



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico**

VANESSA LIMA ALBERNAZ

2014

VANESSA LIMA ALBERNAZ

**Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico**

ORIENTADOR:

PROF. DR. LUCIANO PAULINO DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

BRASÍLIA, DF

2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

Dissertação de Mestrado

Vanessa Lima Albernaz

Título:

**“Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso das folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físico-química, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico.”**

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva  
*Presidente / Orientador*  
UnB / Nano

Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlmann  
*Membro Titular Interno não Vinculado ao Programa*  
UnB / FCE

Prof. Dr. Thales Lima Rocha  
*Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa*  
Embrapa

Brasília, 04 de julho de 2014.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade de Brasília, pelo espaço físico e pelo ensino de qualidade que me proporcionou, assim como aos professores que colaboraram direta ou indiretamente para a minha formação acadêmica.

À EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, em especial ao Laboratório de Espectrometria de Massa, Sala de Nanobiotecnologia, local onde realizei grande parte desse trabalho, pela infraestrutura e apoio a mim proporcionados.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAP-DF, pelo suporte financeiro que permitiu a realização desse trabalho.

À minha família, pelo amor e desvelo incondicionais. Especialmente, à minha mãe, a quem eu serei eternamente grata, pela incansável e constante dedicação para comigo, à ela dedico todos os meus esforços. Ao meu irmão, Daniel, por estar sempre ao meu lado, por ser o meu companheiro e minha fonte de inspiração.

Ao Phillippe, que compartilha comigo a pureza de um apreço sincero, pela sua amizade, paciência e incentivo inestimáveis.

Aos meus amigos, Bruno, Gui, Fer, Alynne, Clara, Jéssica, Mari, Francês, Marcinho e muitos outros, pela amizade e pelos momentos marcantes e inesquecíveis que vivenciamos.

Aos colegas de trabalho, pela convivência, discussões e contribuições. Especialmente à Cinthia Caetano Bonatto e à Luciane Dias da Silva, pela ajuda na realização de alguns experimentos, pela estima e pelo estímulo.

À Dra. Vera Lúcia Perussi Polez, pelas contribuições intelectuais valiosas, pela sua dedicação e pela inspiração que me propiciou.

Ao Dr. Cláudio Lopes, pelas análises de microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Diego Juscelino Santos Dias, pelas análises de espectroscopia de infravermelho.



À Clara Freitas, pelo auxílio na realização do ensaio de viabilidade com bactérias.

Ao Prof. Dr. Elmo Salomão Alves e ao Dr. Elibio Leopoldo Rech Filho pelas contribuições e cooperação nos experimentos com os biossensores.

Ao Dr. Thales Lima Rocha, Dr. Luis Alexandre Muehlmann e Dr. Eduardo Fernandes Barbosa pelas discussões e valiosas contribuições.

Finalmente, faço um agradecimento especial ao Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva que, ao longo dessa jornada, fez muito mais do que me orientar. Além de ter sido um orientador dedicado, foi, é, e sempre será um grande amigo e um exemplo a ser seguido. Incansável e extremamente motivado, a sua vida mostra que não se deve desistir e que se deve sempre olhar adiante, de cabeça erguida, com vistas a um ideal maior. A minha estima por ele caminha em paralelo com a minha consciência de que ele foi o grande responsável pelo meu crescimento acadêmico e pelo caminho que escolhi trilhar.

*“Se enxerguei mais longe, foi porque me  
apoei nos ombros de gigantes”*

- Isaac Newton

## RESUMO

As técnicas fisicoquímicas utilizadas tradicionalmente na síntese de nanopartículas metálicas (NPMs) envolvem solventes tóxicos e a geração de resíduos potencialmente nocivos à saúde e ao meio ambiente, limitando em diversas circunstâncias o seu amplo uso em aplicações biomédicas. Diante desse quadro, surge grande interesse na busca por rotas alternativas de síntese mais seguras e com menor impacto ao meio ambiente. A síntese verde de NPMs visa à utilização de organismos biológicos, ou partes deles (como órgãos, tecidos, células ou biomoléculas), como substituintes de reagentes químicos tóxicos nas reações de síntese de nanocompostos, apresentando-se como uma alternativa sustentável. O presente projeto propôs sintetizar nanopartículas de prata (AgNPs) por rotas de síntese verde utilizando o extrato aquoso proveniente das folhas de *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae), uma planta abundante no cerrado brasileiro. O aperfeiçoamento dos parâmetros e condições da síntese foi realizado visando à obtenção de nanopartículas com características almejavéis de monodispersividade e estabilidade em suspensão coloidal, além da caracterização quanto aos parâmetros morfológicos e fisicoquímicos. Após otimização das condições de síntese, foram obtidas AgNPs com o diâmetro médio de aproximadamente 21 nm e potencial Zeta de -30 mV. A formação eficiente de AgNPs foi dependente de parâmetros do processo, como concentração do extrato, pH inicial da reação e presença/ausência de surfactantes. O extrato de *B. gaudichaudii* atuou na biorredução e no recobrimento das NPs e verificou-se que o período de coleta das folhas (inverno ou verão) influenciou diretamente na taxa de síntese das partículas e nas suas características morfológicas e fisicoquímicas. A cinética de formação das AgNPs, monitorada por microscopia de força atômica, descreveu a nucleação e crescimento das AgNPs, começando com o surgimento de duas populações que, ao longo do tempo, aumentaram de tamanho e formaram uma única população. Também foi avaliado o perfil de dissolução das AgNPs em meio salino e observou-se que nas condições testadas elas não sofrem o processo de dissolução. Ensaio de viabilidade celular mostraram que as AgNPs sintetizadas apresentaram atividade citotóxica dependente da sua concentração, e comparáveis à ação da prata livre, para as linhagens de células eucarióticas tumorais MCF-7 e não tumorais NIH3T3. A sua atividade antibacteriana em *Escherichia coli* foi dependente do período de coleta das folhas da planta e não houve atividade antifúngica em ensaio com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Adicionalmente, as AgNPs foram aplicadas na construção de um nanobiossensor à base de grafeno com o objetivo de possivelmente potencializar o sinal eletroquímico e os resultados preliminares indicam que, embora a capacidade de detecção do dispositivo seja promissora, as AgNPs não aumentaram a condutividade elétrica do sensor devido à formação de artefatos no dispositivo e estudos futuros são necessários. Todas as etapas desse trabalho foram realizadas para que as AgNPs obtidas por essa rota consistissem em um material de interesse no desenvolvimento de novos produtos nanotecnológicos com bases sustentáveis. O processo de síntese apresentou uma alta reprodutibilidade e está de acordo com os princípios da química verde, apresentando-se como uma alternativa sustentável, eco-amigável, de custo baixo e biocompatível na síntese de AgNPs.

**Palavras-chave:** Síntese verde com plantas, *Brosimum gaudichaudii*, nanopartículas de prata.

## ABSTRACT

The physicochemical techniques traditionally used in the synthesis of metallic nanoparticles (MNPs) involve toxic solvents and the generation of residues potentially hazardous to health and to the environment limiting their use in biomedical applications. Therefore, great interest arises in the search for safer and eco-friendly alternative routes for MNP synthesis. The green synthesis of MNPs aims to utilize biological organisms, or parts of them (such as organs, tissues, cells or biomolecules), as substitutes for chemical toxic reagents as a sustainable approach in the synthesis of nanomaterials. The present work aims to greenly synthesize silver nanoparticles (AgNPs) using the aqueous extract from the leaves of *Brosimum gaudichaudii*, a plant abundantly present in the Brazilian Cerrado vegetation. The synthesis parameters optimization was performed in order to obtain nanoparticles with the desired properties of monodispersity and colloidal stability and the AgNPs were also characterized concerning its morphological and physicochemical properties. After the synthesis conditions optimization, AgNPs showed an average diameter of approximately 21 nm and a Zeta potential of -30mV. The efficient AgNPs formation was dependent on the synthesis parameters, such as extract concentration, initial pH of the reaction and the presence of surfactants. The leaf extract of *B. gaudichaudii* was responsible for the metal reduction and capping of the nanoparticles. It was also verified that the season when the plant leaves were harvested (winter or summer) had a major influence in the particle synthesis rate and in its morphological and physicochemical characteristics. The AgNPs formation kinetics, evaluated by atomic force microscopy, described the AgNPs nucleation and growth, starting with two particle populations that, through time, increased in size leading to the formation of only one particle population. The particle dissolution profile in saline solutions was also evaluated and the data showed that the AgNPs do not dissolve in saline media. Cell viability assays revealed that the AgNPs cytotoxic activity was concentration-dependent and comparable to that of silver nitrate with breast cancer cells (MCF-7) and normal cells (NIH3T3). Their antimicrobial activity in *Escherichia coli* was dependent on the season when the leaves were collected and the AgNPs showed no antifungal activity against *Saccharomyces cerevisiae*. Furthermore, the synthesized AgNPs were utilized in the assembly of a biosensor aiming to enhance its electrochemical signal and the preliminary results indicated that the biosensing system had a promising detection range, but the AgNPs did not enhance the electrical conductivity due to the formation of artifacts in the device and further studies are necessary. All the stages of this study were performed aiming that the AgNPs synthesized through this route would consist in a material of interest in the development of new nanotechnological products with a sustainable approach. The synthesis process is in accordance with the green chemistry principles, presenting itself as a sustainable alternative, eco-friendly, biocompatible and low cost alternative for AgNP synthesis.

**Keywords:** Green synthesis using plants, *Brosimum gaudichaudii*, silver nanoparticles

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Taça de <i>Lycurgus</i> sob diferentes iluminações .....	17
<b>Figura 2:</b> Principais fatores relacionados com as propriedades únicas apresentadas pelas nanopartículas.....	18
<b>Figura 3:</b> Principais elementos que constituem um biossensor.....	20
<b>Figura 4:</b> Solventes mais comuns utilizados na síntese de nanopartículas .....	22
<b>Figura 5:</b> Esquema representativo do mecanismo de crescimento de nanopartículas de prata por síntese verde utilizando extrato de planta. Primeiro, o extrato atua reduzindo os sais metálicos, formando átomos neutros. Esses átomos colidem e formam um núcleo estável – processo de nucleação – seguido do crescimento, no qual mais átomos colidem e formam partículas maiores. Por fim, a estabilização ocorre pelo esgotamento dos íons metálicos na solução ou pelo recobrimento da partícula por compostos presentes no extrato impedindo a aglomeração.....	24
<b>Figura 6:</b> Foto da planta <i>Brosimum gaudichaudii</i> (centro) utilizada para a realização dos experimentos desse trabalho .....	31
<b>Figura 7:</b> Esquema representativo das etapas de filtração do extrato verão (EV). Primeiramente, o EV passou pelo filtro de 100 kDa e o filtrado resultante consistiu na amostra utilizada nos experimentos como o EV 100 kDa. Esse filtrado passou então pelo filtro de 30 kDa e a parte filtrada (com massa molecular menor que 30 kDa) foi utilizada como o EV 30 kDa e assim sucessivamente para os filtrados de 10 e 3 kDa.....	45
<b>Figura 8:</b> Esquema representativo de partículas em solução com destaque para a elucidação das medidas de diâmetro hidrodinâmico e potencial Zeta obtidas em um aparelho de DLS para partículas esféricas (A), partículas agregadas ou não-esféricas (B).....	47
<b>Figura 9:</b> Imagem do tipo de dispositivo utilizado para a construção dos biossensores. A região azulada é aquela em que o fotorresiste foi removido pela acetona.....	57
<b>Figura 10:</b> Curvas de formação representativas das medidas de absorvância (unidade adimensional) a 450 nm monitoradas ao longo de 120 horas da síntese de nanopartículas de prata (NPV) utilizando a mistura da solução de nitrato de prata (concentração final de 1 mM) com o extrato verão (EV) na concentração de 10% v/v (A). Foto após 24 horas dos Erlenmeyers armazenados a 25°C contendo o EV e as NPVs (B).....	61
<b>Figura 11:</b> Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número, volume e intensidade das nanopartículas de prata (NPV, acima) e do extrato verão (EV, abaixo) após 24 horas. À direita de cada gráfico estão os valores correspondentes às medidas de <i>Z-average</i> , PDI e potencial Zeta de superfície. ....	64

<b>Figura 12:</b> Imagens de microscopia eletrônica de transmissão obtidas das nanopartículas de prata sintetizadas com o extrato verão na concentração de 10 % (v/v) com a solução de nitrato de prata na concentração final de 1 mM. ....	65
<b>Figura 13:</b> Curvas de formação representativas das medidas de absorvância a 490 nm monitoradas ao longo de 48 horas da síntese de nanopartículas de prata utilizando a mistura da solução de nitrato de prata (concentração final de 1 mM) com o extrato verão nas concentrações de 10, 20 e 50% v/v. ....	67
<b>Figura 14:</b> Curvas representativas da cinética de formação das nanopartículas de prata por meio das medidas de absorvância a 490 nm monitoradas ao longo da síntese utilizando tampões com os pHs variando de 4 a 8. ....	69
<b>Figura 15:</b> Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número, volume e intensidade das nanopartículas de prata (NPVs) com tampão fosfato em pH 6 após 24 horas. À direita de cada gráfico estão os valores correspondentes às medidas de Z-average, PDI e potencial Zeta de superfície. ....	70
<b>Figura 16:</b> Fotos dos poços das microplacas correspondentes às misturas reacionais da síntese de nanopartículas de prata com adição de surfactantes após 24 horas. ....	72
<b>Figura 17:</b> Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número, volume e intensidade das misturas reacionais para a síntese de nanopartículas de prata com a adição de SDS (A) e de CTAB (B) a 1 mM (concentração final) após 24 horas. À direita de cada gráfico estão os valores correspondentes às medidas de Z-average, PDI e potencial Zeta de superfície. ....	74
<b>Figura 18:</b> Curvas representativas das medidas de absorvância a 490 nm monitoradas por 48 horas de formação das nanopartículas de prata ao longo de 48 h. As legendas indicam o tamanho molecular do filtro de exclusão do extrato verão (EV), sendo que foram utilizados os filtrados, ou seja, as moléculas do EV abaixo da massa molecular indicada. ....	75
<b>Figura 19:</b> Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número obtidas por espalhamento de luz dinâmico das nanopartículas de prata (NPVs) formadas por diferentes extratos verão (EVs) filtrados em suspensão com água ultrapura (A). EVs controle nas mesmas concentrações (B). ....	78
<b>Figura 20:</b> Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número obtidas por espalhamento de luz dinâmico da síntese de nanopartículas de prata de acordo com o tempo de armazenamento da mesma em suspensão aquosa a 4°C. ....	80
<b>Figura 21:</b> Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número obtidas por espalhamento de luz dinâmico da síntese de nanopartículas de prata (A) em diferentes situações de acordo com o tempo de congelamento das folhas utilizadas no preparo do extrato verão (EV). Gráfico com as respectivas distribuições de Z-average e PDI (B). ....	81

<b>Figura 22:</b> Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número obtidas por espalhamento de luz dinâmico dos extratos verão (EVs) utilizados nas sínteses de NPV de acordo tempo de congelamento das folhas utilizadas no preparo do EV (A). Gráfico com as respectivas distribuições de <i>Z-average</i> e PdI (B).....	82
<b>Figura 23:</b> Gráfico do potencial Zeta das nanopartículas de prata (NPV) sintetizadas da mesma maneira em diferentes situações com o extrato verão (EV) congelado pelo tempo indicado.....	82
<b>Figura 24:</b> Imagens obtidas por microscopia de força atômica adquiridas em modo dinâmico a partir dos meios reacionais do extrato verão na concentração de 10% v/v (esquerda) e da solução estoque de nitrato de prata na concentração final de 1 mM (direita) .....	84
<b>Figura 25:</b> Imagens obtidas por microscopia de força atômica adquiridas em modo dinâmico a partir da mistura reacional da síntese de nanopartículas de prata após 4, 8, 12 e 24 horas de incubação .....	86
<b>Figura 26:</b> Fotos dos Erlenmeyers contendo misturas reacionais correspondentes às nanopartículas de prata sintetizadas com o extrato verão (acima) e com o extrato inverno (abaixo) ao longo de 24 horas de reação.....	88
<b>Figura 27:</b> Curvas cinéticas de monitoramento das misturas reacionais das nanopartículas de prata sintetizadas com o extrato verão (NPVs, em vermelho) e com o extrato inverno (NPIs, em azul) sendo apresentadas a absorvância medida a 450 nm (A), a variação do pH (B) e a condutividade elétrica (C) durante o curso das reações por 24 horas.....	90
<b>Figura 28:</b> Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número obtidas por espalhamento de luz dinâmico das nanopartículas de prata sintetizadas com o extrato verão EV (NPVs) e com o extrato inverno EI (NPIs).....	92
<b>Figura 29:</b> Espectros obtidos por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier das nanopartículas de prata sintetizadas com o extrato verão EV (NPVs) e com o extrato inverno EI (NPIs), além de seus respectivos controles (extratos) .....	93
<b>Figura 30:</b> Medidas de absorvância a 490 nm das nanopartículas de prata (NPV) e do extrato verão (EV) dispersos nas soluções de NaCl 154 mM, NaCl 559 mM e água ultrapura monitoradas ao longo de 12 horas.....	96
<b>Figura 31:</b> Gráficos das análises de <i>Z-average</i> e PdI obtidos por espalhamento de luz dinâmico ao longo de 4 h de monitoramentos das reações de dissolução das nanopartículas de prata (NPV) em NaCl 154 mM (A), em NaCl 559 mM (B) e do extrato verão (EV) em NaCl 154 mM (C). Gráfico dos dados de potencial Zeta obtidos a partir dos resultados das reações de A e C (D).....	97

- Figura 32:** Histogramas de viabilidade celular das linhagens NIH3T3 (fibroblasto murino) e MCF-7 (células de câncer de mama humano) obtidos no ensaio colorimétrico de MTT na presença das nanopartículas de prata e dos devidos controles. .... 100
- Figura 33:** Histograma de viabilidade celular da bactéria *E. coli* obtido no ensaio colorimétrico de MTT na presença das nanopartículas de prata e dos devidos controles. .... 103
- Figura 34:** Histograma de viabilidade celular da levedura *S. cerevisiae* obtido no ensaio colorimétrico de MTT na presença das nanopartículas de prata e dos devidos controles. .... 105
- Figura 35:** Fotomicrografias dos dispositivos após os procedimentos de preparação e funcionalização. (A) e (C) apresentaram os contatos de ouro rompidos e (B) apresentou uma espécie de filme na superfície proveniente da dissolução do fotorresiste pelo DMF. Fotomicrografias dos dispositivos após deposição do filme de NPVs (D, E, F). .... 107
- Figura 36:** Gráfico da resistência em função do tempo da variação da tensão top gate utilizando água ultrapura em contato com o dispositivo (A) e os últimos 20 valores da resistência obtidos para cada tensão top gate em A (B). .... 108
- Figura 37:** Resistência média do dispositivo em função da tensão de top gate ( $V_g$ ) para cada antígeno (GH – hormônio do crescimento) diluídos nas concentrações de 2, 20 e 200 ng/mL. .... 109
- Figura 38:** Gráfico da resistência média em cada platô correspondente à tensão do dispositivo em função da tensão top gate ( $V_g$ ) para cada solução do antígeno GH (hormônio do crescimento) em diferentes concentrações (A). Resistência média das medidas em A (B)... 110



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Técnicas utilizadas nas abordagens de fabricação de compostos nanoestruturados. ....	22
<b>Tabela 2:</b> Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extratos de plantas provenientes das folhas. ....	27
<b>Tabela 3:</b> Siglas de identificação das nanopartículas e extratos produzidos no presente trabalho. ....	42
<b>Tabela 4:</b> Dados obtidos por DLS referentes ao valor do diâmetro hidrodinâmico da(s) população(s) de partículas (% em número), <i>Z-average</i> , PDI e potencial Zeta de superfície dos EVs que passaram pelos ultrafiltros de exclusão de massa molecular indicados e das NPVs sintetizadas com os respectivos extratos. Os valores estão representados como média ± desvio padrão da média das medidas realizadas em triplicata. ....	76
<b>Tabela 5:</b> Dados obtidos por DLS do diâmetro hidrodinâmico da(s) população(s) de partículas (% número), <i>Z-average</i> , PDI e potencial Zeta de superfície referentes as nanopartículas de prata sintetizadas com o extrato verão EV (NPVs) e com o extrato inverno EI (NPIs). Os valores estão representados como média ± desvio padrão da média das medidas realizadas em triplicata. ....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNP.....	Nanopartícula de prata
AuNP.....	Nanopartícula de ouro
CTAB.....	Brometo de cetiltrimetil amônio
DH.....	Diâmetro hidrodinâmico
DLS.....	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Espalhamento de luz dinâmico)
DMEM.....	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (Meio Eagle modificado por Dubecco)
DMF.....	Dimetilformamida
DMSO.....	Dimetilsulfóxido
DNA.....	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
EL.....	Extrato preparado com folhas de <i>Brosimum gaudichaudii</i> obtidas no inverno/período da seca (Julho, 2013).
EMBRAPA..	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERB.....	Elemento de reconhecimento biológico
EV.....	Extrato preparado com folhas de <i>Brosimum gaudichaudii</i> obtidas no verão/período das chuvas (Janeiro, 2013)
FTIR.....	<i>Fourier Transform Infrared</i> (infravermelho com transformada de Fourier)
MCF-7.....	<i>Michigan Cancer Foundation - 7</i>
MFA.....	Microscopia de força atômica
MET.....	Microscopia eletrônica de transmissão
MTT.....	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NP.....	Nanopartícula
NPI.....	Nanopartículas de prata sintetizadas com o extrato preparado com folhas de <i>Brosimum gaudichaudii</i> obtidas no inverno/período da seca (Julho, 2013).
NPM.....	Nanopartícula metálica
NPV.....	Nanopartículas de prata sintetizadas com o extrato preparado com folhas de <i>Brosimum gaudichaudii</i> obtidas no verão/período das chuvas (Janeiro, 2013).
PBSE.....	<i>1-pyrenebutanoic acid succinimidyl ester</i> (ácido 1-pirenobutanóico estér succinimidico)
PdI.....	<i>Polydispersity Index</i> (Índice de polidispersividade)
pH.....	Atividade do íon hidroxônio
rpm.....	Rotações por minuto
SDS.....	Dodecil sulfato de sódio
SE.....	Solução estoque
UFMG.....	Universidade Federal de Minas Gerais
UnB.....	Universidade de Brasília

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS .....	17
1.1.1 Aplicações .....	19
1.1.2 Abordagens para a síntese .....	21
1.2 SÍNTESE VERDE .....	23
1.2.1 Uso de extratos de plantas .....	23
1.2.2 Critérios para a seleção da planta .....	29
1.2.3 Planta de interesse: <i>Brosimum gaudichaudii</i> .....	30
1.3 JUSTIFICATIVA .....	32
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	34
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
3.1 MATERIAIS .....	35
3.1.1 Equipamentos .....	35
3.1.2 Materiais .....	36
3.1.3 Reagentes .....	36
3.1.4 Soluções .....	37
3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO VEGETAL .....	41
3.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS .....	41
3.4 SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA .....	42
3.5 APERFEIÇOAMENTOS DOS PARÂMETROS DE SÍNTESE .....	42
3.5.1 Concentração dos reagentes .....	43
3.5.2 pH da reação .....	43
3.5.3 Presença/ausência de surfactantes .....	43
3.5.4 Fracionamento molecular dos compostos presentes no extrato .....	44
3.5.5 Uso de extratos de folhas coletadas em duas épocas do ano .....	45
3.6 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FÍSICOQUÍMICA .....	45
3.6.1 Espalhamento de luz dinâmico e potencial Zeta .....	45
3.6.2 Microscopia de força atômica .....	48
3.6.3 Microscopia eletrônica de transmissão .....	49
3.6.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier .....	49
3.7 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS EM MEIO SALINO .....	50

3.8 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR .....	50
3.8.1 Células eucarióticas tumorais e não tumorais .....	51
3.8.2 Bactéria <i>Escherichia coli</i> .....	53
3.8.3 Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	55
3.9 NANOBIOSSENSORES BASEADOS EM GRAFENO .....	56
3.9.1 Remoção do fotorresiste dos dispositivos .....	57
3.9.2 Processo de funcionalização dos dispositivos .....	58
3.9.3 Detecção eletroquímica .....	59
3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E GRÁFICAS .....	60
3.11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
4.1 SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA .....	61
4.2 APERFEIÇOAMENTOS DOS PARÂMETROS DA REAÇÃO DE SÍNTESE VERDE .....	66
4.2.1 Efeitos da concentração do extrato .....	66
4.2.2 Efeitos do pH .....	68
4.2.3 Efeitos da presença/ausência de surfactantes .....	71
4.2.5 Efeitos do fracionamento molecular dos compostos presentes no extrato .....	74
4.2.6 Estabilidade das nanopartículas .....	79
4.3 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA CINÉTICA DE FORMAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA .....	83
4.4 INFLUÊNCIA DA ESTAÇÃO DE COLETA DAS FOLHAS DE <i>B. GAUDICHAUDII</i> NA SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS .....	87
4.5 ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) .....	92
4.6 PERFIL DE DISSOLUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS EM MEIO SALINO .....	95
4.7 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR .....	98
4.7.1 Células eucarióticas tumorais e não tumorais .....	99
4.7.2 Bactéria <i>Escherichia coli</i> .....	101
4.7.3 Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	104
4.8 BIOSSENSORES .....	106
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>112</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>114</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A palavra nano (termo grego: anão) é um prefixo utilizado no sistema métrico para representar um fator de  $10^{-9}$ , que se refere a um bilionésimo de alguma medida. Um material é classificado como em nanoescala quando ele possui pelo menos uma de suas dimensões ocorrendo na faixa entre 1 e 100 nanômetros (nm). Devido a essa faixa de tamanho, os materiais adquirem propriedades fisicoquímicas novas quando comparados aos seus equivalentes macroestruturados. A Nanociência compreende o estudo interdisciplinar de nanoestruturas e dessas novas propriedades e a Nanotecnologia é o setor que faz uso desses conhecimentos para desenvolver novos materiais e dispositivos.

As ideias por trás dos conceitos que originaram os termos Nanociência e Nanotecnologia surgiram com a palestra “Há muito espaço lá embaixo”, proferida pelo físico Richard Feynman no encerramento do encontro da Sociedade Americana de Física, na Caltech, em 1959. Nessa palestra ele aponta a manipulação e controle da matéria em pequena escala como o futuro da ciência (Feynman, 2011). Em 1981, suas previsões se concretizaram com o desenvolvimento do primeiro microscópio de corrente de tunelamento, que permitiu a visualização e manipulação de átomos individuais, o que deu início à Era da Nanotecnologia Moderna conhecida atualmente.

Apesar de ser uma área da ciência relativamente nova, o uso das propriedades de materiais em nanoescala ocorre há séculos. O exemplo mais clássico é a Taça de Lycurgus (Fig. 1), feita pelos Romanos em 400 D.C., que apresenta coloração verde e, quando iluminada por dentro, adquire uma cor avermelhada. Sabe-se hoje em dia que o vidro dessa taça contém nanopartículas (NPs) de prata e ouro, cujo tamanho em nanoescala produz a variação na cor do vidro. Esse efeito também pode ser observado em diversos vitrais europeus produzidos durante o período medieval.



**Figura 1:** Taça de Lycurgus sob diferentes iluminações. Fonte: Curadores do Museu Britânico.

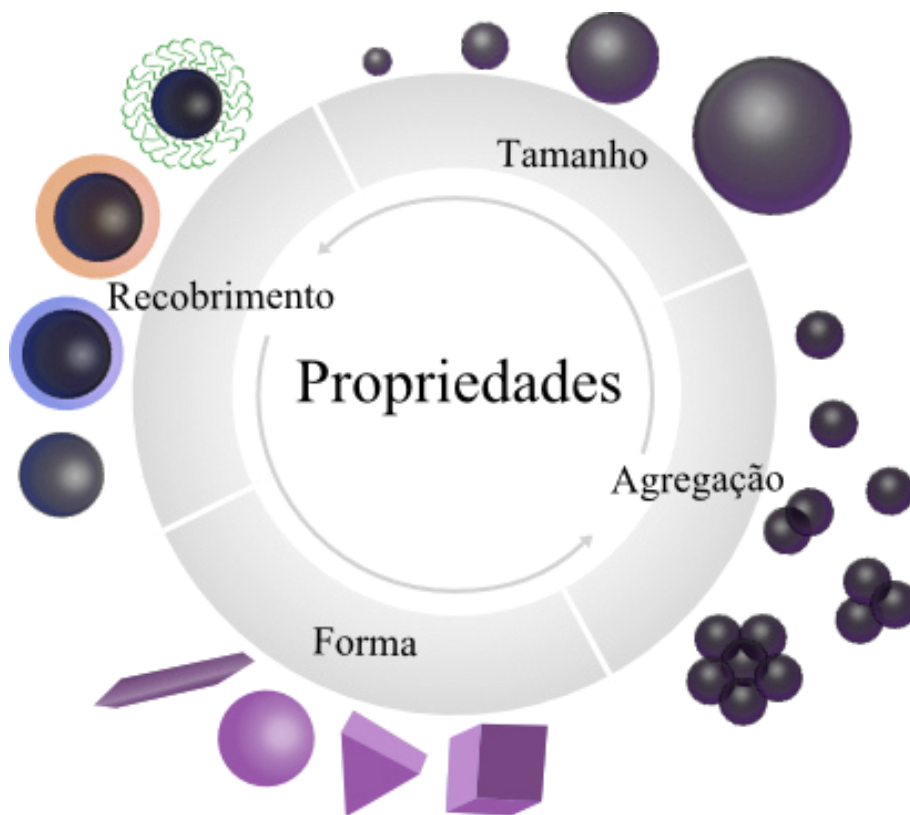
## 1.1 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

A síntese de NPs foi realizada de modo intencional pela primeira vez em 1857, quando o físico e químico Michael Faraday produziu nanopartículas de ouro (AuNPs) dispersas em suspensão coloidal. As NPs são estruturas que possuem pelo menos 50% da sua população (em número) com pelo menos uma de suas dimensões entre 1 e 100 nm (European Commission, 2011). As NPs têm gerado muito interesse em virtude de apresentarem propriedades físicas, químicas e/ou biológicas únicas, em comparação a partículas macroestruturadas. Devido ao seu tamanho em nanoescala, a razão entre a área de superfície e o volume das NPs aumenta, fazendo com que as elas se tornem mais reativas. Adicionalmente, podem surgir comportamentos eletrônicos e ópticos diferenciados, devido ao confinamento eletrônico, característica proeminente nas nanopartículas metálicas (NPMs).

Essas propriedades únicas e a reatividade das NPs são dependentes de diversos fatores, ilustrados na figura 2, entre eles: a composição química; a concentração e o estado de

agregação; o tamanho, que está diretamente ligado à sua reatividade devido à razão volume-área de superfície; a forma, relacionada também com a área de superfície e com a condutividade da NP; e o recobrimento da NP, que vai moldar a sua interação com o meio externo (Grassian, 2008).

Particularmente, as nanopartículas de prata (AgNPs) apresentam um intenso pico de absorção de radiação eletromagnética nos comprimentos de onda entre 400-500 nm devido à sua ressonância plasmônica de superfície (fenômeno que envolve a excitação coletiva de elétrons em um metal). Esse pico ocorre quando a frequência do campo magnético se torna ressonante com o movimento desses elétrons. Devido a esse fato, observa-se uma variação de cor característica em uma dispersão de AgNPs, de marrom avermelhado a marrom escuro, de acordo com o tamanho das NPs produzidas e com a composição do meio em que elas estão dispersas.



**Figura 2:** Principais fatores relacionados com as propriedades únicas apresentadas pelas nanopartículas. Fonte: a própria autora.

### 1.1.1 Aplicações

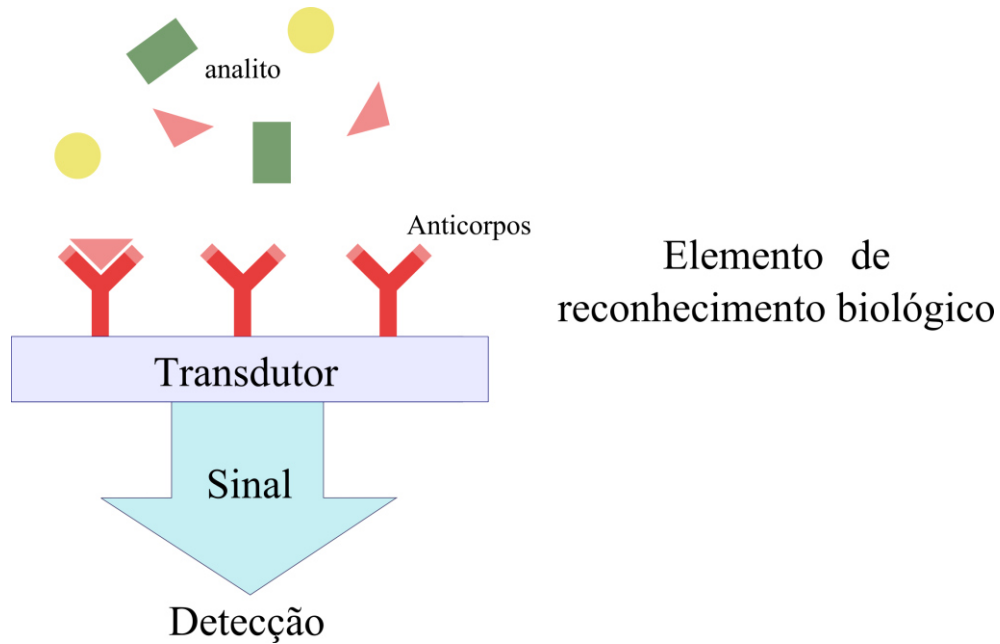
As NPMs possuem aplicações nanotecnológicas nos mais diversos campos, como na medicina diagnóstica (biossensores de alta eficiência, imagem); farmácia (sistemas de entrega de fármacos, cosméticos); indústria alimentícia e têxtil (embalagens e roupas com propriedades antimicrobianas); energia (painéis solares); biorremediação, entre outros (Kumar e Yadav, 2009; Thirumurugan e Dhanaraju, 2011; Ingale, 2013).

Além de aplicações no campo terapêutico com ação direta sobre células alvo (como células tumorais), NPMs podem também ser utilizadas para o desenvolvimento de nanobiossensores, dada sua facilidade de acoplamento a moléculas biológicas, possibilitando detecção rápida e fácil (Mancebo, 2009).

Um biossensor é um dispositivo capaz de responder de forma seletiva à presença de um analito particular, por meio de uma interação química, que consiste em duas etapas: o reconhecimento químico, cuja interação gera um sinal passível de detecção e a amplificação deste sinal. Esse dispositivo é constituído por dois elementos básicos (Fig. 3): um elemento de reconhecimento biológico (ERB) integrado a um elemento transdutor, o qual traduz a ligação do ERB ao analito de interesse a um sinal, o qual pode ser detectado, permitindo a determinação qualitativa ou quantitativa desse analito (Mancebo, 2009).

Dentre os modos de detecção, destacam-se a absorbância, a fluorescência, a eletroquímica, espectroscopia Raman, espectrometria de massa, entre outros. Particularmente, os biossensores eletroquímicos são compactos, práticos, econômicos e, ao mesmo tempo, podem apresentar sensibilidade e precisão altas.





**Figura 3:** Principais elementos que constituem um biossensor. Fonte: a própria autora.

Nanopartículas metálicas, em especial as de ouro e prata, têm sido amplamente utilizadas com sucesso na construção de nanobiossensores devido às suas propriedades eletrônicas, ópticas e espectrais únicas, além de serem facilmente funcionalizáveis e apresentarem uma grande área de superfície (Doria *et al.*, 2012). Essas NPs podem atuar com eficiência tanto no biorreconhecimento, devido à sua maior área de superfície, como na transdução do sinal (Ingale, 2013). Dentre os tipos de biossensores elaborados com NPMs, podem-se citar os nanobiossensores para diagnóstico que são utilizados para detecção de patógenos, proteínas, DNAs; nanossondas para imageamento *in vivo*, rastreamento de células e monitoramento de doenças e terapia (Doria *et al.*, 2012).

As NPMs têm sido utilizadas em biossensores eletroquímicos para aumentar a transdução do sinal eletroquímico devido às suas propriedades condutoras, constituindo-se numa abordagem favorável para aumentar o desempenho desses sistemas quanto à estabilidade, sensibilidade, seletividade e eficiência (Kumar e Yadav, 2009; Huang *et al.*, 2010). Nesse sentido, a maior área de superfície com relação ao volume da partícula permite a

presença de áreas mais eletroquimicamente ativas que podem levar a uma maior sensibilidade de detecção.

As NPMs podem melhorar a aceleração efetiva da transferência de elétrons entre o eletrodo e as moléculas detectoras, o que leva a uma resposta mais rápida da detecção. Interfaces eletroquímicas modificadas com NPMs se comportam como um arranjo de nanoeletrodos sendo que, a princípio, o limite de detecção eletroanalítico de um arranjo de nanoeletrodos pode ser muito menor do que o seu análogo macroeletrodo, devido à proporção maior entre a corrente Farradaica e a corrente capacitativa (Guo e Dong, 2009). O desenvolvimento desses dispositivos representa uma alternativa promissora aos métodos lentos e trabalhosos empregados atualmente, especialmente no diagnóstico clínico (Wang, 2006).

### **1.1.2 Abordagens para a síntese**

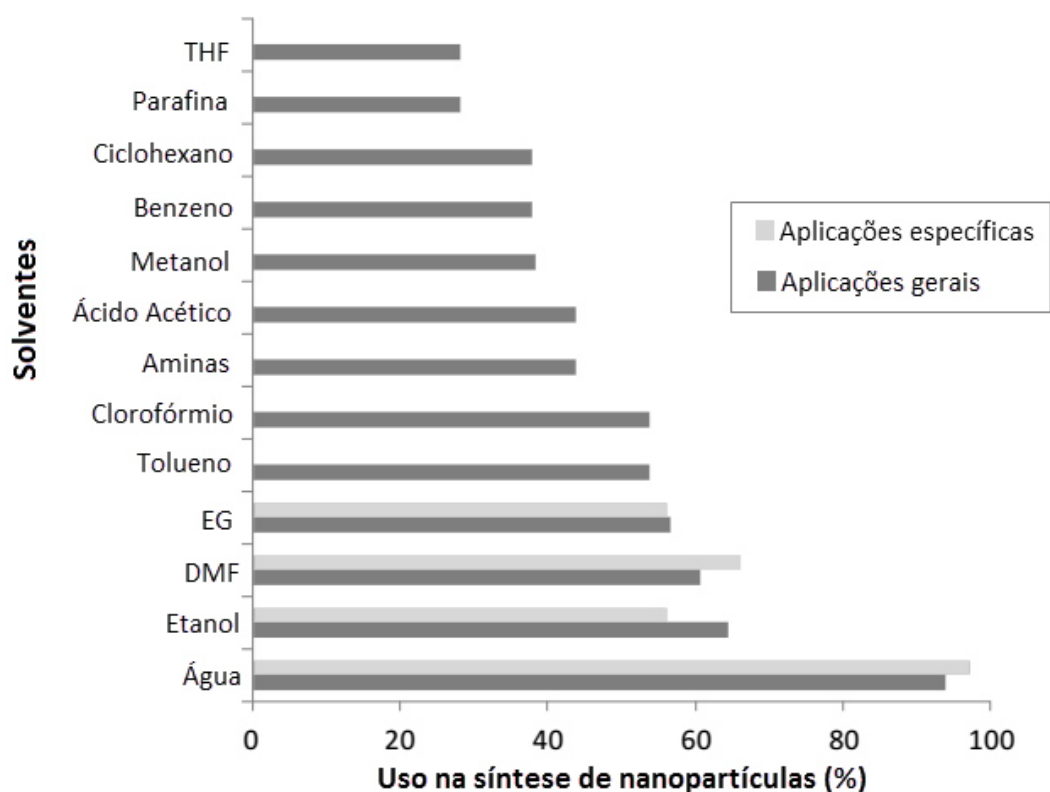
A produção de compostos nanoestruturados pode ser feita por meio de duas abordagens: a primeira é pelo método conhecido como *Top-down* (de cima para baixo), que se baseia na desconstrução de estruturas maiores, utilizando técnicas de fabricação para cortar, moer e moldar materiais até atingir a nanoescala. A segunda é pelo método *Bottom-up* (de baixo para cima), que explora as propriedades químicas de moléculas/átomos individuais para fazer com que estes se organizem e formem uma estrutura em nanoescala. Os principais métodos utilizados nas duas abordagens estão ilustrados na tabela 1.

A maioria das técnicas fisicoquímicas tradicionalmente utilizadas na síntese de NPMs envolvem solventes tóxicos, como ilustrado na figura 4, e a geração de resíduos potencialmente nocivos à saúde e ao meio ambiente, limitando em diversas circunstâncias o amplo uso dessas NPMs no campo farmacêutico e clínico (Salam *et al.*, 2012; Cauerhff e

Castro, 2013). Diante desse quadro, surge grande interesse na busca por rotas alternativas de síntese mais seguras e com menor impacto ao meio ambiente e, dentre elas, a síntese verde é uma abordagem promissora.

**Tabela 1:** Técnicas utilizadas nas abordagens de fabricação de compostos nanoestruturados.

<b>Métodos <i>bottom-up</i></b>	<b>Métodos <i>top-down</i></b>
Redução química	Nanolitografia
Processo Sol-gel	Ablação a laser/térmica
Deposição química em fase vapor	Abrasão ( <i>i.e.</i> moagem de alta energia)
Pirólise por spray ou laser	Pulverização catódica
Condensação atômica ou molecular	Cauterização química



**Figura 4:** Solventes mais comuns utilizados na síntese de nanopartículas. Fonte: modificado de Cauerhff e Castro (2013).

## 1.2 SÍNTESE VERDE

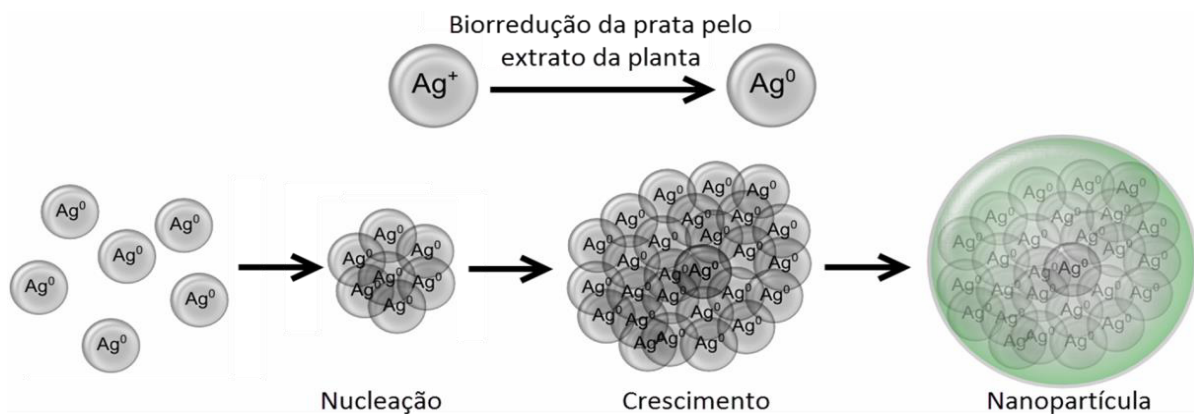
A síntese verde de NPs visa à utilização de organismos biológicos, ou partes deles (por exemplo, órgãos, tecidos, células ou biomoléculas), como substituintes de reagentes químicos tóxicos nas reações de síntese de nanocompostos, apresentando-se como uma alternativa sustentável (Iravani, 2011). Essa rota de síntese tende a utilizar solventes de toxicidade baixa a nula, os quais levam a um impacto ambiental baixo. Além disso, as NPs sintetizadas por essas rotas geralmente apresentam biocompatibilidade e biodegradabilidade. O custo de produção é geralmente baixo e pode-se obter um alto rendimento do produto de interesse.

### 1.2.1 Uso de extratos de plantas

Dentre os insumos utilizados na síntese verde de NPMs, extratos provenientes de tecidos e órgãos de plantas têm sido os mais reportados na literatura (Iravani, 2011; Baker *et al.*, 2013; Ingale, 2013). Plantas podem atuar como agentes químicos redutores de sais metálicos devido aos seus numerosos componentes (Mittal *et al.*, 2013). Dentre estes, destacam-se: aminoácidos, flavonoides, compostos fenólicos, terpenoides, ácido cítrico, grupos funcionais (álcoois, aldeídos, aminas), compostos heterocíclicos, desidrogenases, CO<sub>2</sub> intracelular, proteínas de membrana, NADP redutases, peptídeos, polissacarídeos, saponinas e ácido tânico (Akhtar *et al.*, 2013). Alguns desses compostos também podem atuar como agentes estabilizantes das NPMs, recobrando a superfície das partículas, limitando o seu crescimento e evitando que se agreguem (Ingale, 2013).

O número de publicações nessa área tem crescido e, embora o(s) composto(s) da planta que atua(m) na redução e/ou estabilização das nanopartículas muitas vezes seja(m) conhecido(s), o mecanismo específico da síntese verde mediada por plantas ainda não foi estabelecido (Duran *et al.*, 2011; Narayanan e Sakthivel, 2011; Akhtar *et al.*, 2013).

A figura 5 mostra um esquema geral das etapas envolvidas na formação de NPMs via síntese verde. Um aspecto relevante no que concerne à síntese verde é o fato de que em cada parte da planta há um perfil de fitoquímicos presentes em diferentes concentrações, de acordo com a necessidade de cada tecido e com o estresse ao qual a planta possa estar submetida (como temperatura e umidade). Dessa maneira, a combinação dos constituintes químicos e as condições da parte da planta selecionada vão definir, em última instância, a eficiência do extrato como formador de nanopartículas (Kumar e Yadav, 2009).



**Figura 5:** Esquema representativo do mecanismo de crescimento de nanopartículas de prata por síntese verde utilizando extrato de planta. Primeiro, o extrato atua reduzindo os sais metálicos, formando átomos neutros. Esses átomos colidem e formam um núcleo estável – processo de nucleação – seguido do crescimento, no qual mais átomos colidem e formam partículas maiores. Por fim, a estabilização ocorre pelo esgotamento dos íons metálicos na solução ou pelo recobrimento da partícula por compostos presentes no extrato impedindo a aglomeração. Fonte: a própria autora.

No que concerne à parte da planta utilizada para a realização da síntese verde de NPMs, o extrato proveniente das folhas é a escolha mais comum, mas também há estudos reportando o uso de sementes (Lukman *et al.*, 2011; Vijayaraghavan *et al.*, 2012), raízes (Gnanadesigan *et al.*, 2012), cascas (Sathishkumar *et al.*, 2009; Shameli, Kamyar *et al.*, 2012; Shameli, K. *et al.*, 2012; Velayutham *et al.*, 2013), flores (Mittal *et al.*, 2012; Nethradevi *et al.*, 2012) e frutos (Quelemes *et al.*, 2013).

A eficiência da reação e as características do produto formado podem ser alteradas de acordo com a parte da planta que compõe o extrato. A planta *Ocimum sanctum* (manjeriço) foi utilizada para sintetizar AgNPs e o uso do extrato obtido com as folhas resultou em AgNPs com diâmetro de 25 a 40 nm (Patil *et al.*, 2012) enquanto que, em outra pesquisa, o uso dos extratos do caule e raiz gerou AgNPs de 10 nm e 5 nm, respectivamente (Ahmad *et al.*, 2010). Kumar e colaboradores (2010) compararam a composição dos extratos de *Syzygium cumini* provenientes das folhas e das sementes da planta e observaram que os extratos levaram à formação de AgNPs esféricas com taxas de formação e diâmetros diferentes e esse fato foi atribuído ao conteúdo de polifenóis presentes nos extratos. Esses dados exemplificam as possíveis diferenças nas características do produto final da síntese de acordo com a parte da planta utilizada (Kumar *et al.*, 2010).

O solvente a ser utilizado no preparo do extrato também possui grande relevância, pois determina os tipos de compostos que estarão presentes. Já foram testadas diferentes sínteses de AgNPs com a variação nos solventes utilizados para a preparação dos extratos (hexano, clorofórmio, acetato de etila, butanol e água) e observou-se que a fração aquosa apresentou os resultados mais satisfatórios, prevenindo a extração da maioria dos lipídeos (Kumar *et al.*, 2010).

Vale destacar que as alterações do extrato de acordo com fatores externos, como o estágio de desenvolvimento ou a condição da planta, também podem influenciar na síntese das NPMs. Mudanças foram observadas nas AgNPs de acordo com a condição das folhas utilizadas no preparo do extrato da planta *Clerodendrum inerme*, onde verificou-se que extratos provenientes de folhas frescas apresentaram o maior rendimento na formação de AgNPs avaliada pelos máximos de absorbância, do que aquele obtido por folhas secas ao sol ou secas em forno (Farooqui *et al.*, 2010). Trypathy e colaboradores (2009) também

constatarem que o extrato preparado com folhas secas não levou à formação de AgNPs (Tripathy *et al.*, 2009).

O estágio de desenvolvimento da planta também influencia o perfil fitoquímico. No caso da planta *Sesuvium portulacastrum* L., o uso do extrato das folhas do broto foi mais eficiente na síntese de AgNPs do que o uso da folha adulta (Nabikhan *et al.*, 2010).

Ademais da variação das características de nanopartículas obtidas por diferentes extratos, pode-se variar as condições da síntese, como o tempo de reação, a concentração dos reagentes, a temperatura e o pH, visando a um aumento do rendimento e da velocidade da reação para que ela seja comparável com os padrões de síntese química por rotas convencionais. A alteração dessas condições também pode levar à síntese de NPMs com características morfológicas distintas (Akhtar *et al.*, 2013).

A prata é tipicamente o metal de escolha para a síntese verde de NPMs a partir de extratos de plantas. Entretanto, outros metais nobres foram explorados para a formação de NPMs, entre eles destacam-se o ouro (Huang *et al.*, 2007; Smitha *et al.*, 2009; Narayanan e Sakthivel, 2010; Liny *et al.*, 2012), a platina (Song *et al.*, 2010) e o paládio (Akhtar *et al.*, 2013). As etapas de redução e a de recobrimento podem ser diferenciadas de acordo com o tipo de metal utilizado, havendo a atuação de diferentes compostos do mesmo extrato. Estudos constataram que os agentes de recobrimento das NPs de ouro eram diferentes dos de prata, assim como as taxas de formação das NPMs (Shankar *et al.*, 2004; Philip, 2010; Philip e Unni, 2011).

Para contextualização e formação de uma visão mais abrangente dos elementos pertinentes à síntese verde com extratos de partes de plantas, optou-se pela elaboração de uma tabela com o levantamento bibliográfico, que compreende importantes dados de alguns estudos realizados até o momento. Assim, a tabela 2, a seguir, inclui relatos na literatura sobre

a síntese de AgNPs utilizando extratos provenientes das folhas de diversas plantas, bem como um resumo dos padrões utilizados e obtidos, como o tipo de extrato utilizado, a morfologia, a atividade biológica e o possível composto indicado pelos autores como o agente responsável pela redução do sal metálico. Os autores mencionados na Tabela 2 tiveram os seus trabalhos analisados e os seus resultados mais relevantes foram inseridos ao longo desta pesquisa.

**Tabela 2:** Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extratos de plantas provenientes das folhas.

Planta	Tipo de extrato	Diâmetro das NPs (nm)	Formato das NPs	Atividade biológica	Principais agentes redutores	Referência
<i>Allamanda cathartica</i>	aquoso	19 a 40	esférico	antimicrobiana	-	(Rao <i>et al.</i> , 2013)
<i>Aloe vera</i>	aquoso	15	esférico	-	-	(Chandran <i>et al.</i> , 2006)
<i>Acalypha indica</i>	aquoso	20 a 30	esférico	antibacteriana	quercetina e polissacarídeos	(Krishnaraj <i>et al.</i> , 2010)
<i>Acalypha indica</i>	aquoso	10 a 50	esférico	antifúngica	quercetina	(Krishnaraj <i>et al.</i> , 2012)
<i>Anacardium occidentale</i>	aquoso	3 a 15	esférico	-	poliálcoois	(Sheny <i>et al.</i> , 2011)
<i>Artemisia nilagirica</i>	aquoso	70 a 90	cúbico	antimicrobiana	-	(Vijayakumar <i>et al.</i> , 2013)
<i>Azadirachta indica</i>	aquoso	5 a 35	esférico	-	açúcares redutores e terpenóides	(Shankar <i>et al.</i> , 2004)
<i>Azadirachta indica</i>	aquoso	20	esférico	-	terpenóides	(Tripathy <i>et al.</i> , 2009)
<i>Chenopodium album</i>	-	12	esférico	-	ácido oxálico	(Dwivedi e Gopal, 2011)
<i>Cinnamomum camphora</i>	aquoso	55 a 80	esférico	-	poliálcoois	(Huang <i>et al.</i> , 2007)
<i>Clerodendrum inerme</i>	aquoso	113 a 448	esférico e elíptico	-	-	(Farooqui <i>et al.</i> , 2010)
<i>Coriandrum sativum</i>	aquoso	8 a 75	esférico e triangular	-	aminoácidos	(Sathyavathi <i>et al.</i> , 2010)
<i>Eclipta alba</i>	-	2 a 6	esférico	-	-	(Jha <i>et al.</i> , 2009)
<i>Euphorbia hirta</i>	com éter e triclorometano	31	esférico	antibacteriana	-	(Priya <i>et al.</i> , 2011)
<i>Euphorbia hirta</i>	-	40 a 50	esférico	antibacteriana	-	(Elumalai <i>et al.</i> , 2010)



**Tabela 2 (continuação):** Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extratos de plantas proveniente de folhas.

<i>Eucalyptus hybrida</i>	metanólico	5 a 150	cúbico	-	flavonoides e terpenóides	(Dubey <i>et al.</i> , 2009)
<i>Garcinia mangostana</i>	aquoso	35	esférico	antibacteriana	-	(Veerasamy <i>et al.</i> , 2011)
<i>Gliricidia sepium</i>	aquoso	10 a 50	esférico	antibacteriana	-	(Raut <i>et al.</i> , 2009)
<i>Hibiscus rosa sinensis</i>	aquoso	13	esférico	-	ácido málico	(Philip, 2010)
<i>Lippia citriodora</i>	aquoso	15 a 30	esférico	-	fenilpropanóides	(Cruz <i>et al.</i> , 2010)
<i>Mangifera indica</i>	aquoso	20	triangular, hexagonal e esférico	-	compostos fenólicos, flavonoides	(Philip, 2011)
<i>Mukia scabrella</i>	aquoso	18 a 21	esférico	antibacteriana	-	(Prabakar <i>et al.</i> , 2013)
<i>Nelumbo nucifera</i>	aquoso	25 a 80	esférico e triangular	larvicida	-	(Santhoshkumar <i>et al.</i> , 2011)
<i>Nerium indicum</i>	com éter e triclorometano	29	esférico	antibacteriana	-	(Priya <i>et al.</i> , 2011)
<i>Ocimum canum</i>	aquoso	95	esférico e elíptico	acaricida	polifenóis	(Jayaseelan e Rahuman, 2012)
<i>Ocimum sanctum</i>	aquoso	5 a 10	esférico	-	compostos fenólicos	(Ahmad <i>et al.</i> , 2010)
<i>Ocimum sanctum</i>	aquoso	13	esférico	-	-	(Philip e Unni, 2011)
<i>Ocimum sanctum</i>	aquoso	3 a 20	esférico	-	terpenóides	(Mallikarjuna <i>et al.</i> , 2011)
<i>Ocimum tenuiflorum</i>	aquoso	25 a 40	esférico	antibacteriana	-	(Patil <i>et al.</i> , 2012)
<i>Prosopis juliflora</i>	aquoso	35 a 60	triangular, pentagonal e hexagonal	antibacteriana	terpenóides e flavonoides	(Raja <i>et al.</i> , 2012)
<i>Pelargonium graveolens</i>	aquoso	16 a 40	esférico	-	terpenóides	(Shankar <i>et al.</i> , 2003)
<i>Ricinus communis</i>	aquoso	20 a 30	esférico	-	flavonoides e terpenóides	(Mani <i>et al.</i> , 2013)
<i>Rosa rugosa</i>	aquoso	12	esférico	-	carboxilatos	(Dubey, Lahtinen e Sillanpää, 2010)
<i>Sesuvium portulacastrum</i>	aquoso	5 a 20	esférico	antimicrobiana	terpenóides, proteínas	(Nabikhan <i>et al.</i> , 2010)
<i>Solanum torvum</i>	-	14	esférico	antimicrobiana	carboxilatos	(Govindaraju <i>et al.</i> , 2010)

**Tabela 2 (continuação):** Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extratos de plantas proveniente de folhas.

<i>Sorbus aucuparia</i>	aquoso	16	esférico, triangular e hexagonal	-	ácido sórbico	(Dubey, Lahtinen, Sarkka, <i>et al.</i> , 2010)
<i>Syzygium cumini</i>	aquoso	29	esférico	-	polifenóis	(Kumar <i>et al.</i> , 2010)
<i>Tephrosia purpurea</i>	aquoso	20	esférico	antimicrobiana	flavonoides	(Ajitha <i>et al.</i> , 2013)

### 1.2.2 Critérios para a seleção da planta

A escolha de uma planta para a realização da síntese verde de NPMs tem sido geralmente realizada de maneira empírica ou aleatória. Um trabalho de revisão desenvolvido recentemente por (Das e Brar, 2013) enfatizou diferentes abordagens para a definição da planta e recomenda que alguns critérios de seleção sejam seguidos. Desse modo, é importante considerar alguns fatores para a escolha de uma planta como candidata à síntese verde. Primeiramente, é relevante verificar se o estudo representa o primeiro relato sobre a planta na literatura, o que é vantajoso em termos de publicação e é um fator que leva a contribuição para a construção de um futuro banco de dados sobre a utilização das plantas na síntese verde. Muitas vezes plantas do mesmo gênero podem possuir o perfil fitoquímico semelhante, o que também deve ser levado em consideração.

Complementarmente, é essencial avaliar a eficiência do processo de síntese e a capacidade do extrato da planta de agir como agente redutor do sal metálico e de atuar conjuntamente no recobrimento da partícula é uma possibilidade interessante. Outro fator é a formação NPMs a partir de sais metálicos de composições diferentes e a possibilidade do uso de extratos provenientes de diferentes partes da mesma planta. Adicionalmente, o valor medicinal da planta e uma disponibilidade geográfica cosmopolita também tornam o seu uso mais atrativo.

### 1.2.3 Planta de interesse: *Brosimum gaudichaudii*

*Brosimum gaudichaudii* Trécul (Fig. 6) é uma planta de porte arbustivo pertencente à família Moraceae, popularmente conhecida como mama-cadela, bureré ou algodão-do-campo, e consiste em uma das espécies mais exploradas do bioma Cerrado devido às suas propriedades medicinais no tratamento de doenças de pele (Jacomassi, 2006; Lima *et al.*, 2013). Adicionalmente, seus frutos possuem grande importância alimentar para as populações locais e aos indígenas (Jacomassi, 2006). Essa espécie também apresenta uma produção abundante de látex, especialmente nos estágios iniciais do seu ciclo de vida, o qual já foi explorado para a formação de biofilmes nanoestruturados (Barbosa *et al.*, 2014).

De acordo com um levantamento das espécies lenhosas do Cerrado – segundo maior bioma brasileiro – realizado por (Ratter *et al.*, 2003), *B. gaudichaudii* possui uma ampla distribuição regional e está entre as 30 plantas com maior distribuição nesse bioma. Essa espécie está presente com maior frequência nas regiões do Cerrado no Centro-Oeste (67%) e no Sudeste (68%) (Bridgewater *et al.*, 2004).

O extrato produzido por decocção ou infusão das raízes, folhas e/ou cascas da planta é utilizado topicamente para o tratamento do vitiligo e de outros problemas de pele (Agra *et al.*, 2008). A casca e raiz de *B. gaudichaudii* possuem alto teor de furanocumarinas, em especial o psoraleno e o bergapteno – substâncias fotossensibilizantes – responsáveis pela sua ação farmacológica e motivo da exploração da planta para a produção de fármacos em escala industrial. O extrato hidroalcoólico com 80% de etanol é ideal para a extração desses compostos (Castro *et al.*, 2011).

Adicionalmente, há relatos de que o decocto ou infuso dos ramos com folhas possui ação depurativa e contribui para a melhoria da circulação sanguínea (Rodrigues e Carvalho,

2001). O infuso de toda a planta também pode ser utilizado no tratamento de gripes, resfriados e bronquites (Rodrigues e Carvalho, 2001).



**Figura 6:** Foto da planta *Brosimum gaudichaudii* (centro) utilizada para a realização dos experimentos desse trabalho. Fonte: a própria autora.

No que concerne à toxicidade, pesquisas também indicam que as furanocumarinas, presentes em abundância no extrato da raiz, apresentam atividade citotóxica, mutagênica (Lourenço, 2001; Pozetti, 2005; Varanda, 2006) e antiproliferativa (Quevedo, 2011).

Um estudo descritivo de *B. gaudichaudii*, conduzido por Jacomassi e colaboradores (2007), descreve a morfologia e histoquímica dos órgãos dessa planta. As informações relativas à região internervural das folhas indicam a presença em alta quantidade de

compostos fenólicos e, em menor intensidade, de polissacarídeos, lipídeos, proteínas e amido (Jacomassi *et al.*, 2007). Outro estudo corrobora esses dados e relata a presença abundante de flavonoides glicosilados no extrato das folhas de *B. gaudichaudii* (Lourenço, 2001). Devido à ausência de furanocumarinas nas folhas, a toxicidade destas é favorável.

### 1.3 JUSTIFICATIVA

A hipótese do presente trabalho foi verificar a capacidade do extrato aquoso das folhas de *B. gaudichaudii* em sintetizar nanopartículas de prata por uma rota sustentável e se tais partículas poderiam ser eventualmente aplicadas em nanossensores.

Optou-se por utilizar o extrato a partir das folhas de *B. gaudichaudii* como agente redutor e estabilizante para a síntese verde de AgNPs devido aos estudos fitoquímicos, os quais indicam a presença de compostos de interesse para a redução metálica, como flavonóides e carboidratos, nas folhas de *B. gaudichaudii*. Outras vantagens do uso dessa planta são a sua abundância, facilidade de obtenção e a sua importância farmacológica. Foi definida a preparação do extrato aquoso a partir das folhas, de modo a permitir a utilização racional e sustentável dos recursos naturais.

Levando em consideração os fatores que podem influenciar na síntese das AgNPs citados anteriormente, nesse trabalho o aperfeiçoamento de alguns parâmetros e condições da síntese foi realizado, visando à obtenção de nanopartículas com características desejáveis de monodispersividade e estabilidade em suspensão coloidal, além da caracterização morfológica e fisicoquímica das AgNPs obtidas.

Embora existam muitos trabalhos na literatura sobre síntese verde utilizando extratos de plantas, poucos abordaram a elucidação dos mecanismos de síntese com relação à cinética de formação das NPs obtidas. Sendo assim, é relevante que o percurso da reação de redução

do sal metálico e a possível estabilização das NPs sejam conhecidos, especialmente em função de numerosos compostos presentes no extrato da planta poderem atuar nessa etapa.

O aumento na produção de NPs para fins comerciais leva a um aumento no potencial de entrada indesejável dessas estruturas no meio ambiente em algum momento durante a sua produção, distribuição, utilização ou descarte (Elzey e Grassian, 2009). No decorrer desse ciclo é provável que as NPs eventualmente entrem em contato com sistemas hídricos, sejam esses rios, lagos ou mares. Quando as NPs são lançadas no meio ambiente, a sua composição, estrutura e propriedades de superfície podem ser alteradas, levando a mudanças nas suas propriedades físicoquímicas. A mudança do meio no qual as NPs estão dispersas pode afetar a reatividade, o transporte e a toxicidade das NPs (Zook *et al.*, 2011).

Tendo isso em vista, avaliou-se também no presente estudo o perfil de dissolução em meio salino das AgNPs sintetizadas por síntese verde utilizando o extrato aquoso das folhas de *B. gaudichaudii*. A atividade biológica dessas AgNPs e do extrato aquoso das folhas de *B. gaudichaudii* foi avaliada por meio de ensaios de viabilidade celular realizados em células eucarióticas de mamíferos em linhagens tumorais e não-tumorais, bem como em bactérias e leveduras.

Todas essas etapas foram realizadas para que as AgNPs obtidas por essa rota consistissem em um material de interesse no desenvolvimento de novos produtos nanotecnológicos com bases sustentáveis. Além das possíveis aplicações relacionadas à biomedicina, essas AgNPs também podem ser aplicadas na construção de biossensores. Para isso foi avaliada, de modo preliminar, a aplicação das AgNPs obtidas por síntese verde utilizando o extrato aquoso proveniente das folhas de *B. gaudichaudii* na construção de um nanobiossensor, almejando aproveitar dos efeitos condutores presentes em nanoescala, potencializar o sinal eletroquímico e melhorar a sensibilidade do sensor.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver e caracterizar metodologias de síntese verde de nanopartículas de prata a partir de extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, e utilizar as nanopartículas na construção de um nanobiossensor eletroquímico.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e aperfeiçoar métodos de síntese verde de nanopartículas de prata utilizando o extrato aquoso das folhas de *Brosimum gaudichaudii* coletadas em duas épocas do ano;
- Caracterizar as nanopartículas formadas quanto ao tamanho, forma, disponibilidade de grupamentos químicos e carga de superfície;
- Caracterizar a cinética de formação das nanopartículas e o seu possível perfil de dissolução em meio salino;
- Avaliar a atividade biológica *in vitro* das nanopartículas sintetizadas por meio de ensaios de viabilidade realizados com células eucarióticas de mamíferos, bactérias e leveduras;
- Imobilizar as nanopartículas na superfície de um nanobiossensor para possível amplificação do sinal eletroquímico e testar *in vitro* a eficiência da detecção eletroquímica com o nanobiossensor funcionalizado.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 MATERIAIS**

Os equipamentos, materiais e reagentes utilizados durante a execução desse projeto encontram-se listados a seguir, em ordem alfabética. A maneira pela qual foram preparadas as soluções será descrito posteriormente.

##### **3.1.1 Equipamentos**

Agitador magnético com aquecimento (modelo Q261, Quimis, Brasil); Agitador de tubos (modelo Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., Estados Unidos); Balança analítica (Denver Instruments, Estados Unidos); Capela de fluxo laminar unidirecional (modelo CFLV 12, Veeco); Centrífuga de bancada para microtubos (modelo MiniSpin®, Eppendorf, Alemanha); Condutivímetro de Bancada (modelo Q405M, Quimis, Brasil); Espectrofotômetro UV-Vis (modelo Q898U, Quimis, Brasil); Espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier – FTIR (modelo IR Prestige 21, Shimadzu, Japão); Estufa (Thermo Scientific, Estados Unidos); Forno mufla microprocessado (modelo Q318M, Quimis, Brasil); Freezer (modelo CVU26EBBNA, Consul, Brasil); Leitora de microplacas (modelo ELx808 IU, Biotek, Estados Unidos); Leitora de microplacas (modelo SpectraMax M2, Molecular Devices, Estados Unidos); Microscópio de força atômica (modelo SPM 9600, Shimadzu, Japão); Microscópio eletrônico de transmissão (modelo JEM-1011, Jeol, Japão); Mini Processador de alimentos (modelo HC31, Black & Decker, Estados Unidos); pHmetro Microprocessado de Bancada (modelo Q400MT, Quimis, Brasil); ZetaSizer Nano ZS (Malvern, Reino Unido).



### 3.1.2 Materiais

Câmara de Neubauer (C. A. Hausser & Son, Estados Unidos); Copos de Becker de vidro com capacidade para 5, 50 e 200 mL; Frascos do tipo Erlenmeyer de 200 mL; Frascos (garrafas) para cultura celular; Filme de laboratório (Parafilm M<sup>®</sup>, American National Can, Estados Unidos); Filtros Amicon Ultra 100 kDa, 30 kDa, 10 kDa e 3 kDa (Millipore, Estados Unidos); Funil de vidro; Microplacas de 96 poços de fundo chato (tipo TPP, Alemanha); Micropipetas monocanais de volume variável de 0,1 a 2 µL; 0,5 a 10 µL; 20 a 200 µL e 100 a 1000 µL (LabMate); Micropipeta multicanal 8 canais volume 20 a 200 µL (modelo DV8-200, LabMate); Microtubos de polipropileno de 0,6, 1,5 e 2,0 mL (Axygen, Estados Unidos); Papel alumínio; Papel filtro de retenção média (11 µm, Whatman<sup>®</sup>, Estados Unidos); Papel filme; Placas de Petri; Ponteiras brancas (P10), amarelas (P20 e P200) e azuis (P1000); Tubos tipo Falcon de fundo cônico de 15 e 50 mL (tipo TPP, Alemanha).

### 3.1.3 Reagentes

Ácido 1-pirenobutanóico, éster succinimidico (PBSE, Life Technologies); Ágar (Select Agar<sup>®</sup>, Invitrogen); Água ultrapura (MilliPore); Ácido acético (Merck); Acetato de sódio trihidratado (Sigma Aldrich); Antibióticos Penicilina e Estreptomicina (Gibco); Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Invitrogen); Brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB, Amresco); Cloreto de sódio (Merck); Dodecil sulfato de sódio (SDS, CalBioChem); Dimetilformamida (DMF, Scharlau); Dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich); Etanolamina (Sigma Aldrich); Fosfato de sódio dibásico (Vetec); Fosfato de sódio monobásico (Vetec); Lennox L Broth Base<sup>®</sup> (Invitrogen); Nitrato de prata (Sigma Aldrich); Tripsina (Sigma Aldrich); Tampão fosfato (PBS, Amresco); Tween<sup>®</sup> 20, 40 e 80 (Sigma Aldrich).

### 3.1.4 Soluções

Os procedimentos de pesagem de reagentes foram realizados em um ambiente climatizado, tarando-se a balança antes de cada medição e adotando-se o uso de luvas e espátulas. Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando água ultrapura. Com a finalidade de evitar possíveis efeitos relacionados ao armazenamento, as soluções mencionadas a seguir foram preparadas nas datas de uso nos respectivos experimentos.

#### 3.1.4.1 Solução estoque de nitrato de prata

A solução estoque (SE) de  $\text{AgNO}_3$  na concentração de 30 mM foi obtida pela dissolução de 4,1 mg de  $\text{AgNO}_3$  em 800  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, em um microtubo de polipropileno de 1,5 mL, com o auxílio de um agitador de tubos. O tubo foi recoberto com papel alumínio para proteger a solução da exposição à luz ambiente.

#### 3.1.4.2 Tampão acetato

As soluções tampão acetato (10 mL) na concentração de 0,1 M foram preparadas em tubos tipo Falcon de 15 mL nos pHs 4, 5 e 6. Primeiro, solubilizou-se o acetato de sódio em água ultrapura, utilizando um agitador de tubos e, em seguida, adicionou-se ácido acético com homogeneização manual. Para a solução de pH de 4, 5 e 6, utilizou-se 40  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$  e 2 mL de ácido acético e 30 mg, 140 mg, 210 mg de acetato de sódio, respectivamente. O pH das soluções foi confirmado com o auxílio de um pHmetro.

#### 3.1.4.3 Tampão fosfato

Inicialmente foram preparadas duas SEs: a primeira, de fosfato dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 0,1 M, solubilizando-se 142 mg em 10 mL de água ultrapura em um tubo tipo Falcon de 15

mL sob agitação. A segunda, de fosfato monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,1 M, solubilizando-se 136 mg em 10 mL de água ultrapura em um outro tubo tipo Falcon de 15 mL sob agitação. A solução tampão fosfato a pH 7 foi preparada misturando-se 2 mL da SE de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 1,75 mL da SE de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Já para solução tampão de pH 8, utilizou-se 1 mL da SE de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 1,5 mL da SE de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . O pH final das soluções foi confirmado com o auxílio de um pHmetro.

#### *3.1.4.4 Solução estoque de dodecil sulfato de sódio (SDS)*

A SE de SDS na concentração de 30 mM foi preparada em um microtubo de polipropileno de 1,5 mL pela dissolução de 4,33 mg de SDS em 500  $\mu\text{L}$  de água ultrapura sob agitação.

#### *3.1.4.5 Solução estoque de brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB)*

A SE de CTAB na concentração de 30 mM foi preparada em um microtubo de polipropileno de 1,5 mL pela dissolução de 5,46 mg de CTAB em 500  $\mu\text{L}$  de água ultrapura sob agitação.

#### *3.1.4.6 Soluções estoque de Tween® 20, 40 e 80*

As SEs de Tween® 20, 40 e 80, na concentração de 30 mM, foram preparadas em microtubos de polipropileno de 1,5 mL pela dissolução de 11 mg, 11,6 mg e 11,8 mg de Tween® 20, 40 e 80, respectivamente, em 300  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, sob agitação.

#### 3.1.4.7 Preparação do meio nutritivo utilizado na cultura de células eucarióticas

Para a preparação do meio de cultura de células eucarióticas utilizado no ensaio de viabilidade celular, foi obtido um meio sintético complexo composto por uma mistura de sais, aminoácidos e outros componentes essenciais para as células conhecido como meio Eagle modificado por Dubecco (DMEM). Para a preparação da SE de DMEM, aproximadamente 9,1 g de DMEM em pó foi solubilizada sob agitação em 1 L de água ultrapura. Em seguida, foram adicionados 3,7 g de bicarbonato de sódio e ajustou-se o pH da solução para 7,4 utilizando uma solução de HCl 0,1 M ou de NaOH 0,1 M, quando necessário. A SE de DMEM foi então filtrada utilizando-se uma membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  sob pressão positiva, transferida para um frasco de vidro e armazenada a 4°C.

O meio nutritivo completo foi preparado pela adição de 10% (v/v) de soro bovino fetal (SFB), além de 0,1% (v/v) de uma mistura de penicilina e estreptomicina adicionadas diretamente na SE de DMEM. Esse meio foi armazenado em um tubo tipo Falcon de 50 mL. As SEs de DMEM, de SFB, de antibióticos e de tripsina utilizadas no presente trabalho foram preparadas e fornecidas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília (UnB).

#### 3.1.4.8 Preparação do meio nutritivo LB utilizado na cultura de bactérias

Os meios de cultura LB líquido e LB sólido foram utilizados para cultura de bactérias avaliadas por meio de ensaio de viabilidade celular. A SE do meio LB líquido foi preparada pela dissolução de 20 g de *LB Broth Base* (Lennox L Broth Base) em 1 litro de água (pH 7), seguidos de autoclavagem a 121°C durante 15 minutos. A solução estoque do meio LB sólido foi preparada da mesma maneira, mas com adição de ágar na concentração de 15 mg/mL. As

SEs do meio LB líquido e sólido foram gentilmente fornecidas pelo grupo do Laboratório de Metabolômica, da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia.

#### *3.1.4.9 Solução de Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT)*

A SE de MTT na concentração de 5 mg/mL foi preparada em um tubo tipo Falcon de 15 mL pela solubilização de 25 mg de MTT em 5,0 mL de água ultrapura, com o auxílio de um agitador de tubos. A solução obtida foi filtrada por meio de uma membrana de 0,22 µm sob pressão positiva e transferida para um tubo tipo Falcon de 15 mL, revestido com alumínio para proteger o conteúdo da luz.

#### *3.1.4.10 Solução de Ácido 1-pirenobutanóico éster succinimidico (PBSE)*

A solução de PBSE na concentração de 5 mM foi preparada em um frasco de vidro de 2 mL pela dissolução de 0,96 mg de PBSE em 500 µL de dimetilformamida (DMF), sob agitação. O frasco foi recoberto com papel alumínio para proteger o conteúdo da luz ambiente.

#### *3.1.4.11 Solução de Etanolamina*

A solução de etanolamina na concentração de 0,1 M foi preparada em um microtubo de polipropileno de 1,5 mL pela adição de 6,3 µL de etanolamina em 993,7 µL de água ultrapura sob agitação.

#### *3.1.4.12 Solução estoque de Cloreto de Sódio*

A SE de NaCl na concentração de 1 mol/L foi preparada em um tubo tipo Falcon de 50 mL pela dissolução de 1,753 g de NaCl em 30 mL de água ultrapura, sob agitação. Essa

SE foi então utilizada para o preparo de 8 mL das soluções de NaCl nas concentrações de 154, 235, 316, 397, 478 e 559 mM, pela adição de 1,39; 2,12; 2,84; 3,57; 4,30 e 5,03 mL da SE, respectivamente, com água ultrapura para completar 8 mL. Cada solução foi preparada em tubo tipo Falcon de 15 mL.

### 3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO VEGETAL

As partes aéreas (folhas) de *Brosimum gaudichaudii* foram coletadas no estado de Goiás, município de Colinas do Sul, em uma propriedade particular (Fazenda Coqueiro, coordenadas -14,07 e -48,15), nos períodos de verão/chuvas (janeiro) e inverno/seca (julho) de 2013. As folhas foram lavadas com água destilada em abundância, seguida por três ciclos de lavagem sob agitação com etanol e enxague com água ultrapura. Após escorrerem a temperatura ambiente, as folhas foram trituradas em pequenos pedaços (aproximadamente de 3 × 3 mm), com o auxílio de um mini processador de alimentos. O material foi pesado e frações do triturado (10 g) foram separadas e armazenadas em tubos tipo Falcon em um freezer a -20°C.

### 3.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS

Uma fração de 10 g do material triturado foi fervida por 2 minutos em 50 mL água ultrapura utilizando um agitador magnético com aquecimento. Após um minuto em repouso, o material foi filtrado com papel filtro rendendo aproximadamente 30 mL de extrato. O extrato aquoso filtrado resultante consistiu em um líquido amarelo claro e transparente, utilizado nas rotas de síntese verde de nanopartículas de prata. Para cada experimento, preparou-se um novo extrato imediatamente antes do uso.

### 3.4 SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Para facilitar a compreensão e evitar a repetição dos termos, criou-se uma denominação para as amostras produzidas, representadas na tabela 3. Em seguida, serão detalhados os procedimentos adotados para a síntese de AgNPs.

**Tabela 3:** Siglas de identificação das nanopartículas e extratos produzidos no presente trabalho.

<b>Sigla</b>	<b>Referência</b>
<b>EV</b>	Extrato Verão - Extrato preparado com folhas de <i>Brosimum gaudichaudii</i> obtidas no verão/período das chuvas (Janeiro, 2013).
<b>EI</b>	Extrato Inverno - Extrato preparado com folhas de <i>Brosimum gaudichaudii</i> obtidas no inverno/período da seca (Julho, 2013).
<b>NPV</b>	Nanopartícula Verão - Nanopartículas de prata sintetizadas com o extrato preparado com folhas de <i>Brosimum gaudichaudii</i> obtidas no verão/período das chuvas (Janeiro, 2013).
<b>NPI</b>	Nanopartícula Inverno - Nanopartículas de prata sintetizadas com o extrato preparado com folhas de <i>Brosimum gaudichaudii</i> obtidas no inverno/período da seca (Julho, 2013).

### 3.5 APERFEIÇOAMENTOS DOS PARÂMETROS DE SÍNTESE

Nitrato de prata foi utilizado como o sal metálico precursor em solução aquosa com uma concentração final de 1 mM para a realização das rotas de síntese das AgNPs. Essa concentração foi escolhida por limitar a quantidade de precursores disponíveis no meio reacional, visando à obtenção de um processo de nucleação homogêneo. A formação de AgNPs foi avaliada em termos da mudança de absorbância na faixa de 400 a 500 nm.

Os efeitos da variação na concentração do EV; no pH do meio reacional; no uso de agentes surfactantes; no uso do EV comparativamente ao EI; e na massa molecular dos componentes presentes no EV foram verificados. Esses procedimentos serão descritos com mais detalhes a seguir. As NPs que apresentaram formação pela avaliação das curvas de absorção foram caracterizadas pelas demais metodologias até que fosse realizado um aperfeiçoamento dos padrões de síntese com base nas características físicoquímicas obtidas.

### 3.5.1 Concentração dos reagentes

A síntese de NPVs foi realizada variando-se as concentrações de EV em 10, 20 ou 50% v/v. Em microplacas de 96 poços de fundo chato (300  $\mu$ L/poço) aplicou-se, em cada poço, o respectivo volume de EV, a quantidade de água ultrapura para completar 290  $\mu$ L, e 10  $\mu$ L da SE de AgNO<sub>3</sub>. Cada condição foi testada em triplicata, com os respectivos controles negativos, e as leituras de absorbância ocorreram em intervalos de 15 minutos, a 25°C por 48 horas. As curvas de formação representativas das medidas de absorbância foram plotadas a partir da média das triplicatas.

### 3.5.2 pH da reação

A síntese de NPVs em diferentes pHs foi preparada em microplacas de 96 poços utilizando, em cada poço, a mistura reacional consistindo de 30  $\mu$ L de EV (concentração de 10% v/v), 10  $\mu$ L da SE de AgNO<sub>3</sub> e 260  $\mu$ L de soluções tampão em diferentes pHs. As SEs de tampão acetato 0,1 M para os pHs 4, 5 e 6 e, para os pHs 7 e 8, as SEs de tampão fosfato 0,1 M foram utilizadas. Cada condição foi testada em triplicata, com os respectivos controles negativos, e as leituras de absorbância executadas em intervalos de 15 minutos, a 25°C por 24 horas. As curvas de formação representativas das medidas de absorbância foram plotadas a partir da média das triplicatas.

### 3.5.3 Presença/ausência de surfactantes

Foram testados os efeitos de três tipos de surfactantes na síntese de NPVs, de acordo com as suas propriedades de surfactante aniônico (SDS), catiônico (CTAB) ou neutro (Tween<sup>®</sup> 20, 40 e 80). A síntese de NPVs foi realizada em microplacas de 96 poços

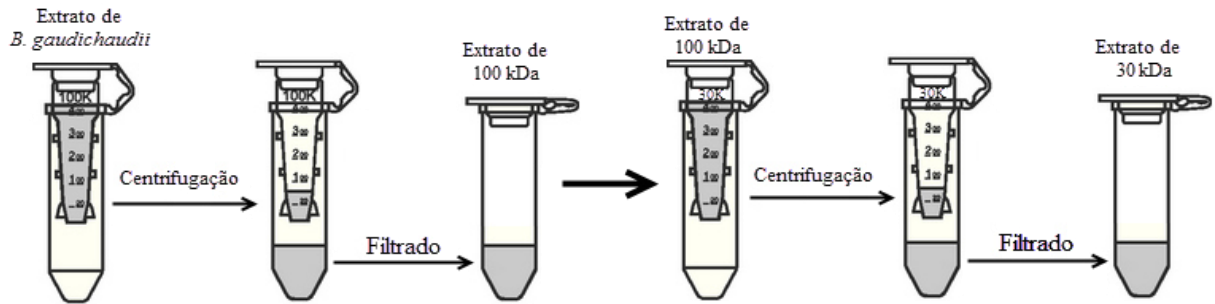


aplicando-se, em cada poço, 30  $\mu\text{L}$  de EV (concentração de 10% v/v), 10  $\mu\text{L}$  da SE de  $\text{AgNO}_3$ , 250  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e 10  $\mu\text{L}$  de uma solução do surfactante. Cada surfactante foi testado nas concentrações finais de 0,1, 0,5 ou 1 mM, que foram preparadas via diluição da SE de cada surfactante. Adicionalmente, verificou-se o efeito da adição conjunta de Tween<sup>®</sup> e de SDS, misturando-se as soluções na proporção de 1:1 v/v. Cada condição foi testada em duplicata, com os respectivos controles negativos, e as leituras de absorbância ocorreram em intervalos de 15 minutos, a 25°C por 48 horas. As curvas de formação representativas das medidas de absorbância foram plotadas a partir da média das duplicatas.

#### **3.5.4 Fracionamento molecular dos compostos presentes no extrato**

O EV a ser utilizado na síntese de NPVs foi separado em diferentes frações via filtração por exclusão molecular, realizada utilizando ultrafiltros Amicon (Millipore) com capacidade de 500  $\mu\text{L}$  e com faixas de exclusão por massa molecular de 100 kDa, 30 kDa, 10 kDa e 3 kDa. As filtrações foram feitas em série (*in tandem*), de modo que o filtrado de cada etapa foi utilizado na filtração seguinte com menor faixa de exclusão, como ilustra a figura 7.

Para a síntese, testou-se separadamente os filtrados de EV que, após centrifugação (604 g por 10 minutos), passaram pelos filtros de 100, 30, 10 e 3 kDa, denominados EV 100 kDa, EV 30 kDa, EV 10 kDa e EV 3 kDa, respectivamente. Adicionalmente, avaliou-se a presença de algum possível sinergismo entre os compostos de diferentes tamanhos extrato pela realização da síntese com as misturas de EV 100+10 kDa, EV 100+3 kDa e EV 30+3 kDa. Cada condição descrita acima foi testada em microplaca de 96 poços e o experimento foi conduzido em triplicata com os respectivos controles. As leituras de absorbância ocorreram em intervalos de 15 minutos, a 25°C por 48 horas, e as curvas de formação representativas das medidas de absorbância foram plotadas a partir da média das triplicatas.



**Figura 7:** Esquema representativo das etapas de filtração do extrato verão (EV). Primeiramente, o EV passou pelo filtro de 100 kDa e o filtrado resultante consistiu na amostra utilizada nos experimentos como o EV 100 kDa. Esse filtrado passou então pelo filtro de 30 kDa e a parte filtrada (com massa molecular menor que 30 kDa) foi utilizada como o EV 30 kDa e assim sucessivamente para os filtrados de 10 e 3 kDa. Fonte: a própria autora.

### 3.5.5 Uso de extratos de folhas coletadas em duas épocas do ano

A síntese de AgNPs utilizando os extratos de folhas coletadas em duas épocas do ano (EV e EI) foi realizada em frascos do tipo Erlenmeyer, à temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). A mistura reacional foi preparada com 5 mL de extrato aquoso (EV ou EI) e 45 mL de uma solução de AgNO<sub>3</sub> (concentração final de 1 mM). Essa solução foi preparada pela dissolução de 8,5 mg de AgNO<sub>3</sub> em 45 mL de água ultrapura. Com essas condições, efetuou-se o escalonamento da síntese em mais de 150 vezes em relação aos experimentos previamente descritos (de 0,3 mL para 50 mL).

Adicionalmente, durante o curso da reação escalonada, alíquotas de 1,5 mL foram retiradas e verificadas quanto aos valores de pH, condutividade elétrica (CE) e absorvância a 450 nm, a cada hora pelas primeiras 12 horas e também no marco de 24 horas.

## 3.6 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FÍSICOQUÍMICA

### 3.6.1 Espalhamento de luz dinâmico e potencial Zeta

A metodologia de espalhamento de luz dinâmico (DLS) permite determinar o diâmetro hidrodinâmico (DH) das partículas em suspensão pelo espalhamento de luz decorrido do

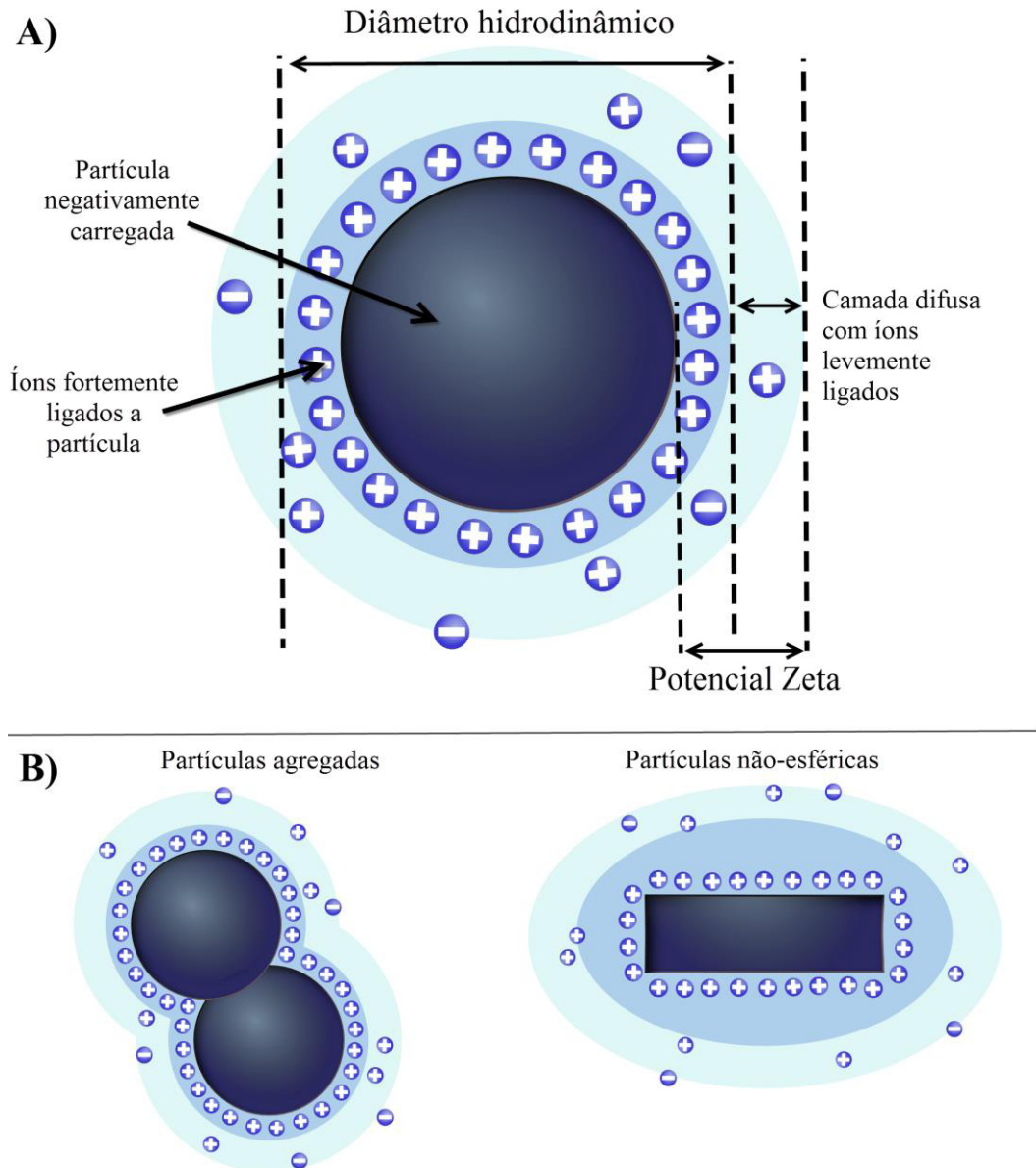
movimento Browniano das partículas. Quando uma partícula é dispersa em um meio líquido, forma-se uma camada de solvatação em sua superfície. O DH inclui essa camada de solvatação (Fig. 8A), o que faz com que esse dado possa ser superestimado quando comparado, por exemplo, com técnicas de microscopia, que medem o diâmetro das partículas secas. Percebe-se também que esse dado é representativo apenas para partículas de forma esférica (Fig. 8B). Além disso, destaca-se que partículas com o tamanho maior do que 1  $\mu\text{m}$  estarão sujeitas ao movimento gravitacional, além do Browniano, o que faz com que essa técnica seja adequada apenas para a caracterização de partículas  $< 1 \mu\text{m}$  (Malvern, 2004).

Essa metodologia também oferece informações sobre a distribuição das populações de tamanho das partículas analisadas por meio da determinação do índice de polidispersividade (PdI). O PdI se refere à variedade do tamanho da amostra relativo à sua distribuição por intensidade (Malvern, 2004). Esse valor varia de 0 a 1 e, quanto menor, mais monodispersa e, conseqüentemente, menos heterogênea é a amostra.

Adicionalmente, no mesmo instrumento pode-se determinar a carga de superfície das partículas por meio da medida do potencial Zeta de superfície (Fig. 8A). Esse valor se refere à carga da bicamada elétrica que recobre a partícula sendo, então, um indicativo da estabilidade coloidal, pois quanto maior o valor das cargas em módulo, maior a repulsão eletrostática entre as partículas e menor o estado de agregação e a probabilidade de floculação ou sedimentação.

Os valores medidos no DLS são sensíveis a variação dos fatores de temperatura, pH e concentração de eletrólitos na solução. Por esse motivo, no presente trabalho, todas as medidas foram executadas da mesma maneira. As medidas foram realizadas no instrumento ZetaSizer Nano ZS no Laboratório de Biofísica Molecular, na UnB. Para cada análise, utilizou-se a diluição das amostras em água ultrapura na proporção de 1:20. As amostras foram analisadas em triplicata, com número de medidas no automático, ângulo de

espalhamento fixado em  $173^\circ$  e temperatura a  $25^\circ\text{C}$ , permitidos 1 minuto de estabilização da temperatura antes das medições. Os dados foram analisados utilizando o software do equipamento (ZetaSizer 10.11.1, Malvern). Os dados obtidos são referentes à média das triplicatas  $\pm$  desvio padrão da média e os gráficos foram plotados no programa Origin<sup>®</sup> 8.



**Figura 8:** Esquema representativo de partículas em solução com destaque para a elucidação das medidas de diâmetro hidrodinâmico e potencial Zeta obtidas em um aparelho de DLS para partículas esféricas (A), partículas agregadas ou não-esféricas (B).

### 3.6.2 Microscopia de força atômica

A microscopia de força atômica (MFA) foi a principal técnica de microscopia utilizada para caracterização das AgNPs e também a técnica escolhida para investigar a cinética de formação das AgNPs. A partir de análises periódicas ao longo do curso da reação de síntese, foram determinados o tamanho, a forma e a distribuição do diâmetro (em altura) das partículas. NPVs foram sintetizadas com 50 mL da mistura reacional, seguindo a metodologia descrita anteriormente no tópico 3.5.5.

Para cada análise, utilizou-se 1  $\mu\text{L}$  de uma suspensão preparada a partir da diluição (1:20) de 50  $\mu\text{L}$  de NPV diluída em 950  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, colocada em superfície de mica muscovita recém clivada. Alíquotas da amostra foram coletadas a cada 2 horas a partir do início da reação, pelas primeiras 12 horas e, também, no marco cinético de 24 horas.

Como as NPVs possuem dimensões em nanoescala, as medidas topográficas foram realizadas com um microscópio de força atômica no modo de operação dinâmico, pois a vibração do cantilever permite a obtenção de dados mais precisos por minimizar possíveis interações laterais entre as partículas e a ponteira. Para isso, também se utilizou um cantilever com raio de curvatura da ponteira inferior a 10 nm (Nanosensors, Alemanha) e as varreduras foram realizadas com a frequência de 1 Hz e com a resolução máxima permitida no equipamento (de  $512 \times 512$  pixels). As imagens foram processadas no próprio software do equipamento (SPM Manager 3.0, Shimadzu) e as distribuições do diâmetro (altura) foram determinadas por meio da especificação da altura média, dado representativo para nanopartículas esféricas. Os gráficos foram plotados utilizando o programa Origin<sup>®</sup> 8.

### 3.6.3 Microscopia eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada para a determinação do tamanho (diâmetro) e da ultraestrutura das nanopartículas obtidas após secagem, com o objetivo de comparar com a avaliação dos dados de MFA e DLS. As amostras foram analisadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica, na UnB, com o auxílio de um microscópio eletrônico de transmissão operado a 100 kV, e as imagens foram obtidas com uma câmera digital (modelo Ultrascan, Gatan, Estados Unidos) integrada ao microscópio. Para a preparação das amostras, 2  $\mu$ L de uma suspensão da mistura reacional das NPVs e do EV diluídos em 1:20 em água ultrapura foram instilados sobre grades de cobre com 150 malhas vazadas (Electron Microscopy Sciences, Estados Unidos) recobertas por uma película de Formvar revestida com carbono. Antes da análise, o material foi mantido em ambiente seco a 25°C por 24 horas para evaporação completa do solvente.

### 3.6.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

Medidas de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas no Laboratório de Instrumentação Analítica (UnB, Campus Ceilândia) em amostras liofilizadas do extrato de *B. gaudichaudii* e das AgNPs sintetizadas, com o propósito de determinar os grupamentos químicos e identificar as possíveis biomoléculas responsáveis pela biorredução dos íons  $\text{Ag}^+$  e pelo capeamento das AgNPs.

Os espectros de infravermelho das amostras foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro FTIR. Para a análise, foram utilizadas pastilhas de brometo de potássio (KBr, Shimadzu, Japão) com massa média de 30 mg preparadas com aproximadamente 5% de amostra, prensadas a 80,0 kN por 3 minutos. Não houve qualquer tratamento adicional nas amostras. Para cada leitura foram obtidos 45 registros, com resolução de 4,0  $\text{cm}^{-1}$  na região do

espectro eletromagnético compreendida entre os números de onda de 400,0 e 4.000,0  $\text{cm}^{-1}$  no modo de porcentagem de transmitância. Os dados obtidos foram tratados com o software IR Solution 1.50<sup>®</sup> e transferidos para o programa de construção gráfica Origin<sup>®</sup> 8.

### 3.7 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS EM MEIO SALINO

Os possíveis perfis de dissolução das nanopartículas sintetizadas e do extrato controle foram avaliados em meio salino. Inicialmente, em uma microplaca de 96 poços, acompanhou-se a reação entre as NPs sintetizadas ou o extrato de *B. gaudichaudii* em meio salino, com uma solução de NaCl em 6 concentrações (154, 235, 316, 397, 478 e 559 mM) de modo a mimetizar desde a salinidade fisiológica até a concentração de NaCl em água do mar. As condições foram testadas em triplicata e acompanhou-se a reação em leitora de microplacas nas absorvâncias de 405, 490 e 630 nm, por 48 horas, a 25°C.

Em seguida, acompanhou-se a dissolução das amostras por monitoramento em DLS por 4 horas. As leituras foram realizadas em intervalos de 20 minutos, de modo a obter informações sobre a possível dissolução ou o estado de agregação das nanopartículas. Esse acompanhamento foi realizado para as AgNPs em solução de NaCl 154 mM, para as AgNPs com NaCl 559 mM e para o extrato aquoso das folhas de *B. gaudichaudii* com NaCl 154 mM.

### 3.8 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

A possível citotoxicidade das AgNPs sintetizadas e dos extratos aquosos das folhas de *B. gaudichaudii* foi avaliada *in vitro* em quatro tipos celulares pelo ensaio colorimétrico de MTT. Nitrato de prata (Ag) livre e água ultrapura foram utilizados como controles. Foram utilizadas células eucarióticas tumorais de mama (humano, linhagem MCF-7) e não tumorais

(fibroblasto murino, linhagem NIH3T3); bactérias *Escherichia coli* (cepa XL1-Blue); e leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (Fermipan®).

Os ensaios foram efetuados levando em consideração as devidas precauções para evitar qualquer tipo de contaminação, em particular com uso de luvas e jalecos limpos, higienização e /ou esterilização dos materiais a serem utilizados por meio de autoclave, limpeza com álcool 70%, esterilização dos equipamentos e materiais antes do seu uso com pelo menos 15 minutos de exposição a luz UV na capela de fluxo laminar.

### **3.8.1 Células eucarióticas tumorais e não tumorais**

#### *3.8.1.1 Tripsinização das células*

Os ensaios de viabilidade com células eucarióticas de mamíferos foram realizados no Laboratório de Nanobiotecnologia na UnB. Primeiramente, células das linhagens NIH3T3 e MCF-7 foram cultivadas em frascos de cultura com base de 75 cm<sup>2</sup> com DMEM em ambiente controlado em uma estufa a 5% de CO<sub>2</sub>, mantida úmida a 37°C. Para assegurar a viabilidade dessas células, o meio de cultivo era trocado a cada 48 horas. Para a realização do experimento, o meio de cultivo foi descartado e foram adicionados 5 mL da SE de tripsina, incubados em estufa por 3 minutos. Em seguida, foram adicionados 5 mL de DMEM para neutralizar a tripsina e o conteúdo da garrafa foi transferido para um tubo tipo Falcon de 15 mL. Após 3 minutos de centrifugação a 1341 g, o sobrenadante foi descartado e o pellet (células) foram ressuspensos em 1 mL de DMEM.

#### *3.8.1.2 Plaqueamento das células*

Em um microtubo de polipropileno de 0,6 mL, foram adicionados 10 µL da suspensão de células obtida na etapa anterior. Essa suspensão foi diluída com 140 µL de uma solução de



Azul de Tripan. Adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  da suspensão em uma câmara de Neubauer que foi, então, levada a um microscópio de luz invertido para realizar a contagem das células. As células foram plaqueadas em microplacas de 96 poços de fundo chato sendo que, em cada poço, foram adicionadas 5.000 células ressuspendidas em 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura DMEM. Uma microplaca foi utilizada para cada linhagem celular e as placas foram incubadas por 24 horas na estufa a 5% de  $\text{CO}_2$ , mantida úmida a 37°C.

#### *3.8.1.3 Tratamento com as amostras*

Após esse período, o meio de cultura foi substituído por um meio novo mediante adição de 180  $\mu\text{L}$  de DMEM em cada poço. O tratamento foi realizado com a adição de 20  $\mu\text{L}$  de amostra, de modo que o  $\text{AgNO}_3$  e a NPV fossem correspondentes. Como controles foram utilizados o EV, DMEM ou água ultrapura. Com relação ao volume final (200  $\mu\text{L}$ ), cada amostra foi testada nas concentrações de 2,5, 5 e 10% (v/v). Essas concentrações são equivalentes a concentração do  $\text{AgNO}_3$  em 0,1 mM, 50 $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Todas as condições foram testadas em triplicata. As microplacas foram então incubadas em estufa a 5% de  $\text{CO}_2$ , mantida úmida a 37°C pelo período de 24 horas.

#### *3.8.1.4 MTT*

Primeiramente, retirou-se o meio contendo as amostras e adicionou-se, em cada poço, 150  $\mu\text{L}$  da solução de MTT-DMEM (15  $\mu\text{L}$  da SE de MTT em 135  $\mu\text{L}$  de DMEM). Essa solução foi incubada por 2 horas em estufa. Em seguida, essa solução foi substituída por 200  $\mu\text{L}$  de dimetil sulfoxido (DMSO) e foi efetuada a leitura espectrofotométrica das placas com o auxílio de uma leitora de microplacas no comprimento de onda de 590 nm a 26°C. Os resultados de viabilidade celular foram expressos em porcentagem relativa à absorbância

medida nas células com o tratamento feito com o controle negativo (água ultrapura). Os dados numéricos foram apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média.

### **3.8.2 Bactéria *Escherichia coli***

#### *3.8.2.1 Plaqueamento das bactérias*

Uma unidade formadora de colônia (UFC) de *E. coli* (cepa XL1-Blue) foi selecionada a partir de uma placa de petri previamente elaborada e essa UFC foi raspada em uma placa de Petri contendo a SE de meio LB sólido. Esse procedimento foi executado em triplicata e as placas foram inoculadas em estufa a 37°C por 20 horas.

Após esse período, a UFC da placa que apresentou o crescimento bacteriano mais homogêneo foi transferida para o meio LB líquido. Para isso, foram adicionados 5 mL da SE desse meio a tubos tipo Falcon de 50 mL. Essa etapa também foi realizada em triplicata, além do controle com ampicilina. Os tubos foram então incubados em um *shaker* a 37°C e a 220 rpm por 18 horas.

#### *3.8.2.2 Tratamento com as amostras*

As bactérias foram então quantificadas por absorvância, de acordo com o Padrão McFarland. A absorvância dos quatro tubos tipo Falcon foram medidas em um espectrofotômetro na região do visível no comprimento de onda de 625 nm. Em seguida, preparou-se uma suspensão das bactérias com o conteúdo do tubo que melhor apresentou crescimento celular (com absorvância medida de 1,841) utilizando 27  $\mu$ L em 973  $\mu$ L de meio líquido LB para obter uma suspensão de células com OD de 0,05.

A incubação das amostras foi efetuada logo em sequência, em tubos tipo Falcon de 15 mL. Em cada tubo adicionou-se 260  $\mu$ L do meio LB líquido, 10  $\mu$ L do inóculo da bactéria e

30  $\mu\text{L}$  da amostra a ser testada. As seguintes amostras foram diluídas em água ultrapura e utilizadas na proporção de 1:10: solução de nitrato de prata 1 mM, e as misturas reacionais de NPV, NPI, EV e EI. As concentrações testadas foram correspondentes à concentração de  $\text{AgNO}_3$  de 0,1 mM. As condições foram testadas em triplicata, juntamente com os controles de água ultrapura, meio líquido e ampicilina. Os tubos foram incubados em *shaker* a 200 rpm, 37°C por 2 horas.

### 3.8.2.3 MTT

O conteúdo dos tubos tipo Falcon foi então transferido para microtubos de polipropileno de 1,5 mL, que foram então centrifugados a 6711 g por 30 segundos. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e substituído por 280  $\mu\text{L}$  de meio LB líquido e 20  $\mu\text{L}$  da SE de MTT. Essa mistura foi homogeneizada via agitação em um agitador de tubos e incubada em *shaker* a 220 rpm, 37°C por 20 minutos. Logo depois se repetiu o mesmo procedimento, só que desta vez o sobrenadante foi substituído por 280  $\mu\text{L}$  de DMSO. O precipitado de células foi ressuscitado com o auxílio de um agitador e transferido para uma microplaca de 96 poços. A leitura espectrofotométrica da placa foi realizada em uma leitora de microplacas no comprimento de onda de 630 nm. Os resultados de viabilidade celular foram expressos em porcentagem relativa à absorbância medida nas células com o tratamento feito com o controle negativo (água ultrapura). Os dados numéricos foram apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média.

### 3.8.3 Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

#### 3.8.2.1 Cultivo das células

Para o crescimento das leveduras, a quantidade de 20 mg de *S. cerevisiae* liofilizadas (Fermipan®) foi colocada em meio de cultura YEPD (peptona 4%, extrato de levedura 2% e glicose 4%). Essa mistura foi, então, incubada por 18 h em um Erlenmeyer sob agitação de 60 rpm em estufa a 28°C. Após esse período, a densidade celular foi ajustada de acordo com a medida de absorbância a 600 nm com OD 0,7.

#### 3.8.2.2 Tratamento com as amostras

Em seguida, 190 µL da mistura obtida foram adicionados a microtubos de polipropileno de 1,5 mL. A cada microtubo foram adicionadas 10 µL das concentrações finais de cada amostra testada e as misturas foram incubadas a 28° C em estufa por 3 h. Nesse experimento, avaliou-se a atividade de AgNO<sub>3</sub> livre a 1 mM, das misturas reacionais de NPVs, NPIs, EV, EI e os controles de água ultrapura e meio de cultura YEPD. Aplicou-se 10 µL de amostra por microtubo e o volume final foi de 200 µL. Sendo assim, foram utilizadas as concentrações de 5% e 2,5% (v/v) das misturas reacionais, essas concentrações testadas foram correspondentes às concentrações de AgNO<sub>3</sub> de 50 e 25 µM, respectivamente. Todas as condições foram realizadas em triplicata. Os microtubos foram incubados com a tampa aberta e recobertos por papel alumínio.

#### 3.8.2.3 MTT

Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 604 g por 3 minutos e formou-se um precipitado contendo as células. O meio de cultura (sobrenadante) foi retirado com cuidado e 150 µL da solução de MTT-YEPD (15 µL da SE de MTT diluídos em 135 µL

de YEED) foram adicionados a cada microtubo. Os microtubos foram recobertos por papel alumínio e, então, incubados por 2 h em estufa.

Subsequentemente, os tubos foram novamente centrifugados a 604 g por 3 minutos e a solução de MTT (sobrenadante) foi removida e foram adicionados 200 µL de DMSO para solubilizar o formazan. O conteúdo dos tubos foi cuidadosamente ressuspendido e transferido para uma placa de 96 poços de fundo chato. A quantificação do formazan foi realizada pela medida da absorbância da solução nos poços a 630 nm em uma leitora de microplacas. Os resultados de viabilidade celular foram expressos em porcentagem relativa à absorbância medida nas células com o tratamento feito com o controle negativo (água ultrapura). Os dados numéricos foram apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média.

### 3.9 NANOBIOSENSORES BASEADOS EM GRAFENO

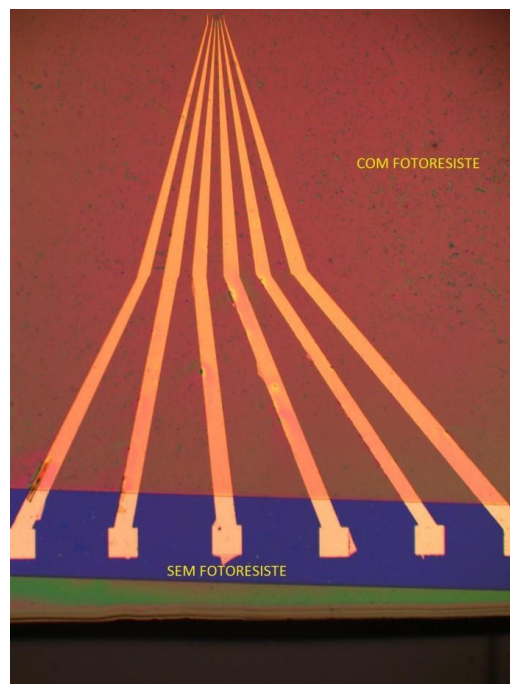
Os testes com os nanobiossensores foram realizados em colaboração com o pesquisador da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Dr. Elibio Leopoldo Rech Filho, que contribuiu com o fornecimento dos anticorpos utilizados nesse trabalho, e em colaboração com o Professor Dr. Elmo Salomão Alves, do Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), no que concerne ao fornecimento dos dispositivos e a etapa de detecção eletroquímica.

Dispositivos com propriedades condutoras contendo filmes de grafeno foram utilizados e atuaram como base para a funcionalização com os anticorpos – Anti-PAX (vírus de planta), da molécula Cianovirina (anti-HIV) e Anti-GH (hormônio do crescimento) - com função de ERBs, e com as NPVs sintetizadas para amplificação do sinal eletroquímico.

### 3.9.1 Remoção do fotorresiste dos dispositivos

Os dispositivos utilizados possuíam contatos elétricos os quais são recobertos com uma camada de fotorresiste. Para que seja feito o processo de funcionalização, foi necessário remover essa camada na extremidade dos contatos elétricos de ouro, de modo a expor o grafeno aos reagentes. Para remover o fotorresiste (processo de *lift-off*), utilizou-se um cotonete umedecido em acetona sobre a extremidade dos contatos, tomando cuidado para que a acetona não escorresse para a região próxima ao grafeno. Esse procedimento removeu o fotorresiste e deixou o substrato exposto, como mostrado na figura 9.

O fotorresiste é solúvel em DMF, um solvente utilizado no processo de funcionalização. Para que o fotorresiste ficasse insolúvel em DMF, os dispositivos foram submetidos a um tratamento térmico, no qual os dispositivos foram colocados em um forno tipo Mufla a 200°C por 30 minutos.



**Figura 9:** Imagem do tipo de dispositivo utilizado para a construção dos biossensores. A região azulada é aquela em que o fotorresiste foi removido pela acetona. Fonte: cedido pelo Prof. Dr. Elmo Salomão Alves (UFMG).

### 3.9.2 Processo de funcionalização dos dispositivos

Nove dispositivos foram utilizados e funcionalizados em triplicata, de acordo com o anticorpo utilizado durante o processo de funcionalização. Primeiramente, os dispositivos foram incubados na SE de PBSE por 2 horas à temperatura ambiente. A incubação foi realizada por meio de adição da solução (aproximadamente 12  $\mu\text{L}$ ) na superfície dos dispositivos, de modo a cobrir a parte sem o fotorresiste. À medida que a solução evaporou, adicionou-se mais DMF (solvente utilizado na SE de PBSE).

Nessa etapa, o PBSE age como molécula ligante, onde o grupamento pireno presente nesse composto atua formando uma forte ligação com a superfície do grafeno, deixando exposto o grupamento éster succinimidico do PBSE, que reage com o grupo amina, permitindo a posterior funcionalização com os anticorpos (Chen *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2011).

Após essa etapa, os dispositivos foram lavados cinco vezes com DMF de modo a remover as moléculas de PBSE eventualmente livres. Em seguida, as soluções dos anticorpos foram preparadas nas concentrações de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em PBS. Os dispositivos foram então incubados com as respectivas soluções dos anticorpos por 20 horas a 4°C em câmara úmida. Com eventual evaporação da solução, adicionou-se PBS. Posteriormente, os dispositivos passaram por cinco ciclos de lavagem com PBS para remoção dos anticorpos que não se ligaram ao PBSE.

Para garantir que não houvesse a funcionalização do PBSE com outras moléculas, foi necessária a desativação dos grupos éster succinimidicos que permaneceram livres na superfície do grafeno. Para esse fim, os dispositivos foram incubados por 1 hora em uma solução de etanolamina 0,1 M à temperatura ambiente.

Em seguida, os dispositivos foram incubados em uma solução de Tween<sup>®</sup> 20 na concentração de 0,1% por 1 hora a temperatura ambiente, com o objetivo de passivar a área do grafeno que não foi recoberta.

Um dispositivo a cada triplicata foi incubado por 30 minutos à temperatura ambiente com uma suspensão NPVs na diluição de 1:20. Após secagem da solução, um filme de nanopartículas possivelmente foi formado na superfície do dispositivo.

### 3.9.3 Detecção eletroquímica

As medidas de detecção eletroquímica foram realizadas de modo a relacionar as medidas de variações na resistência do dispositivo funcionalizado com grafeno em contato com a solução contendo os antígenos para os anticorpos testados. Inicialmente a resistência elétrica do dispositivo foi medida em função do tempo, enquanto variou-se a tensão de *top gate* (tensão elétrica entre o grafeno e o líquido) em 0,1 V de 0 V até 0,6 V, em seguida retornando até 0 V. Vale ressaltar que para cada tensão aplicada, esperou-se a estabilização da resistência. As medidas foram obtidas com o auxílio de um Amplificador *Lock-in*, utilizando corrente ISD de 300 nA, frequência de 13,33 Hz e constante de tempo de 1 segundo.

As últimas 20 medidas de resistência obtidas foram selecionadas para cada valor de tensão de *top gate* e valor médio da resistência em cada platô foi plotado em função dessa tensão. Esse procedimento então foi repetido com diferentes soluções contendo o analito em contato com o grafeno. É importante destacar que as medidas foram realizadas colocando-se as soluções dos analitos sobre o grafeno na sequência da menor para a maior concentração do antígeno, de modo a evitar um resultado falso positivo.



### 3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E GRÁFICAS

Os dados quantitativos dos experimentos de caracterização, realizados em triplicata, foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão da média. Os dados dos ensaios de viabilidade foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. As análises estatísticas foram efetuadas utilizando o software PAST (versão 2.17b, Hammer & Harper, Noruega). As possíveis diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) de um fator, considerando-se estatisticamente significativo  $P < 0,05$ . Os gráficos foram plotados no programa Origin<sup>®</sup> 8.

### 3.11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

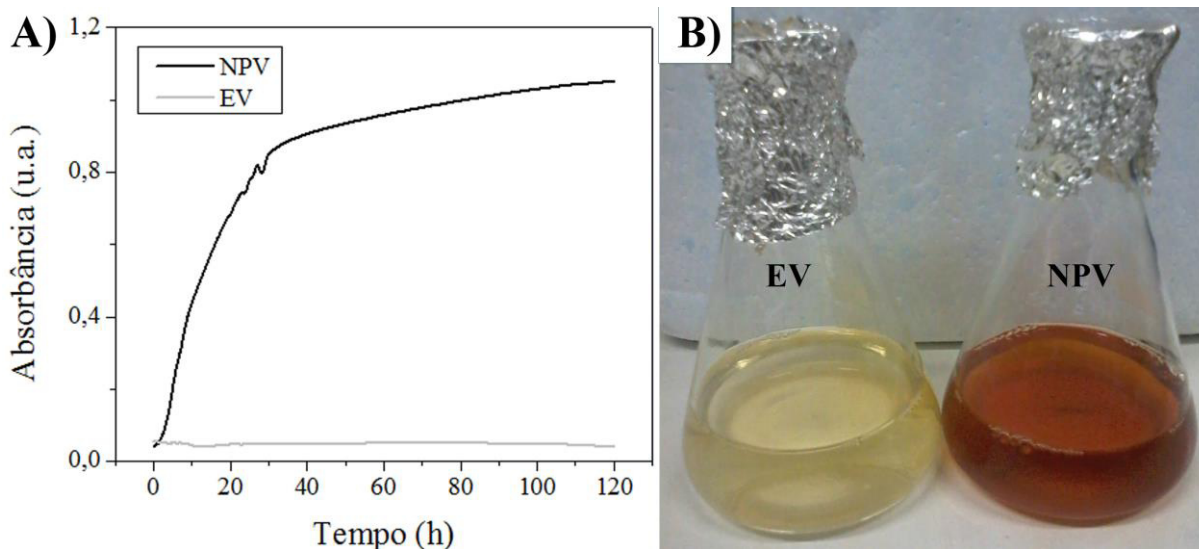
As referências apresentadas nesse documento foram processadas e geradas utilizando o software EndNote<sup>®</sup> (versão X7), da Thomson Reuters (Estados Unidos).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A formação de AgNPs por síntese verde utilizando o extrato aquoso das folhas da planta *B. gaudichaudii* foi realizada em apenas uma etapa a partir da mistura da solução de  $\text{AgNO}_3$  na concentração final de 1 mM com o EV na concentração de 10% (v/v), a 25°C.

O monitoramento da reação foi realizado por medidas periódicas de absorvância no comprimento de onda de 450 nm. Após 48 h as amostras foram monitoradas com intervalos de 24 h até completar o marco de 120 h (Fig. 10A). Esse máximo na absorvância está relacionado também à mudança visível da mistura reacional contendo as NPVs, que passou de uma coloração amarelo claro para marrom após 24 horas de reação. Não foram observadas mudanças no controle contendo apenas o EV na mesma concentração (Fig. 10B).



**Figura 10:** Curvas de formação representativas das medidas de absorvância (unidade adimensional) a 450 nm monitoradas ao longo de 120 horas da síntese de nanopartículas de prata (NPV) utilizando a mistura da solução de nitrato de prata (concentração final de 1 mM) com o extrato verão (EV) na concentração de 10% v/v (A). Foto após 24 horas dos Erlenmeyers armazenados a 25°C contendo o EV e as NPVs (B).

A análise espectroscópica de absorção na faixa UV-vis (ultravioleta-visível) consiste em um método simples e amplamente utilizado na determinação da formação de AgNPs e AuNPs em uma dispersão, devido à ressonância plasmônica de superfície dessas NPs (Chaudhuri e Paria, 2012). Essa máxima da absorção é dependente do diâmetro médio das NPs, possuindo intensidade maior quando as NPs possuem o raio em torno de 20 nm (Georgiev *et al.*, 2013).

A concentração final de  $\text{AgNO}_3$  de 1 mM foi escolhida pois ao utilizar uma baixa concentração de sal precursor, a redução metálica ocorre de forma a favorecer o esgotamento dos cátions  $\text{Ag}^+$  livres em solução e a conversão deles à  $\text{Ag}^0$ , levando à formação das AgNPs. Portanto, é possível estimar a quantidade de AgNPs produzida pela quantidade de  $\text{Ag}^+$  adicionado ao meio e, desse modo, a concentração aproximada de AgNPs na mistura reacional foi de 110  $\mu\text{g/mL}$ .

Um estudo conduzido por Veerasamy e colaboradores (2011) avalia a formação de AgNPs por síntese verde utilizando diferentes concentrações finais de  $\text{AgNO}_3$  e, entre as concentrações finais testadas de 0,25; 0,5; 0,75; 1, 2 e 5 mM, a de 1 mM apresentou maior formação de AgNPs de acordo com as máximas observadas por medidas de absorbância (Veerasamy *et al.*, 2011). Por esse motivo e em função de outros estudos utilizarem essa concentração, no presente estudo ela foi a escolhida durante as rotas de síntese desenvolvidas.

Após o período de incubação, a mistura reacional não passou por procedimentos de purificação das AgNPs. Das e Brar (2013) relatam que os extratos provenientes de plantas podem apresentar compostos de diferentes massas moleculares que podem vir a comprometer o processo de isolamento das NPs sintetizadas pelo processo de separação por centrifugação.

Geralmente o diâmetro das NPs obtidas por rotas de síntese verde utilizando extratos de plantas é descrito por meio de dados obtidos por MET (Nath e Banerjee, 2013). Quando

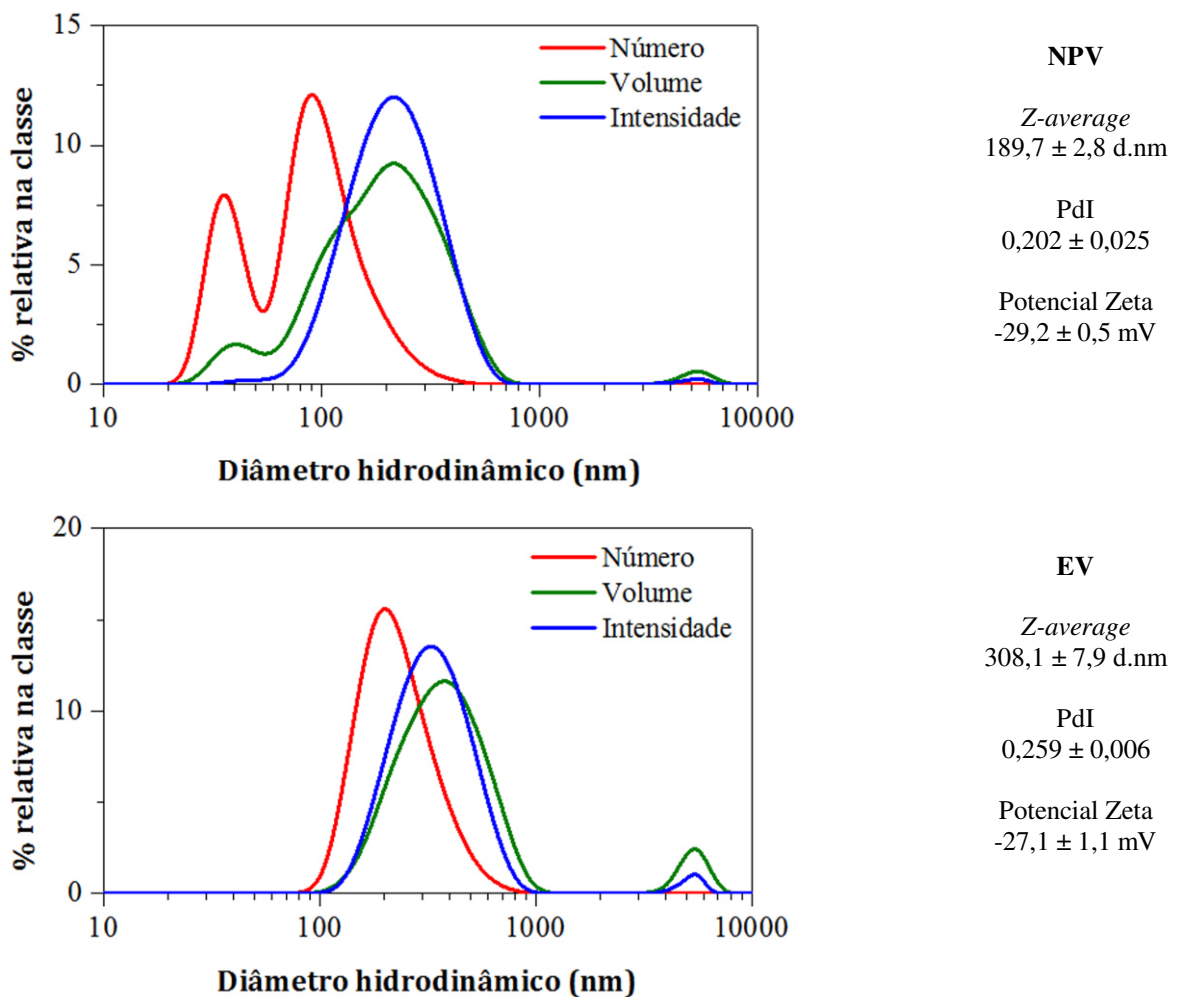
são realizadas medidas de DLS, geralmente não são mostrados os dados referentes ao extrato controle, provavelmente porque este também possui substâncias as quais também se organizam em nanoescala. No presente trabalho, optou-se pela metodologia de DLS para analisar as NPs em suspensão, por MFA para as análises quantitativas e MET para confirmar os dados obtidos pelas outras técnicas.

A análise por DLS das NPVs e do EV, representada na figura 11, avaliou o tamanho das partículas em dispersão aquosa. O diâmetro hidrodinâmico (DH) das NPVs apresentou uma bimodal na distribuição de classes por número, com máximos em 35 nm e 90 nm, indicando a presença de duas populações de partículas. O valor de *Z-average* – medida que leva em consideração também as distribuições de volume e intensidade – foi de 189,7 d.nm. Como a mistura reacional de NPV não passou por nenhum processo de isolamento das AgNPs, sugere-se que as populações de maior DH das NPVs, correspondentes às classes de volume e intensidade, sejam referentes à presença de moléculas ou agregados do EV, pois os dados de DLS referentes à intensidade são muito semelhantes aos obtidos para EV controle.

O índice de polidispersividade (PdI) obtido para as NPVs foi de 0,202 e esse valor é um indicativo de monodispersividade moderada das NPs obtidas (Malvern, 2004). As AgNPs formadas por rotas de síntese verde geralmente possuem um PdI moderado, variando de 0,3 a 0,5 (Bonatto e Silva, 2014). A importância em obter NPs monodispersas está atribuída à uniformidade das propriedades físicoquímicas das NPs do sistema em dispersão coloidal, o que permite a correlação direta das propriedades das NPs do sistema obtido com as propriedades das NPs individuais (Sugimoto, 1987). Dessa forma, quanto maior a monodispersividade, maior a homogeneidade das propriedades da amostra obtida.

O valor do potencial Zeta de superfície das NPVs foi de -29,2 mV, o que demonstra que a superfície dessas partículas está negativamente carregada em meio aquoso. Esse valor

também foi bastante próximo ao do valor de potencial Zeta de superfície observado para o EV controle, de -27,1 mV, um indicativo de que moléculas presentes no EV podem ser responsáveis pelo recobrimento das AgNPs sintetizadas, evento esse que será discutido com mais detalhes nas seções adiante. De qualquer forma, o alto valor em módulo do potencial Zeta das NPs obtidas, juntamente com a polidispersividade baixa a moderada, constituem uma evidência satisfatória de que a tendência dessas partículas em se agregarem é baixa.

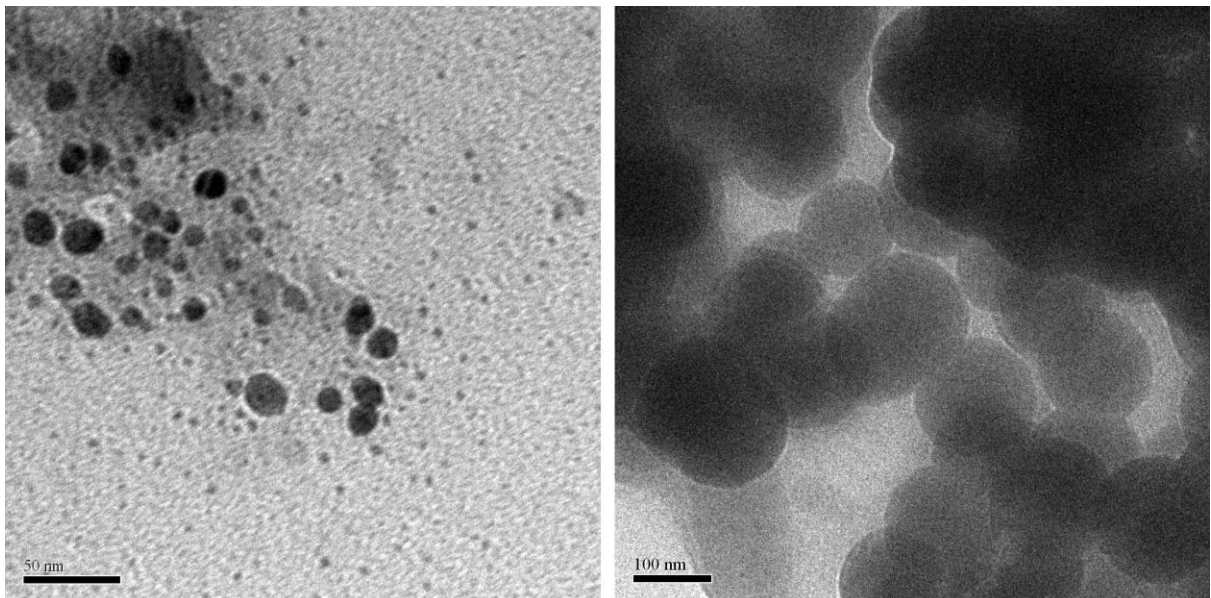


**Figura 11:** Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número, volume e intensidade das nanopartículas de prata (NPV, acima) e do extrato verão (EV, abaixo) após 24 horas. À direita de cada gráfico estão os valores correspondentes às medidas de *Z-average*, PdI e potencial Zeta de superfície.

A análise ultraestrutural das NPVs foi realizada utilizando MET com o objetivo de determinar o diâmetro e a forma das AgNPs secas. A presença de NPs esféricas isoladas, de aproximadamente 20 nm e, também, de agregados contendo partículas de 80-100 nm foi detectada (Fig. 12).

A grande maioria dos relatos na literatura caracterizam as AgNPs sintetizadas por MET e os diâmetros obtidos são variáveis, como apresentado na tabela 2, pois esse fator é dependente das condições da reação e do extrato da planta. Além disso, seria esperado que houvesse uma diferença entre o DH e o diâmetro seco avaliado por MET. Em um estudo conduzido por Murdock e colaboradores (2008), as AgNPs analisadas por MET obtiveram diâmetro médio de 25 a 30 nm e, em análise por DLS em dispersão aquosa apresentaram o *Z-average* de 128 nm (Murdock *et al.*, 2008).

Dessa maneira, os dados apresentados no presente estudo são condizentes com aqueles observados nas medidas do DH por DLS, mas nesse caso não foram utilizados para realizar medidas quantitativas. Tais medidas foram realizadas por MFA.



**Figura 12:** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão obtidas das nanopartículas de prata sintetizadas com o extrato verão na concentração de 10 % (v/v) com a solução de nitrato de prata na concentração final de 1 mM.

## 4.2 APERFEIÇOAMENTOS DOS PARÂMETROS DA REAÇÃO DE SÍNTESE VERDE

Com a finalidade de verificar os possíveis efeitos da variação de alguns parâmetros físicoquímicos nas rotas de síntese e obter AgNPs com características almejavéis como monodispersividade, tamanho em nanoescala e estabilidade coloidal, avaliou-se o efeito de algumas condições de reação de síntese, cujos resultados estão descritos e discutidos a seguir.

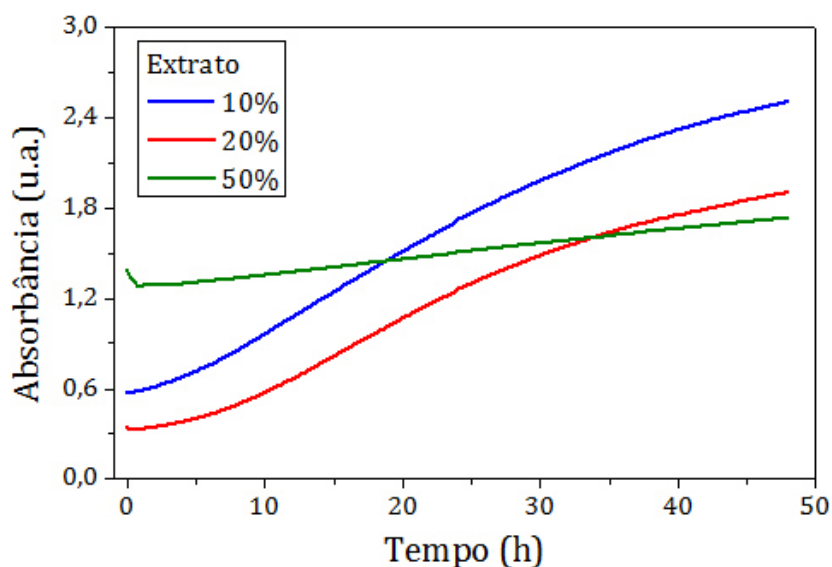
### 4.2.1 Efeitos da concentração do extrato

Primeiramente, testou-se em qual concentração de EV na mistura reacional para a síntese de AgNPs, entre 10, 20 e 50% (v/v), ocorria a formação de AgNPs de forma mais rápida e estável de acordo com análises das máximas de absorbância a 490 nm.

A concentração do agente redutor da prata (EV) apresentou-se como um fator determinante na formação das AgNPs por essa rota de síntese. Ao analisar os dados de formação pela medida das absorbâncias obtidas para as reações testadas (Fig. 13), constatou-se que não houve formação de NPVs ao utilizar o EV na maior concentração (50%), devido a ausência de máximo de absorbância a 490 nm que, como mencionado, é uma característica marcante da presença de AgNPs em uma suspensão. Já nas concentrações mais baixas, com EV de 10 e 20%, observa-se um aumento progressivo da absorbância nas 48 horas de reação. A curva com EV 10% apresentou os valores de absorbância aproximadamente 20% mais pronunciados, quando comparada com a curva de EV 20%, o que indica que a concentração de 10% (v/v) do EV levou a um maior rendimento na formação de NPV nessas condições de ensaio.

Essa diferença na síntese de acordo com as concentrações do extrato pode ocorrer visto que concentrações maiores tendem a favorecer a rápida redução do sal metálico, o que faz com que a etapa de crescimento das NPs possa ocorrer de forma desordenada, levando à

agregação das partículas formadas, exibindo, portanto, uma menor máxima na absorbância referente a estruturas nanométricas formadas (Kasthuri *et al.*, 2008).



**Figura 13:** Curvas de formação representativas das medidas de absorbância a 490 nm monitoradas ao longo de 48 horas da síntese de nanopartículas de prata utilizando a mistura da solução de nitrato de prata (concentração final de 1 mM) com o extrato verão nas concentrações de 10, 20 e 50% v/v.

Um estudo realizado por Krishnaraj e colaboradores (2012) também observou que, utilizando o extrato das folhas de *Acalypha indica* (preparados com 1 g/10 mL) para a síntese de AgNPs, dentre as concentrações de 12, 24 e 36% (v/v), a de 12% apresentou maior absorbância com 8 horas de reação (Krishnaraj *et al.*, 2012). Por outro lado, foi verificado por Vilchis-Nestor e colaboradores (2008), cujos extratos de *Camellia sinensis* (preparados com chá, 1,5 g/100 mL) a 10 e 20% (v/v) apresentaram mais formação de AgNPs do que a 2%, de acordo com o pico de absorção UV-Vis (Vilchis-Nestor *et al.*, 2008). Em contrapartida, Cruz e colaboradores (2010) avaliaram o efeito da concentração do extrato das folhas de *Lippia citriodora* (preparados com 1,5 g/100 mL) e observaram que a formação das AgNPs, avaliada por absorbância, foi mais pronunciada com o aumento da concentração do extrato de 10 a 20% (Cruz *et al.*, 2010). A discrepância entre esses resultados pode ocorrer devido às



diferenças na quantidade de folhas utilizadas no preparo dos extratos ou ainda dos metabólitos presentes em cada espécie ou época de colheita, fator esse que não possui uma padronização entre os diferentes estudos relatados na literatura.

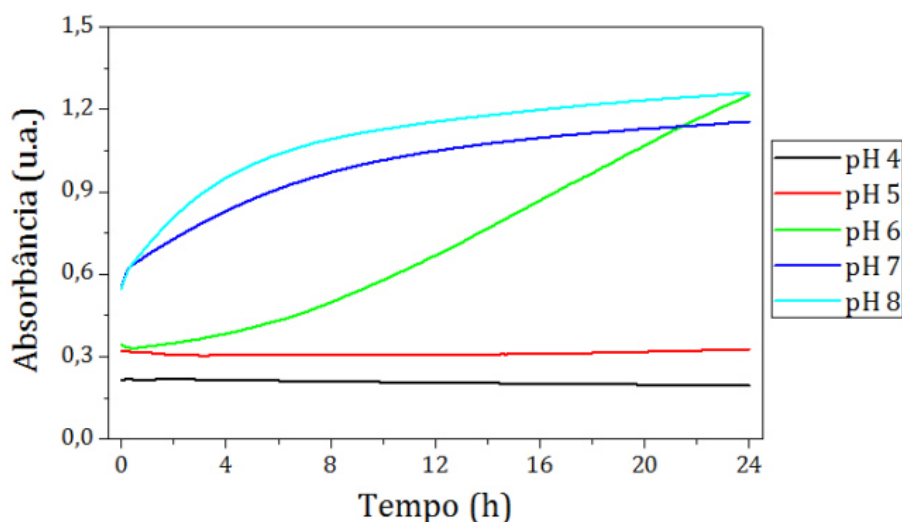
Adicionalmente, no presente estudo foi testada a concentração de 5% do EV (v/v), porém não foi possível obter os dados de absorvância devido a problemas na leitura da microplaca. Uma observação interessante é que a síntese de AgNPs por essa rota utilizando o extrato aquoso das folhas *B. gaudichaudii* pareceu ser afetada quanto ao uso dos reagentes em um volume muito pequeno nas reações feitas nos poços com a microplaca. É possível que esse fato também seja devido ao pequeno volume utilizado nas reações ou que o componente das microplacas (poliestireno) influencie na reação, levando à adsorção de moléculas em sua superfície. Estudos futuros realizando a síntese em diferentes tipos de materiais serão conduzidos para verificar essa hipótese e esse constitui um dos esforços atuais do grupo de pesquisa em outros projetos.

#### **4.2.2 Efeitos do pH**

Após definir a concentração dos reagentes, optou-se por investigar a possível influência do uso de soluções tampão com diferentes valores de pH na formação das NPVs e os resultados encontram-se na Figura 14. Optou-se pelo uso de solução tampão de modo a mimetizar a estabilidade da formação de AgNPs em possíveis pHs nos quais células e tecidos poderiam estar expostos em diferentes partes dos organismos vivos.

Percebeu-se pela ausência de variação na absorvância que não houve a formação de AgNPs nos pHs de 4 e 5. Já nos pHs de 6, 7 e 8, houve um aumento da absorvância a 490 nm, indicando que houve a formação de AgNPs. Adicionalmente, observa-se que as curvas cinéticas com os pHs 7 e 8 são diferentes da curva com o pH 6 quanto aos valores de

absorbância; enquanto que as primeiras aumentam e se estabilizam, a segunda cresce lentamente até atingir o mesmo valor de absorbância, mas sem se estabilizar. A velocidade de reação pode ser acelerada na presença de um pH mais alcalino (Philip, 2011).



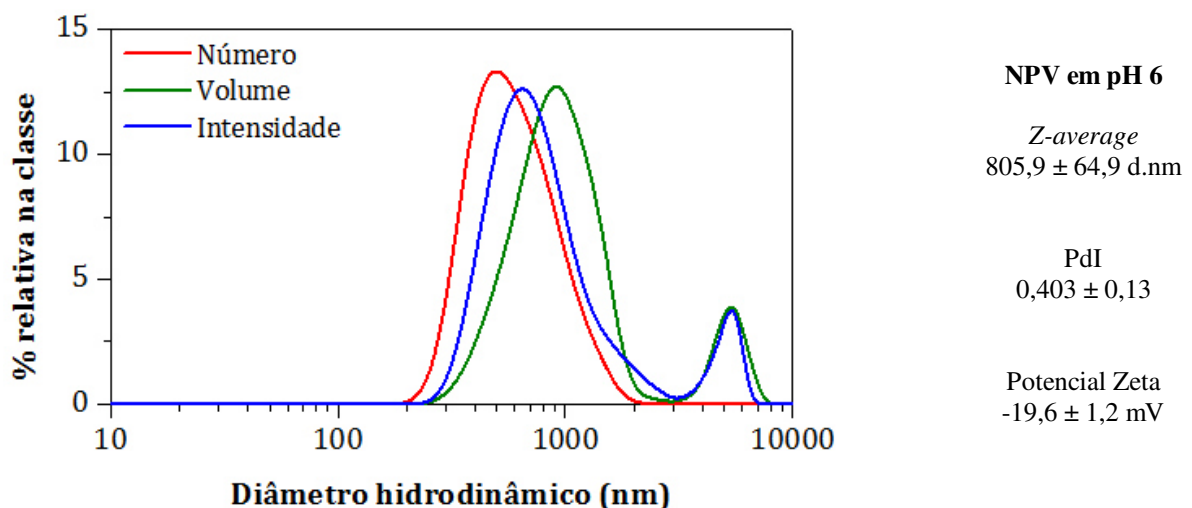
**Figura 14:** Curvas representativas da cinética de formação das nanopartículas de prata por meio das medidas de absorbância a 490 nm monitoradas ao longo da síntese utilizando tampões com os pHs variando de 4 a 8. A mistura reacional foi preparada a partir da solução de nitrato de prata (concentração final de 1 mM) com o extrato verão na concentração de 10% v/v.

Para determinar se essa diferença na curva de absorbância correspondeu a uma diferença no tamanho das NPVs em suspensão, as amostras das reações foram avaliadas por DLS. A partir dos dados obtidos, reparou-se que as NPVs formadas com pH 6 (Fig. 15) apresentaram um DH com a principal população em um máximo em 500 nm (% em número), um potencial Zeta de -19,6 mV e o PDI de 0,404.

Um alto valor de DH e PDI e um baixo potencial Zeta (em módulo) foram observados para as NPVs com tampão fosfato nos pHs 7 e 8. É possível que o fosfato tenha interagido com o nitrato de prata e formado precipitados de fosfato de prata, os quais poderiam aumentar a turbidez do meio e apresentar uma curva de absorbância mais pronunciada.

Os dados apresentados indicam que essas partículas são muito maiores em dispersão do que as NPVs formadas apenas com água ultrapura, além de apresentarem menor estabilidade coloidal, indicado pelo potencial Zeta de valor baixo. É possível que a condição tamponante tenha prejudicado a redução da prata e a estabilização das partículas, fator que ocorre especialmente por repulsão eletrostática. O uso de solução tampão diminuiu em módulo o potencial Zeta de AuNPs de -30 mV para -12 mV (Narayanan e Sakthivel, 2011). Outra possibilidade é a interferência dos íons presentes na solução tampão para o percurso da reação de síntese, sejam eles interagindo com o EV ou com o  $\text{AgNO}_3$ .

O valor do potencial Zeta vai depender do pH da solução na qual a amostra está dispersa. Para as análises de DLS as amostras foram diluídas em água ultrapura na proporção de 1:20 com o objetivo de minimizar esses efeitos. Além disso, um pH neutro ou básico tende a aumentar o valor do potencial Zeta, tornando-o mais negativo (Sathishkumar *et al.*, 2009; Salem *et al.*, 2011). Portanto, pode ser relatado que os resultados referentes ao potencial Zeta não foram alterados pelo valor do pH das reações.



**Figura 15:** Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número, volume e intensidade das nanopartículas de prata (NPVs) com tampão fosfato em pH 6 após 24 horas. À direita de cada gráfico estão os valores correspondentes às medidas de *Z-average*, PdI e potencial Zeta de superfície. A mistura reacional das NPVs foi preparada a partir da solução de nitrato de prata (concentração final de 1 mM) com o extrato verão na concentração de 10% v/v e diluída 1:20 antes de realizar as análises.

Durante a síntese verde, um pH de reação ácido tende a favorecer a agregação das NPs, enquanto que um pH básico favorece a nucleação e tende a gerar AgNPs de menor diâmetro (Akhtar *et al.*, 2013). Na maioria dos relatos da literatura, nos quais o efeito do pH é investigado, percebe-se que são utilizados água acidificada ou basificada, ao invés de um meio reacional tamponado. Krishnaraj e colaboradores (2012) monitoraram a reação de AgNPs por absorvância em diferentes pHs (2 a 13), constataram que não houve formação de AgNPs nos pHs baixos (2 e 5) e, nos pHs mais altos (9 e 11), havia um deslocamento do pico de absorvância para a faixa de 500 nm, indicando agregação das partículas (Krishnaraj *et al.*, 2012). Veerasamy e colaboradores (2011) também relataram que em pHs ácidos a formação de AgNPs não ocorreu (Veerasamy *et al.*, 2011). Ambos os trabalhos utilizaram HCl e NaOH para o ajuste do pH e portanto não podem ser diretamente relacionados com a abordagem adotada no presente estudo.

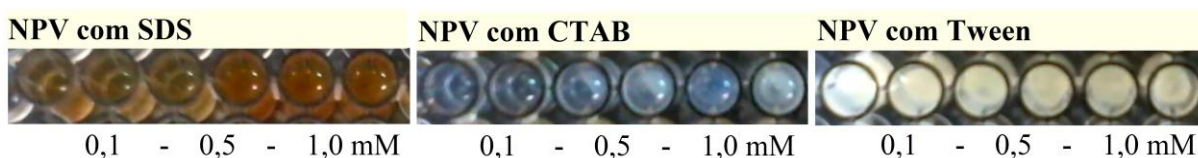
#### **4.2.3 Efeitos da presença/ausência de surfactantes**

O uso de surfactantes tem sido relatado com o potencial para acelerar e/ou estabilizar a formação das NPMs (Sharma *et al.*, 2009). Para examinar essa hipótese, foram investigados surfactantes com diferentes propriedades SDS (aniônico), CTAB (catiônico) ou Tween® (20, 40 ou 80 - neutros) via adição deles à mistura reacional no início da reação de síntese de AgNPs.

Cada surfactante apresentou um efeito diferente sobre a formação de NPVs e apenas na presença de SDS a reação adquiriu a coloração marrom avermelhada característica da formação de AgNPs (Fig. 16). De fato, a adição de SDS na concentração final de 1 mM apresentou os melhores efeitos sobre a formação de NPVs pelo monitoramento das máximas de absorvância dentre os surfactantes testados. Porém, a análise dessa amostra por DLS (Fig.

17A) mostrou que a distribuição do DH das NPVs na presença de SDS apresentou uma distribuição nas populações de partículas mais ampla do que a observada na síntese de NPVs apenas com água ultrapura, como indicado pelo PDI com o valor 0,05 maior. Adicionalmente, a adição do SDS não contribuiu para um aumento significativo na estabilidade das NPVs com relação ao potencial Zeta.

O extrato de plantas pode atuar diretamente como agente estabilizante na síntese verde de AgNPs, dispensando surfactantes adicionais ou ainda sendo superior em efeito surfactante a alguns deles (Akhtar *et al.*, 2013). Ainda assim, surfactantes aniônicos como o SDS têm sido utilizados como agentes estabilizantes em sínteses de AgNPs por métodos químicos convencionais, com o objetivo de limitar o crescimento das partículas e obter uma monodispersividade (Bae *et al.*, 2011; Vijayakumar *et al.*, 2013). Al-Thabaiti e colaboradores (2008) avaliaram o efeito de diferentes surfactantes na formação de AgNPs pela redução com ácido ascórbico e observaram que, com a adição de SDS, as AgNPs se encontravam adsorvidas e/ou aglomeradas na porção aniônica das micelas de SDS por interações eletrostáticas (Al-Thabaiti *et al.*, 2008). Desse modo, apesar dos benefícios que poderiam advir da utilização de surfactantes a nanopartículas recém-sintetizadas, nas concentrações investigadas no presente estudo não houve ganho de propriedades e ainda acarretou em agregação das AgNPs.

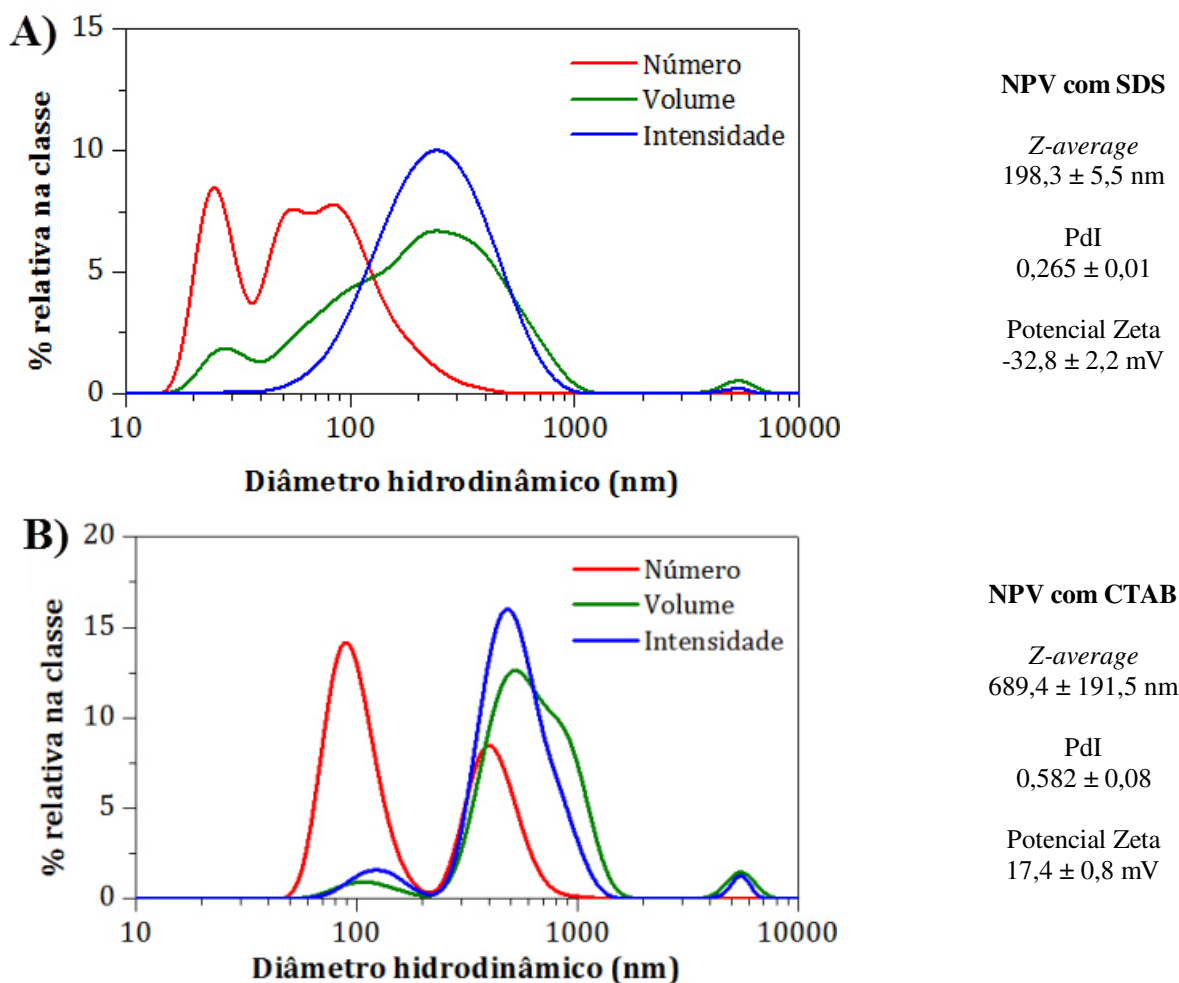


**Figura 16:** Fotos dos poços das microplacas correspondentes às misturas reacionais da síntese de nanopartículas de prata com adição de surfactantes após 24 horas. As misturas foram compostas do extrato verão na concentração de 10% (v/v), da SE de  $\text{AgNO}_3$  (concentração final de 1 mM) com a adição dos surfactantes SDS, CTAB ou Tween® (20, 40 ou 80) em duplicata nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1 mM.

Com relação ao CTAB (surfactante catiônico) não houve formação de AgNPs de acordo com o monitoramento da absorbância e com a presença de uma coloração azulada e transparente da mistura reacional com nitrato de prata (Fig. 16). As análises por DLS das amostras expostas ao CTAB (Fig. 17B) mostraram a presença de diversas classes de diâmetros entre 1 e 10.000 nm, polidispersividade alta e potencial Zeta de superfície com o valor positivo.

Dada a natureza catiônica do CTAB, é possível que haja uma interação entre o(s) composto(s) com carga negativa, como aqueles presentes no extrato aquoso das folhas de *B. gaudichaudii*, com o grupamento positivamente carregado do surfactante ( $-N^+(CH_3)_3$ ) e que a repulsão eletrostática da prata livre ( $Ag^+$ ) faça com que esta permaneça em solução, dificultando a formação de AgNPs, conforme observado em outros estudos (Al-Thabaiti *et al.*, 2008). Também foi relatado na literatura um aumento no tamanho das partículas formadas com a adição de CTAB em comparação ao uso de outros surfactantes (Al-Thabaiti *et al.*, 2008; Bae *et al.*, 2011).

Já os surfactantes Tween<sup>®</sup> 20, 40 e 80 (surfactantes neutros) não apresentaram alterações na absorbância ao longo do intervalo de tempo monitorado e a mistura reacional adquiriu a cor branca e apresentou turbidez (Fig. 16). Por esse motivo, as amostras expostas a Tween<sup>®</sup> não foram analisadas por DLS. A ausência de formação e estabilização de AgNPs na presença de surfactantes neutros, como Triton e Tween, também foi reportada em outros estudos (Al-Thabaiti *et al.*, 2008; Bae *et al.*, 2011).

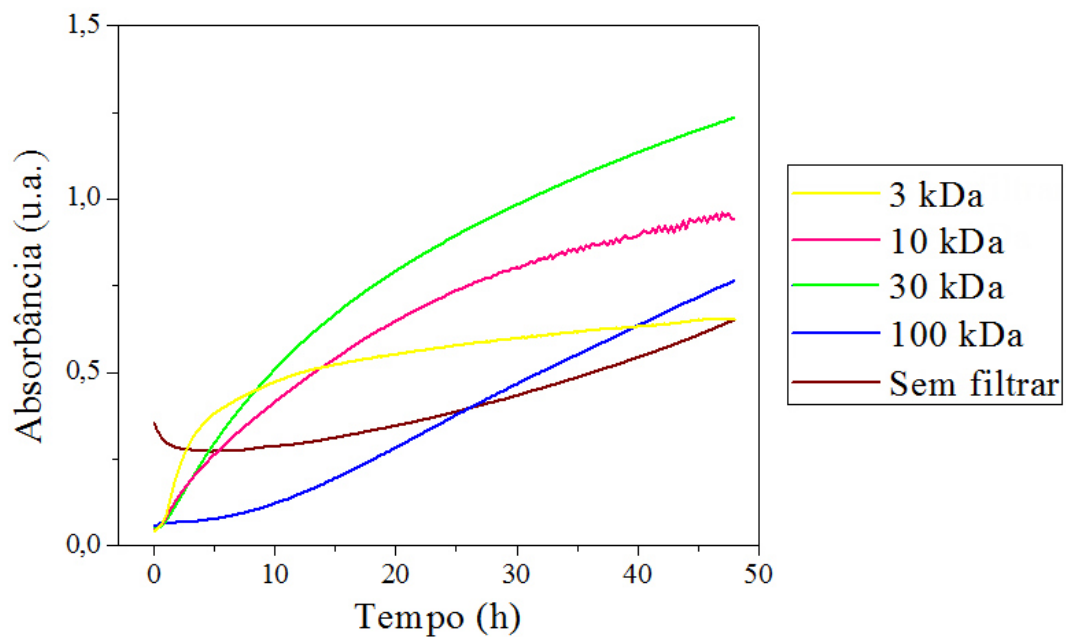


**Figura 17:** Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número, volume e intensidade das misturas reacionais para a síntese de nanopartículas de prata com a adição de SDS (A) e de CTAB (B) a 1 mM (concentração final) após 24 horas. À direita de cada gráfico estão os valores correspondentes às medidas de Z-average, PdI e potencial Zeta de superfície.

#### 4.2.5 Efeitos do fracionamento molecular dos compostos presentes no extrato

Na tentativa de verificar qual a possível faixa de massa molecular da(s) molécula(s) responsável(is) pela redução metálica, foram efetuadas filtrações por exclusão molecular do EV utilizando ultrafiltros de capacidade de 500  $\mu$ L com faixas de exclusão por massa molecular de 100 kDa, 30 kDa, 10 kDa e 3 kDa. Pode ser observado nas curvas de formação das AgNPs monitoradas por absorvância (Fig. 18) que todas as faixas de massas moleculares dos componentes presentes no EV levaram à formação de nanopartículas devido ao aumento

da absorvância, mesmo que em níveis diferentes. Dentre esses, o extrato filtrado em ultrafiltro com exclusão de 30 kDa apresentou o crescimento de AgNPs mais expressivo de acordo com as curvas de absorvância. Com exceção do extrato filtrado em ultrafiltro com exclusão de 3 kDa, todos apresentaram a máxima de absorvância superior àquela apresentada pelo extrato intacto (sem filtrar).



**Figura 18:** Curvas representativas das medidas de absorvância a 490 nm monitoradas por 48 horas de formação das nanopartículas de prata ao longo de 48 h. As legendas indicam o tamanho molecular do filtro de exclusão do extrato verão (EV), sendo que foram utilizados os filtrados, ou seja, as moléculas do EV abaixo da massa molecular indicada. A mistura reacional foi preparada a partir da solução de nitrato de prata (concentração final de 1 mM) com os diferentes EVs na concentração de 10% v/v.

Foram então realizadas medidas por DLS para determinar as possíveis diferenças no tamanho e nas propriedades de potencial Zeta de superfície das NPs sintetizadas e nos EVs e os resultados estão ilustrados na tabela 4 e na figura 19. Notou-se que a NPV formada com o extrato filtrado em filtros de exclusão de 30 kDa (EV 30 kDa) apresentou com o menor DH (em número) com uma população de apenas 16 nm. Comparando essa NP com a NPV intacta, o seu valor de Pdl foi de 0,03 menor e o potencial Zeta foi 6,4 mV menor (em módulo). Isso



indica que a polidispersividade foi um pouco menor, porém a estabilidade eletrostática foi prejudicada pela filtração, um indicativo que moléculas com massa molecular maiores do que 100 kDa possivelmente são responsáveis, pelo menos em parte, pela estabilização das NPs. Essa hipótese é corroborada pela análise dos dados referentes aos EVs controles. Observa-se que os EVs que passaram por etapas de filtração apresentaram uma diminuição pronunciada do potencial Zeta (em módulo), levando a uma baixa na estabilidade eletrostática. Esse dado é refletido pelos valores de PDI dos EVs filtrados, que aumentaram consideravelmente com relação ao EV intacto.

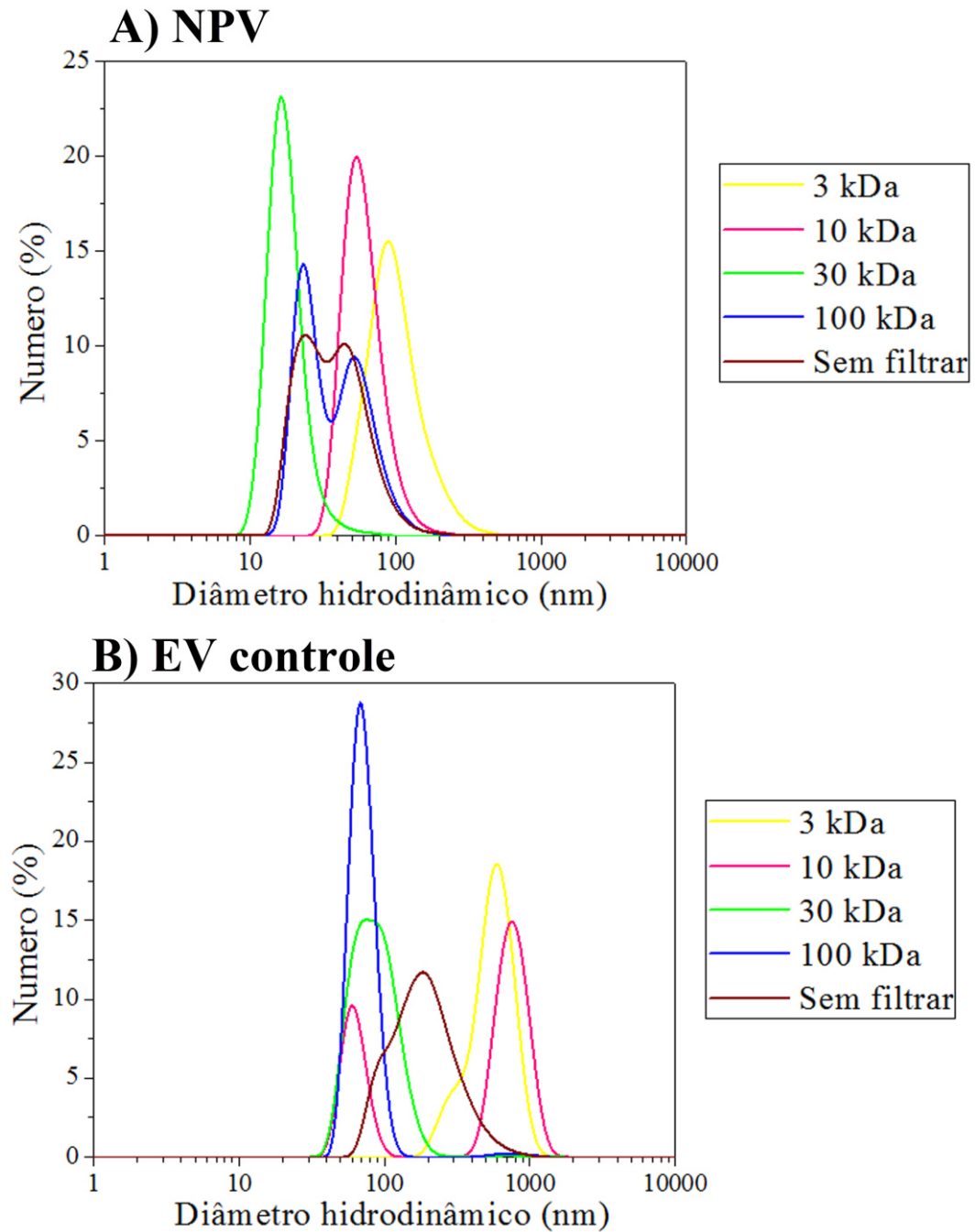
**Tabela 4:** Dados obtidos por DLS referentes ao valor do diâmetro hidrodinâmico da(s) população(s) de partículas (% em número), *Z-average*, PDI e potencial Zeta de superfície dos EVs que passaram pelos ultrafiltros de exclusão de massa molecular indicados e das NPVs sintetizadas com os respectivos extratos. Os valores estão representados como média  $\pm$  desvio padrão da média das medidas realizadas em triplicata.

Amostra	Diâmetro hidrodinâmico médio da(s) população(s) de partículas	<i>Z-average</i> (d.nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
NPV 3 kDa	88 nm	200,8 $\pm$ 5,7	0,252 $\pm$ 0,020	-27,5 $\pm$ 0,3
NPV 10 kDa	53 nm	112,1 $\pm$ 0,6	0,193 $\pm$ 0,006	-25,5 $\pm$ 1,0
NPV 30 kDa	16 nm	80,0 $\pm$ 1,1	0,232 $\pm$ 0,012	-25,7 $\pm$ 0,3
NPV 100 kDa	23 nm e 54 nm	114,1 $\pm$ 0,7	0,197 $\pm$ 0,008	-26,0 $\pm$ 0,8
NPV sem filtrar	24 nm e 45 nm	161,5 $\pm$ 8,9	0,267 $\pm$ 0,026	-32,1 $\pm$ 0,1
EV 3 kDa	602 nm	1373 $\pm$ 339	0,757 $\pm$ 0,114	-14,4 $\pm$ 4,5
EV 10 kDa	758 nm	1451 $\pm$ 198	0,670 $\pm$ 0,057	-18,2 $\pm$ 3,2
EV 30 kDa	82 nm	931 $\pm$ 283	0,708 $\pm$ 0,166	-7,1 $\pm$ 0,7
EV 100 kDa	68 nm	1346 $\pm$ 129	0,716 $\pm$ 0,027	-15,9 $\pm$ 1,2
EV sem filtrar	99 nm e 180 nm	333,5 $\pm$ 14,1	0,287 $\pm$ 0,017	-24,8 $\pm$ 1,0

De modo geral, as NPVs sintetizadas com os EVs de 100 kDa e sem filtrar apresentaram distribuições bimodais e valores semelhantes às NPVs sintetizadas anteriormente. Já as NPVs sintetizadas com os EVs de 10 e 3 kDa, diferentemente dos demais, apresentaram apenas uma única população de partículas com DHs (em número) de 53

e 88 nm, respectivamente. Sendo assim, levantou-se a hipótese de que o composto majoritário responsável pela redução de  $\text{Ag}^+$  possivelmente está abaixo dos 30 kDa e acima de 10 kDa e também que há um possível efeito sinérgico entre os compostos do extrato com diferentes faixas de massas moleculares.

A avaliação da formação de NPs por rotas de síntese verde após o fracionamento do extrato é raramente realizada na literatura. Um estudo conduzido por Chandran e colaboradores (2006) realizou a separação dos componentes moleculares do extrato de *Aloe vera* por uma membrana de diálise de 3 kDa e constatou que não houve formação de AuNPs quando se utilizou o extrato contendo moléculas com a massa molecular acima de 3 kDa (Chandran *et al.*, 2006), portanto as moléculas responsáveis pela redução do extrato também se encontravam em uma faixa de massa molecular específica.



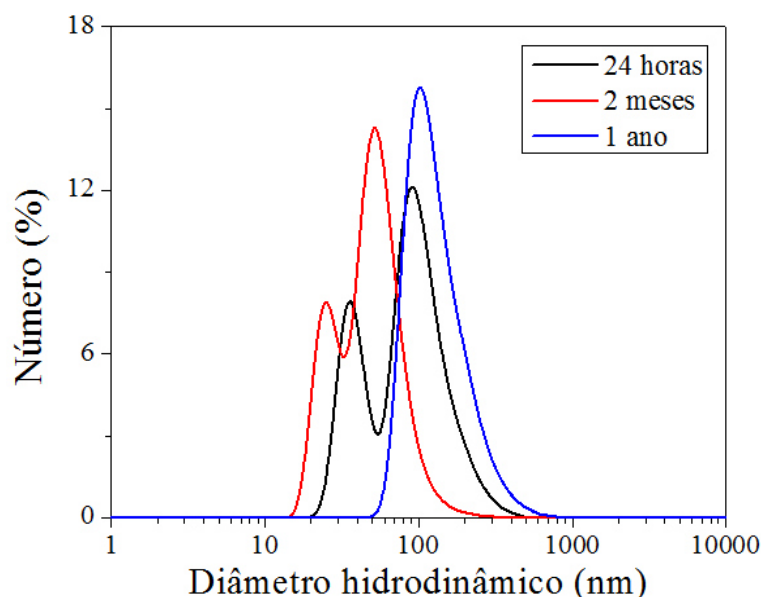
**Figura 19:** Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número obtidas por espalhamento de luz dinâmico das nanopartículas de prata (NPVs) formadas por diferentes extratos verão (EVs) filtrados em suspensão com água ultrapura (A). EVs controle nas mesmas concentrações (B). As legendas indicam o tamanho molecular do ultrafiltro de exclusão do EV, sendo que foram utilizados os filtrados, ou seja, as moléculas do EV abaixo da massa molecular indicada.

#### 4.2.6 Estabilidade das nanopartículas

Com o intuito de avaliar a estabilidade coloidal das NPVs de acordo com o tempo de armazenamento (a 4°C, com fotoproteção) foram realizadas análises por DLS da mesma mistura reacional de uma síntese de NPV após um período de 24 horas, 2 meses e um ano (Fig. 20). As NPVs apresentaram um potencial Zeta de superfície de  $-29,2 \pm 0,5$  em 24 horas,  $-29,8 \pm 0,5$  em dois meses e  $-30,8 \pm 0,6$  após um ano. Os valores de PDI foram de 0,202; 0,218 e 0,230, respectivamente.

Observando os dados de distribuição em número (%), percebe-se que as NPs passaram por um moderado processo de crescimento, seja por agregação de nanopartículas seja pela agregação de materiais (extrato ou íons) livres, e que após um ano, repara-se que há a presença de apenas uma única população, com um DH médio em cerca de 100 nm.

Durante a síntese das NPs, o evento de nucleação ocorre concomitantemente com o crescimento para rapidamente depletar a concentração de precursores no sistema reacional. Após a estabilização, o decréscimo resultante da supersaturação suprime o acontecimento de uma nucleação futura, o que faz com que apenas o crescimento seja possível. A partir dessa análise, foi possível perceber que o fenômeno de crescimento das NPVs sintetizadas nesse trabalho é um processo extremamente lento e gradual, mas que apresenta como vantagem uma estabilização prolongada das NPs. De qualquer modo, as características físicoquímicas de maneira geral foram mantidas ao longo do tempo e condições de armazenamento, mesmo em suspensão aquosa e dispensando a necessidade de liofilização, por exemplo, e que muitas vezes não possibilita uma ressuspensão adequada.

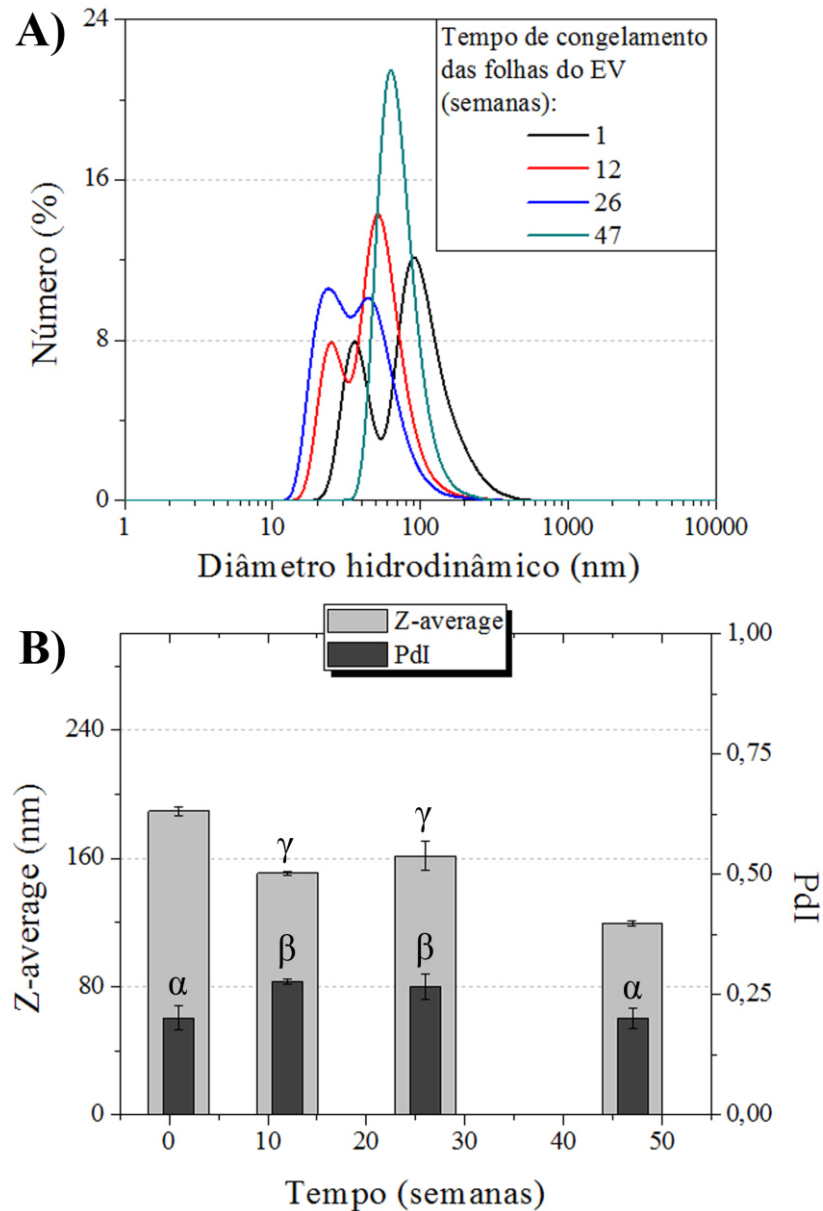


**Figura 20:** Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número obtidas por espalhamento de luz dinâmico da síntese de nanopartículas de prata de acordo com o tempo de armazenamento da mesma em suspensão aquosa a 4°C. A mistura reacional foi preparada utilizando a SE de nitrato de prata (concentração final de 1 mM) com o extrato verão na concentração de 10% v/v.

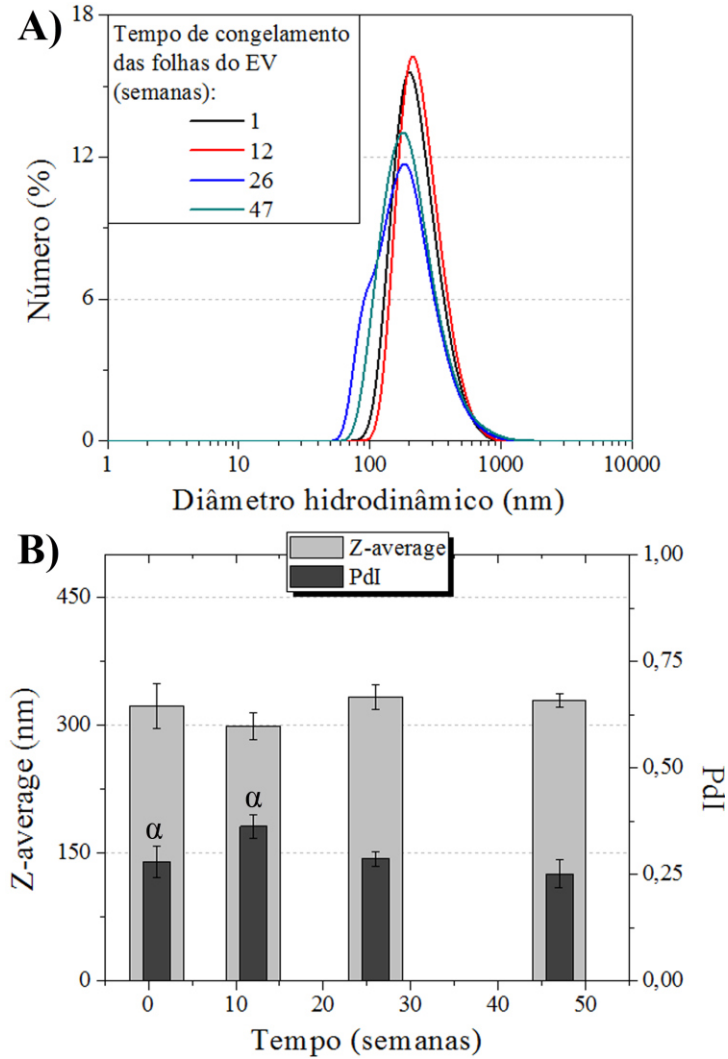
Como o EV é composto por diferentes biomoléculas, é natural que haja alguma variação nas características das AgNPs formadas em diferentes sínteses. Por esse motivo, realizou-se uma compilação dos dados de DLS das sínteses realizadas ao longo do trabalho, o que permitiu a elaboração dos gráficos da figura 21. A partir dessa análise é possível determinar a reprodutibilidade da síntese de NPVs (Fig 21) e também a estabilidade do EV controle (Fig 22) após longos períodos de congelamento das folhas.

As populações observadas para as distribuições do DH (% em número) das NPVs variaram entre 25 e 90 nm imediatamente após as sínteses. Os valores de *Z-average* e de PDI variaram entre 119,6 e 189,7 e entre 0,202 e 0,277, respectivamente. Com relação aos valores de potencial Zeta, as NPs apresentaram valor semelhante (Fig. 23), tendo sempre uma estabilidade coloidal alta, enquanto houve uma pequena diferença entre os EVs. Exceto para a primeira síntese, a diferença entre os valores de potencial Zeta das NPVs e dos EVs foi de apenas aproximadamente 7 mV (Fig. 23).

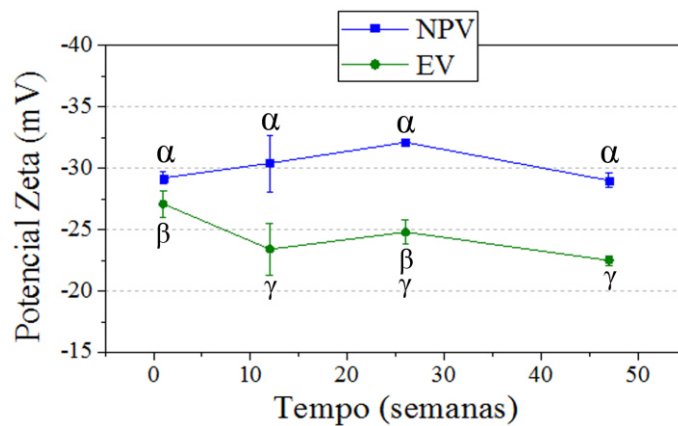
Os EVs não apresentaram diferença significativa entre os valores de *Z-average*, e a primeira síntese apresentou diferenças apenas com relação ao PDI e potencial Zeta. Desse modo, o extrato não parece ter sido afetado pelo tempo de congelamento das folhas de *B. gaudichaudii*.



**Figura 21:** Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número obtidas por espalhamento de luz dinâmico da síntese de nanopartículas de prata (A) em diferentes situações de acordo com o tempo de congelamento das folhas utilizadas no preparo do extrato verão (EV). Gráfico com as respectivas distribuições de *Z-average* e PDI (B). Símbolos iguais ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) indicam grupos cuja diferença entre os valores não é significativa ( $P > 0,05$ ).



**Figura 22:** Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número obtidas por espalhamento de luz dinâmico dos extratos verão (EVs) utilizados nas sínteses de NPV de acordo tempo de congelamento das folhas utilizadas no preparo do EV (A). Gráfico com as respectivas distribuições de *Z-average* e PDI (B). O símbolo  $\alpha$  indica o grupo que apresentou uma diferença significativa entre os valores ( $P < 0,05$ ).



**Figura 23:** Gráfico do potencial Zeta das nanopartículas de prata (NPV) sintetizadas da mesma maneira em diferentes situações com o extrato verão (EV) congelado pelo tempo indicado. Símbolos iguais ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) indicam grupos cuja diferença entre os valores não é significativa ( $P > 0,05$ ).

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA CINÉTICA DE FORMAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

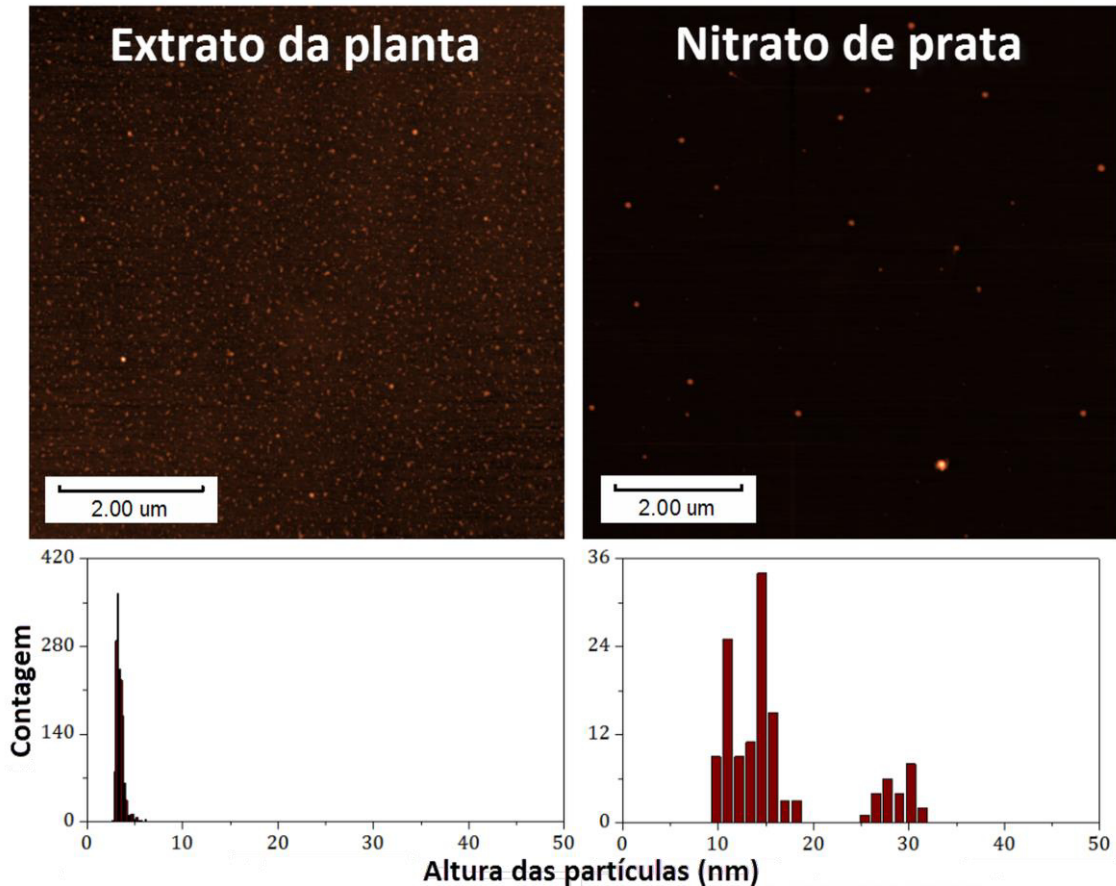
Para compreender a cinética de formação das AgNPs obtidas por essa rota de síntese verde utilizando extratos das folhas de *B. gaudichaudii*, o processo de nucleação e subsequente crescimento das NPs em dispersão aquosa, as NPVs foram analisadas por MFA em intervalos periódicos. Com fins comparativos, também foram analisados os controles do EV (na concentração de 10% v/v) e da solução de AgNO<sub>3</sub> (na concentração final de 1 mM), representados na figura 24.

Após a secagem, notou-se que o EV controle forma nanopartículas de forma esférica e tamanho uniforme com o diâmetro (altura) em torno de 3 nm. Esse dado é bastante diferente em termos absolutos do observado por DLS, um indicativo que, em dispersão os compostos do EV se organizam em agregados de partículas ou com uma extensa camada de recobrimento e/ou de solvatação. A distribuição das estruturas solução controle de AgNO<sub>3</sub> não permitiu a contagem de um número relevante de partículas (mais de 1000) para a determinação da distribuição de diâmetros pela altura, mas observou-se a presença de agregados esféricos de altura variável entre 10 e 32 nm.

A formação das NPVs acompanhada com análises a intervalos regulares por MFA está representada na figura 25. No início da reação, a população de partículas possui uma distribuição heterogênea, ao passo que com 4 horas a média de alturas está em torno de 13 nm. A partir de 8 horas de reação nota-se o surgimento de outra população, em torno de 20 nm, até a estabilização na altura em torno de 25 nm com 24 horas. Notou-se que as partículas estão constantemente se agregando e parcialmente se dissolvendo ou se dissociando no meio reacional aquoso e o tamanho geral aumenta com o tempo até atingir uma estabilização. Nessa



rota de síntese verde, a etapa de nucleação ocorre de maneira relativamente rápida, seguida de um crescimento lento e gradual.

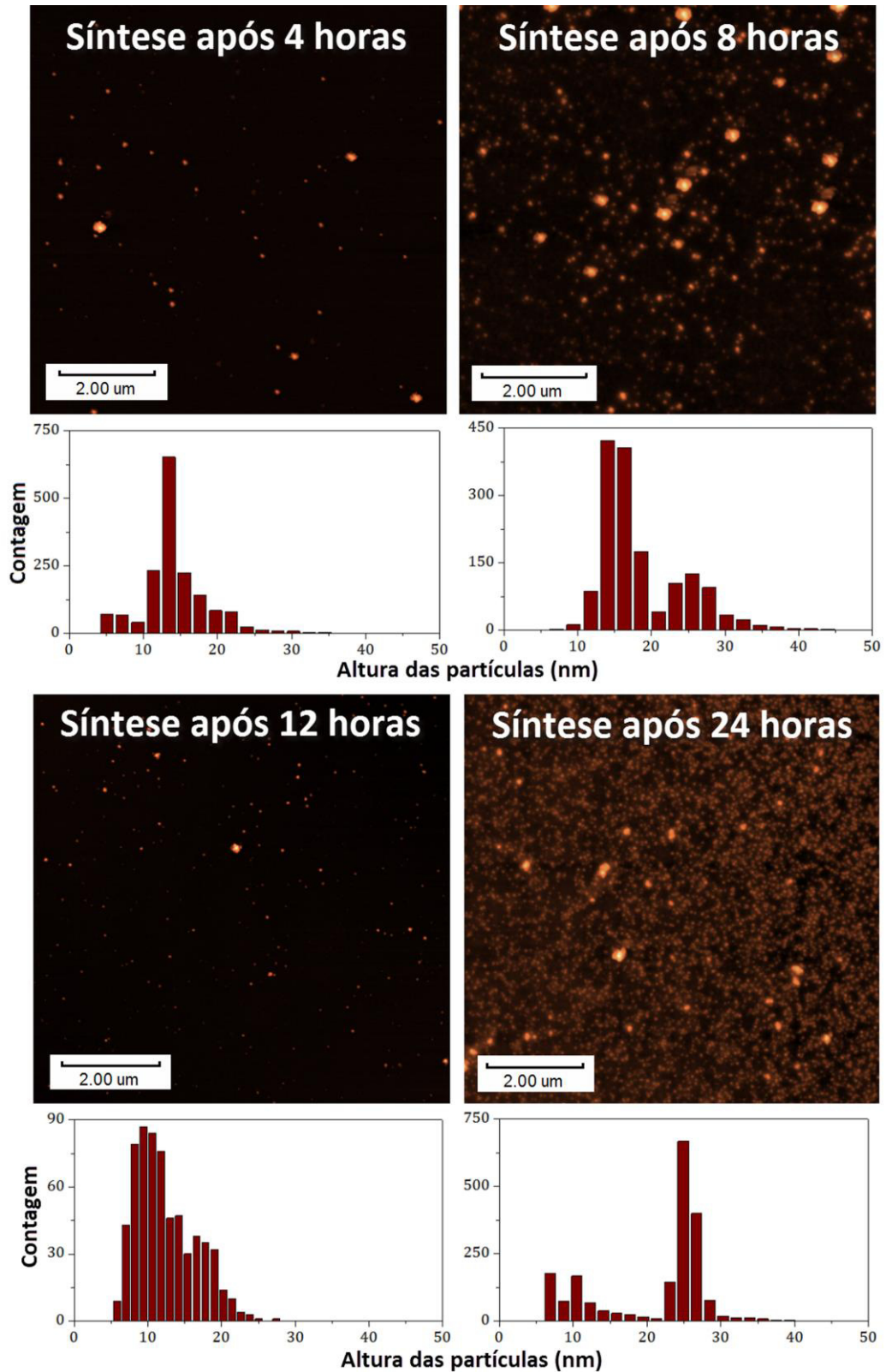


**Figura 24:** Imagens obtidas por microscopia de força atômica adquiridas em modo dinâmico a partir dos meios reacionais do extrato verão na concentração de 10% v/v (esquerda) e da solução estoque de nitrato de prata na concentração final de 1 mM (direita). Abaixo de cada imagem estão representados os histogramas de distribuição do tamanho das partículas determinados pela altura média (nm).

De maneira geral, as NPMs obtidas por síntese verde tendem a aumentar de tamanho ao longo do tempo, apresentando um crescimento lento quando comparado às sínteses químicas. Cruz e colaboradores (2010) acompanharam a cinética de formação de AgNPs por MET e observaram um aumento do tamanho médio das partículas, de  $16 \pm 5$  nm com 3 horas de reação, para  $20 \pm 5$  nm com 24 horas (Cruz *et al.*, 2010). Outro estudo relata que AgNPs sintetizadas utilizando o extrato de *Capsicum annum* L. possuíam o tamanho médio de 10

nm após 5 horas, enquanto que, com 9 horas, o tamanho aumentou para 25 nm e, com 13 horas, para 40 nm (Li *et al.*, 2007). Esse tipo de avaliação é importante dado que, ao longo da reação e de acordo com o tempo de incubação, as NPs podem variar quanto ao tamanho e quanto à forma, como já relatado na literatura para AgNPs e AuNPs (Chandran *et al.*, 2006; Begum *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010).

O fenômeno de nucleação e crescimento de partículas em dispersão coloidal foi inicialmente proposto por (Lamer e Dinegar, 1950). Esse modelo de formação de partículas foi aperfeiçoado ao longo dos anos por diversos pesquisadores e posteriormente descrito com mais detalhes por (Watzky e Finke, 1997). De modo geral, o processo de nucleação e crescimento observado para as NPVs sintetizadas segue o modelo estabelecido por LaMer. Em teoria, durante o processo de nucleação, quanto menor o tamanho da partícula, maior a energia livre de Gibbs. O componente de superfície da energia livre de Gibbs domina o componente de volume termodinâmico favorável. Quando o tamanho da partícula aumenta, esse componente de volume começa a ter maior contribuição na barreira de nucleação. A máxima dessa barreira, que ocorre no chamado “raio crítico” da partícula, representa uma fronteira na qual as NPs com dimensões menores que o raio crítico não serão termodinamicamente estáveis e, como resultado, se dissolvem. Enquanto isso, as partículas que forem maiores que o raio crítico apresentarão estabilidade termodinâmica e passarão pelo processo de crescimento. Após a nucleação inicial, a concentração ou supersaturação das espécies em crescimento diminui e a energia livre de Gibbs também reduz. Quando a concentração diminui abaixo dessa concentração específica, que corresponde à energia crítica, os núcleos não se formam mais, enquanto que o crescimento continua até que a concentração das espécies em crescimento atinja a concentração de equilíbrio ou de solubilidade.



**Figura 25:** Imagens obtidas por microscopia de força atômica adquiridas em modo dinâmico a partir da mistura reacional da síntese de nanopartículas de prata após 4, 8, 12 e 24 horas de incubação. A síntese foi realizada utilizando o extrato verão (concentração de 10% v/v) e solução de nitrato de prata (concentração final 1 mM). Abaixo de cada imagem estão representados os histogramas de distribuição do tamanho das partículas determinados pela altura média (nm).

Adicionalmente, de acordo com os presentes resultados o uso da MFA provou-se uma técnica útil na avaliação desse tipo de evento, especialmente quando se almeja interromper a reação em um momento específico para a obtenção de um tamanho de partículas definido. Vale também ressaltar a facilidade da técnica com relação ao preparo da amostra por não precisar de vácuo, mantendo as amostras em condições próximas à nativa.

#### 4.4 INFLUÊNCIA DA ESTAÇÃO DE COLETA DAS FOLHAS DE *B. GAUDICHAUDII* NA SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS

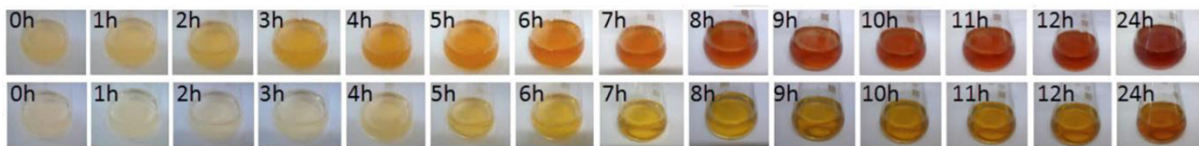
Com o objetivo de verificar se a época de coleta das folhas de *B. gaudichaudii* poderia levar a alguma alteração nas AgNPs formadas, foi realizada a síntese de NPVs e NPIs utilizando extratos de folhas coletadas da mesma planta em duas épocas do ano características no bioma Cerrado como períodos de chuvas e seca, respectivamente. Essa estratégia de coletar folhas exatamente da mesma planta visou a minimizar possíveis interferências genótípicas ou fenotípicas que não fossem simplesmente relacionadas com a estação de coleta das folhas.

O escurecimento da mistura reacional de amarelo claro para marrom utilizando o EV foi duas vezes mais rápido do que com o EI, conforme observado pela mudança visível na coloração das misturas reacionais (Fig. 26) e corroborada pelos dados correlacionados de absorvância (Fig. 27A). Isso indica que a taxa de formação das AgNPs foi maior utilizando o EV que o EI. A partir desse dado, formulou-se a hipótese de que esse é um indicativo de que metabólitos, produzidos em menor quantidade em épocas de seca, possivelmente participam das reações de redução de íons prata e a investigação desses metabólitos constitui um dos focos de interesse atual no grupo de pesquisa e fará parte de estudos futuros. Outra

possibilidade é a presença de compostos que interfiram no processo de redução, inibindo ou limitando a formação de AgNPs no caso do EI.

Um estudo conduzido por Miranda e colaboradores (1997) investigou o fluxo de carbono, água e energia sobre algumas plantas do cerrado brasileiro. Esse estudo incluiu *B. gaudichaudii* e mostrou que entre as épocas de chuva e seca existem variações nas taxas de respiração das plantas, no conteúdo de nitrogênio e carbono nas folhas e, também, que durante a seca as folhas apresentam menor condutividade de superfície (Miranda *et al.*, 1997). Outra pesquisa relatou que diferentes condições ambientais derivadas do cultivo *in vitro* versus o cultivo *in vivo* de *B. gaudichaudii* levam a diferenças na estrutura foliar da planta, podendo alterar seu perfil fitoquímico (Fidelis *et al.*, 2000).

Desta maneira, é importante ressaltar que a época de coleta, bem como outros fatores (como o local e as condições da planta), podem alterar a morfologia e o perfil fitoquímico de diferentes órgãos da planta, de modo que essas alterações possam influenciar de forma significativa a produção e as características das NPMs sintetizadas pelas rotas de síntese verde. Esse fator é geralmente negligenciado e as condições da planta e dos seus órgãos utilizados no preparo do extrato são raramente relatadas na literatura.



**Figura 26:** Fotos dos Erlenmeyers contendo misturas reacionais correspondentes às nanopartículas de prata sintetizadas com o extrato verão (acima) e com o extrato inverno (abaixo) ao longo de 24 horas de reação. Para a síntese, utilizou-se o extrato na concentração de 10% v/v e nitrato de prata na concentração final de 1 mM.

Adicionalmente, foram monitorados os valores de pH e de condutividade elétrica (CE) ao longo do curso das reações de síntese de NPVs e NPIs. Uma diminuição do pH do meio reacional foi observada em aproximadamente 0,86 com o EV e em 0,82 com o EI (Fig. 27B)

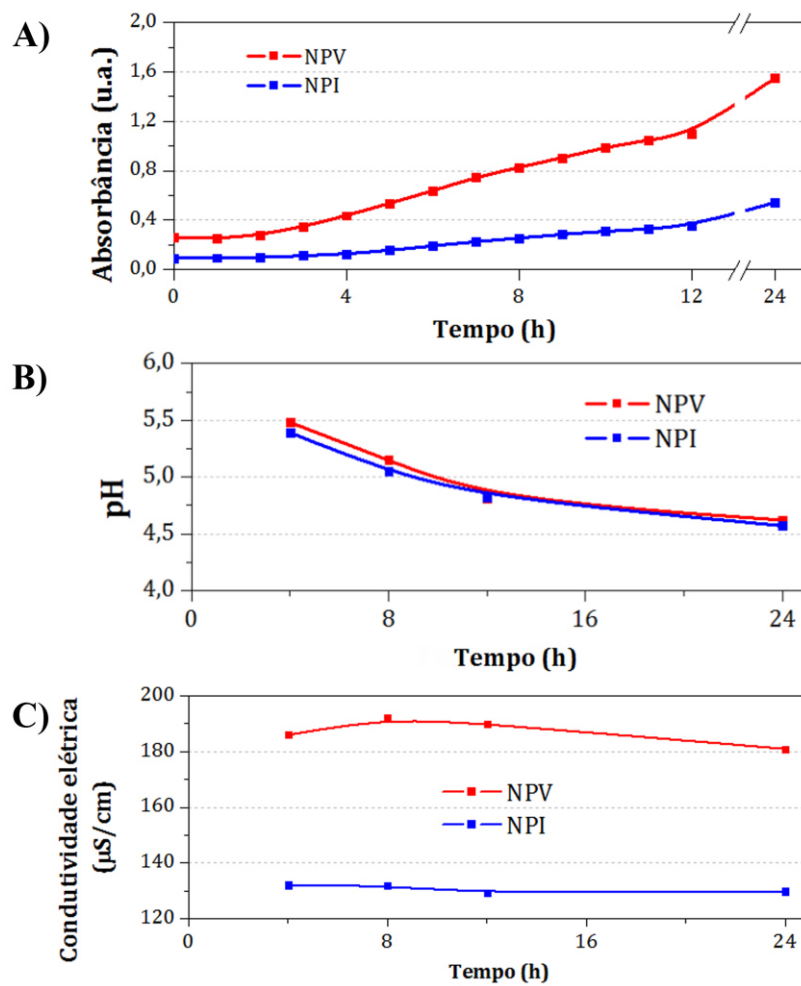
ao longo de 24 horas. Sathishkumar e colaboradores (2009) também relataram uma diminuição semelhante no pH da reação de AgNPs por uma rota de síntese verde ao longo da reação para uma faixa de pHs de 1 a 11 (Sathishkumar *et al.*, 2009).

A CE, por outro lado, permaneceu inalterada ao longo do período monitorado e foi aproximadamente 40% maior nas NPVs do que nas NPIs (Fig. 27C). Entretanto, a CE do EV controle foi de 65,9  $\mu\text{S}/\text{cm}$  e a do EI controle foi de 20,0  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . A CE da solução controle de  $\text{AgNO}_3$  na concentração final de 1 mM foi de 107,6  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . A partir desses dados observa-se que as CEs das NPs sintetizadas apresentaram o valor da soma das CEs da solução dos controles e não estão relacionados ao aumento da condutividade devido à presença das AgNPs. Esses dados contrastam com o observado por (Bonatto e Silva, 2014) no qual a mistura reacional apresentou aumento da CE ao longo da reação de formação de AgNPs por síntese verde utilizando extratos aquosos de castanhas de caju como material biológico. Essas diferenças de efeitos de diferentes tipos de materiais vegetais e espécies sobre a CE devem ser relacionadas a características de composição molecular específicas e as quais precisam ser investigadas caso a caso.

A partir das diferenças observadas nas análises de absorvância, pH e CE, foi realizada a análise das amostras NPV, NPI, EV e EI por DLS com o intuito de verificar se elas apresentavam alguma variação quanto ao DH e ao potencial Zeta de superfície devido ao período de coleta das folhas utilizadas para preparação dos extratos. Os resultados estão apresentados na Tabela 5 e na figura 28.

Dentre os extratos, nota-se que o EI apresenta, em número, estruturas muito menores que o EV, com duas populações com o DH (em número) com média de 6 e de 35 nm, além de um potencial Zeta com maior valor em módulo (-30 mV). Dentre as nanopartículas, as NPIs apresentaram uma única população de acordo com o DH (em número) com a média de DH

obtido pelo número de nanopartículas de aproximadamente 37 nm, enquanto que as NPVs apresentaram novamente duas populações, uma com uma em média de 25 nm e a outra de 51 nm. Coincidentemente, o DH das NPIs é praticamente o mesmo de uma das populações do EI, o que pode contribuir para o aumento na intensidade da porcentagem em número dessa população de partículas. Os valores de PDI em torno de 0,27 foram semelhantes para as duas amostras, indicando uma polidispersividade moderada.



**Figura 27:** Curvas cinéticas de monitoramento das misturas reacionais das nanopartículas de prata sintetizadas com o extrato verão (NPVs, em vermelho) e com o extrato inverno (NPIs, em azul) sendo apresentadas a absorvância medida a 450 nm (A), a variação do pH (B) e a condutividade elétrica (C) durante o curso das reações por 24 horas. Para a síntese, utilizou-se o extrato na concentração de 10% v/v e nitrato de prata na concentração final de 1 mM.

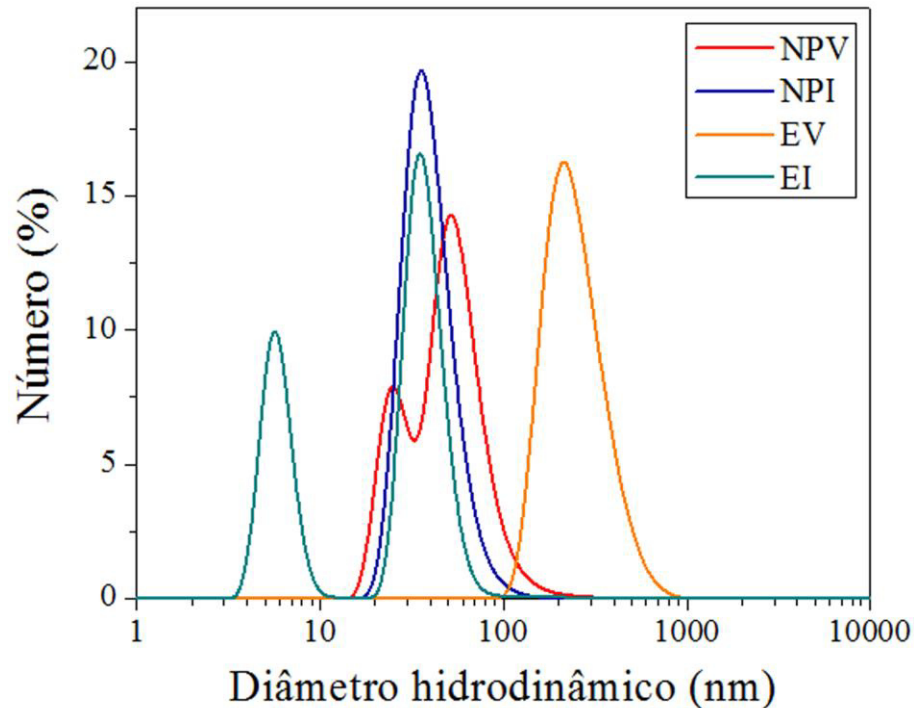
**Tabela 5:** Dados obtidos por DLS do diâmetro hidrodinâmico da(s) população(s) de partículas (% número), *Z-average*, PdI e potencial Zeta de superfície referentes as nanopartículas de prata sintetizadas com o extrato verão EV (NPVs) e com o extrato inverno EI (NPIs). Os valores estão representados como média  $\pm$  desvio padrão da média das medidas realizadas em triplicata.

<b>Amostra</b>	<b>Diâmetro hidrodinâmico da(s) médio da(s) população(s) de nanopartículas</b>	<b><i>Z-average</i> (d.nm)</b>	<b>PdI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
<b>NPV</b>	25 e 51 nm	150,7 $\pm$ 0,8	0,277 $\pm$ 0,006	-30,4 $\pm$ 2,3
<b>NPI</b>	37 nm	82,4 $\pm$ 0,6	0,271 $\pm$ 0,003	-29,6 $\pm$ 4,5
<b>EV</b>	215 nm	299,0 $\pm$ 15,8	0,363 $\pm$ 0,028	-23,4 $\pm$ 2,1
<b>EI</b>	6 e 35 nm	232,1 $\pm$ 3,4	0,378 $\pm$ 0,026	-30,4 $\pm$ 3,0

Em suma, as NPVs e NPIs possuem tamanhos semelhantes em solução (da ordem de dezenas de nanômetros), mas o processo de formação das partículas é claramente diferenciado e as NPIs possuem uma única população de partículas, enquanto que as NPVs possuem duas populações. Ambas as NPVs e NPIs possuem estabilidade coloidal moderada, como indicado pelo potencial Zeta de superfície de -30,4 e -29,6 mV, respectivamente.

Suplementarmente, avaliou-se a capacidade de formação de AgNPs do EV após uma etapa de congelamento do extrato. Dados obtidos pela análise dessa amostra por DLS após 24 horas de reação indicou um *Z-average* de 147,7  $\pm$  2,0 d.nm, PdI de 0,216  $\pm$  0,01 e potencial Zeta de -27,1  $\pm$  0,7 mV. A CE dessa amostra foi de 67,5  $\mu$ S/cm e todos esses resultados foram muito semelhantes aos obtidos pelo extrato recém preparado (antes do congelamento), o que indica que essa etapa não inativa ou altera o(s) composto(s) ativo(s) na redução do sal metálico e estabilização das nanopartículas.



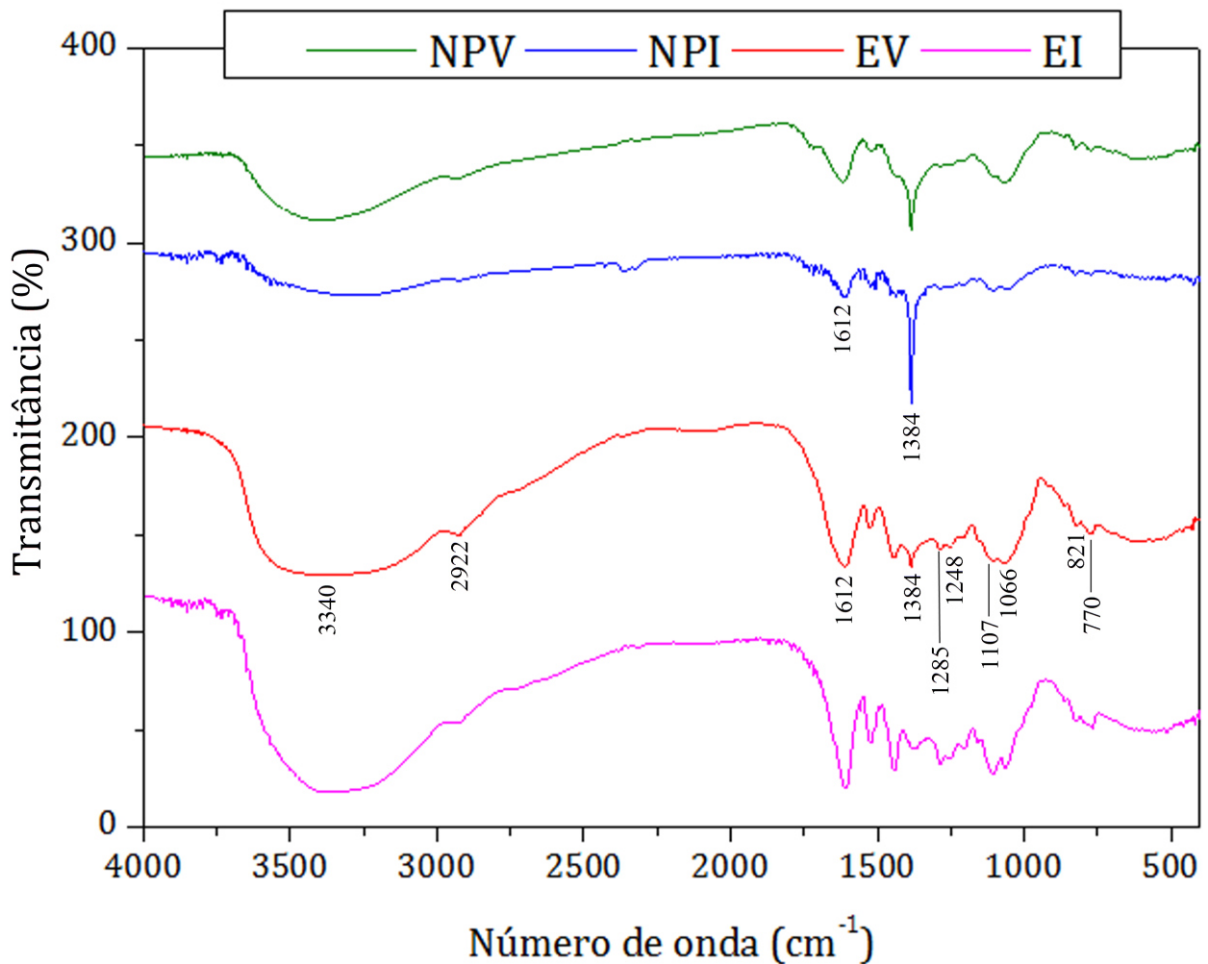


**Figura 28:** Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número obtidas por espalhamento de luz dinâmico das nanopartículas de prata sintetizadas com o extrato verão EV (NPVs) e com o extrato inverno EI (NPIs). Para a síntese, utilizou-se o extrato na concentração de 10% v/v e nitrato de prata na concentração final de 1 mM.

#### 4.5 ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Apesar da formação e estabilização das AgNPs sintetizadas ocorrer por meio de um processo de síntese relativamente simples (etapa única), é um fenômeno quimicamente complexo, pois o extrato das folhas de *B. gaudichaudii* possivelmente apresenta diversas biomoléculas, como flavonoides, polissacarídeos, compostos fenólicos, ácidos orgânicos, e proteínas, como relatado na literatura (Lourenço, 2001; Jacomassi *et al.*, 2007). Sendo assim, foram realizadas análises das NPVs, NPIs e dos controles EV e EI para investigar a possível presença/ausência de diferentes grupos funcionais. Os resultados dessa análise por FTIR estão ilustrados na figura 29.

Como as amostras não passaram por etapas de purificação do extrato de *B. gaudichaudii*, a interpretação dos espectros foi realizada de modo a comparar os espectros obtidos para os extratos aquosos das folhas (EV e EI) com os espectros das AgNPs sintetizadas a partir desses extratos (NPV e NPI). Inicialmente, percebe-se que os extratos são bastante semelhantes, apresentando os mesmos picos e bandas de absorção, com pequenas diferenças entre as intensidades. O mesmo vale para as AgNPs obtidas as quais assemelharam bastante entre si sob o ponto de vista dos espectros obtidos.



**Figura 29:** Espectros obtidos por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier das nanopartículas de prata sintetizadas com o extrato verão EV (NPVs) e com o extrato inverno EI (NPIs), além de seus respectivos controles (extratos). Para a síntese, utilizou-se o extrato na concentração de 10% v/v e nitrato de prata na concentração final de 1 mM. Para a análise, as amostras foram prensadas em pastilhas de KBr.

Ao observar os espectros dos extratos controle, percebe-se a presença proeminente dos picos/bandas 3340, 1612, 1107 e 1066 com maior intensidade de absorção. A banda larga a 3340  $\text{cm}^{-1}$  é característica do grupo funcional hidróxi, presente em água, álcoois e compostos fenólicos. Os picos a 821 e 770  $\text{cm}^{-1}$  representam a vibração C-H em anéis aromáticos (Chandran *et al.*, 2006) e o pico a 1612  $\text{cm}^{-1}$  se refere a grupamentos carbonila, possivelmente de polifenóis (Jayaseelan e Rahuman, 2012) ou carboidratos. Já as bandas 1066 e 1107  $\text{cm}^{-1}$  podem ser atribuídas ao estiramento vibracional de C-O-C e C-O em compostos fenólicos, como já relatado para AgNPs obtidas em síntese verde (Cruz *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2010).

Nos espectros correspondentes às NPVs e NPIs notou-se a ocorrência de uma diminuição notável na intensidade dos picos/bandas em 3340, 1612, 1066 e 1107  $\text{cm}^{-1}$ , quando comparados aos espectros dos respectivos extratos EV e EI. Esse fato indica que esses grupamentos podem ser diretamente responsáveis pela redução do íon metálico, mas a averiguação da identidade molecular dessas substâncias ainda precisa ser realizada. De qualquer modo, esses picos/bandas são menos expressivos no espectro das NPI do que nas NPV, o que pode ser um indicativo da presença desses grupamentos em menor quantidade no EI do que no EV, ainda que sendo necessárias ressalvas nesse tipo de constatação. Esse fenômeno colabora com a hipótese de que metabólitos presentes no extrato aquoso das folhas de *B. gaudichaudii* são responsáveis pela redução da prata e estão presentes em maior abundância no EV do que no EI, contribuindo para que a síntese de NPVs seja mais rápida do que a das NPIs.

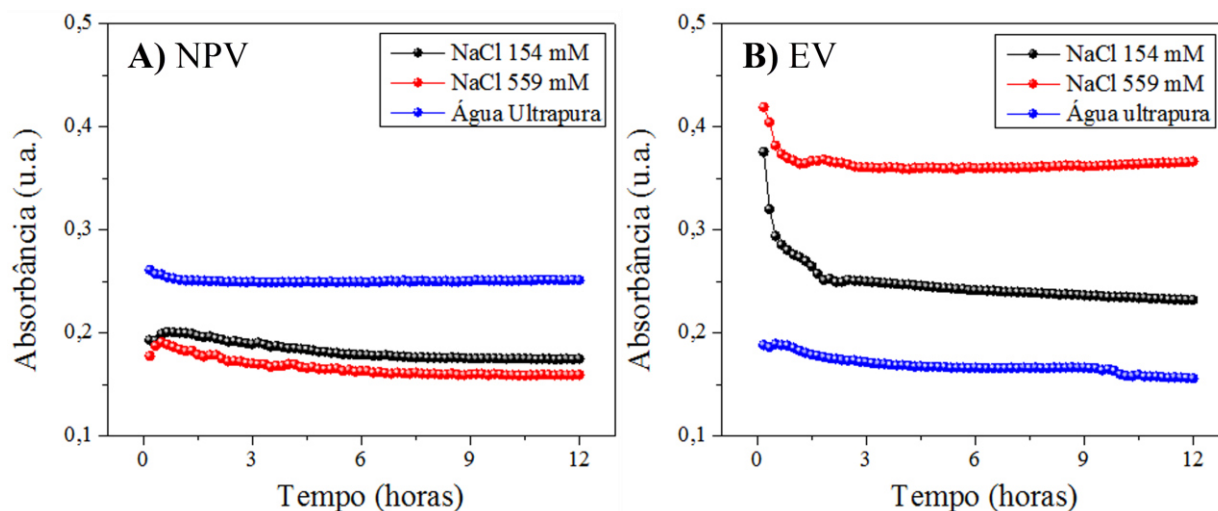
Além da diminuição da intensidade de alguns picos, notou-se também a presença do pico a 1384  $\text{cm}^{-1}$  em alta intensidade. Esse pico pode ser atribuído à presença de  $\text{NO}_3$  residual da solução de  $\text{AgNO}_3$ , como reportado em outro estudo (Cruz *et al.*, 2010) e de fato foi observado em alta intensidade apenas nas amostras contendo originalmente nitrato de prata.

#### 4.6 PERFIL DE DISSOLUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS EM MEIO SALINO

Uma vez que NPs entram em um sistema com um meio diferente daquele no qual foi sintetizada/armazenada, seu comportamento estará intimamente relacionado com a sua estabilidade coloidal e com a possibilidade de os componentes ali presentes afetarem o seu estado de agregação, se a partícula permanece em suspensão ou se o processo leva à sua dissolução (Li *et al.*, 2010).

Dessa forma, no presente estudo almejou-se avaliar o comportamento das NPVs em meio salino a partir da análise da mistura reacional das NPVs dispersas em soluções com várias concentrações de NaCl, de forma a mimetizar desde a concentração salina fisiológica de 0,9% (154 mM de NaCl) até uma concentração que mimetiza a água do mar (559 mM de NaCl), sempre em pH neutro.

Inicialmente as dispersões foram avaliadas de acordo com as absorvâncias a 490 nm (Fig. 30). Observou-se que as NPVs, na presença das soluções de NaCl e na presença de água ultrapura, não apresentaram alterações quanto aos perfis de absorvância. Caso as AgNPs se agregassem ou dissolvessem, seria esperada alteração nesses perfis, decorrente da diminuição do efeito de ressonância plasmônica de superfície das AgNPs. Já com os EVs controles, observou-se que, nas 3 horas iniciais houve uma pequena diminuição da absorvância quando em soluções de NaCl, mais pronunciadas em menores concentrações do sal.

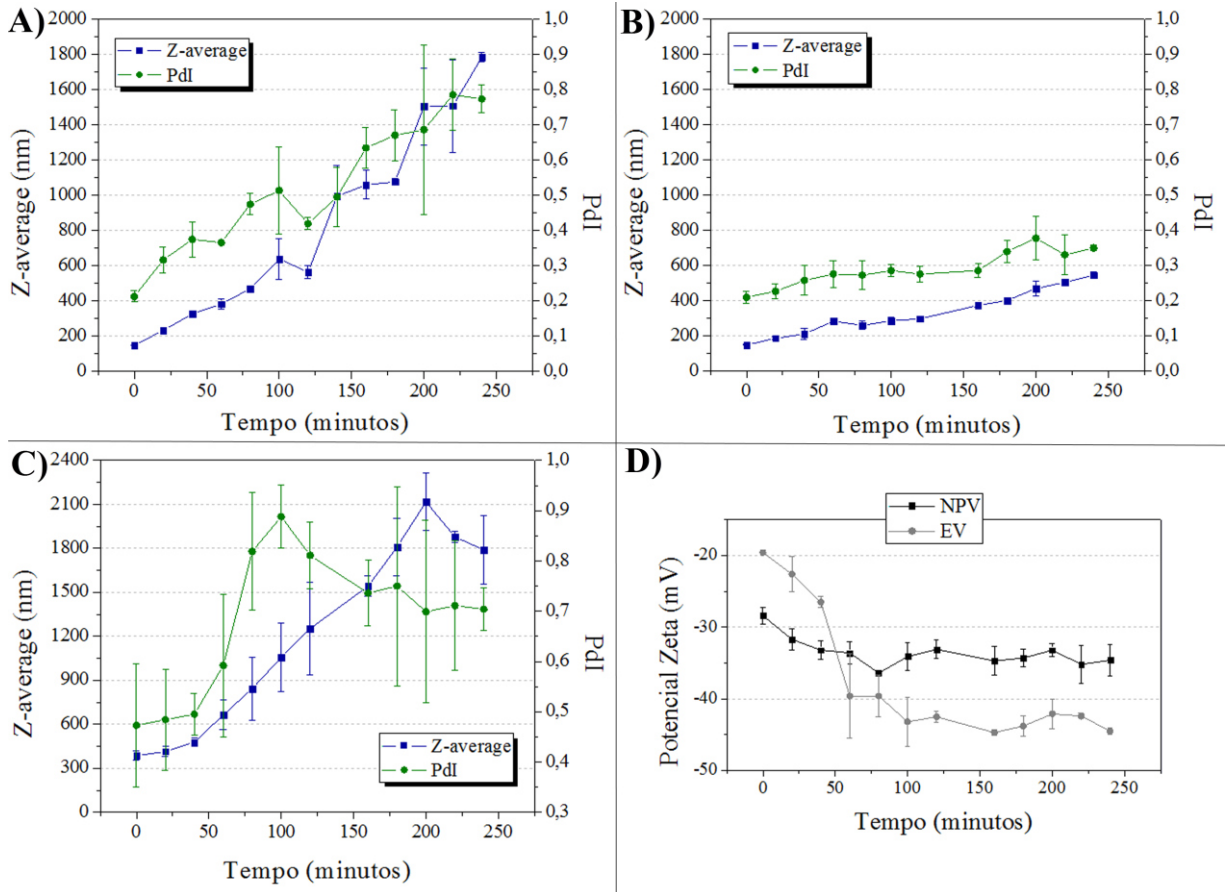


**Figura 30:** Medidas de absorbância a 490 nm das nanopartículas de prata (NPV) e do extrato verão (EV) dispersos nas soluções de NaCl 154 mM, NaCl 559 mM e água ultrapura monitoradas ao longo de 12 horas. Para a síntese das NPVs utilizou-se o EV na concentração de 10% v/v e nitrato de prata na concentração final de 1 mM.

Para investigar esse evento, foram realizadas análises periódicas por DLS das NPVs e do EV em meio salino fisiológico por 4 horas (Fig 31). Para as NPVs com NaCl 154 mM, ao longo do tempo ocorreu um aumento progressivo dos valores de *Z-average* e PdI de 148 a 1785 d.nm, e de 0,213 a 0,774, respectivamente, enquanto os valores de potencial Zeta permaneceram em torno de -33 mV (Fig. 31D). Já com NaCl a 559 mM, o aumento do tamanho médio e da polidispersividade foram menos expressivos, sendo de 148 a 546 d.nm para o *Z-average* e de 0,210 a 0,315 para o PdI (Fig. 31B).

As análises por DLS feitas para o EV em solução de NaCl 154 mM (Fig. 31C) foram muito semelhantes ao das NPVs. De forma que, juntamente com os dados de absorbância, é possível que esse aumento do tamanho da mistura reacional das NPVs tenha sido decorrente do aumento do EV livre presente na mistura reacional das NPVs. Notavelmente, ao observar os valores de potencial Zeta de superfície obtidos para as duas reações é possível perceber que durante as 4 horas de reação, o valor observado para as NPVs sofreu apenas uma pequena

alteração (de -28,4 para -34,6 mV) possivelmente relacionada com mudanças nos valores de potencial Zeta do EV controle, que passou de -19,6 para -44,5 mV ao longo da reação.



**Figura 31:** Gráficos das análises de Z-average e PDI obtidos por espalhamento de luz dinâmico ao longo de 4 h de monitoramentos das reações de dissolução das nanopartículas de prata (NPV) em NaCl 154 mM (A), em NaCl 559 mM (B) e do extrato verão (EV) em NaCl 154 mM (C). Gráfico dos dados de potencial Zeta obtidos a partir dos resultados das reações de A e C (D). Para a síntese das NPVs utilizou-se o EV na concentração de 10% v/v e nitrato de prata na concentração final de 1 mM.

Li e colaboradores (2010) examinaram a possível dissolução de AgNPs por DLS em diferentes concentrações de NaCl e perceberam que o DH das AgNPs passou de 60 para 140 d.nm em apenas 12 minutos de reação com NaCl nas concentrações de 40, 50 e 200 mM. Já para concentrações de NaCl de 10 e 20 mM, os mesmos autores observaram que o diâmetro permaneceu constante a 80 nm (Li *et al.*, 2010). No presente trabalho observou-se o contrário,

onde o DH sofreu menos variação com a maior concentração de NaCl, entretanto com valores bem diferentes daqueles avaliados por Li e colaboradores (2010). Levando todos os eventos em consideração, é provável que os efeitos observados para as NPVs sejam decorrentes da interação entre as biomoléculas do EV e os íons sódio e/ou cloro presentes na solução, e não de qualquer evento de dissolução das AgNPs.

#### 4.7 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

A preocupação com a toxicologia de sistemas nanoestruturados tem sido uma área de interesse crescente. O emprego de ensaios de viabilidade celular *in vitro* consiste no passo inicial para a determinação da toxicologia das NPs porque permite prever a possível resposta celular às NPs, definindo o potencial para seu uso em diversas aplicações, especialmente na área de biomedicina (Albrecht *et al.*, 2006; Yildirimer *et al.*, 2011).

Com esse objetivo, foram investigados os efeitos das AgNPs sintetizadas e dos EV e EI utilizados na síntese dessas partículas em diversos sistemas biológicos. A determinação da viabilidade celular *in vitro* foi realizada por meio do ensaio colorimétrico utilizando MTT. De modo geral, as células de escolha são cultivadas e submetidas ao contato com as amostras que se deseja testar e com os respectivos controles. Após um período de tempo pré-determinado, é aplicada uma solução contendo MTT que, por sua vez, é internalizado pela célula e metabolizado por enzimas mitocondriais, resultando na formação de cristais de formazan. Esses cristais possuem uma cor azul-púrpura característica e a sua presença indica que há a respiração celular e esse fato é então correlacionado a viabilidade celular. Desse modo, pode-se quantificar a presença de cristais de formazan (posteriormente dissolvidos) por espectrofotometria e os dados obtidos são proporcionais à quantidade de células viáveis.

#### 4.7.1 Células eucarióticas tumorais e não tumorais

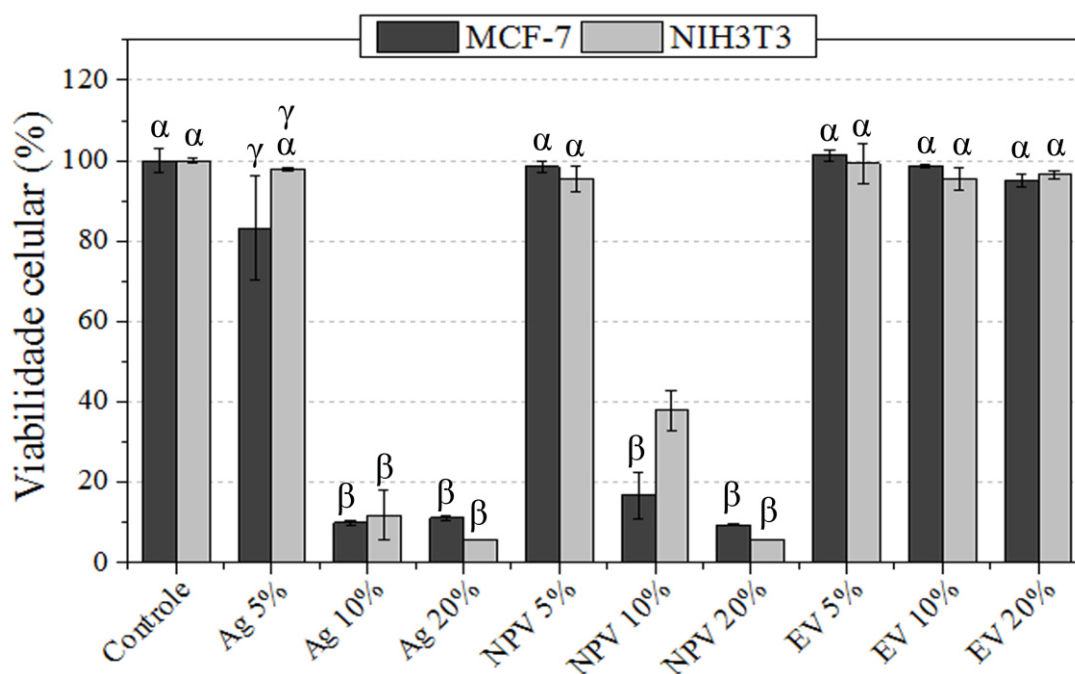
Os ensaios de viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico MTT com células eucarióticas não tumorais da linhagem NIH3T3 (fibroblasto murino) e tumorais da linhagem MCF-7 (células de câncer de mama humano) foram realizados com o intuito de verificar a possível citotoxicidade do EV e das NPV em células eucarióticas quando comparados ao efeito do controle negativo e da prata livre (Ag). Assim, foi possível estimar se as NPVs teriam influência em eventuais aplicações biológicas, além de determinar se há alguma resposta diferenciada para as células tumorais. Os resultados estão apresentados na figura 32.

Os EVs, nas três concentrações testadas, não afetaram a viabilidade das duas linhagens celulares de mamíferos e apresentaram efeitos semelhantes ao controle negativo (Fig. 32). Um estudo desenvolvido com o extrato das raízes de *B. gaudichaudii* detectou atividade citotóxica para células de carcinoma epidermóide humano de nasofaringe (*in vitro*) e para leucemia linfocítica P388 em camundongos (*in vivo*), porém essa atividade foi relacionada ao alto teor de furanocumarinas, presentes em abundância na raiz da planta, mas não em partes aéreas (Pozetti, 2005). Lourenço (2001) constatou que o extrato metanólico das folhas de *B. gaudichaudii* possui menos de 1% de psoraleno e bergapteno. Dessa forma, pode-se sugerir que a baixa toxicidade do EV atribui-se à presença escassa de compostos com potenciais atividades citotóxicas nas concentrações avaliadas no presente estudo (Lourenço, 2001).

A prata livre (Ag), nas concentrações de 50  $\mu$ M e 0,1 mM (Ag 10% e Ag 20%), promoveu uma diminuição da viabilidade celular de linhagens NIH3T3 e MCF-7 (Fig. 32). A prata livre possui um efeito citotóxico bem caracterizado. É importante ressaltar que não houve diferenças significativas entre a resposta das linhagens celulares (MCF-7 e NIH3T3) para cada concentração de AgNO<sub>3</sub>, o que indica que não houve especificidade da citotoxicidade da prata livre quanto aos tipos celulares testados. Na menor concentração de 25



$\mu\text{M}$  ( $\text{Ag}$  5%), o  $\text{AgNO}_3$  e as NPVs apresentaram efeitos semelhantes ao controle negativo ( $P>0,05$ ).



**Figura 32:** Histogramas de viabilidade celular das linhagens NIH3T3 (fibroblasto murino) e MCF-7 (células de câncer de mama humano) obtidos no ensaio colorimétrico de MTT na presença das nanopartículas de prata e dos devidos controles. O eixo X representa as amostras testadas e suas respectivas diluições. As amostras foram testadas nas diluições de 5%, 10 e 20% v/v em 200  $\mu\text{L}$  a partir das misturas de síntese, com concentrações de  $\text{AgNO}_3$  equivalentes a 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  e 0,1 mM, respectivamente. Símbolos iguais ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ) indicam grupos cuja diferença entre os valores não é significativa ( $P>0,05$ ). Controle: água ultrapura; Ag: solução de nitrato de prata (concentração inicial de 1 mM); EV: extrato verão; NPV: nanopartículas de prata sintetizadas utilizando-se o EV na concentração de 10% v/v e nitrato de prata na concentração final de 1 mM.

As NPVs, de maneira similar ao  $\text{AgNO}_3$ , promoveram uma diminuição da viabilidade celular das duas linhagens nas concentrações de 10% e 20% (Fig. 32). Entretanto, para as NPVs na concentração de 10%, a linhagem NIH3T3 apresentou a viabilidade celular aproximadamente 21% maior que as células MCF-7, com uma diferença significativa entre as medidas ( $P=0,0009391$ ).

A partir desses resultados obtidos nas linhagens de mamíferos, é importante destacar que as AgNPs obtidas estão de acordo com os princípios almejados pela química verde, que

visam a utilização de um solvente benigno ao meio ambiente e que o(s) redutor(es) do sal metálico não apresentem toxicidade (Albrecht *et al.*, 2006). O processo de síntese se apresenta, portanto, como uma alternativa eco-amigável, de custo baixo e sustentável para a produção de AgNPs. Quanto ao potencial uso dessas AgNPs em aplicações biomédicas, a mesma ainda precisa ser avaliada em outros ensaios *in vitro* e também por meio de investigações *in vivo*. De qualquer modo uma possibilidade seria a veiculação ativa a células específicas, por meio de moléculas de reconhecimento, diminuindo a eventual toxicidade a células normais. Essas abordagens serão investigadas em estudos futuros.

#### **4.7.2 Bactéria *Escherichia coli***

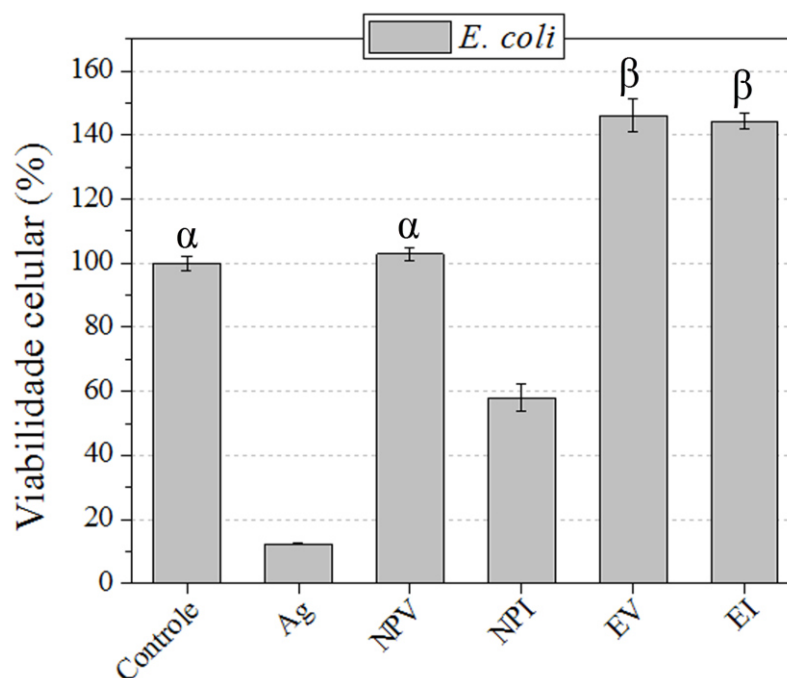
O ensaio de viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico MTT foi realizado com a bactéria *E. coli*, utilizando a cepa XL1-Blue. Os efeitos das NPV, NPI, EV e EI foram testados para avaliar se há alguma diferença entre a possível atividade antimicrobiana das partículas com relação à época de coleta das folhas com as quais foi produzido o extrato utilizado na síntese. Os resultados estão ilustrados na figura 33 e comparados com o controle negativo e com o AgNO<sub>3</sub> (prata livre – referida como Ag).

No presente experimento, observou-se que o EV e o EI favoreceram o crescimento celular de maneira semelhante, aumentando a viabilidade de *E. coli* em aproximadamente 40% (Fig. 33). Portanto, sugere-se que os extratos das folhas de *B. gaudichaudii* forneceram compostos que favoreceram a proliferação bacteriana. Uma pesquisa relatou que o extrato hidroalcoólico (etanol a 70%) das folhas de *B. gaudichaudii* também não apresentou atividade antimicrobiana contra diversas cepas bacterianas (Pozetti, 2005). Já em outro estudo, constatou-se atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, porém foi utilizado o extrato da raiz de *B. gaudichaudii* (Alves *et al.*, 2000), rico em furanocumarinas.

Por sua vez, as NPVs não apresentaram atividade antibacteriana e, sim, o mesmo efeito que o controle negativo, não alterando a viabilidade celular (Fig. 33). Esse dado reforça a hipótese de que o EV forma um recobrimento nas nanopartículas de prata, o que pode, nesse caso, impedir a sua ação antimicrobiana, já que o EV controle favoreceu a proliferação celular. Outra possibilidade ainda é a de que os extratos tenham atuado como interferentes dos ensaios de MTT e essa hipótese ainda precisa ser devidamente verificada em estudos futuros.

Interessantemente, as NPIs apresentaram atividade antimicrobiana moderada e diminuíram a viabilidade celular de *E. coli* para cerca de 60% (Fig. 33). É possível que, devido à taxa de formação das AgNPs ser mais lenta com o EI do que com o EV, pode ser que a redução dos íons  $Ag^+$  para  $Ag^0$  não tenha ocorrido completamente, de modo que ainda haja a presença de  $Ag^+$  livre na mistura reacional das NPIs, o que pode ser responsável pela diminuição mais pronunciada da viabilidade celular.

A prata livre apresentou atividade antibacteriana intensa e reduziu o número de células viáveis à apenas 12% (Fig. 33). A prata livre possui ação antibacteriana caracterizada até concentrações micromolares e há indícios de que o mecanismo de ação antibacteriana das AgNPs está relacionado à liberação progressiva de íons de prata pela NPs (Patil *et al.*, 2012; Salam *et al.*, 2012). Uma das aplicações mais proeminentes das AgNPs ocorre devido à sua atividade antimicrobiana relatada por diversos autores ao longo dos últimos anos (Sharma *et al.*, 2009; Lloyd *et al.*, 2011; Pencheva *et al.*, 2012; Salam *et al.*, 2012) e essa atividade também tem sido investigada em AgNPs sintetizadas via síntese verde, como ilustrado anteriormente na tabela 2.



**Figura 33:** Histograma de viabilidade celular da bactéria *E. coli* obtido no ensaio colorimétrico de MTT na presença das nanopartículas de prata e dos devidos controles. O eixo X representa as amostras testadas. As amostras foram testadas na concentração de 1% v/v em 300 µL a partir das misturas de síntese com concentração de AgNO<sub>3</sub> equivalente a 0,1 mM. Símbolos iguais (α e β) indicam grupos cuja diferença entre os valores não é significativa (P>0,05). Controle: água ultrapura; Ag: solução de nitrato de prata; EV: extrato verão; EI: extrato inverno; NPV: nanopartículas de prata sintetizadas utilizando-se o EV; NPI: nanopartículas de prata sintetizadas utilizando-se o EI. Para a síntese das NPVs e NPIs foram utilizados os respectivos extratos na concentração de 10% v/v e nitrato de prata na concentração final de 1 mM.

Como a atividade antimicrobiana está relacionada à capacidade da AgNP em liberar os íons Ag<sup>+</sup>, consequentemente ela é dependente do perfil de diluição das AgNPs. No caso das NPVs, o EV pode ter atuado no recobrimento da AgNP, impedindo a liberação dos íons prata e levando à ausência de atividade antimicrobiana contra *E. coli*. Da mesma maneira, o recobrimento das NPIs pode não ocorrer da mesma forma do que a das NPVs, devido às diferenças nos perfis fitoquímicos dos extratos EI e EV, de modo que as NPIs possam liberar mais íons Ag<sup>+</sup> em solução e consequentemente apresentar atividade pronunciada.

#### 4.7.3 Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

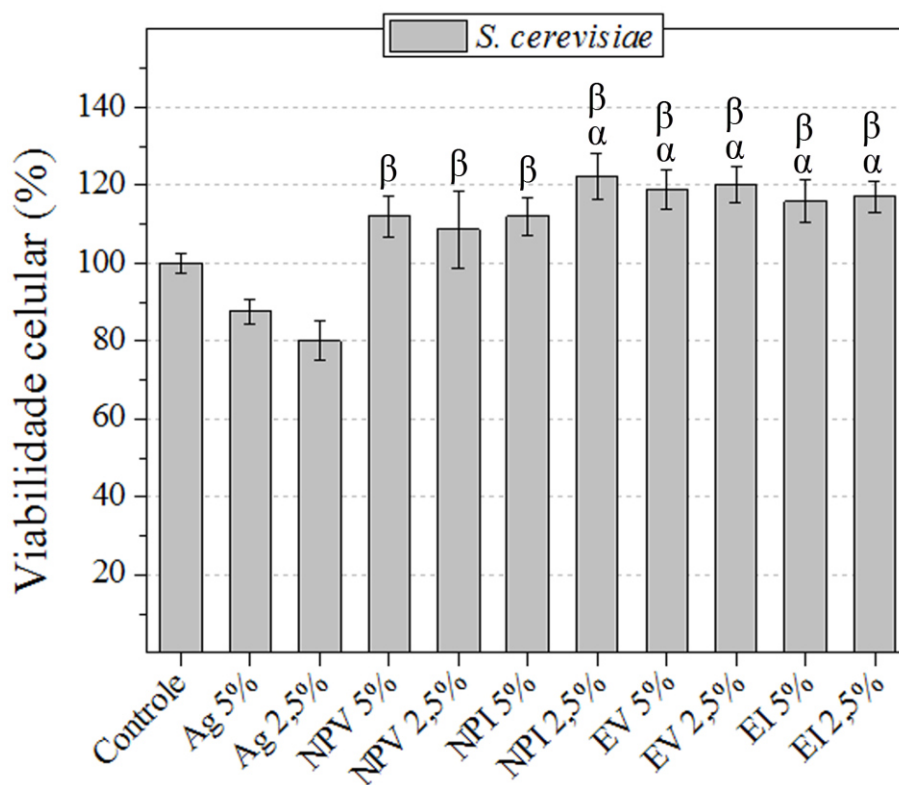
A determinação da viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico MTT foi realizado com a levedura *S. cerevisiae* (Fermipan<sup>®</sup>) no intuito de investigar os efeitos de NPV, NPI, EV e EI nesses organismos e comparar as possíveis diferenças de atividade de acordo com o extrato utilizado. Os resultados estão apresentados na figura 34.

O EV e o EI aumentaram a viabilidade da levedura *S. cerevisiae* em aproximadamente 20% nas duas concentrações testadas (Fig. 34). A possível presença de amido e outros polissacarídeos nas folhas de *B. gaudichaudii* (Jacomassi *et al.*, 2007) pode ter atuado como substrato que favoreceu a proliferação de *S. cerevisiae*. Estudos relatam que o extrato da raiz de *B. gaudichaudii* possui atividade fungicida contra *Cladosporium sphaerospermum* (Alves *et al.*, 2000), atribuída novamente à presença de furanocumarinas, substâncias pouco presentes nas folhas.

As NPVs e NPIs também aumentaram a viabilidade celular de *S. cerevisiae*, de maneira semelhante ao EV e EI (Fig. 34). Já foi reportado na literatura que AgNPs obtidas por síntese verde apresentaram atividade antifúngica contra *S. cerevisiae*, porém diminuindo a sua viabilidade celular de forma apenas moderada (Nagajyothi e Lee, 2011; Bonatto e Silva, 2014).

A prata livre levou à diminuição da viabilidade celular em 10%, na concentração equivalente de AgNO<sub>3</sub> de 50 µM (Ag 5%) e, em 20% na concentração de 25 µM (Ag 2,5%), como ilustra a figura 34. Bonatto e Silva (2014) observaram uma diminuição de 40% na viabilidade celular utilizando AgNPs produzidas à base de extrato aquoso de castanha de caju do cerrado utilizando a concentração equivalente a AgNO<sub>3</sub> 25 µM. As possíveis diferenças entre as atividades podem ser devido aos diferentes protocolos de formação das

nanopartículas ou ainda aos diferentes tipos de extratos utilizados para a redução e recobrimento das AgNPs descritas em diferentes estudos.



**Figura 34:** Histograma de viabilidade celular da levedura *S. cerevisiae* obtido no ensaio colorimétrico de MTT na presença das nanopartículas de prata e dos devidos controles. O eixo X representa as amostras testadas. As amostras foram testadas nas concentrações de 5% e 2,5% v/v em 200  $\mu$ L a partir das misturas de síntese, com  $\text{AgNO}_3$  equivalente de 50 e 25  $\mu$ M, respectivamente. Os símbolos indicam que a diferença de valores é significativa ( $P < 0,05$ ) quando comparada com o grupo Ag 5% ( $\alpha$ ) e Ag 2,5% ( $\beta$ ). Controle: água ultrapura; Ag: solução de nitrato de prata; EV: extrato verão; EI: extrato inverno; NPV: nanopartículas de prata sintetizadas utilizando-se o EV; NPI: nanopartículas de prata sintetizadas utilizando-se o EI. Para a síntese das NPVs e NPIs foram utilizados os respectivos extratos na concentração de 10% v/v e nitrato de prata na concentração final de 1 mM.

#### 4.8 BIOSENSORES

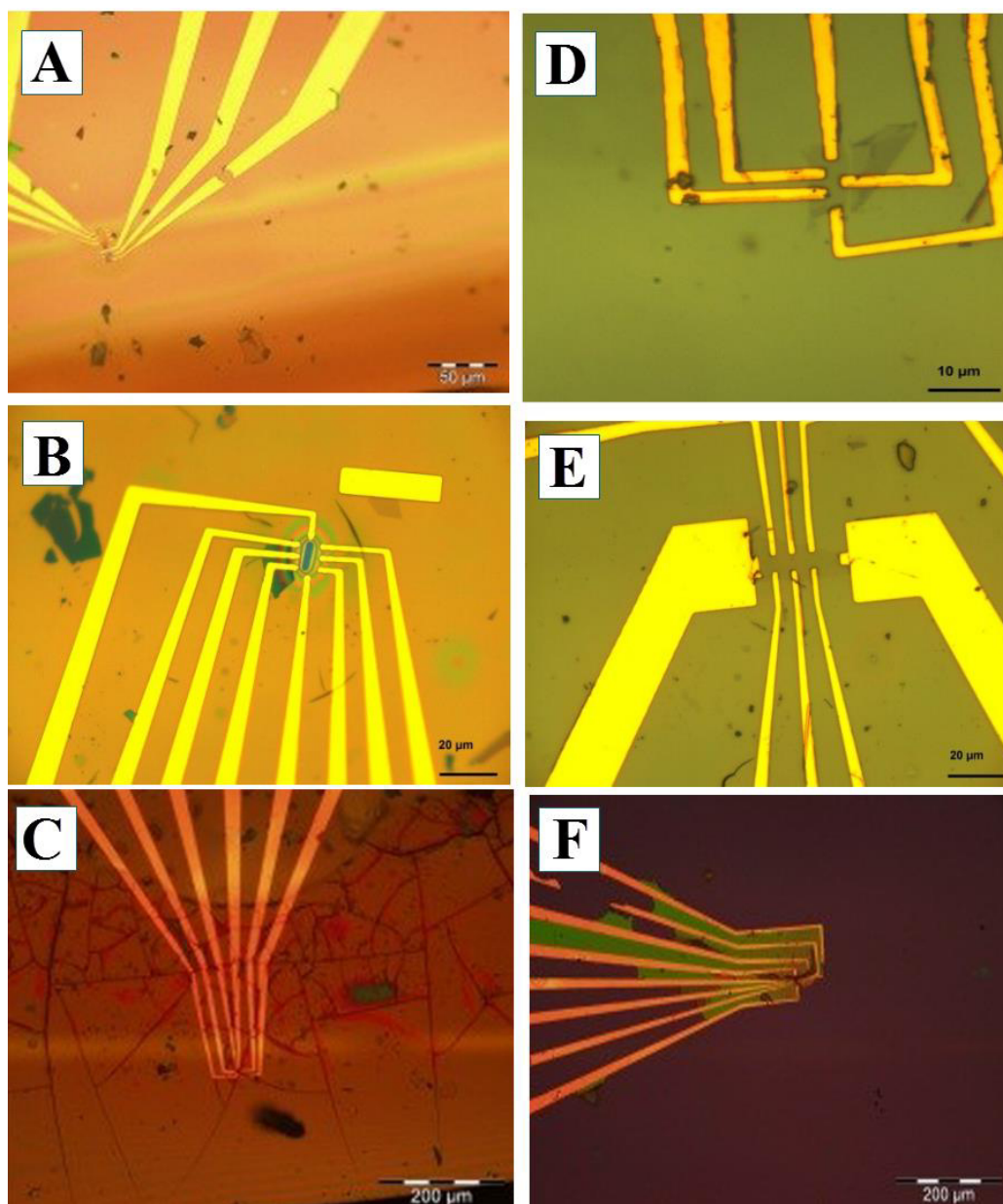
Após a formação e caracterização das AgNPs sintetizadas a partir dos extratos aquosos de folhas de *B. gaudichaudii*, buscou-se uma aplicação por meio da imobilização/recobrimento de biossensores. Os dispositivos inicialmente passaram por um procedimento de *lift-off* para a remoção da camada de fotorresiste onde estava localizado o grafeno, para que pudesse ocorrer o processo de funcionalização das biomoléculas de reconhecimento. Após essa etapa, os dispositivos foram enviados para a análise eletroquímica e os resultados preliminares estão descritos a seguir.

Várias amostras ficaram com os contatos elétricos rompidos (Fig. 35A, 35B e 35C). Isso pode ser devido à interação com a solução de DMF ou ao tratamento térmico ao qual os dispositivos foram submetidos. Adicionalmente, as amostras nas quais foram depositados os filmes de NPVs apresentaram uma coloração esverdeada (Fig. 35D, 35E e 35F) e uma baixa resistência elétrica. Possivelmente houve percolação das AgNPs ou a solução em que as AgNPs (NPVs) estão em suspensão é condutora e deixou um resíduo uniforme sobre o dispositivo.

Assim, como vários dispositivos apresentavam artefatos, não foi possível fazer as medições em uma sequência controlada como inicialmente planejado. Será necessário verificar detalhadamente cada etapa do processamento dos dispositivos e na funcionalização de modo a evitar essas situações em aplicações futuras.

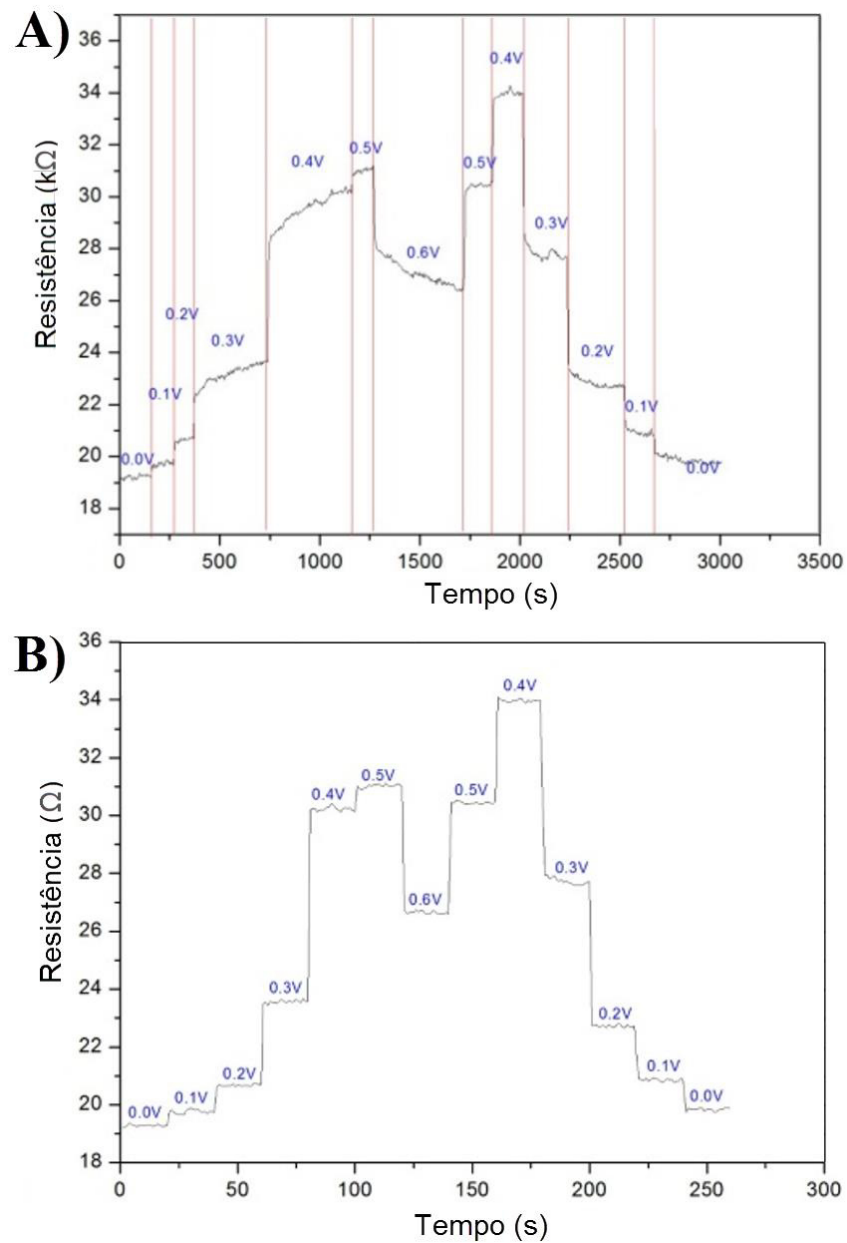
Desse modo, foi possível realizar as medidas apenas no dispositivo contendo o anticorpo funcionalizado Anti-GH, portanto os resultados descritos a seguir são preliminares e referentes apenas a esse anticorpo. Inicialmente a resistência elétrica do dispositivo foi medida em função do tempo, enquanto variou-se a tensão de *top gate* (tensão elétrica entre o grafeno e o líquido) em 0,1 V de 0 V até 0,6 V, em seguida retornando até 0 V (Fig. 36A). Em

seguida, foram selecionadas as últimas 20 medidas de resistência obtidas para cada valor de tensão *top gate* e valor médio da resistência em cada platô da figura 36B foi plotado em função da tensão de *top gate*. Esse procedimento então foi repetido com diferentes soluções contendo o analito (GH – hormônio do crescimento) em contato com o grafeno (Fig. 37).



**Figura 35:** Fotomicrografias dos dispositivos após os procedimentos de preparação e funcionalização. (A) e (C) apresentaram os contatos de ouro rompidos e (B) apresentou uma espécie de filme na superfície proveniente da dissolução do fotorresiste pelo DMF. Fotomicrografias dos dispositivos após deposição do filme de NPVs (D, E, F).



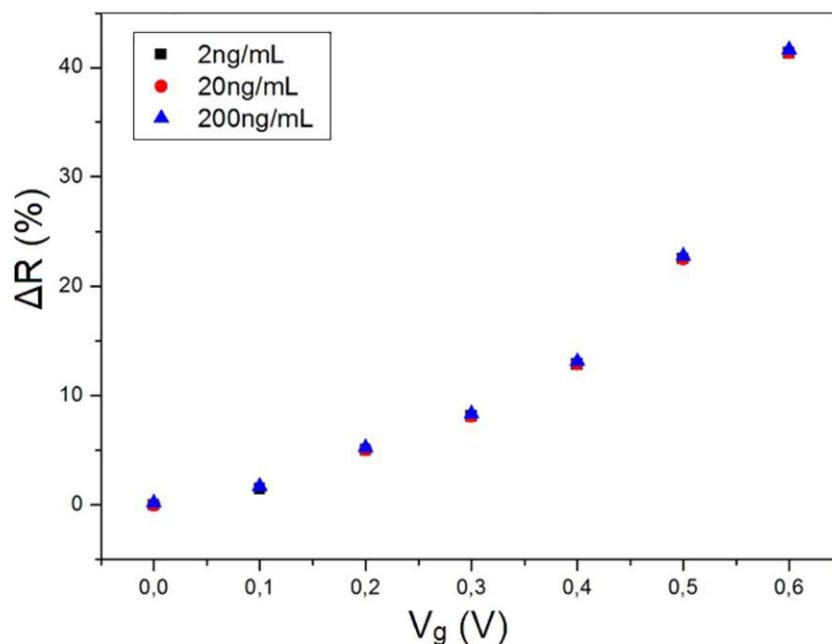


**Figura 36:** Gráfico da resistência em função do tempo da variação da tensão top gate utilizando água ultrapura em contato com o dispositivo (A) e os últimos 20 valores da resistência obtidos para cada tensão top gate em A (B).

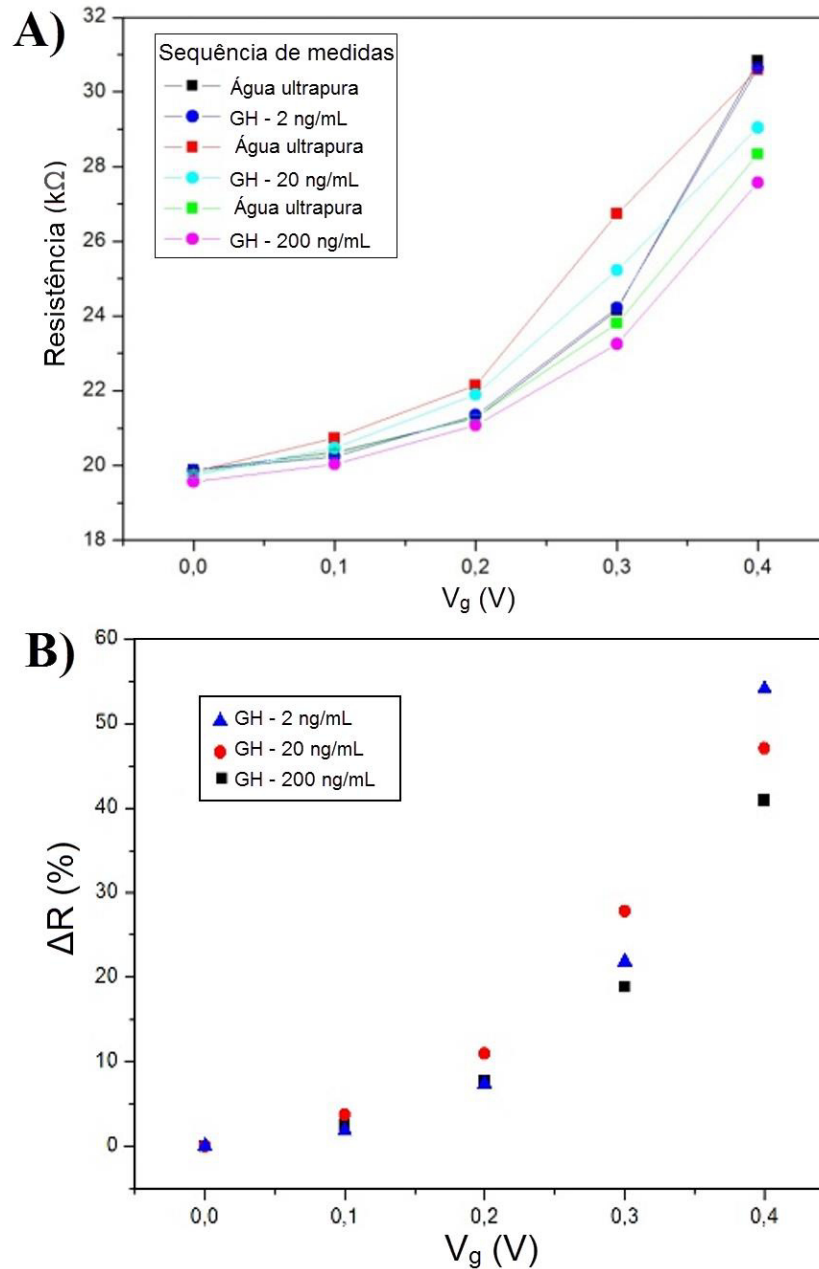
O resultado apresentado na figura 37 sugere que a concentração de GH de apenas 2 ng/mL foi suficiente para saturar todas as ligações anticorpo/antígeno, por isso as soluções com maiores concentrações apresentaram os mesmos valores. No entanto, embora as medidas de calibração tenham sido realizadas com água ultrapura, como não foi feita uma medida

apenas com água sobre o dispositivo antes de se colocar a solução de GH, portanto esse resultado ainda é inconclusivo e apenas sugere uma sensibilidade de ng/mL.

Em seguida, as mesmas medidas foram repetidas intercalando-se uma injeção de água entre cada solução com antígenos. A sequência em que cada líquido foi colocado sobre o grafeno foi novamente da menor para a maior concentração de GH. As medidas da resistência e da variação percentual da resistência estão ilustrados na figura 38. Dessa maneira observou-se que houve uma resposta diferente para cada concentração de antígeno. Porém, essas respostas não foram consistentes, ou seja, a mudança na resistência não variou monotonicamente com a concentração do antígeno. Essas medidas foram realizadas três dias após as medidas iniciais e é possível que o estado da superfície do grafeno e dos funcionalizantes possam ter sido alterados nessa ocasião.



**Figura 37:** Resistência média do dispositivo em função da tensão de top gate ( $V_g$ ) para cada antígeno (GH – hormônio do crescimento) diluídos nas concentrações de 2, 20 e 200 ng/mL.



**Figura 38:** Gráfico da resistência média em cada platô correspondente à tensão do dispositivo em função da tensão top gate ( $V_g$ ) para cada solução do antígeno GH (hormônio do crescimento) em diferentes concentrações (A). Resistência média das medidas em A (B).

Particularmente, publicações nessa área têm crescido nos últimos anos e já foram relatados nanobiossensores baseados em grafeno por detecção de fluorescência e eletroquímica, além da funcionalização do grafeno para esses fins (Ma *et al.*, 2013). O grafeno apresenta uma condutividade maior do que a dos nanotubos de carbono, o que torna

seu uso como elemento transdutor na construção de biossensores extremamente atrativa (Pumera *et al.*, 2010; Pumera, 2011). A deposição de nanopartículas para aumentar a detecção desse tipo de sensor também já foi relatada com sucesso (Liu e Guo, 2012; Ma *et al.*, 2013), permitindo a capacidade de detecção desses sensores na faixa de concentração do analito em picomolar e nanomolar.

De acordo com os resultados apresentados, será necessário substituir o DMF ou realizar um processamento alternativo com outro material para isolar os contatos elétricos da solução. Após o processo de aperfeiçoamento da produção dos dispositivos e do procedimento de funcionalização, as medidas serão realizadas com os devidos controles relacionados ao dispositivo e as soluções testadas em outros projetos em andamento no grupo.

## 5 CONCLUSÕES

No presente estudo, AgNPs foram sintetizadas a partir de  $\text{AgNO}_3$  utilizando o extrato aquoso das folhas da planta *Brosimum gaudichaudii*. As partículas sintetizadas apresentaram quando secas um diâmetro médio de 21,1 nm, medido por MFA, e quando em dispersão aquosa apresentaram duas populações com o diâmetro hidrodinâmico (% número) aproximado de 35 e 90 nm. O potencial Zeta foi de -30 mV e o PDI foi de 0,202, indicando estabilidade coloidal e monodispersividade altas.

As biomoléculas presentes no extrato de *B. gaudichaudii* foram responsáveis pela biorredução e possivelmente pelo recobrimento e estabilização das AgNPs. O processo de síntese apresentou uma alta reprodutibilidade e está de acordo com os princípios da química verde, apresentando-se como uma alternativa sustentável, eco-amigável, de custo baixo e biocompatível.

A formação das NPVs foi dependente de parâmetros do processo, como concentração do extrato, pH inicial da reação e presença/ausência de surfactantes. Entre as concentrações do EV de 10, 20 e 50% (v/v), observou-se pelas máximas de absorbância, que a formação de AgNPs foi mais eficiente com 10%. O uso de soluções tampão para o controle do pH da reação levou à formação de agregados/partículas maiores nos pHs 6, 7 e 8, ao passo que nos pHs 4 e 5 não houve formação de AgNPs. O uso dos surfactantes CTAB (catiônico) e Tween (neutro) não contribuíram para a formação de AgNPs, enquanto que com o SDS (aniônico) houve a formação de AgNPs, porém com o DH maior do que apenas em água e a adição desse surfactante não contribuiu para uma estabilidade eletrostática superior.

A cinética de formação das NPVs, monitorada por MFA, mostra que o crescimento das AgNPs começa com o surgimento de duas populações, que ao longo do tempo aumentam

de tamanho e culminam com uma única população, processo de maneira semelhante aos descritos pelas teorias de nucleação e crescimento de partículas estabelecidos na literatura.

Em meio salino com NaCl em concentração fisiológica, as NPVs não sofrem o processo de dissolução e isso pode influenciar a sua atividade biológica *in vitro*.

A época de coleta das folhas de *B. gaudichaudii* (verão ou inverno) utilizadas na preparação do extrato aquoso influenciou diretamente na taxa de síntese das AgNPs e nas suas características morfológicas e fisicoquímicas. A atividade antimicrobiana das NPIs foi moderada contra *Escherichia coli*, diminuindo sua viabilidade celular em 40%, enquanto que as NPVs na concentração testada não apresentaram atividade antimicrobiana.

Não houve atividade antifúngica contra *Saccharomyces cerevisiae*, tanto das AgNPs quanto dos diferentes extratos Ev e EI, enquanto que a prata livre ( $\text{AgNO}_3$ ) diminuiu a viabilidade celular de *S. cerevisiae* em cerca de 20%.

As NPVs apresentaram atividade citotóxica, dependente da sua concentração e comparáveis à ação da prata livre, para as linhagens de células eucarióticas de mamíferos da linhagem MCF-7 (câncer de mama humano) e NIH3T3 (fibroblasto murino).

Os testes preliminares com os biossensores revelaram que os dispositivos com NPVs apresentaram baixa condutividade elétrica porque possivelmente as NPVs interagiram com algum composto utilizado durante a funcionalização ou até mesmo com o dispositivo, pois apresentaram uma mudança de cor particular. Para isso serão necessárias alterações no processo de funcionalização. Adicionalmente, os resultados iniciais da capacidade de detecção do dispositivo funcionalizados com o anticorpo Anti-GH são promissores, com possível detecção do analito na concentração de 2 ng/mL ou até mesmo inferiores.

## REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- AHMAD, N. et al. Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried medicinal plant of basil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 1, p. 81-6, 2010.
- AJITHA, B.; ASHOK KUMAR REDDY, Y.; REDDY, P. S. Biogenic nano-scale silver particles by *Tephrosia purpurea* leaf extract and their inborn antimicrobial activity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 121C, p. 164-172, 2013.
- AKHTAR, M. S.; PANWAR, J.; YUN, Y.-S. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 1, n. 6, p. 591-602, 2013.
- AL-THABAITI, S. A. et al. Formation and characterization of surfactant stabilized silver nanoparticles: a kinetic study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 67, n. 2, p. 230-237, 2008.
- ALBRECHT, M. A.; EVANS, C. W.; RASTON, C. L. Green chemistry and the health implications of nanoparticles. **Green Chemistry**, v. 8, n. 5, p. 417, 2006.
- ALVES, T. M. A. et al. Biological screening of brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.
- BAE, E.-J. et al. Effect of Chemical Stabilizers in Silver Nanoparticle Suspensions on Nanotoxicity. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 32, n. 2, p. 613-619, 2011.
- BAKER, S. et al. Plants: Emerging as Nanofactories towards Facile Route in Synthesis of Nanoparticles. **Bioimpacts**, v. 3, n. 3, p. 111-117, 2013.
- BARBOSA, E. F. et al. Protein characterization of *Brosimum gaudichaudii* Trécul latex and study of nanostructured latex film formation. **IET Nanobiotechnology**, v. 8, p. 1-8, 2014.
- BEGUM, N. A. et al. Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 71, n. 1, p. 113-118, 2009.
- BONATTO, C. C.; SILVA, L. P. Higher temperatures speed up the growth and control the size and optoelectrical properties of silver nanoparticles greenly synthesized by cashew nutshells. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 46-54, 2014.
- BRIDGEWATER, S.; RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F. Biogeographic patterns, beta-diversity and dominance in the cerrado biome of Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 13, p. 2295-2318, 2004.
- CASTRO, T. F. et al. **Optimization of extraction hydroalcoholic *Brosimum gaudichaudii* Trécul (moraceae)**. 9th International Congress of Pharmaceutical Sciences. Ribeirão Preto, Brazil 2011.
- CAUERHFF, A.; CASTRO, G. R. Bionanoparticles, a green nanochemistry approach. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 3, 2013.

- CHANDRAN, S. P. et al. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using *Aloe vera* plant extract. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 2, p. 577-583, 2006.
- CHAUDHURI, R. G.; PARIA, S. Core/shell nanoparticles: classes, properties, synthesis mechanisms, characterization, and applications. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 4, p. 2373-433, 2012.
- CHEN, R. J. et al. Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 16, p. 3838-3839, 2001.
- CRUZ, D. et al. Preparation and physicochemical characterization of Ag nanoparticles biosynthesized by *Lippia citriodora* (Lemon Verbena). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 1, p. 67-73, 2010.
- DAS, R. K.; BRAR, S. K. Plant mediated green synthesis: modified approaches. **Nanoscale**, v. 5, n. 21, p. 10155-62, 2013.
- DORIA, G. et al. Noble metal nanoparticles for biosensing applications. **Sensors**, v. 12, n. 12, p. 1657-1687, 2012.
- DUBEY, M.; BHADAURIA, S.; KUSHWAH, B. S. Green synthesis of nanosilver particles from extract of *Eucalyptus hybrida* (safeda) leaf. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 4, n. 3, p. 537-543, 2009.
- DUBEY, S. P. et al. Bioprospective of *Sorbus aucuparia* leaf extract in development of silver and gold nanocolloids. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 80, n. 1, p. 26-33, 2010.
- DUBEY, S. P.; LAHTINEN, M.; SILLANPÄÄ, M. Green synthesis and characterizations of silver and gold nanoparticles using leaf extract of *Rosa rugosa*. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 364, n. 1-3, p. 34-41, 2010.
- DURAN, N. et al. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 5, p. 1609-24, 2011.
- DWIVEDI, A. D.; GOPAL, K. Plant-mediated biosynthesis of silver and gold nanoparticles. **Journal of Biomedicine and Nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 163-164, 2011.
- ELUMALAI, E. et al. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using leaves of *Euphorbia hirta* and their antibacterial activities. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 9, p. 549-554, 2010.
- ELZEY, S.; GRASSIAN, V. H. Agglomeration, isolation and dissolution of commercially manufactured silver nanoparticles in aqueous environments. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 5, p. 1945-1958, 2009.
- EUROPEAN COMMISSION. On the definition of a nanomaterial. **Official Journal of the European Union**, v. 696, p. 38-40, 2011.
- FAROOQUI, M. A. et al. Extraction of silver nanoparticles from the leaf extracts of *Clerodendrum inerme*. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, n. 1, p. 43-49, 2010.
- FEYNMAN, R. P. Classics: There's plenty of room at the bottom. **Resonance**, v. 16, p. 890-905, 2011.



- FIDELIS, I. et al. Características anatómicas de estruturas vegetativas de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. desenvolvidas *in vitro* e *in vivo*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 2, p. 327-336, 2000.
- GEORGIEV, P. et al. Implementing atomic force microscopy (AFM) for studying kinetics of gold nanoparticle's growth. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 434, p. 154-163, 2013.
- GNANADESIGAN, M. et al. Antibacterial potential of biosynthesised silver nanoparticles using *Avicennia marina* mangrove plant. **Applied Nanoscience**, v. 2, n. 2, p. 143-147, 2012.
- GOVINDARAJU, K. et al. Biogenic silver nanoparticles by *Solanum torvum* and their promising antimicrobial activity. **Journal of Biopesticides**, v. 3, n. 1, p. 394-399, 2010.
- GRASSIAN, V. H. When size really matters: size-dependent properties and surface chemistry of metal and metal oxide nanoparticles in gas and liquid phase environments. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 47, p. 18303-18313, 2008.
- GUO, S.; DONG, S. Biomolecule-nanoparticle hybrids for electrochemical biosensors. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 96-109, 2009.
- HUANG, J. et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. **Nanotechnology**, v. 18, n. 10, p. 11, 2007.
- HUANG, L. et al. Identifying the emerging roles of nanoparticles in biosensors. **Journal of Business Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 15-30, 2010.
- HUANG, Y. et al. Graphene-based biosensors for detection of bacteria and their metabolic activities. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 33, p. 12358, 2011.
- INGALE, A. G. Biogenic synthesis of nanoparticles and potential applications: an eco-friendly approach. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 04, n. 02, 2013.
- IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 2638-2650, 2011.
- JACOMASSI, E. **Morfoanatomia e histoquímica de órgãos vegetativos e reprodutivos de *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae)**. 2006. 81 (Doutorado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Bocatú, SP, Brasil.
- JACOMASSI, E.; MOSCHETA, I. S.; MACHADO, S. R. Morfoanatomia e histoquímica de *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 3, p. 575-597, 2007.
- JAYASEELAN, C.; RAHUMAN, A. A. Acaricidal efficacy of synthesized silver nanoparticles using aqueous leaf extract of *Ocimum canum* against *Hyalomma anatolicum* and *Hyalomma marginatum isaaci* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 111, n. 3, p. 1369-1378, 2012.
- JHA, A. K. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using Eclipta leaf. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 5, p. 1476-1479, 2009.
- KASTHURI, J.; KATHIRAVAN, K.; RAJENDIRAN, N. Phyllanthin-assisted biosynthesis of silver and gold nanoparticles: a novel biological approach. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 11, n. 5, p. 1075-1085, 2008.

- KRISHNARAJ, C. et al. Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, n. 1, p. 50-56, 2010.
- KRISHNARAJ, C. et al. Optimization for rapid synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 93, p. 95-99, 2012.
- KUMAR, V.; YADAV, S. C.; YADAV, S. K. *Syzygium cumini* leaf and seed extract mediated biosynthesis of silver nanoparticles and their characterization. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 85, n. 10, p. 1301-1309, 2010.
- KUMAR, V.; YADAV, S. K. Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, n. 2, p. 151-157, 2009.
- LAMER, V. K.; DINEGAR, R. H. Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols. **Journal of the American Chemical Society**, v. 72, n. 11, p. 4847-4854, 1950.
- LI, S. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* L. extract. **Green Chemistry**, v. 9, n. 8, p. 852-858, 2007.
- LI, X.; LENHART, J. J.; WALKER, H. W. Dissolution-accompanied aggregation kinetics of silver nanoparticles. **Langmuir**, v. 26, n. 22, p. 16690-8, 2010.
- LIMA, M. C. F.; SILVA, C. C.; JUNIOR, V. F. V. *Brosimum* sp. da Amazônia: uma revisão. **Scientia Amazonia**, v. 2, n. 1, p. 20-27, 2013.
- LINY, P. et al. Preparation of gold nanoparticles from *Helianthus annuus* (sun flower) flowers and evaluation of their antimicrobial activities. **International Journal of Pharma & Bio Sciences**, v. 3, n. 1, 2012.
- LIU, S.; GUO, X. Carbon nanomaterials field-effect-transistor-based biosensors. **NPG Asia Materials**, v. 4, n. 8, p. 23, 2012.
- LIU, Z. et al. Preparation of carbon nanotube bioconjugates for biomedical applications. **Nature Protocols**, v. 4, n. 9, p. 1372-82, 2009.
- LLOYD, J. R.; BYRNE, J. M.; COKER, V. S. Biotechnological synthesis of functional nanomaterials. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 509-515, 2011.
- LOURENÇO, M. V. **Estudo comparativo dos constituintes químicos de *Brosimum gaudichaudii* Trécul e do medicamento "V"**. 2001. 141 (PhD). Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
- LUKMAN, A. I. et al. Facile synthesis, stabilization, and anti-bacterial performance of discrete Ag nanoparticles using *Medicago sativa* seed exudates. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 353, n. 2, p. 433-444, 2011.
- MA, H. et al. Graphene-based optical and electrochemical biosensors: a review. **Analytical Letters**, v. 46, n. 1, p. 1-17, 2013.
- MALLIKARJUNA, K. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Ocimum* leaf extract and their characterization. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 6, n. 1, p. 181-186, 2011.
- MALVERN. Zetasizer Nano Series User Manual. **User Manuals**, England, 2004.  
Disponível em: <

[http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer\\_Nano\\_user\\_manual\\_Man0317-1.1.pdf](http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf) >. Acesso em: 19/11/2013.

- MANCEBO, S. M. **Synthesis and applications of nanoparticles in biosensing systems**. 2009. 130 Chemistry Department, Autonomous University of Barcelona
- MANI, U. et al. A simple and green method for the synthesis of silver nanoparticles using *Ricinus Communis* leaf extract. **Progress in Nanotechnology and Nanomaterials** v. 2, n. 1, p. 21-25, 2013.
- MIRANDA, A. C. et al. Fluxes of carbon, water and energy over Brazilian cerrado: an analysis using eddy covariance and stable isotopes. **Plant, Cell and Environment**, v. 20, p. 315-328, 1997.
- MITTAL, A. K.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 346-356, 2013.
- MITTAL, A. K.; KALER, A.; BANERJEE, U. C. Free radical scavenging and antioxidant activity of silver nanoparticles synthesized from flower extract of *Rhododendron dauricum*. **Nano Biomedicine and Engineering**, v. 4, n. 3, p. 118-124, 2012.
- MURDOCK, R. C. et al. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. **Toxicological Sciences**, v. 101, n. 2, p. 239-53, 2008.
- NABIKHAN, A. et al. Synthesis of antimicrobial silver nanoparticles by callus and leaf extracts from saltmarsh plant, *Sesuvium portulacastrum* L. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 2, p. 488-493, 2010.
- NAGAJYOTHI, P. C.; LEE, K. D. Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using *Dioscorea batatas* rhizome extract and evaluation of their antimicrobial activities. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, p. 1-7, 2011.
- NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Phytosynthesis of gold nanoparticles using leaf extract of *Coleus amboinicus* Lour. **Materials Characterization**, v. 61, n. 11, p. 1232-1238, 2010.
- NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 169, n. 2, p. 59-79, 2011.
- NATH, D.; BANERJEE, P. Green nanotechnology - a new hope for medical biology. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 3, p. 997-1014, 2013.
- NETHRADEVI, C.; SIVAKUMAR, P.; RENGANATHAN, S. Green synthesis of silver nanoparticles using *Datura metel* flower extract and evaluation of their antimicrobial activity **International Journal of Nanomaterials and Biostructures** v. 2, n. 2, p. 16-21, 2012.
- PATIL, R. S.; KOKATE, M. R.; KOLEKAR, S. S. Bioinspired synthesis of highly stabilized silver nanoparticles using *Ocimum tenuiflorum* leaf extract and their antibacterial activity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 91, p. 234-238, 2012.
- PENCHEVA, D.; BRYASKOVA, R.; KANTARDJIEV, T. Polyvinyl alcohol/silver nanoparticles (PVA/AgNps) as a model for testing the biological activity of hybrid materials with included silver nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 7, p. 2048-2051, 2012.

- PHILIP, D. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus rosa sinensis*. **Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures**, v. 42, n. 5, p. 1417-1424, 2010.
- PHILIP, D. *Mangifera indica* leaf-assisted biosynthesis of well-dispersed silver nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 78, n. 1, p. 327-331, 2011.
- PHILIP, D.; UNNI, C. Extracellular biosynthesis of gold and silver nanoparticles using Krishna tulsi (*Ocimum sanctum*) leaf. **Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures**, v. 43, n. 7, p. 1318-1322, 2011.
- POZETTI, G. L. *Brosimum gaudichaudii* Trecul (Moraceae): da planta ao medicamento. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 26, n. 3, p. 159-166, 2005.
- PRABAKAR, K. et al. Evaluation of antibacterial efficacy of phyto fabricated silver nanoparticles using *Mukia scabrella* (Musumusukkai) against drug resistance nosocomial gram negative bacterial pathogens. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 104, p. 282-288, 2013.
- PRIYA, M. M.; SELVI, B. K.; PAUL, J. A. J. Green synthesis of silver nanoparticles from the leaf extracts of *Euphorbia hirta* and *Nerium indicum*. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures** v. 6, n. 2, p. 869-877, 2011.
- PUMERA, M. Graphene in biosensing. **Materials Today**, v. 14, n. 7-8, p. 308-315, 2011.
- PUMERA, M. et al. Graphene for electrochemical sensing and biosensing. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 9, p. 954-965, 2010.
- QUELEMES, P. V. et al. Development and antibacterial activity of cashew gum-based silver nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 4969-4981, 2013.
- QUEVEDO, A. E. P. **Atividades melanogênica, genotóxica e antiproliferativa de extratos de *Brosimum gaudichaudii* Trécul e *Dorstenia brasiliensis* Lam induzidas por radiação UVA**. 2011. 123 (PhD). Programa de Pós Graduação em Saúde e Desenvolvimento, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
- RAJA, K.; SARAVANAKUMAR, A.; VIJAYAKUMAR, R. Efficient synthesis of silver nanoparticles from *Prosopis juliflora* leaf extract and its antimicrobial activity using sewage. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 97, p. 490-494, 2012.
- RAO, M. L.; BHUMI, G.; SAVITHRAMMA, N. Green synthesis of silver nanoparticles by *Allamanda cathartica* L. leaf extract and evaluation for antimicrobial activity. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**, v. 6, n. 4, p. 2260-2268, 2013.
- RATTER, J. A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J. F. Analysis of the floristic composition of the brazilian cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 60, n. 1, p. 57-109, 2003.
- RAUT, R. W. et al. Phytosynthesis of silver nanoparticle using *Gliricidia sepium* (Jacq.). **Current Nanoscience**, v. 5, n. 1, p. 117-122, 2009.
- RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.

- SALAM, H. A. et al. Plants: green route for nanoparticle synthesis. **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 5, p. 6, 2012.
- SALEM, H. F.; EID, K. A. M.; SHARAF, M. A. Formulation and evaluation of silver nanoparticles as antibacterial and antifungal agents with a minimal cytotoxic effect. **International Journal of Drug Delivery**, v. 3, p. 293-304, 2011.
- SANTHOSHKUMAR, T. et al. Synthesis of silver nanoparticles using *Nelumbo nucifera* leaf extract and its larvicidal activity against malaria and filariasis vectors. **Parasitology Research**, v. 108, n. 3, p. 693-702, 2011.
- SATHISHKUMAR, M. et al. *Cinnamon zeylanicum* bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 332-8, 2009.
- SATHYAVATHI, R. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Oriandrum sativum* leaf extract and their application in nonlinear optics. **Advanced Science Letters**, v. 3, n. 2, p. 138-143, 2010.
- SHAMELI, K. et al. Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Callicarpa maingayi* stem bark extraction. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 8506-17, 2012.
- SHANKAR, S. S.; AHMAD, A.; SASTRY, M. Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 6, p. 1627-1631, 2003.
- SHANKAR, S. S. et al. Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, n. 2, p. 496-502, 2004.
- SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, n. 1-2, p. 83-96, 2009.
- SHENY, D. S.; MATHEW, J.; PHILIP, D. Phytosynthesis of Au, Ag and Au-Ag bimetallic nanoparticles using aqueous extract and dried leaf of *Anacardium occidentale*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 79, n. 1, p. 254-262, 2011.
- SMITHA, S. L.; PHILIP, D.; GOPCHANDRAN, K. G. Green synthesis of gold nanoparticles using *Cinnamomum zeylanicum* leaf broth. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 74, n. 3, p. 735-9, 2009.
- SONG, J. Y.; KWON, E. Y.; KIM, B. S. Biological synthesis of platinum nanoparticles using *Diopyros kaki* leaf extract. **Bioprocess and Biosystems Engineering** v. 33, n. 1, p. 159-64, 2010.
- SUGIMOTO, T. Preparation of monodispersed colloidal particles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 28, p. 65-108, 1987.
- THIRUMURUGAN, G.; DHANARAJU, M. D. Novel biogenic metal nanoparticles for pharmaceutical applications. **Advanced Science Letters**, v. 4, n. 2, p. 339-348, 2011.
- TRIPATHY, A. et al. Process variables in biomimetic synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of *Azadirachta indica* (Neem) leaves. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 1, p. 237-246, 2009.
- VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2006.

- VEERASAMY, R. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using mangosteen leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 113-120, 2011.
- VELAYUTHAM, K. et al. Larvicidal activity of green synthesized silver nanoparticles using bark aqueous extract of *Ficus racemosa* against *Culex quinquefasciatus* and *Culex gelidus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n. 2, p. 95-101, 2013.
- VIJAYAKUMAR, M. et al. Biosynthesis, characterisation and anti-bacterial effect of plant-mediated silver nanoparticles using *Artemisia nilagirica*. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 235-240, 2013.
- VIJAYARAGHAVAN, K. et al. One step green synthesis of silver nano/microparticles using extracts of *Trachyspermum ammi* and *Papaver somniferum*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 94, p. 114-117, 2012.
- VILCHIS-NESTOR, A. R. et al. Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camellia sinensis* extract. **Materials Letters**, v. 62, n. 17-18, p. 3103-3105, 2008.
- WANG, J. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 10, p. 1887-92, 2006.
- WATZKY, M. A.; FINKE, R. G. Transition metal nanocluster formation kinetic and mechanistic studies. A new mechanism when hydrogen is the reductant: slow, continuous nucleation and fast autocatalytic surface growth. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 43, p. 10382-10400, 1997.
- YILDIRIMER, L. et al. Toxicology and clinical potential of nanoparticles. **Nano Today**, v. 6, n. 6, p. 585-607, 2011.
- ZOOK, J. M. et al. Measuring silver nanoparticle dissolution in complex biological and environmental matrices using UV-visible absorbance. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 6, p. 1993-2002, 2011.