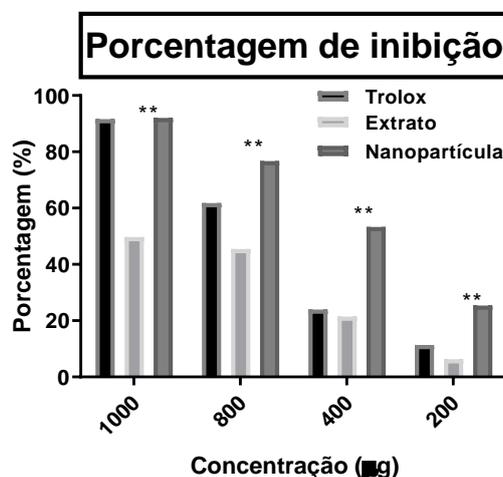
analisada diminui. A curva padrão formada representada abaixo demonstra ótimos resultados utilizando o padrão de sulfato ferroso visto que seu ótimo valor de regressão linear (R^2).

Gráfico 2 – curva padrão resultante utilizando os valores de absorbância do sulfato ferroso ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$). **Fonte:** autora, GraphPad Prism.



Os resultados também demonstraram que as nanopartículas possuem um potencial antioxidante maior do que o extrato, visto que os valores de absorbância foram maiores para uma mesma massa em μg . Ainda no tangente de comparativos, observou-se que as nanopartículas possuem um alto poder antioxidante sendo até mais eficiente que o controle positivo Trolox®(gráfico 3).

Gráfico 3 – comparativo entre as porcentagens de inibição do Trolox®, extrato e nanopartículas nas respectivas concentrações em μg representadas. **Fonte:** autora, GraphPad Prism.



Além disso, a maior atividade foi comprovada quanto aos valores de concentração em micromols encontrados utilizando a equação da curva padrão, valores esses numerados na tabela abaixo. ** $p < 0.01$ de extrato vs. AuNPs.

Tabela 4 – Comparativo entre os valores de concentração de Fe (μmol) nas amostras analisadas.

Amostra	Massa (μg)	Trolox	Extrato	Nanopartículas
1	1000	0,4475	0,2465	0,4495
2	800	0,3045	0,226	0,376
3	400	0,123	0,111	0,2635
4	200	0,063	0,0385	0,13

Fonte: autora

Considera-se ademais que em 1 mL de FRAP adicionado em um poço contém aproximadamente 1,6 μmol de íons ferro e os resultados expressos na tabela 5 são comparativos em porcentagem relacionando a quantidade em micromols de Fe (II) que se formou em cada amostra com a quantidade total (1,6 μmol) conforme já discutido. Os resultados demonstram coerência onde pode-se perceber a diminuição dos valores de porcentagem conforme o aumento das diluições, além dos valores pertencerem ao intervalo 0-100%.

O valor de IC 50 (Tabela 6), foram determinadas equações padrões para cada amostra e calculada a massa em μg de amostra que reduziu 50% dos íons ferro. Os valores resultantes demonstraram que as nanopartículas possuem maior IC 50 no comparativo com o extrato corroborando com trabalhos anteriores, como de Salari (2019), Contreras (2016), e Godói (2011), os quais obtiveram valores de IC 50 maiores para as nanopartículas. Isso comprova que as nanopartículas também podem possuir baixa toxicidade.

Tabela 5 – Valores das porcentagens de inibição das substâncias analisadas nas respectivas massas. **Fonte:** autora.

Massa/%	Trolox	Extrato	Nanopartículas
1000	91,662125	49,703375	92,079625
800	61,810875	45,424	76,7365
400	23,92275	21,41775	53,252125
200	11,39775	6,283375	25,384

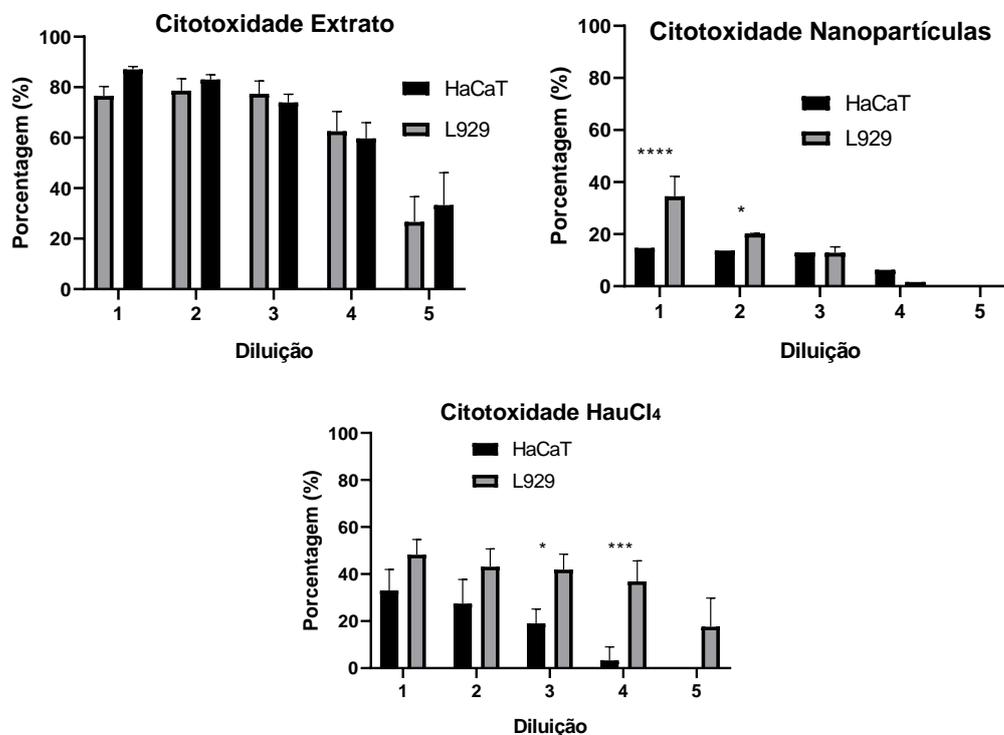
Tabela 6 –Comparativo entre as massas onde a porcentagem de inibição foi de 50%. **Fonte:** autora.

IC50	Trolox	Extrato	Nanopartículas
	535,6592	948,4981	448,9796

5.5. AVALIAÇÃO DE CITOTOXIDADE

Com as absorbâncias encontradas, realizou-se os cálculos da porcentagem de citotoxicidade de acordo com a equação apresentada no capítulo 4.7 e com os resultados encontrados, foram plotados os gráficos de correlação (gráfico 4). Os valores de porcentagem encontrados demonstraram que tanto para células L929 quanto para HaCaT, as nanopartículas apresentaram valores de citotoxicidade inferiores a 50% mesmo na amostra menos diluída (diluição 1). Ademais, as nanopartículas foram menos tóxicas no comparativo com o extrato que teve um comportamento mais tóxico do que o HAuCl_4 também para ambas as células, mesmo no comparativo de iguais concentrações. Segundo Chan (2011), tal fenômeno correu, pois as AuNPs com cargas aniônicas apresentam menor citotoxicidade que suas análogas catiônicas. Os sistemas aniônicos, como é o caso das AuNPs *Virola oleífera*, se ligam com menor eficiência às superfícies celulares do que moléculas neutras ou catiônicas (como é o caso do HAuCl_4 e o extrato), devido às forças de repulsão eletrostáticas da membrana celular eucariota que se encontra carregada negativamente (CHENEVIER et al., 2000). * $p < 0.1$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ de L929 vs. HaCaT.

Gráfico 4 – comparativo entre as porcentagens de citotoxicidade entre extrato, nanopartículas e HAuCl₄ na ordem da menor para a maior diluição (1 a 5). **Fonte:** autora, GraphPad Prism.



No comparativo com os valores de IC 50 (tabela 7), observa-se que eles se encontram acima dos valores máximos de concentração utilizados nos tratamentos de nanopartículas e de sal de ouro, o pode-se concluir que os valores utilizados para ambos foram menos tóxicos para as células do que os utilizados para os extratos o HAuCl₄.

Tabela 7 – Comparativo entre IC 50 das amostras celulares em contato com o extrato, nanopartículas e ouro.

IC50 (µg/ml)	HaCaT	L929
Extrato	221,544	218,078
Nanopartículas	3065,347	1491,343
Ouro	3,78×10 ⁻⁴	2,82×10 ⁻⁴

Fonte: autora

Os valores das amostras de células que tiveram contato apenas com o DMSO apresentaram valores de absorbâncias maiores em comparação com o controle

negativo em que a sobrevivência das células foi de 100%. Tal resultado comprova que o DMSO não foi nocivo para as mesmas e pode ser comprovado pela tabela abaixo.

Tabela 8 – Comparativo entre as absorvâncias das amostras celulares em contato com o DMSO puro e tratadas apenas com o meio de cultura (controle negativo).

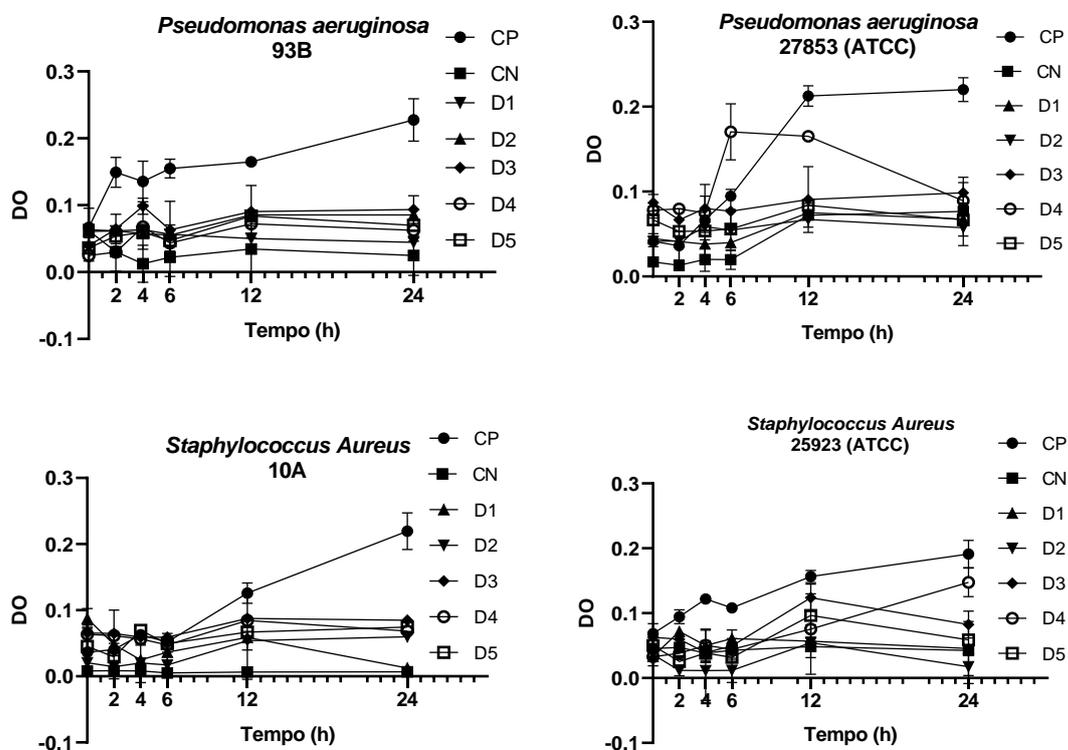
Absorbâncias	HaCaT	L929
DMSO	0,718	1,479
Controle Negativo	0,634	1,275

Fonte: autora.

5.6. CEPAS E ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

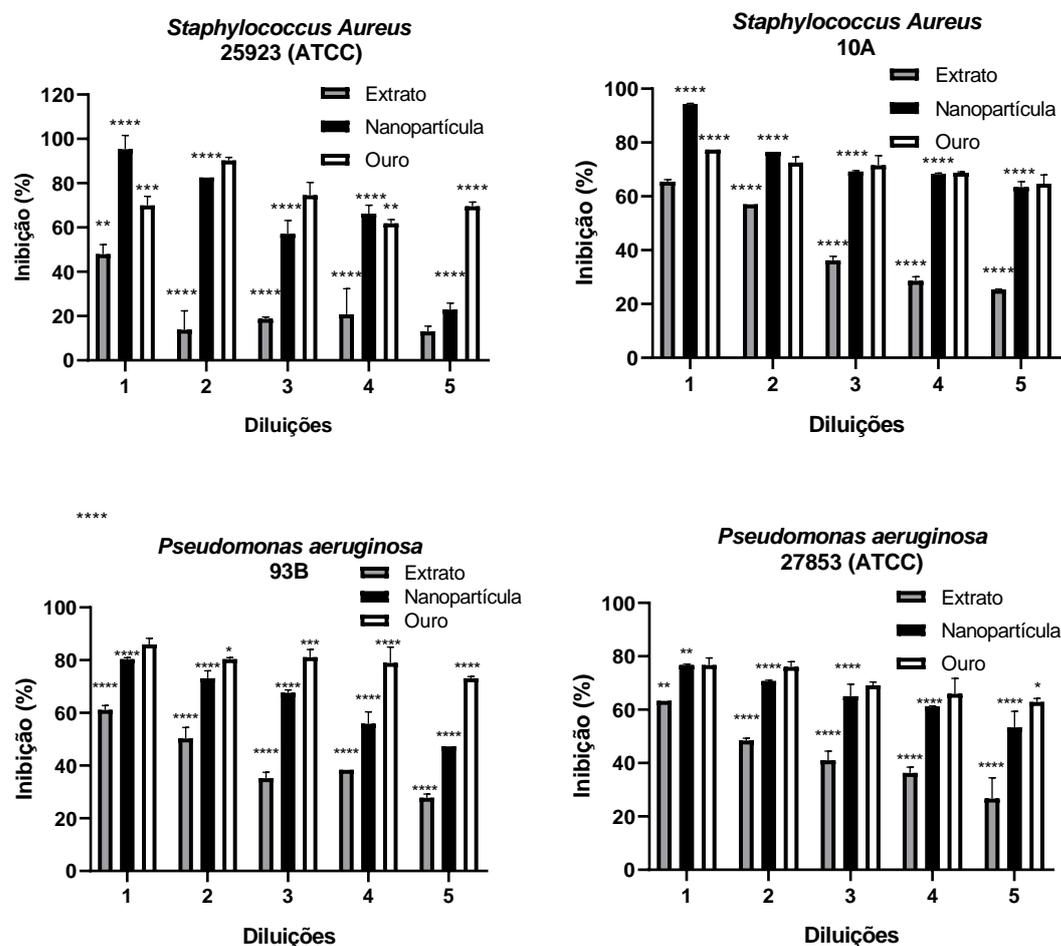
Os valores de DO encontrados para as nanopartículas nas diluições 900µg (D1) e 450µg (D2) demonstraram melhores resultados por conterem maior concentração em massa do material (Gráfico 5). Entre 6h 12h houve um crescimento notável das bactérias, o que pode indicar um possível mecanismo de defesa de sobrevivência das mesmas. Entretanto, para a maioria das diluições, as bactérias demonstraram crescimento diminuído a partir do tempo 12h. Suganya *et al.* (2015) também observou que a atividade bacteriana das nanopartículas de ouro sintetizadas por uma rota verde, aumentou consideravelmente com o aumento da concentração das AuNP's, corroborando com os resultados encontrados no presente ensaio.

Gráfico 5 – comparativo de densidade ótica entre diferentes concentrações de nanopartículas na ordem da menor para a maior diluição (D1 a D5) nos diferentes tempos analisados. As densidades óticas formam curvas de tempo-morte. **Fonte:** autora, GraphPad Prism.



Quanto aos valores de porcentagem de inibição, as nanopartículas obtiveram um melhor comportamento de inibição com valores superiores aos encontrados para o extrato para as quatro bactérias (gráfico 6). As nanopartículas também se mostraram mais eficientes em tal comparativo, assim como nos testes de citotoxicidade demonstrando ser uma ótima candidata para tratamento antibiótico. Esse resultado pode ser devido ao seu tamanho reduzido que possibilita sua possível passagem intracelular somado aos componentes antioxidantes agregados em sua superfície, conforme afirmou Martelli (2018). Já o extrato não demonstrou tanta eficiência no presente ensaio nem no teste de citotoxicidade, o que se pode concluir que o mesmo não possui eficiência antimicrobiana suficiente. Portanto as AuNPs são capazes de potenciar os efeitos antibacterianos das moléculas conjugadas na sua superfície, moléculas essas conhecidas por um potencial antimicrobiano. ** $p < 0.01$ e **** $p < 0.0001$ de extrato vs. AuNPs; **** $p < 0.0001$ de extrato vs. Ouro.

Gráfico 6 – comparativo entre as porcentagens de inibição entre extrato, nanopartículas e HAuCl₄ na ordem da menor para a maior diluição (1 a 5). **Fonte:** autora, GraphPad Prism.



A CIM para as concentrações utilizadas no tratamento, as nanopartículas foram mais eficientes para *Staphylococcus aureus* 93B e *Staphylococcus aureus* 25923 (ATCC), pois para as duas cepas foram encontrados valores de inibição acima de 90%. Tal resultado pode sugerir a maior afinidade de carga das cepas frente as cargas negativas do material de tratamento, além de as bactérias gram positivas apresentarem parede celular menos espessa do que a bactéria gram negativa dificultando em parte a ação do nanomaterial (Milaneze, 2015). Devido ao seu tamanho e grande área de superfície, as AuNP's de produzir efeitos eletrônicos e estes efeitos podem aumentar a força de ligação das nanopartículas com as bactérias (MUTHUVEL et al., 2014). Para as *Pseudomonas aeruginosas* 10 A e 27853 (ATCC), os valores foram inferiores a 90% sendo que foram encontrados valores superiores a 80% até no tratamento

da amostra menos diluída (D5). Todavia, um possível aumento da concentração em testes sucessores a estes poderia obter melhores resultados atingindo o valor de CIM e ao mesmo tempo não serem tóxicos para as células animais submetidas aos ensaios de citotoxicidade. Segundo Milaneze (2015), o material com resina de *Virola oleifera* na concentração de 1mg/L ou mais é capaz de gerar maior potencial redutor e, conseqüentemente, antimicrobiano.

Em conclusão, nanopartículas de ouro podem agir como excelentes sistemas de transporte e liberação de agentes antibacterianos em sítios de interesse (GHOSH et al., 2008).

5.6.1. Análise morfológica das bactérias tratadas com AuNPs por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises das imagens do MEV (Figura 12) permitem confirmar os resultados encontrados no UV-VIS. Foi possível perceber uma perda de volume sugerindo uma vazão citoplasmática gradativa. Além disso, as imagens mostram agregação de materiais nas membranas celulares inferiores ao tamanho das mesmas, o que sugere que sejam nanomateriais e possíveis afinidades por carga com a membrana. Devido ao seu tamanho e grande área de superfície, as AuNP's de produzir efeitos eletrônicos e estes efeitos podem aumentar a força de ligação das nanopartículas com as bactérias, já que a ação inibitória não depende só do tamanho e da área de superfície, mas também do agente de proteção que estabiliza e funcionaliza a AuNP's, como já observado (MUTHUVEL et al., 2014). Essa afinidade pode permitir o rompimento da mesma e, conseqüentemente, a liberação do material citoplasmático para a região externa. Os resultados encontrados corroboram novamente com Martelli (2018) e Milaneze (2015) em seus tratamentos com o mesmo nanomaterial, que foi capaz de gerar danos na membrana da bactéria, e em alguns casos fazer com que houvesse perda de conteúdo da mesma.

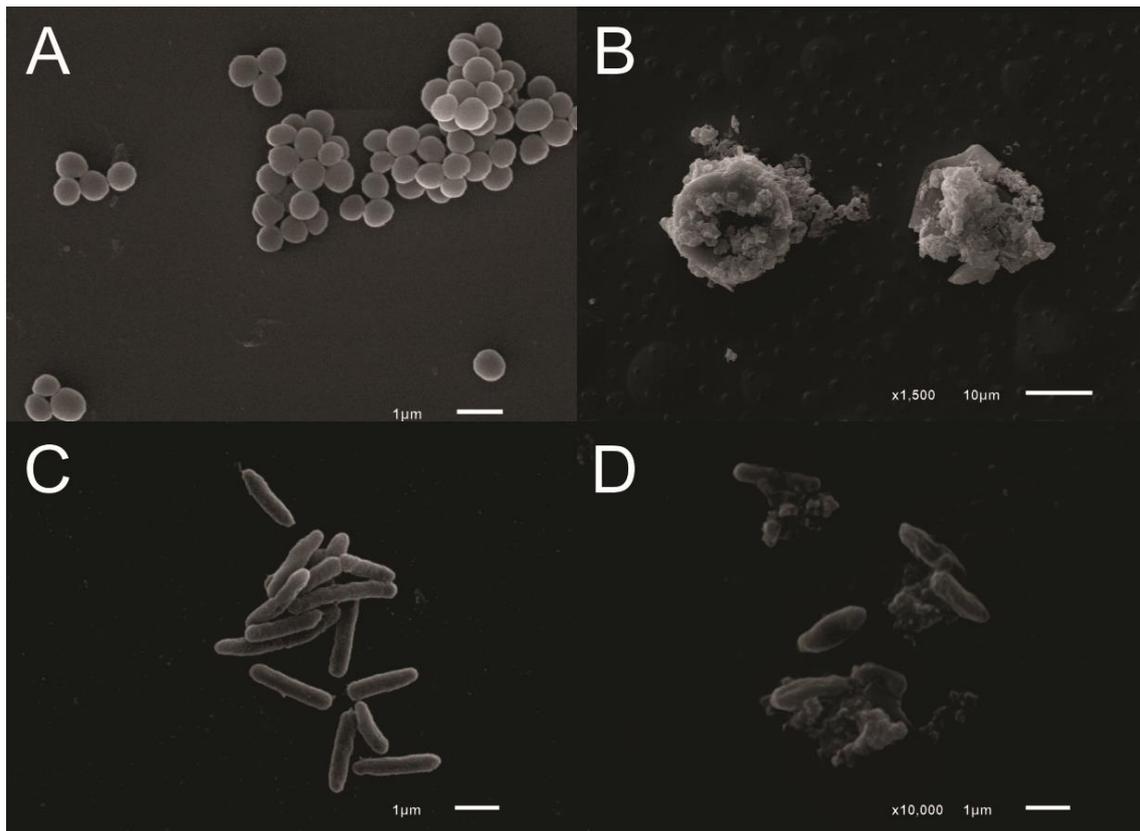


Figura 12 – Imagens das bactérias *S. aureus* (acima) e *P. aeruginosa* (abaixo) no MEV. Fonte: autora.

6. CONCLUSÃO

Nós reportamos aqui uma rota de síntese verde confiável para obtenção de nanopartículas de ouro (pH 7.7 e tempo 6 minutos).

O nanomaterial recém sintetizado se demonstrou estável em diferentes condições de meios de cultura sendo possível utiliza-lo em modelos in vitro para ensaios antibacterianos.

No experimento de floculação, as nanopartículas variaram sua estabilidade ao reagir com soluções de diferentes pHs do que com soluções com diferentes concentrações de sal, o que comprova novamente que o pH é uma condição significativa para o material.

Os compostos químicos presentes no extrato manifestaram seu potencial de redução nos ensaios antioxidantes realizados tanto com extrato quanto com as nanopartículas reduzidas. Além disso, o potencial antioxidante no nanomaterial é maior, o que pode ser observado tanto na variável de concentrações quanto nos valores de IC 50. Isso comprova que extrato e ouro juntos possuem as ações antioxidantes mais potencializadas.

As concentrações utilizadas baseadas no IC 50 para os testes de citotoxicidade demonstraram que o nanomaterial é de baixa citotoxicidade, demonstrando uma citotoxicidade inferior a 50% tanto para as células L929 quanto para as HaCaT. Ademais, as nanopartículas obtiveram citotoxicidade inferior a seu extrato.

Nos ensaios antimicrobianos, as nanopartículas também demonstraram ótimos resultados de inibição devido as suas características de tamanho e carga, que pode ser confirmado pelas imagens de MEV.

Por fim, presente trabalho representou uma estratégia para aplicação como antibacterianos de nanopartículas de ouro obtidas por síntese verde.

REFERÊNCIAS

1. Al-Qadi S., Remuñán-López C. Nanopartículas metálicas: oro. En: Real Academia Nacional de Farmacia. Nanotecnología farmacéutica. Madrid; 2009. pp. 223-248.
2. 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.
3. BINDHU, M. R.; UMADEVI, M. Antibacterial activities of green synthesized gold nanoparticles. *Materials Letters*, v.120, p.122-125, 2014.
4. BÔA I.S.F; PORTO, M.L; PEREIRA, A.C.H; RAMOS, J.P.L; SCHERER, R., OLIVEIRA, J.P., et al. Resin from *Virola oleifera* Protects Against Radiocontrast-Induced Nephropathy in Mice. *Journal PLoS ONE*, v.10, n.12, p.1-15, 2015.
5. Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Soc Rev*. 2009 Jun;38(6):1759-82.
6. BONIFÁCIO, L. D. S. **Processos de agregação e fusão de nanopartículas de ouro: Uma abordagem química**. [s.l.] UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2006.
7. 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.
8. 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.
9. Cao, Y.C.; Jin, R.; Mirkin, C.A. Nanoparticles with Raman Spectroscopic Fingerprints for DNA and RNA Detection. *Science*. 2002; 297: 1536-1540.
10. CHENG, J.; GU, Y-J.; CHENG, S. H.; WONG, W-T. Surface Functionalized Gold Nanoparticles for Drug Delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 9, n. 8, p. 1362–1369, 2013.
11. CHENG, Y.; SAMIA, A.C.; LI, J.; KENNEY, M.E.; RESNICK, A.; BURDA, C. Delivery and efficacy of a cancer drug as a function of the bond to the gold nanoparticle surface. *Langmuir*, n.26, p.2248–2255, 2010.
12. 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.
13. CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. *Análise instrumental*. Rio de Janeiro: Interciências, 2000.
14. 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.
15. Contreras, L. A. A., PROPOSIÇÃO DE UMA ROTA DE SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO REDUZIDAS COM RESINA DE *Virola oleifera* ATRAVÉS DO PLANEJAMENTO FATORIAL, Vitória, 2018
16. CUI, Y. et al. The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*. *Biomaterials*, v. 33, n.7, p. 2327-2333, 2012.
17. D. W. Mayo, F. A. Miller, R. W. Hannah. *Course Notes on the Interpretation of Infrared and Raman Spectra* Ed. John Wiley & Sons, 2003.
18. Derfus AM, Chan WCW, Bhatia SN. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Lett*. 2004; 4(1):11–8.
19. 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.
20. 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).
21. **Ferreira, Débora** Machado, 1986 -. F383b. *Biossíntese otimizada de nanopartículas de ouro com extrato de Virola oleifera / Débora Machado Ferreira*. – 2016.
22. GANESAN, R. M.; PRABU, H. G. Synthesis of gold nanoparticles using herbal *Acorus calamus* rhizome extract and coating on cotton fabric for antibacterial and U blockin applications. *Arabian Journal of Chemistry*, 2015.
23. Glusker, J.; Katz, A.; Bock, C. Metal ions in biological systems. *The Rigaku Journal*.1999; 16(2): 8–16.

24. Godoi, A. A., Ishikawa, R. B., Porto, K. R., Roel, A. R., Xavier, P. C. N., Yano, M., Evaluation of antioxidant activity, antibacterial and cytotoxic *Urera aurantiaca*, 2011.
25. 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.
26. 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.
27. Ibrahim, H. M. M. Cairo, Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms 2015.
28. IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, v. 13, n. 10, p. 2638, 2011.
29. J F Kennedy, G. O. Phillips, P A Williams. *Recent Advances in Environmentally Compatible Polymers: Cellucon '99 Proceedings*. Woodhead published limited, 2001.
30. Kimling, J.; Maier M.; Okenve, B.; Kotaidis, V. ; Ballot, H.; Plech. A. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *The Journal of Physical Chemistry*. 2006; 110 (32): 15700–15707.
31. Keijok, W. J., otimização e controle da síntese verde de nanopartículas de ouro utilizando o extrato de *Coffea arábica*, Vitória, 2018.
32. Kindel, K. -----
33. Martelli -----
34. MILANEZE, B. A. Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro com resina de *Virola oleifera* e avaliação do seu efeito antibacteriano, Vitória , 2015.
35. MISHRA, A. et al. Biocatalytic and antimicrobial activities of gold nanoparticles synthesized by *Trichoderma* sp. *Bioresource Technology*, v. 166, p. 235-242, 2014.
36. MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Nanomedicine: current status and future prospects. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 19, n.3, p. 311-330, 2005.
37. MOREIRA, E. A. M.; SHAMI, N. J. I. E. Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrição, Campinas*, v. 17, n. 2, p.227-236, 2004.
38. Marwah M. Mohamed,S. A. Fouad, H. A. Elshoky, Antibacterial effect of gold nanoparticles against *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 2017
39. MULVANEY, P. Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles. *Langmuir*, v. 12, n. 3, p. 788–800, 1996.
40. Njagi, E.C.; Huang, H.; Stafford, L.; Genuino, H.; Galindo, H.M.; Collins, J.B.; Hoag, G.E.; Suib, S.L. Biosynthesis of Iron and Silver Nanoparticles at Room Temperature Using Aqueous Sorghum Bran Extracts *Langmuir*. 2011; 27 (1): 264-271.
41. N. Roy, S. Mondal, R. A . Laskar, S. Basu, D. Mandal, N. A. Begum, *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*. 2010, 76, 317-325.
42. P. Raveendran, J. Fu and Wallen, S.L., *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125, pp. 13940–13941.
43. PACIOTTI, G.F.; MAYER, L.; WEINREICH, D.; GOIA, D.; PAVEL, N.; MCLAUGHLIN, R.E.; TAMARKIN, L. Colloidal gold: A novel nanoparticle vector for tumour directed drug delivery. *Drug Delivery*, n.11, p.169–183, 2006.
44. PETRYAYEVA, E.; KRULL, U. J. Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing-A review. ***Analytica Chimica Acta***, v. 706, n. 1, p. 8–24, 2011a.
45. Polte, J. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective. *The Royal Society of Chemistry*. 2015; 17: 6809-6830.
46. PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, v. 48, p. 3396-3402, 2000.
47. R. Sardar, A. M. Funston, P. Mulvaney and R.W. Murray, *Langmuir*, 2009, 25, pp. 13840–13851.
48. Rana, S. Bajaj, A. Mout, R. Rotello, V. Monolayer coated gold nanoparticles for delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (2012) 200-216.
49. 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). 60

50. Salari S, Esmaeilzadeh Bahabadi S, Samzadeh-Kermani A, Yosefzadei F. Avaliação in vitro do potencial antioxidante e antibacteriano de nanopartículas de prata sintetizadas em verde usando extrato de fruta de *Prosopis farcta*. *Iran J Pharm Res*. 2019; 18 (1): 430–455.
51. 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.
52. Weisbecker CS, Merritt MV, Whitesides GM. Molecular self-assembly of aliphatic thiols on gold colloids. *Langmuir*. 1996. 12:3763–3772.
53. Yu, K., Lu, F., Li, Q. et al. In situ assembly of Ag nanoparticles (AgNPs) on porous silkworm cocoon-based wound film: enhanced antimicrobial and wound healing activity. *Sci Rep* 7, (2017).