



**UFAM**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC**

*Licaria puchury-major* (MART.) KOSTERM: **BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS  
DE PRATA DOS EXTRATOS VEGETAIS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

**ROSILANE RAMOS GRAÇA**

**Manaus-AM  
2015**

**ROSILANE RAMOS GRAÇA**

*Licaria puchury-major* (MART.) KOSTERM: **BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA DOS EXTRATOS VEGETAIS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva

**Manaus-AM  
2015**

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

G726l GRA A, ROSILANE RAMOS GRAÇA  
Licaria puchury-major (MART.) KOSTERM: BIOSÍNTESE DE  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA DOS EXTRATOS VEGETAIS  
COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA / ROSILANE RAMOS  
GRAÇA GRA A. 2015  
116 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Carlos Gustavo Nunes da Silva  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do  
Amazonas.

1. Lauraceae. 2. Síntese biogênica. 3. Química verde. 4.  
Caracterização. I. Silva, Carlos Gustavo Nunes da II. Universidade  
Federal do Amazonas III. Título

## AGRADECIMENTOS

A Deus

Ao plano superior pela força invisível

A Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pela oportunidade

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos

A Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pela colaboração

Ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), pela colaboração

Ao meu marido Francélio Diniz Torres da Costa, por tudo

A minha mãe Iolanda Ramos Graça, por tudo

Ao meu filho Francélio Diniz Torres da Costa Filho

As minhas irmãs Aparecida, Leonor, Lane, Gerlane e Lauren

Aos meus irmãos Mário e Wellington

Aos meus familiares pelo apoio

Ao meu orientador Carlos Gustavo Nunes da Silva por tudo principalmente por acreditar na realização do projeto, pelo apoio, confiança, compreensão e conhecimento

A Professora Maria Francisca Simas Teixeira pela colaboração e conhecimento

Ao Professor Doutor Nelson Durán Caballero pela parceria, colaboração, apoio, ensinamentos, conhecimentos, dedicação, paciência e principalmente por eu não desistir

A Doutora Patrícia Fernanda Andrade pela colaboração, apoio técnico como também pelos ensinamentos, conhecimentos, dedicação, paciência e principalmente por eu não desistir

Aos Coordenadores Carlos Gustavo Nunes da Silva e Edmar Vaz de Andrade por todo apoio durante todo o curso, pela confiança e por acreditar no meu projeto.

Aos membros da banca pelas colaborações e considerações: Carlos Gustavo Nunes da Silva, Gustavo Frigi Perotti, Juliana Mesquita Vidal Martinez de Lucena, Orivaldo da Silva Lacerda Junior e Raimundo Filho

Aos suplentes da banca pelas colaborações e considerações: Pedro Queiroz e Rosana Antunes Palheta

A secretária do PPGBIOTEC Nubiane

Aos amigos (as) do Laboratório DPUA, em especial, Taciana Amorim Silva, Salomão Rocha Martim e Nelimara Vinhote

Ao professor Jeferson Rocha Andrade pelo conhecimento

Aos amigos (as) da instituição UFAM em especial Joelma Alcântara por tudo

A Doutora Enedina Nogueira de Assunção

Ao pesquisador do INPA João Domingos pela colaboração e apoio

Aos amigos (as) do INPA

Ao técnico do Laboratório de Microscopia Eletrônica (UNICAMP) Douglas Soares da Silva

A técnica do Laboratório de Espectrometria de Massas (UNICAMP) Priscila A. da Silva

Ao técnico do Laboratório de Espectrometria de Alta Pressão (UNICAMP) Ricardo Pereira

A Doutora Silvia Vaz Guerra Nista (UNICAMP)

Ao Amigo Jaime pela ajuda na coleta do material botânico

A amiga Mary Fonseca

A amiga Maria Lenise Trindade

A amiga Joyce Santos

Aos coletores Jacó, Francisco, Rosária, Juca e família

A todos que de alguma forma colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*Agradeço*

*Dedicatória*

*A minha mãe Iolanda Ramos Graça  
(Landinha)*

*Epígrafe*

*A confiança na salvação em Deus está presente no coração daqueles que perseveram em sua caminhada de fé.*

## RESUMO

Atualmente o uso da química verde para a síntese de nanopartículas tornou-se uma alternativa na área da nanotecnologia. As plantas armazenam diversos compostos bioativos, e a interação entre a bioquímica de plantas e as nanopartículas inorgânicas tende a ser promissora nessa área. Diversos estudos reportam o uso de extratos de plantas na biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs) com o intuito de investigar aplicações clínicas com atividade sobre vários micro-organismos, pela eficácia que certas espécies da flora demonstram como fontes de antimicrobianos e pela reduzida toxicidade em comparação às nanopartículas biossintetizadas pelos métodos químico e físico. Este estudo tem como objetivo investigar os extratos de *Licaria puchury-major* para biossíntese de AgNPs com atividade antimicrobiana. Este trabalho foi realizado em três etapas. Na etapa I, foi selecionado o método de extração promissor por meio das AgNPs biossintetizadas com os extratos aquosos das estruturas anatômicas da folha, galho, semente, cúpula, casca e raiz pelos métodos de extração a frio (temperatura ambiente 25-27 °C), infusão (<100 °C por 15 min) e decocção (100 °C por 15 min). A seleção foi feita por meio da formação das AgNPs, indicada pela alteração das cores das soluções coloidais e análises de Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível (UV-vis) e da atividade antimicrobiana determinada pela técnica de difusão em ágar contra os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. As AgNPs selecionadas nessa etapa foram investigadas para verificar a estabilidade após seis meses e sistema de lavagem. Na etapa II – foi realizada a caracterização dos extratos e das AgNPs obtidos pelo método promissor de extração (infusão). As técnicas empregadas para a caracterização dos extratos foram de quantificação de fenólicos, flavonoides e proteínas totais; Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR); Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Espectrometria de Massa (EM). As AgNPs foram caracterizadas por Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível (UV-vis), por análises de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), Espectroscopia de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES), Difração de Raios X (DRX) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM). Na etapa III, foi avaliada a atividade antimicrobiana da nanopartícula promissora selecionada por meio da caracterização, determinada pelas técnicas de difusão em ágar e da Concentração Inibitória Mínima (CIM), utilizando somente os micro-organismos que apresentaram ação. Os resultados mostraram: Etapa I - foi selecionado o método de infusão como promissor, obtidos por meio das análises de UV-vis, estabilidade e antimicrobiano; Etapa II - a caracterização dos dos extratos obtidos pelo método de infusão, demonstraram para o extrato da semente abortada os maiores teores de compostos fenólicos, flavonoides e proteínas:  $(388 \pm 5 \text{ mg.g}^{-1})$ ,  $(447 \pm 3 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1})$  e  $(116 \pm 8 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1})$ , respectivamente. Pelos espectros e dados obtidos da CLAE e EM, foi sugerida a presença das neolignananas licarina A, ferrearina B e C somente no extrato da folha. A caracterização feita pelo TEM mostrou que as AgNPs biossintetizadas pelo método de infusão não apresentaram considerável diferença de tamanho:  $57,0 \pm 7 \text{ nm}$  (AgNPs-FI),  $60 \pm 14 \text{ nm}$  (AgNPs-CI),  $56 \pm 13 \text{ nm}$  (AgNPs-SI) e  $60 \pm 18 \text{ nm}$  (AgNPs-SabI); nem de morfologias, todas apresentaram formas triangular, triangular- truncada e pseudoesféricas. A presença da proteína nos extratos pode ser responsável pela formação da camada em torno das AgNPs e pela estabilização. A AgNPs-FI foi a nanopartícula promissora, a qual, na etapa III, apresentou atividade antimicrobiana na concentração  $17,23 \text{ mg.L}^{-1}$  indicada pelo halo de  $19 \pm 0,0 \text{ mm}$  contra *S. aureus*; e  $17 \pm 0,0 \text{ mm}$  contra *E. coli*. A CIM foi de  $10 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  para *S. aureus* e de  $0,625 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  para *E. coli*. A biossíntese utilizando o extrato aquoso de folha de *L. puchury-major*, obtido pelo método de infusão pode ser uma alternativa sustentável na produção de nanopartículas com aplicações biotecnológicas como antimicrobiano.

**Palavras chaves:** Lauraceae, síntese biogênica, química verde.

## ABSTRACT

Currently the use of green chemistry for the synthesis of nanoparticles become an alternative in the area of nanotechnology. Plants store many bioactive compounds, and the interaction between the biochemistry of plants and inorganic nanoparticles tends to be promising in this area. Several studies report on the use of plant extracts in the biosynthesis of silver nanoparticles (AgNPs) in order to investigate clinical applications active on various micro-organisms, the effectiveness certain plant species show as sources of antimicrobial and the reduced toxicity compared to biosynthesized nanoparticles by chemical and physical methods. This study aims to investigate the statements of *Licaria puchury-major* to AgNPs biosynthesis with antimicrobial activity. This work was carried out in three stages. In stage I, was selected the promising method of extraction through biosynthesized AgNPs with the aqueous extracts of the anatomical structures of leaf, branch, seed, cupola, bark and root for the cold extraction methods (ambient temperature 25-27 °C), infusion (<100 °C for 15 min) and decoction (100 °C for 15 min). The selection was made through the formation of AgNPs indicated by changing the color of the colloidal solutions and Spectroscopic Analysis in the Ultraviolet-Visible Region (UV-vis) and antimicrobial activity determined by the diffusion technique in agar against micro-organisms *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. The AgNPs selected at this stage were investigated to check stability after six months and washing system. Step II - it was characterized the extracts of the silver nanoparticles obtained by extraction promising method (infusion). The techniques employed for the characterization of the extracts were quantified phenolics, and flavonoids total protein; Vibrational Spectroscopy in the Infrared Fourier Transform Spectroscopy (FTIR); High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Mass Spectrometry (MS). The AgNPs were characterized by Spectroscopy in the Ultraviolet-Visible Region (UV-vis), for Analysis of Dynamic Light Scattering (DLS), Atomic Emission Spectroscopy with Inductively Coupled Plasma (ICP-OES), X-Ray Diffraction (XRD) and Transmission Electron Microscopy (TEM). In step III, the antimicrobial activity of promising nanoparticle selected by characterization was evaluated determined by agar diffusion techniques and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) using only the micro-organisms present action. The results showed: Step I - was selected as a promising method for infusion, obtained by UV-vis Analysis, stability and antimicrobial; Step II - characterization of the extracts obtained by the infusion method, shown for aborted seed extract the highest levels of phenolic compounds, flavonoids and proteins: ( $388 \pm 5 \text{ mg.g}^{-1}$ ), ( $447 \pm 3 \text{ ug.ml}^{-1}$ ) and ( $116 \pm 8 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), respectively. The spectra and data obtained from HPLC and MS, the presence of licarina neolignans A was suggested ferrearina B and C only in the leaf extract. The characterization made by TEM showed that AgNPs biosynthesized by the infusion method showed no significant difference in size:  $57.0 \pm 7 \text{ nm}$  (AgNPs -FI),  $60 \pm 14 \text{ nm}$  (AgNPs -CI),  $56 \pm 13 \text{ nm}$  (AgNPs- SI) and  $60 \pm 18 \text{ nm}$  (AgNPs -SabI); or morphologies, all presented triangular shapes, truncated triangular- and pseudospherical. The presence of the protein in the extract can be responsible for the formation of the layer around the AgNPs and stabilization. The AgNPs -FI was promising nanoparticle which, in step III showed antimicrobial activity in the concentration  $17.23 \text{ mg.L}^{-1}$  indicated by halo  $19 \pm 0.0 \text{ mm}$  against *S. aureus*; and  $17 \pm 0,0 \text{ mm}$  against *E. coli*. The MIC was  $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  for *S. aureus* and  $0.625 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  for *E. coli*. The biosynthesis using the aqueous extract of *L. puchury-major* sheet obtained by the infusion method can be a sustainable alternative for the production of nanoparticles with biotechnological applications as an antimicrobial.

**Key words:** Lauraceae, biogenic, green chemistry.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Licaria puchuri-major</i> e suas estruturas vegetais: 1- árvore; 2-folhas; 3-semente; 4-cúpula; 5-galhos; 6-casca.....	15
<b>Figura 2.</b> Habitat de <i>Licaria puchury-major</i> na Região Amazônica.....	20
<b>Figura 3.</b> Árvore de <i>Licaria puchury-major</i> .....	21
<b>Figura 4.</b> Fruto com cúpula de <i>Licaria puchury-major</i> .....	22
<b>Figura 5.</b> Folha de <i>Licaria puchury-major</i> .....	22
<b>Figura 6.</b> Sementes de <i>Licaria puchury-major</i> (a) com tegumento, (b) Sementes “moqueadas”: esbranquiçadas, (c) secas ao sol, (d) sementes “abortadas”.....	23
<b>Figura 7.</b> Cascas de <i>Licaria puchury-major</i> (a) com manchas líquênicas, (b) secas ao sol....	24
<b>Figura 8.</b> Raiz de <i>Licaria puchury-major</i> .....	24
<b>Figura 9.</b> (a) semente ralada na língua do pirarucu, (b) chá da semente, (c) semente utilizada como defumação.....	26
<b>Figura 10.</b> Espectros de UV-vis de nanopartículas de prata selecionadas e mudança de coloração correlacionado com o comprimento de onda com a cor das nanopartículas.....	58
<b>Figura 11.</b> Espectros de UV-vis de nanopartículas de prata selecionadas na etapa I (a) após seis meses de preparação, (b) após sistema de lavagem.....	61
<b>Figura 12.</b> Curva padrão de ácido gálico.....	69
<b>Figura 13.</b> Curva de calibração da quercetina.....	70
<b>Figura 14.</b> Curva padrão de soro de albumina bovina.....	71
<b>Figura 15.</b> Espectro de FTIR dos extratos aquosos pelo método de infusão.....	72
<b>Figura 16.</b> Cromatogramas dos extratos de diferentes partes da planta <i>Licaria puchury-major</i> obtidos em diferentes comprimentos de onda. (a) 215 nm; (b) 254 nm e (c) 280 nm.....	74
<b>Figura 17.</b> Espectros FTIR dos extratos aquosos obtidos pelo método de infusão.....	77
<b>Figura 18.</b> Espectros de UV-vis das AgNPs biossintetizadas pelo método de infusão.....	79
<b>Figura 19.</b> (a e b) Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanopartículas de prata e (c) histograma da distribuição de tamanho de AgNPs-FI.....	84
<b>Figura 20.</b> (a e b) Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanopartículas de prata e (c) histograma da distribuição de tamanho de AgNPs-CI.....	84
<b>Figura 21.</b> (a) Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanopartículas de prata e (c) histograma da distribuição de tamanho de AgNPs-SI.....	84
<b>Figura 22.</b> (a e b) Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanopartículas de prata e (c) histograma da distribuição de tamanho de AgNPs-SabI.....	84
<b>Figura 23.</b> DRX – Espectro das nanopartículas de prata.....	88
<b>Figura 24.</b> Zona de inibição da AgNPs promissora (AgNPs-FI) após 24 horas frente as bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> (a) e <i>Escherichia coli</i> (b). AgNPs-FI (1), Controle positivo: Cloranfenicol (2), Padrão: AgNO <sub>3</sub> (3).....	90
<b>Figura 25.</b> Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da AgNPs promissora (AgNPs-FI) após 24 horas frente as bactérias (a) <i>Staphylococcus aureus</i> e (b) <i>Escherichia coli</i> .....	91

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Plantas exploradas na biossíntese de nanopartículas de prata.....	31
<b>Quadro 2.</b> Nanopartículas de prata biossintetizadas com extratos de plantas utilizadas como antimicrobiano .....	36

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características dos reagentes utilizados neste trabalho .....	41
<b>Tabela 2.</b> Abreviações para as nanopartículas de prata .....	44
<b>Tabela 3.</b> Quantidades de reagentes e solventes usados para curva de calibração com ácido gálico .....	45
<b>Tabela 4.</b> Quantidades de reagentes e solventes usados para determinação de fenólicos totais nos extratos da planta .....	45
<b>Tabela 5.</b> Quantidades de reagentes e solventes usados para determinação de fenólicos totais nos extratos da planta liofilizada .....	46
<b>Tabela 6.</b> Quantidades de reagentes e solventes usados para curva de calibração quercetina .....	47
<b>Tabela 7.</b> Quantidades de reagentes e solventes usados para determinação de flavonoides dos extratos da planta .....	48
<b>Tabela 8.</b> Quantidades de reagentes e solventes usados para curva de calibração do BSA ...	49
<b>Tabela 9.</b> Mudança de coloração das soluções coloidais biossintetizados com diferentes extratos das diferentes estruturas anatômicas de <i>Licaria puchury-major</i> pelos métodos: a frio, decocção e infusão.....	56
<b>Tabela 10.</b> Banda plasmônica das nanopartículas de prata biossintetizada com o extrato de <i>Licaria puchury-major</i> por diferentes métodos de obtenção.....	57
<b>Tabela 11.</b> Atividade antimicrobiana das nanopartículas de <i>Licaria puchury-major</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> .....	62
<b>Tabela 12.</b> Atividade antimicrobiana das AgNPs biossintetizadas pelo método a frio e das soluções que não formaram AgNPs.....	63
<b>Tabela 13.</b> Atividade antimicrobiana das AgNPs biossintetizadas pelo método de decocção e das soluções que não formaram AgNPs .....	65
<b>Tabela 14.</b> Atividade antimicrobiana das AgNPs biossintetizadas pelo método de infusão e das soluções que não formaram AgNPs.....	66
<b>Tabela 15.</b> Concentração de fenólicos totais (liofilizado e não liofilizado), flavonoides totais e proteínas obtidos dos extratos das diferentes partes da planta <i>Licaria puchury-major</i> .....	68
<b>Tabela 16.</b> Íons moleculares presentes no extrato aquoso de <i>Licaria puchury-major</i> .....	75
<b>Tabela 17.</b> Possíveis moléculas presentes nos extratos aquosos de <i>Licaria puchury-major</i> obtidas por Espectrômetro de Massas (EM) no modo negativo.....	76
<b>Tabela 18.</b> Análises de DLS - diâmetro, potencial zeta e polidispersividade das nanopartículas de prata biossintetizadas pelo método de infusão.....	81
<b>Tabela 19.</b> Concentração da prata obtida por ICP-OES (Espectrômetro de Emissão Óptica por Plasma Indutivamente Acoplado .....	88
<b>Tabela 20.</b> Atividade antimicrobiana da AgNPs-FI determinada pela técnica de difusão em ágar .....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, UNIDADES, TERMINOLOGIAS E SÍMBOLOS

**Ag<sup>+</sup>**: íon prata

**Ag**: prata

**AgNO<sub>3</sub>**: nitrato de prata

**AgNPs**: nanopartículas de prata

**AgNPs-CI**: nanopartículas de prata biossintetizadas com o extrato da cúpula pelo método de infusão

**AgNPs-FD**: nanopartículas de prata biossintetizadas com o extrato da folha pelo método de decocção

**AgNPs-FI**: nanopartículas de prata biossintetizadas com o extrato da folha pelo método de infusão

**AgNPs-GF**: nanopartículas de prata biossintetizadas com o extrato do galho pelo método a frio

**AgNPs-GI**: nanopartículas de prata biossintetizadas com o extrato do galho pelo método de infusão

**AgNPs-SF**: nanopartículas de prata biossintetizadas com o extrato da semente pelo método a frio

**AgNPs-SI**: nanopartículas de prata biossintetizadas com o extrato da semente pelo método de infusão

**AgNPs-SabI**: nanopartículas de prata biossintetizadas com o extrato da semente abortada pelo método de infusão

**Å**: angström (é uma unidade de medida utilizada na física para átomo ou espaçamentos entre dois planos cristalinos)

**A**: ampère (unidade de corrente elétrica)

**ATCC**: Coleção de micro-organismos Norte Americano (do inglês American type culture collection)

**AlCl<sub>3</sub>**: cloreto de alumínio

**BSA**: soro de albumina bovino

**°C**: graus Celsius

**cm**: centímetro

**CIM**: Concentração Inibitória Mínima

**CLAE**: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês high performance liquid chromatography, HPLC)

**Da**: Dalton (unidade de medida utilizada para expressar a massa atômica)

**DNA**: ácido desoxirribonucleico

**DLS**: Espalhamento Dinâmico de Luz (do inglês Dynamic Light Scattering)

**DRX**: Difractometria de Raios X

**E-FI**: extrato da folha, pelo método de infusão

**E-GI**: extrato do galho, pelo método de infusão

**E-CI**: extrato da cúpula, pelo método de infusão

**E-SI**: extrato da semente, pelo método de infusão

**E-SabI**: extrato da semente abortada, pelo método de infusão

**E-R**: extrato da raiz, pelo método de infusão

**E-Cs**: extrato da casca, pelo método de infusão

**EM**: Espectrômetro de Massas

**ESI**: Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray

**FTIR**: Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

**g**: grama

**h**: hora

**HNO<sub>3</sub>**: ácido nítrico  
**ICP-OES**: Espectrometria Óptica de Emissão por Plasma Indutivamente Acoplado  
**IV**: infravermelho  
**kg**: quilo grama  
**kV**: quilovolt (medida de tensão elétrica)  
**KCl**: cloreto de potássio  
**L**: litro  
**m**: metro  
**MABA**: técnica do alamar blue em microplaca  
**mesh**: diâmetro da esfera que possui a mesma área superficial da partícula (utilizado para especificação de peneiras)  
**mg**: miligrama  
**min**: minuto  
**mL**: mililitro  
**mM**: concentração milimolar  
**mm**: milímetro  
**m/z**: razão massa/carga  
**nm**: nanômetro ( $10^{-9}$  m)  
**NPs**: nanopartículas  
**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>**: carbonato de sódio  
**NaNO<sub>2</sub>**: nitrito de sódio  
**NaOH**: hidróxido de sódio  
**pH**: potencial hidrogeniônico  
**ppm**: parte por milhão  
**s**: segundo  
**SPR**: Ressonância Plasmônica de Superfície (do inglês Surface Plasmon Resonance)  
**T**: temperatura  
**TEM**: Microscopia Eletrônica de Transmissão  
**μ**: micro ( $1 \times 10^{-6}$  m)  
**μg**: micrograma  
**μL**: micro Litro  
**μm**: micrômetro  
**UV-vis**: ultravioleta-visível  
**V**: volt (unidade de voltagem da tensão elétrica)  
**λ**: comprimento de onda  
**%**: porcentagem  
**(ζ)**: potencial zeta  
**Ω**: ohm (símbolo representa a unidade de medida da resistência elétrica)

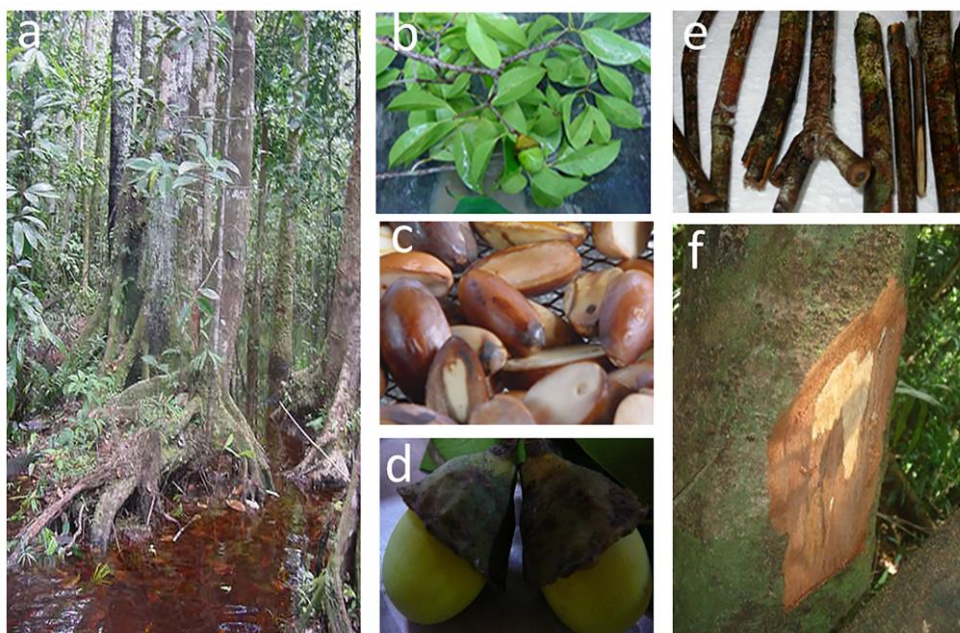
## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
3.1 A ESPÉCIE <i>Licaria puchury-major</i> (Mart.) Kosterm.....	19
3.1.1 Sinonímia da Espécie <i>Licaria puchury-major</i> (Mart.) Kosterm.....	19
3.1.2 Nomes Atribuídos à Espécie.....	19
3.1.3 Distribuição/ <i>habitat</i> .....	20
3.1.4 Dispersão .....	20
3.1.5 Descrição Botânica das Estruturas Anatômicas da Espécie <i>Licaria puchury-major</i> . ....	20
3.1.5.1 Estrutura anatômica da árvore.....	21
3.1.5.2 Estrutura anatômica do fruto.....	21
3.1.5.3 Estrutura anatômica da folha.....	22
3.1.5.4 Estrutura anatômica da semente.....	22
3.1.5.5 Estrutura anatômica da casca.....	24
3.1.5.6 Estrutura anatômica da raiz.....	24
3.1.6 Usos de <i>Licaria puchury-major</i> .....	24
3.1.7 Estudos Realizados com a Espécie.....	26
3.2 NANOTECNOLOGIA .....	27
3.2.1 Nanopartículas Metálicas.....	27
3.2.2 Nanopartículas de Prata.....	28
3.2.2.1 Nanopartículas de prata produzida pela síntese verde.....	29
3.2.2.1.1 <i>Nanopartículas de prata biossintetizadas com extratos de plantas</i> .....	30
3.2.2.1.2 <i>Nanopartículas de prata biossintetizadas com extratos de plantas utilizadas como antimicrobiano</i> .....	34
3.2.2.1.3 <i>Aplicações e perspectivas de nanopartículas de prata biossintetizadas com extratos vegetais</i> .....	38
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	39
4.1 MATÉRIA-PRIMA .....	41
4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DAS ESTRUTURAS ANATÔMICAS DE <i>Licaria puchury-major</i> .....	42
4.2.1 Método de Extração por Infusão.....	42
4.2.2 Método de Extração a Frio.....	42
4.2.3 Método de Extração por Decocção.....	42
4.3 PREPARO DA BIOSÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs) .....	43
4.3.1 Processo de Lavagem (Purificação das Nanopartículas).....	43
4.4 NOMENCLATURA DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	43
4.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO .....	44
4.5.1 Caracterização dos Extratos.....	44
4.5.1.1 Determinação de fenólicos totais.....	44
4.5.1.2 Determinação de flavonoides totais.....	46
4.5.1.3 Determinação de proteínas .....	48
4.5.1.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	49
4.5.1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	49
4.5.1.6 Espectrômetro de Massas (EM).....	50
4.5.2 Caracterização das Nanopartículas de Prata.....	50

4.5.2.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	50
4.5.2.2 Espectroscopia na Região do Ultravioleta-visível (UV-vis).....	51
4.5.2.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	51
4.5.2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	51
4.5.2.5 Difração de Raio X (DRX).....	51
4.5.2.6 Espectrometria Óptica de Emissão por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES).....	52
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	52
4.6.1 Atividade Antimicrobiana Determinada pela Técnica de Difusão em Ágar.....	52
4.6.2 Atividade Antimicrobiana Determinada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	53
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
5.1 ETAPA I – SELEÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO PROMISSOR NA BIOSSÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs) PARA CARACTERIZAÇÃO.....	56
5.1.1 Formação das AgNPs Indicadas pela Alteração da Cor.....	56
5.1.2 Análise por Espectroscopia na Região do Ultravioleta-visível (UV-vis).....	57
5.1.3 Estabilidade Após Seis Meses de Armazenamento sob Refrigeração e Após Sistema de Lavagem por Análise de UV-vis.....	60
5.1.4 Atividade Antimicrobiana das AgNPs Determinadas pela Técnica de Difusão em Ágar.....	61
5.2 ETAPA II - CARACTERIZAÇÃO DO MÉTODO PROMISSOR DE EXTRAÇÃO NA PRODUÇÃO DA BIOSSÍNTESE DA NANOPARTÍCULA DE PRATA.....	67
5.2.1 Caracterização dos Extratos Obtidos pelo Método Promissor (Infusão).....	67
5.2.1.1 Determinações dos teores de fenólicos totais, flavonoides totais e proteínas.....	67
5.2.1.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) dos extratos de <i>Licaria puchury-major</i> .....	71
5.2.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos extratos de <i>Licaria puchury-major</i> .....	73
5.2.1.4 Espectrômetro de Massas (EM) dos extratos de <i>Licaria puchury-major</i> .....	74
5.2.2 Caracterização das Nanopartículas de Prata Produzidas pela Biossíntese pelo Método de Infusão.....	76
5.2.2.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) das AgNPs.....	76
5.2.2.2 Espectroscopia na Região do Ultravioleta-visível (UV-vis).....	78
5.2.2.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	81
5.2.2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	83
5.2.2.5 Difração de Raio X (DRX).....	87
5.2.2.6 Espectrômetro de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado (ICP-OES).....	88
5.3 ETAPA III – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA NANOPARTÍCULA PROMISSORA OBTIDA PELO MÉTODO DE INFUSÃO.....	89
5.3.1 Determinação pelo Método de Difusão em Ágar.....	89
5.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	90
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>93</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>94</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>95</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>109</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A *Licaria puchury-major* (Mart.) Kostermans é uma espécie arbórea da Região Amazônica, pertence à família Lauraceae, ao gênero *Licaria*, planta aromática e medicinal, conhecida popularmente como puxuri ou puchuri; ocorre em áreas periodicamente inundadas e de terra firme, com maior frequência no município de Borba - Amazonas, no Rio Mapiá e afluentes (SILVA; MAIA, 1973; CRONQUIST, 1981; MAIA; RAMOS; LUZ, 1985; GRAÇA, 2010;) (Figura 1).



**Figura 1.** *Licaria puchury-major* e suas estruturas vegetais: a-árvore; b-folhas; c-semente; d-cúpula; e-galhos; f-casca  
**Fonte:** Rosilane R. Graça

A folha, a casca do tronco, o fruto e a semente são bastantes valorizados por suas propriedades aromáticas e digestivas (ALVES et al., 2006). Na medicina popular, essas estruturas são utilizadas na forma de chá para problemas intestinais, diarreia e dispepsia; na forma de pó, são aplicadas como cataplasmas para queimaduras (BERG, 1993); e, o chá das folhas e dos galhos finos é um substituto do café, nas comunidades de Borba-AM (GRAÇA, 2010).

Embora haja comercialização das sementes para o mercado local e exportação para outros estados brasileiros, inexistem qualquer produto elaborado com as biomoléculas de *L. puchury-major* (GRAÇA, 2003).

As biomoléculas de plantas apresentam diferentes aplicações, incluindo o seu uso na área da saúde como antimicrobianos. Diversas pesquisas em relação à atividade antimicrobiana



têm sido desenvolvidas por diferentes métodos, e a biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs) envolvendo extratos vegetais vem-se sobressaindo devido à excelente aplicação de suas propriedades biológicas (BANERJEE et al., 2014; LOGESWARI; SILAMBARASAN; JAYANTHI, 2015; MIRI et al., 2015). Assim, a nanotecnologia pode ser uma alternativa para a exploração dessa planta em relação à sua ação antimicrobiana para futura aplicação na indústria farmacêutica.

A nanotecnologia envolve o estudo multidisciplinar com base no desenvolvimento, na caracterização e no emprego de estruturas, de dispositivos e de sistemas com forma e tamanho na escala nanométrica (1-100 nm) (SANTOS e FIALHO, 2007; VENGADESH et al., 2011; BHAJI et al., 2014; VERMA et al., 2015). A exigência e o aumento da conscientização do emprego sustentável da biodiversidade, houve um direcionamento e a concentração de investigações em “química verde”, condição que está promovendo a redução do uso de produtos químicos tóxicos nocivos à saúde humana e ao meio ambiente (AJITHA; REDDY; REDDY, 2015; MO et al., 2015). Nesse contexto, a nanobiotecnologia representa uma integração entre a biotecnologia e a nanotecnologia para o desenvolvimento de tecnologias ambientalmente sustentáveis e para a síntese de novos materiais (NIEMEYER, 2006; AKHTAR; PANWAR; YUN, 2013; KIM; ZHANG; YANG, 2015).

Na fabricação de nanoestruturas funcionais, como as nanopartículas metálicas, a nanotecnologia vem-se tornando a ferramenta de excelência em função dessas nanopartículas transportarem com eficiência substâncias nos organismos, nos tecidos ou nas células, melhorando a sua eficácia terapêutica e diminuindo o efeito tóxico das substâncias por elas veiculadas (SANTOS e FIALHO, 2007; BORASE et al., 2014; JEEVA et al., 2014; MUTHUKRISHNAN et al., 2015).

As nanopartículas apresentam propriedades características e específicas, tais como tamanho, distribuição e morfologia. As de prata têm destaque devido ao conhecido efeito inibitório desse elemento químico frente a diversas bactérias, o que promoveu sua aplicação medicinal, além do fato da prata apresentar baixa toxicidade em tecido de mamíferos (SAVITHRAMMA et al., 2011; GUDADHE et al., 2013; MIRI et al., 2015; SLEPICKA et al., 2015).

Nos últimos anos, as AgNPs têm sido avaliadas como um veículo para liberação direcionada de antibióticos e desenvolvimento de compostos para utilização como filtros de desinfecção e materiais de revestimento. No entanto, a propriedade bactericida dessas nanopartículas depende da sua estabilidade no meio, propriedade que confere maior tempo de retenção para a interação entre a bactéria e a nanopartícula (SINGH et al., 2015). A síntese de

nanopartículas é feita por métodos físicos e químicos, mas o seu sistema biológico tem chamado a atenção por ser uma técnica eficaz e ecológica. Esse método utiliza organismos como bactérias, fungos e plantas, fontes de compostos bioativos, beneficiando tanto o homem quanto todos os ecossistemas, por ser um procedimento ambientalmente aceitável e não tóxico (AJITHA; REDDY; REDDY, 2015).

A biossíntese de nanopartículas metálicas utilizando métodos biológicos pode oferecer vantagens, como a relação custo-eficácia, por ser um método simples, de baixo custo e apropriado para aplicações medicinais (RAI et al., 2008; PATIL et al., 2012; ROY et al., 2013; ARRUDA et al., 2015). Essa via oferece valiosa contribuição para a síntese verde e para a nanotecnologia sem uso de produtos químicos tóxicos (AJITHA; REDDY; REDDY, 2015). A escolha da rota de síntese de nanopartículas verde tem recebido crescente atenção, por estar relacionada com a necessidade de desenvolver protocolos experimentais ambientalmente correto, sem a manipulação de produtos químicos e solventes tóxicos, com o objetivo de obter e utilizar materiais renováveis e biocompatíveis de fácil preparação (SALEM et al., 2014; KONJARI et al., 2015).

A síntese verde utilizando extrato de plantas é um método rápido de etapa única, de baixo custo, ambientalmente benéfico, com gasto reduzido de energia (HUANG et al., 2007; SATHISHKUMAR et al., 2010, 2012; SHAMELI et al., 2012; AKHTAR; PANWAR; YUN, 2013). Certas espécies de plantas sintetizam biomoléculas funcionais que reduzem ativamente íons metálicos e atuam como agentes protetores e estabilizadores das nanopartículas. Flavonoides, proteínas, polifenóis e carboidratos presentes nos extratos de plantas são os agentes mais promissores para síntese de nanopartículas (HUANG et al., 2007; RAI; YADAV; GADE, 2009; DING et al., 2014; JEEVA et al., 2014; KUMAR; PALANICHAMY; ROOPAN, 2014; AJITHA et al., 2015; IBRAHIM et al., 2015).

Nanopartículas metálicas têm atraído grande interesse na comunidade científica devido à variedade de aplicações, entre outras, em biomedicina, em processos de catálise e na preparação de nanocompostos (GUPTA; ANDERSON; RAI, 2015; MUTHUKRISHNAN et al., 2015). Entre as nanopartículas metálicas, as de prata ganharam interesse devido às suas propriedades únicas, tais como estabilidade química, boa condutividade, excelente catalisador, ação antibacteriana e antifúngica. Por essa razão, podem ser incorporadas em tecidos, cosméticos e embalagens (AHMED et al., 2016).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a biossíntese de AgNPs utilizando extratos das estruturas anatômicas de *L. puchury-major* para selecionar a nanopartícula mais promissora com atividade antimicrobiana.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e padronizar um protocolo para extração dos bioativos por diferentes métodos de extração utilizando folha, casca do caule, galho, cúpula, raiz e semente desidratados de *L. puchury-major*;
- Proceder a biossíntese de AgNPs a partir do extrato aquoso de cada estrutura vegetal;
- Selecionar o método de obtenção de extratos mais promissor para a biossíntese de AgNPs;
- Determinar a atividade antimicrobiana das AgNPs frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*;
- Caracterizar as AgNPs obtidas pelo método de extração promissor quanto à forma, ao tamanho e à polidispersividade;
- Caracterizar os extratos de *L. puchury-major* obtidos pelo método de extração promissor.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A ESPÉCIE *Licaria puchury-major* (Mart.) Kosterm.

##### 3.1.1 Sinonímia da Espécie *Licaria puchury-major* (Mart.) Kosterm

*Ocotea puchury-minor* Mart. (basiônimo, 1830), *Ocotea puchury-major*, Mart. (1831), *Nectandra puchury-minor* (Mart.) Nees (1831), *Nectandra puchury-major* (Mart.) Nees (1836), *Ocotea puchury-minor* Mart. (1836), *Nectandra minor* Nees (1836), *Nectandra puchury-minor* (Mart.) Nees (1836), *Nectandra puchury-major* (Mart.) Nees & C. Martius et Nees (1836), *Aniba puchury-minor* Mez (1889), *Nectandra puchury-minor* Nees et Mart. (1889), *Acrodiclidium puchury-major* Mez. (1889), *Nectandra puchury-major*, Nees. (1889), *Acrodiclidium puchury-major* (Mart.) Mez. (1889), *Nectandra pichurim* (H.B. & K.) Mez. (1889), *Nectandra pichurim* Mez. (1889), *Nectandra cuspidata*, Nees. (1889), *Nectandra puchury-major* Peckolt. (1891), *Ocotea pichurim*, Peckolt. (1891), *Nectandra pichurini* Mez. et Duran & Jackson (1906), *Acrodiclidium pucheri* (Ruiz et Pav.) Kosterm. (1936), *Nectandra puchuri*, Nees et Kosterm. (1936), *Nectandra pichurim* (H.B.K.), Mez. (1936), *Ocotea pichury-major*, Peckolt. (1936); *Nectandra pichury-major*, Peckolt. (1936), *Ocotea puchury-minor*, Mart. (1936), *Nectandra puxuri* Nees et Kosterm. (1936), *Acrodiclidium puchury-major* (Mart.) Mez. (1936) e *L. puchury-major* (Mart.) Kosterm. (LÊ COINTE, 1937; DUKE, 1947; COE TEIXEIRA, 1980).

##### 3.1.2 Nomes Atribuídos à Espécie

A espécie *L. puchury-major* (Mart.) Kosterm é conhecida popularmente por pixuri, puxurim, pixurim, puchuri-grosso, puchuri-miúdo, puchuri-bastardo, puchuri-pequeno, puxuri-branco, puchuri-preto, puxurirana, pexorim, pichury, louro-pucherim, fava-de-puxiri, fava-de-pexorim, fava-de-puchorin (CRONQUIST, 1981; MAIA; RAMOS; LUZ, 1985). Puxuri, puxuri-imbaúba e puxuri-roxo (GRAÇA, 2010).

### 3.1.3 Distribuição/habitat

A planta ocorre na Região Amazônica e se estende até o Brasil Central (MAIA; RAMOS; LUZ, 1985). A maior ocorrência da espécie nativa se dá no município de Borba, localizado na região do Madeira-AM, no rio Mapiá e em todos seus afluentes; habita as margens dos rios e igarapés periodicamente inundáveis e os igapós, cujas águas são bastante frias, fatores favorecidos pela área, clima e região. Há relatos de ocorrência também no município de Silves, prevalecendo o plantio. A concentração da espécie nessas localidades faz que o conhecimento empírico fique restrito às comunidades (GRAÇA, 2010) (Figura 2).



**Figura 2.** Habitat de *Licaria puchury-major* na Região Amazônica  
**Fonte:** Rosilane R. Graça

### 3.1.4 Dispersão

A dispersão dos frutos é do tipo zoocórica, feita por pássaros, macacos e certos roedores que são atraídos pelos frutos, que, quando maduros, são verdes ou amarelos. Os espécimes que ocorrem próximos dos rios, igarapés, igapós ou em áreas alagadas têm dispersão hidrocórica, uma vez que os frutos possuem espaços cheios de ar (aerênquima) entre a testa e o endocarpo, que contribuem para a flutuação (GRAÇA, 2010).

### 3.1.5 Descrição Botânica das Estruturas Anatômicas da Espécie *Licaria puchury-major*

A descrição botânica da espécie foi realizada pela Professora Doutora Marlene Silva (*in memoriam*), do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Os dados descritos são parte de trabalhos de graduação (2003) e de mestrado (2010) realizados pela autora.

### 3.1.5.1 Estrutura anatômica da árvore

As árvores nativas de *L. puchury-major* apresentam odor característico em todas as estruturas anatômicas, como cúpula, casca, folha, flor, fruto, galho, madeira, semente e raiz. A altura e o volume do fuste da árvore variam de acordo com a localização dos indivíduos. Na floresta úmida, periodicamente alagável, a população é mais densa, e os indivíduos são mais volumosos e produtivos, principalmente nas cabeceiras dos igarapés. As árvores (Figura 3) atingem em média 20-30 m de altura e 70-80 cm de diâmetro; no igapó assumem menor porte e volume, atingindo no máximo 11-15 m de altura por 55 cm de diâmetro (GRAÇA, 2003; 2010).



**Figura 3.** Árvore de *Licaria puchury-major*  
**Fonte:** Rosilane R. Graça

### 3.1.5.2 Estrutura anatômica do fruto

O fruto é do tipo bacáceo, ovoide; possui 2-5 cm de comprimento, 1-2 cm de diâmetro, endocarpo doce e aromático, inserido em uma cúpula ou pedúnculo espesso e rugoso, que o recobre até quase a metade, quando maduro (Figura 4). A coloração verde do fruto não é um bom parâmetro para identificar se está fisiologicamente maduro, uma vez que na maturação se apresenta verde, variando de verde-claro (puxuri-embaúba) para o verde-escuro (puxuri-roxo) (GRAÇA, 2003; 2010).



**Figura 4.** Fruto com cúpula de *Licaria puchury-major*  
**Fonte:** Rosilane R. Graça

### 3.1.5.3 Estrutura anatômica da folha

As folhas são muito aromáticas; possuem ramos eretos; quando jovens, glabros (Figura 5). São alternadas ou subopostas, cartáceas, subcoriáceas a coriáceas, elípticas a oblongas, 8-14 cm de comprimento, 3,5-5,5 cm de largura, ápice acuminado a ligeiramente caudado, base obtusa a subaguda, glabras, lustrosas na face ventral, pardacentas e mais claras no dorso (GRAÇA, 2003; 2010).



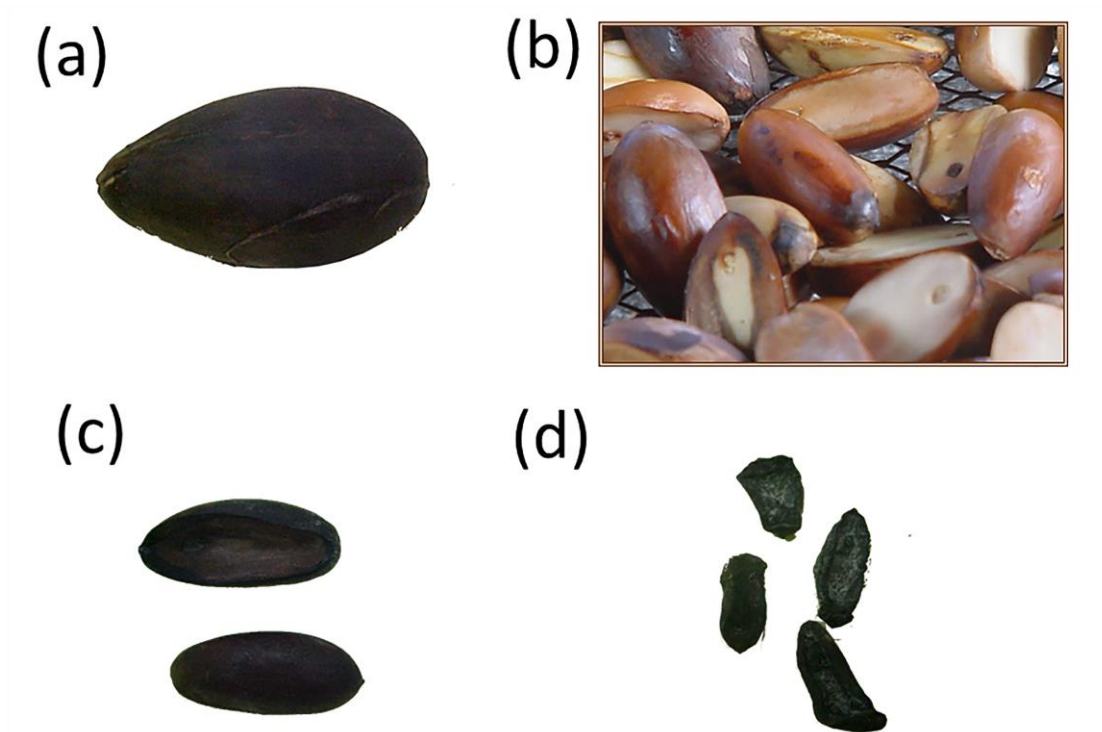
**Figura 5.** Folha de *Licaria puchury-major*  
**Fonte:** Rosilane R. Graça

### 3.1.5.4 Estrutura anatômica da semente

A semente de *L. puchury-major* é constituída por dois cotilédones espessos, aromáticos, que se separam somente após o processo denominado “moqueamento”, que consiste em levar as sementes cruas com o tegumento (Figura 6-a) ao forno de barro para serem aquecidas pelas brasas, quando as sementes são colocadas em um tacho e são manipuladas com um remo, para não queimarem. O aquecimento ocorre somente para soltar o tegumento, e o processo é

semelhante ao realizado com o amendoim (*Arachis* sp.), do qual, depois de torrado, a “casca” sai com facilidade.

As sementes, após serem “moqueadas”, ficam esbranquiçadas (Figura 6-b); e o próximo passo é levá-las ao sol durante oito a dez dias para secarem e ganharem cor escura (Figura 6-c). Os primeiros frutos não germinam e são todos abortados pela árvore (Figura 6-d). Os frutos provenientes desse fenômeno natural são denominados pelos coletores locais de “cachimbo”, os quais são exclusivamente destinados para a alimentação da fauna local, visto que os coletores não têm interesse de os guardarem por serem enrugados e por não possuírem valor comercial. Os frutos bem desenvolvidos e maduros caem naturalmente das árvores e não ficam murchos, entretanto os que são apanhados diretamente delas, ainda imaturos, não servem para serem comercializados, pois, ao serem “moqueados” ou secos ao sol, ficam murchos e enrugados (GRAÇA, 2003; 2010).



**Figura 6.** Sementes de *L. puchury-major* (a) Semente com tegumento, (b) Sementes “moqueadas”: esbranquiçadas, (c) Sementes escuras secas ao sol, (d) sementes “abortadas”

**Fonte:** Rosilane R. Graça



### 3.1.5.5 Estrutura anatômica da casca

A casca do tronco (Figura 7) é em geral marrom-acinzentada, com lenticelas e manchas líquênicas brancas e esverdeadas. Possui aroma característico decorrente da existência de óleo essencial no interior de células oleaginosas (GRAÇA, 2003; 2010).



**Figura 7.** Cascas de *Licaria puchury-major* (a) com manchas líquênicas, (b) secas ao sol  
**Fonte:** Rosilane R. Graça

### 3.1.5.6 Estrutura anatômica da raiz

A raiz (Figura 8) apresenta sistema radicular pivotante, ocorrência característica de dicotiledôneas, com raiz primária axial, cilíndrica, creme, espessa, glabra. As raízes secundárias são irregularmente distribuídas e são também espessas, cremes e glabras; possuem a cor castanho-clara de aspecto brilhoso, cheiro forte e aromático (GRAÇA, 2003; 2010).



**Figura 8.** Raiz de *Licaria puchury-major*  
**Fonte:** Rosilane R. Graça

### 3.1.6 Usos de *Licaria puchury-major*

O primeiro relato sobre o uso da espécie foi no Brasil, no século XIX, em 1855, no Grão-Pará, onde a semente ralada era chamada de “pó de marfim”, utilizada nos casos de *Colera*

*murbus*, doença trazida da Europa, particularmente do norte de Portugal (BELTRÃO, 1997; 1999; 2000).

A literatura reporta o uso das diferentes estruturas botânicas da espécie *L. puchury-major* na medicina popular. Os chás dos frutos, cascas do tronco, folhas e sementes são utilizados como tônico resolutivo e estimulante, contra diarreia, dispepsia, problemas intestinais e leucorreia (MAIA, 1973).

A semente é utilizada também como carminativa e estomáquica no tratamento de insônia e irritabilidade de adultos e de crianças (CARLINI; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 1983); ralada, é usada para fazer emplastos contra queimaduras (BERG, 1986; 1993). As sementes e as folhas são estimulantes, tônicas e adstringentes, com bons resultados nos casos de dores intestinais e paralesia dos intestinos, porque ativam os movimentos peristálticos (MAIA; RAMOS; LUZ, 1973; 1985).

O chá do fruto e da folha tem propriedades sedativas. O cozimento da folha verde é usado para reumatismo. O chá da casca do tronco é resolutivo e usado contra os problemas intestinais e asma, o qual é preparado pela trituração da semente, que é adicionada a um copo com água fervente. O remédio assim elaborado é conhecido como “abafado” (MAIA; RAMOS; LUZ, 1985; BERG 1986; 1993).

Nas comunidades do município de Borba a semente é ralada na língua do pirarucu, o que resulta em um pó fino do qual é preparado o chá utilizado para problemas do trato gastrointestinal. Além da semente, as outras estruturas da espécie também são utilizadas pelas comunidades locais e pelos animais (GRAÇA, 2010).

Os frutos das árvores localizadas nas cabeceiras dos rios, próximo à margem, quando estão com frutos, servem de alimentos para macacos, morcegos e vários tipos de aves, como araras e papagaios. Os que não são coletados permanecem na água e servem de alimentos para tartarugas, cabeçudos e matrinxã. Os coletores e moradores das comunidades onde ocorrem a espécie *L. puchury-major* afirmaram que a carne dos animais que consomem os frutos agrega sabor e aroma do fruto. Os que caem próximo à margem do rio são comidos pelos animais roedores como ratos, cutias e pacas. Aqueles que não são coletados ou consumidos são levados pelas águas e germinam pelo leito do rio (GRAÇA, 2003).

As folhas e os galhos finos substituem o café, nas comunidades que ficam distantes da cidade. As outras partes são utilizadas para fazer banhos e defumação para energizar ambientes. Os coletores vendem as sementes moqueadas para o comércio local, o qual as revende para compradores de outros estados; porém, no mercado não se conhece nenhum produto feito a

partir de alguma parte da árvore. Ilustrações de usos de *L. puchury-major* pelas comunidades podem ser observadas na Figura 9 (GRAÇA, 2010).



**Figura 9.** (a) semente ralada na língua do pirarucu, (b) chá da semente, (c) semente utilizada como defumação  
**Fonte:** Rosilane R. Graça

### 3.1.7 Estudos Realizados com *Licaria puchury-major*

A literatura reporta diversos trabalhos realizados com o óleo essencial de *L. puchury-major* extraído das estruturas anatômicas da semente (ROURE-BERTRAND, 1920; GOTTLIEB, 1956; MELO e CARLINI, 1973; SILVA e MAIA, 1973; CARLINI; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 1983), da folha, do galho (SEABRA et al., 1967) e da madeira do tronco (MAIA, 1973; SILVA e MAIA, 1973). E citaram o estudo do hidrolato (resultante do arraste com vapor de água da extração do óleo essencial da semente), utilizado para promover proteção contra as convulsões induzidas por choque elétrico (CARLINI; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 1983).

Alguns desses efeitos farmacológicos são atribuídos à presença de safrol, eugenol e metileugenol (CARLINI; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 1983). Himejima e Kubo (1992) estudaram a atividade antimicrobiana dos extratos hexânicos das sementes bem como seu efeito sinérgico com poligodial.

Graça (2003) realizou estudo etnobotânico em várias comunidades do município de Borba-AM, onde fez levantamento sobre o uso, *habitat*, safra e colheita, a respeito da espécie. Uchiyama et al., (2009) estudaram a indução de apoptose em células humanas de leucemia (Jurkat) por neolignanas isoladas do extrato etanólico da semente. Graça (2010) avaliou a atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana do óleo essencial da folha e da flor, além do chá da folha, do galho fino, do caule e da semente.

## 3.2 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é o conjunto de tecnologias, técnicas e processos para a preparação, a caracterização, a manipulação e o controle de átomos ou moléculas para construir novos materiais, com novas propriedades, inerentes às suas dimensões nanométricas (MAHMOUDI et al., 2014). Está inserida na nanociência, que estuda o uso da matéria em escala nanométrica utilizando os princípios da física, da química e da biotecnologia (DURÁN et al., 2010).

A interface da nanotecnologia em combinação com a biotecnologia no desenvolvimento de tecnologias ambientalmente corretas para a síntese de nanomateriais fez surgir a nanobiotecnologia, que representa a integração multidisciplinar entre a ciência, a tecnologia e o meio ambiente (HUANG et al., 2007; RAI; YADAV; GADE, 2009).

O avanço nessas áreas está proporcionando o desenvolvimento de produtos inovadores na escala nanométrica com aplicações em diversas áreas da saúde, agricultura, alimentação, transportes, energia, eletrônica e comunicação (GRILLO; ROSA; FRACETO, 2015). Os nanomateriais provenientes da nanotecnologia são empregados principalmente na medicina (GUPTA; ANDERSON; RAI, 2015; SLEPICKA et al., 2015).

### 3.2.1 Nanopartículas Metálicas

De acordo com o Comitê Europeu de Normatização, os nanomateriais são definidos como um material natural, incidental ou fabricado, que contém partículas num estado desagregado ou na forma de um agregado ou de um aglomerado, em cuja distribuição número-tamanho 50% ou mais das partículas têm uma ou mais dimensões externas compreendidas entre 1 e 100 nm (GRILLO; ROSA; FRACETO, 2015), porém em dispositivos farmacêuticos ou médicos possuem diâmetros médio entre 100 e 1000 nm (MASKOS e STAUBER, 2011; LINSINGER et al., 2012; ARRUDA et al., 2015). Embora seja um campo de estudo em larga expansão, o conceito de nanopartícula e o seu estudo químico existem desde o século XIX (ASTRUC et al., 2004).

As nanopartículas metálicas são obtidas a partir de dispersões coloidais; e, de acordo com o método aplicado durante a síntese, podem ser compostas por metais, óxidos de metais, não metais, carbono, polímeros, lipídios, entre outros. Apresentam morfologias diversificadas, tais como nanocubos, nanoprismas, nanoesferas, nanotriângulos e nanofios (SARKAR; KAPOOR; MUKHERJEE, 2005; CHANG et al., 2011; ARRUDA et al., 2015).

As nanopartículas naturais, presentes no ambiente, derivam de acontecimentos como tempestades terrestres de poeira, erosão, erupções vulcânicas e incêndios florestais (GRILLO; ROSA; FRACETO, 2015).

As nanopartículas são um grupo especial de materiais; e atualmente estão entre os nanomateriais mais estudados, por apresentarem propriedades que estão entre os efeitos quânticos dos átomos. Essas características específicas como tamanho pequeno, vários formatos e maior área de superfície são fatores que deixam o material quimicamente mais reativo; e apresentam diferentes propriedades quando comparadas aos seus tamanhos de origem (AJITHA; REDDY; REDDY, 2015; PACIONI et al., 2015; RAJAN et al., 2015).

As nanopartículas metálicas vêm-se tornando a ferramenta mais utilizada na fabricação de nanoestruturas funcionais com características distintas e extensas aplicações em diferentes campos da ciência e da medicina (GADE et al., 2010; MUTHUKRISHNAN et al., 2015).

A sua síntese vem sendo extensivamente investigada na área da nanotecnologia, focada na síntese controlada de nanopartículas por meio de diversos métodos sintéticos, como físicos, químicos e biológicos, na busca por nanomateriais com diferentes tamanhos, formas e composição química, além do controle da sua dispersão para aplicações biológicas com benefícios humano (SATHISHKUMAR et al., 2009; SHAMELI et al., 2012; ROY et al., 2013; AJITHA; REDDY; REDDY, 2015).

### 3.2.2 Nanopartículas de Prata

Dentre os metais utilizados na síntese de nanopartículas, a prata é conhecida pelo seu amplo uso desde os tempos antigos, por prevenir e combater infecções. Na forma de nitrato e sulfadiazina pode ser utilizada no tratamento de queimaduras e feridas. No entanto, com o advento dos antibióticos a partir da década de 1940, houve seu decaimento significativo, e a sua utilização foi esquecida (DURÁN et al., 2010).

Na busca por novos antimicrobianos, devido ao aumento de bactérias resistentes aos antibióticos, houve o retorno notável pelo interesse da prata metálica na forma de AgNPs (RAI; YADAV; GADE, 2009), não somente por sua conhecida ação antimicrobiana, mas também por ser considerado o metal que apresenta menor toxicidade para as células animais (MIRI et al., 2015).

As AgNPs começaram a ser produzidas por via química e física, com elevada eficiência, obtendo-se partículas puras e com propriedades bem definidas. No entanto esses métodos de síntese são considerados muito caros e potencialmente perigosos para o meio ambiente. Para

contornar esse problema, recorreu-se ao uso de sistemas biológicos, como micro-organismos, extratos de plantas ou a sua biomassa para a produção de nanopartículas de forma ambientalmente correta (AJITHA; REDDY; REDDY, 2015).

### 3.2.2.1 Nanopartículas de prata produzida pela síntese verde

Atualmente, o uso da química verde para a síntese de nanopartículas metálicas tornou-se uma alternativa na área da nanociência e da nanotecnologia (MIRI et al., 2015). E tem recebido atenção, devido à crescente necessidade de desenvolver tecnologias ambientalmente sustentáveis para a síntese de nanomateriais. Recentemente, o uso da química verde, nomeadamente de sistemas biológicos ou síntese biogênica, tem adotado diferentes métodos biológicos para a produção de nanopartículas devido às suas múltiplas aplicações e vem ganhando reconhecimento (SHAMELI et al., 2012; HEBBALALU et al., 2013; LI et al., 2015).

O conceito de síntese verde, relacionado com o preparo de AgNPs, foi introduzido pela primeira vez por Raveendran e colaboradores, em 2003. Nesse trabalho, os pesquisadores usaram glicose como agente redutor e amido como agente estabilizador para produzir AgNPs (RAVEENDRAN; FU; WALLEN, 2003).

São utilizados produtos naturais com potencial para reduzir, formar e estabilizar as nanopartículas metálicas, como a biomassa oriunda de micro-organismos, tais como bactérias, fungos, como também, extratos de plantas provenientes de diversas estruturas do vegetal, além de usar enzimas, proteínas, aminoácidos, polissacarídeos, celulose, quitosana e outros metabólitos (SALEM et al., 2014; RAJAN et al., 2015; AHMED et al., 2016). A biorredução no processo biológico é mediada pelos constituintes presentes nos extratos que transformam o íon em prata metálica, resultando na formação de nanopartículas (BONATTO e SILVA, 2014).

A rota de síntese verde tem recebido crescente atenção, por estar relacionada com a necessidade de desenvolver protocolos experimentais ambientalmente benignos, sem a manipulação de produtos químicos e solventes tóxicos, com o objetivo de utilizar materiais renováveis e biocompatíveis e de fácil preparação (AJITHA; REDDY; REDDY, 2015). As técnicas de síntese empregadas na produção de nanopartículas metálicas oferecem vantagens com relação ao custo-eficácia, por constituírem um método simples, de baixo custo e mais apropriado para aplicações medicinais (ROY et al., 2013; JEEVA et al., 2014; RAJAN, et al., 2015).

### 3.2.2.1.1 Nanopartículas de prata biossintetizadas com extratos de plantas

A possibilidade de utilização de plantas para a síntese de metais em nanoescala foi inicialmente relatada por Gardea-Torresdey et al. (2003). Atualmente a literatura descreve inúmeros trabalhos utilizando a síntese verde na obtenção de AgNPs usando o nitrato de prata como precursor e o extrato de plantas como agente redutor e estabilizador da prata (SHAMELI et al., 2012). De acordo com dados da PubMed, o maior número de artigos publicados foca a pesquisa de biossíntese utilizando plantas (BORASE et al., 2014; RAJAN et al., 2015).

O uso de plantas na síntese de nanopartículas chama a atenção da comunidade científica por oferecer uma abordagem ecologicamente correta, facilidade de obtenção da matéria-prima, possibilidade de produção em grande escala, por possuir processo rápido, rentável e por utilizar menos energia (HUANG et al., 2007; SATHISHKUMAR et al., 2009; DALPOZZO, 2015; RAJAN et al., 2015).

As plantas produzem biomoléculas funcionais que reduzem ativamente os íons metálicos, além de oferecerem vários tipos de matéria-prima para a produção de nanopartículas, como látex, biomassa morta e seca e várias estruturas da planta, como folha, galho, caule, semente, fruto, flores e raiz (RAI; YADAV; GADE, 2009). E possuem os agentes redutores mais promissores, que são seus bioativos isolados ou presentes nos seus extratos, como polifenóis, alcaloides, flavonoides, terpenos, proteínas, entre outros (HUANG et al., 2007; RAI; YADAV; GADE, 2009; DING et al., 2014; JEEVA et al., 2014; KUMAR; PALANICHAMY; ROOPAN, 2014; AJHITA et al., 2015; IBRAHIM et al., 2015). E têm recebido mais atenção em relação aos outros métodos biológicos (SHAMELI et al., 2012). As desvantagens oferecidas na biossíntese de nanopartículas utilizando plantas estão em seu mecanismo de redução, formação e estabilidade, ainda desconhecido, na complexidade dos extratos e na falta de elucidação de interação entre os constituintes e a prata (ARRUDA et al., 2015; RAJAN et al., 2015).

A literatura reporta uma variedade de espécies de plantas na obtenção da biossíntese de AgNPs utilizando diferentes métodos e estruturas do vegetal *in natura* ou processado (Quadro 1). Em relação a família Lauraceae, foram reportadas à utilização das folhas de *Cinnamomum camphora* na produção de AgNPs e ouro (HUANG et al., 2007; HUANG et al., 2008), além da folha e da casca de *C. zeylanicum* utilizadas na produção de nanopartículas de ouro (SMITHA; PHILIP; GOPCHANDRAN, 2009) e prata (SATHISHKUMAR et al., 2009), respectivamente. Não foram encontrados trabalhos reportando a utilização de plantas de origem Amazônica, nem do gênero *Licaria*. O que torna esse trabalho inédito.

**Quadro 1.** Plantas exploradas na biossíntese de nanopartículas de prata

Método de extração a frio (25-27 °C)						
Estrutura vegetal	Planta	Família	$\lambda^*$ (nm)	Diâmetro (nm)	**Morfologia	Referência
Folha em pó	<i>Prosopis farcta</i>	Fabaceae	433	8,5-11	E	(MIRI et al., 2015)
	<i>Caesalpinia coriaria</i>	Caesalpiniaceae	420	78 e 98	E, T, H	(JEEVA et al., 2014)
	<i>Ficus sycomorus</i>	Moraceae	435	20-100	EL, E	(SALEM et al., 2014)
	<i>Cynodon dactylon</i>	Poaceae	450	5-25	E	(LOKINA, 2011)
	<i>Rhizophora apiculata</i>	Rhizophoraceae	422	15	E	(DHAS; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2013)
	<i>Euphorbia hirta</i>	Euphorbiaceae	430	40-50	E	(ELUMALAI et al., 2010)
	<i>Anacardium occidentale</i>	Anacardiaceae	422	15,5	E	(SHENY; MATHEW; PHILIP, 2011)
Folha fresca cortada	<i>Morinda citrifolia</i>	Rubiaceae	425	8-220	NI	(PAI et al., 2015)
	<i>Ixora coccínea</i>	Rubiaceae	430	13-57	E	(KARUPPIAH; RAJMOHAN, 2013)
	<i>Ocimum sanctum</i>	Lamiaceae	426	10-20	QE	(PHILIP e UNNI, 2011)
	<i>Murraya koenigii</i>	Rutaceae	411	10 e 20	QE	(PHILIP et al., 2011)
	<i>Mangifera indica</i>	Anacardiaceae	-	20	T, H, QE	(PHILIP, 2011)
	<i>Anacardium occidentale</i>	Anacardiaceae	420	15,5	E	(SHENY; MATHEW; PHILIP, 2011)
	<i>Nicotiana tobaccum</i>	Solanaceae	418	1,15-8,43	NI	(PRASAD et al., 2011)
Método de Decocção (Fervida a 60-100 °C por 5-30 min)						
Folha em pó	<i>Momordica charantia</i>	Cucurbitaceae	424	16	QE	(AJITHA; REDDY; REDDY, 2015)
	<i>Ceropegia thwaitesii</i>	Asclepiadaceae	430	100	E	(MUTHUKRISHNAN et al., 2015)
	<i>Mentha piperita</i>	Lamiaceae	450	90	E	(MUBARAKALI et al., 2011)
	<i>Moringa oleifera</i>	Moringaceae	445	57	E	(PRASAD e ELUMALAI, 2011)
	<i>Cymodocea serrulata</i>	Cymodoceaceae	420	Abaixo de 100	E	(PALANIAPPAN; SATHISHKUMAR; SANKAR, 2015)



	<i>Memecylon edule</i>	Melastomataceae	475	50-90	C	(ELAVAZHAGAN; ARUNACHALAM, 2011)
	<i>Melia azedarach</i>	Meliaceae	436	78	E	(SUKIRTHA et al., 2012)
	<i>Nelumbo nucifera</i>	Nelumbonaceae	420	25-80	E, T,	(SANTHOSHKUMAR et al., 2011)
Cascas em pó	<i>Cinnamon zeylanicum</i>	Lauraceae	435	31-40	E	(SATHISHKUMAR et al., 2009)
	<i>Citrus sinensis</i>	Rubiaceae	420	34	E	(LOGESWARI; SILAMBARASAN; ABRAHAM, 2013)
	<i>Curcuma longa</i>	Zingiberaceae	435	21 e 30	D, T, EL, E	(SATHISHKUMAR; SNEHA; YUN, 2010)
Raiz em pó	<i>Curcuma longa</i>	Zingiberaceae	435	21 e 30	T, E, B	(SATHISHKUMAR; SNEHA; YUN, 2010)
	<i>Delphinium denudatum</i>	Ranunculaceae	416	≤85	E	(SURESH et al., 2014)
Semente em pó	<i>Olea europaea sativa</i> (oliva)	Oleaceae	419	30	E	(KHADRI et al., 2013)
Semente	<i>Calendula officinalis</i>	Asteraceae	440	7,5	E	(BAGHIZADEH et al., 2015)
Folha fresca cortada	<i>Morinda citrifolia</i>	Rubiaceae	425	100	NI	(PAI et al., 2015)
	<i>Carica papaya</i>	Caricaceae	500	25-50	E	(KONJARI et al., 2015)
	<i>Ceratonia siliqua</i>	Fabaceae	420	5-40	E	(AWWAD; SALEM; ABDEEN, 2013)
	<i>Garcinia mangostana</i>	Clusiaceae	438	25	E	(VEERASAMY et al., 2011)
	<i>Rosa rugosa</i>	Rosaceae	451	12	E	(DUBEY; LAHTINEN; SILLANPA, 2010)
	<i>Ocimum tenuiflorum</i>	Lamiaceae	450	25-40	E	(PATIL; MANGESH; SANJAY, 2012)
	<i>Catharanthus roseus</i>	Apocynaceae	400	35-55	E	(PONARULSELVAM et al., 2012)
	<i>Eclipta prostrata</i>	Asteraceae	420	35-60	T, H	(RAJAKUMAR e RAHUMAN, 2011)
	<i>Coleus amboinicus lour</i>	Lamiaceae	560	26-0,8	NI	(SUBRAMANIAN; SUJA, 2012)
	<i>Coleus aromaticus</i>	Lamiaceae	460	40-50	E	(VANAJA e GURUSAMY, 2013)
	<i>Garcinia mangostana</i>	Clusiaceae	480	35	E	(VEERASAMY et al., 2011)
<i>Argemone mexicana</i>	Papaveraceae	440	10-50	C, H	(SINGH et al., 2010)	

	<i>Cassia auriculata</i>	Fabaceae	450	20-40	E	(UDAYASOORIAN; KUMAR; JAYABALAKRISHNAN, 2011)
	<i>Aloe vera</i>	Liliaceae	410	15.2-4.2	E	(CHANDRAN et al., 2006)
	<i>Acalypha indica</i>	Euphorbiaceae	420	20-30	E	(KRISHNARAJ et al., 2010)
	<i>Neem (Azadirachta indica)</i>	Meliaceae	450	5-35	E	(SHANKAR et al., 2004)
	<i>Desmodium triflorum</i>	Fabaceae	425	5-20	A	(AHMAD et al., 2010)
	<i>Ficus benghalensis</i>	Moraceae	410	16	E	(SAXENA et al., 2012)
	<i>Piper betle L.</i>	Piperaceae	440	50	E	(RANI; RAJASEKHARREDDY, 2011)
	<i>Pinus desiflora</i>	Pinaceae	430	-	E	(SONG; KIM, 2009)
	<i>Diopyros kaki</i>	Ebenaceae	430	-	E	(SONG; KWON; KIM, 2010)
	<i>Ginko biloba</i>	Ginkgoaceae	430	-	E	(SONG; KIM, 2009)
	<i>Ocimum tenuiflorum</i>	Lamiaceae	535	24-40	E	(PATIL; MANGESH; SANJAY, 2012)
	<i>Skimmia laureola</i>	Rutaceae	460	15	E, H	(AHMED et al., 2016)
	<i>Magnolia kobus</i>	Magnoliaceae	430	15-500	E	(SONG; KIM, 2009)
	<i>Platanus orientalis</i>	Platanaceae	430	-	E	(SONG; KIM, 2009)
	<i>Swietenia mahogany</i>	Meliaceae	430	20-50	EL	(MONDAL et al., 2011)
	<i>Caesalpinia coriaria</i>	Caesalpinaceae	420	40 - 52	T	(JEEVA et al., 2014)
Casca não-cortada	<i>Musa paradisiaca</i>	Musaceae	433	23,7	E	(IBRAHIM et al., 2015)
Raiz não-cortada	<i>Ocimum sanctum</i>	Lamiaceae	442	2-10	E	(AHMAD et al., 2010)
Caule não-cortado	<i>Ocimum sanctum</i>	Lamiaceae	440	1.5-5	E	(AHMAD et al., 2010)
Folha fresca não-cortada	<i>Croton sparsiflorus morong</i>	Euphorbiaceae	452	22-52	E	(KATHIRAVAN et al., 2015)
	<i>Alternanthera dentata</i>	Amaranthaceae	430	50-100	E	(KUMAR; PALANICHAMY; ROOPAN, 2014)
Folha esmagada	<i>Lantana camara</i>	Verbenaceae	430	42-200	A	(SINGH et al., 2015)
Outras formas de obtenção						
Folha em pó	<i>Cinnamomum camphora</i>	Lauraceae	440	64,8	QE, EL	(HUANG et al., 2007)

\*Comprimento de onda; \*\*Morfologia: E-esférica; T-triangular; EL-elipsoidal; QE-quase esférica; H-hexagonal e B-nanobastões, D-decaédrica; C-cúbica, A-anisotrópica; NI-não informou

### *3.2.2.1.2 Nanopartículas de prata biossintetizadas com extratos de plantas utilizadas como antimicrobiano*

Íons e compostos de prata são alvos de inúmeros estudos para investigações antibacterianas e têm despertado grande interesse devido ao seu potencial antimicrobiano no combate de estirpes resistentes (RAI; YADAV; GADE, 2009). Os materiais em nanoescala emergiram como novos agentes antimicrobianos, por causa da sua elevada área superficial em relação ao volume, química única e propriedades físicas (RAI; YADAV; GADE, 2008; 2009). A prata na forma de nanopartícula apresenta maior atividade antimicrobiana, quando comparada com o seu homólogo na forma macroscópica (RAJAN et al., 2015).

As AgNPs constituem um importante agente antimicrobiano, eficaz contra diversos micro-organismos patogênicos. Essas características despertam o interesse dos pesquisadores na busca de novos fármacos com ação antimicrobiana para o desenvolvimento de medicamentos no combate às cepas resistentes de micro-organismos patogênicos (MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013).

Apesar do efeito antimicrobiano dos compostos de prata ser bem conhecido, os mecanismos de ação em relação aos micro-organismos ainda não foram bem esclarecidos e possuem muitas controvérsias por serem um sistema complexo. É de conhecimento da comunidade científica que as diferentes formas da prata metálica, iônica e AgNPs apresentam diferentes mecanismos de ação (MARAMBIO e HOEK, 2010).

Para o mecanismo de ação dos íons de prata ( $\text{Ag}^+$ ) em micro-organismos foi proposta a atração eletrostática entre a parede celular dos micro-organismos carregada negativamente e a carga positiva dos íons de prata (MAHMOUDI et al., 2014). No entanto, íons de prata têm utilização antimicrobiana limitada por possuírem elevada toxicidade e baixa estabilidade. Devido a essas limitações aumentou o número de pesquisas com AgNPs (MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013).

Para o mecanismo de ação das AgNPs em micro-organismos, estudos sugerem que isso pode acontecer devido às características da superfície, tamanho, forma e estabilidade química, ou à soma de mecanismos de ação distintos (DURÁN et al., 2010; MUTHUKRISHNAN et al., 2015):

- A elevada área superficial das AgNPs, por estas serem um material em escala nanométrica, possui uma melhor interação com os micro-organismos, atacando a superfície celular e penetrando no interior desses organismos. No entanto a reatividade das AgNPs está

fortemente relacionada ao seu tamanho (PAL; TAK; SONG, 2007; RAMESH; KOKILA; GEETHA, 2015);

- A adsorção das AgNPs na membrana celular bacteriana pode levar à formação de poros, extravasamento do conteúdo citoplasmático e conseqüentemente à morte celular (SHARMA; YNGARD; LIN, 2009; MAHMOUDI et al., 2014; RAMESH; KOKILA; GEETHA, 2015);

- A afinidade das AgNPs com os elementos químicos enxofre e fósforo, que são encontrados nas estruturas das membranas celulares dos micro-organismos, nas partes exterior e interior das células. A liberação de íons  $Ag^+$ , os quais podem se ligar a agrupamentos tióis (-SH), desestabilizando a estrutura de proteínas e enzimas da membrana celular, além de provocar danos à cadeia respiratória, dentro da mitocôndria, provocando a morte celular. A interação das AgNPs com esses grupos pode inibir as funções do DNA (RAI; YADAV; GADE, 2009; DURÁN et al., 2005; MARAMBIO e HOEK, 2010; VELUSAMY et al., 2014);

- Ao estresse oxidativo da célula, promovido pelas AgNPs, que podem agir como catalisadores na produção em excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais podem causar desestabilização da estrutura do DNA e desnaturação de proteínas ou a ruptura da membrana celular (MARAMBIO e HOEK, 2010).

Diante dos diferentes mecanismos de ação sugeridos, pode-se considerar que acontece uma ação sinérgica provocada por vários fatores na atuação da atividade antibacteriana (MOHANTY et al., 2011). Esses mecanismos e a toxicidade propostos são de suma importância, e vários estudos estão em andamento para melhor elucidar esses aspectos (DURÁN et al., 2010).

A atividade antimicrobiana de AgNPs biossintetizada com extratos de plantas por meio de diferentes técnicas vem sendo reportada por inúmeros autores (Quadro 2).

**Quadro 2.** Nanopartículas de prata biossintetizadas com extratos de plantas utilizadas como antimicrobiano

<b>Método de extração a frio (25-27 °C)</b>				
<b>Método antimicrobiano</b>	<b>Planta</b>	<b>Estrutura</b>	<b>Micro-organismos teste</b>	<b>Referência</b>
Difusão em ágar	<i>Morinda citrifolia</i>	folha fresca cortada	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(PAI et al., 2015)
	<i>Caesalpinia coriaria</i>	pó da folha	<i>Escherichia coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>S. aureus</i>	(JEEVA et al., 2014)
Disco de difusão	<i>Prosopis farcta</i>	pó da folha	<i>S. aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	(MIRI et al., 2015)
Densidade ótica - espectrofotometro	<i>Ficus sycomorus</i>	pó da folha	<i>Salmonella typhimurium</i> , <i>S. typhi</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	(SALEM et al., 2014)
CIM ( <i>resazurina</i> )	<i>Cynodon dactylon</i>	pó da folha	<i>S. aureus</i> , <i>Citrobacter koseri</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> e <i>Candida albicans</i>	(LOKINA e NARAYANAN, 2011)
<b>Método de extração por decocção (100 °C)</b>				
Difusão em ágar	<i>Mentha piperita</i>	pó da folha	<i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	(MUBARAKALI, et al., 2011)
	<i>Moringa Oloifera</i>	pó da folha	<i>S. aureus</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>K. pneumoniae</i>	(PRASAD e ELUMALAI, 2011)
	<i>Citrus sinensis</i>	pó da casca	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> .	(LOGESWARI; SILAMBARASAN; ABRAHAM, 2013)
	<i>Alternanthera dentata</i>	folha fresca não cortada	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>Enterococcus faecalis</i>	(KUMAR; PALANICHAMY; ROOPAN, 2014)
	<i>Ocimum tenuiflorum</i>	folha fresca cortada	<i>E. coli</i> , <i>Corney bacterium</i> , <i>B. substilus</i>	(PATIL; MANGESH; SANJAY, 2012)
	<i>Morinda citrifolia</i>	casca	<i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i>	(PAI et al., 2015)
	<i>Musa paradisiaca (banana)</i>	casca	<i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i>	(IBRAHIM, 2015)
	<i>Olea europaea sativa (oliva)</i>	pó da semente	<i>Aspegillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Rhizoctonia bataticola</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Alternaria macrospora</i>	(KHADRI et al., 2013)
	<i>Momordica charantia</i>	pó da folha	<i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Penicillium spp.</i>	(AJITHA; REDDY; REDDY, 2015)

Disco de difusão	<i>Ceropegia thwaitesii</i>	pó da folha	<i>E. coli</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Proteus mirabilis</i> .	(MUTHUKRISHNAN et al., 2015)
	<i>Croton sparsiflorus morong</i>	folha fresca não cortada	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Mucor sp.</i> , <i>Trichoderma sp.</i> , <i>Aspergillus niger</i>	(KATHIRAVAN et al., 2015)
	<i>Lantana camara</i>	folha esmagada	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	(SINGH et al., 2015)
	<i>Ceratonia siliqua (carob)</i>	folha fresca cortada	<i>E. coli</i>	(AWWAD; SALEM; ABDEEN, 2013)
	<i>Raphanus sativus var. longipinnatus</i>	folha fresca cortada	<i>P. putida</i> , <i>Klebsilla pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> e <i>B. subtilis</i>	(KOYYATI et al., 2013)
	<i>Garcinia mangostana</i>	folha fresca cortada	<i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	(VEERASAMY et al., 2011)
	<i>Skimmia laureola</i>	folha fresca cortada	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Proteus vulgaris</i> e <i>S. aureus</i>	(AHMED et al., 2016)
Densidade ótica - espectrofotometro	<i>Cinnamon zeylanicum</i>	pó da casca	<i>E. coli</i>	(SATHISHKUMAR et al., 2009)
	<i>Curcuma longa</i>	pó da raiz	<i>E. coli</i>	(SATHISHKUMAR; SNEHA; YUN, 2010)
CIM – em ágar	<i>Delphinium denudatum</i>	pó da raiz	<i>S. aureus</i> , <i>B. Cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>	(SURESH et al., 2014)
	<i>Lantana camara</i>	folha esmagada	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	(SINGH et al., 2015)
	<i>Ceratonia siliqua (carob)</i>	folha fresca cortada	<i>E. coli</i>	(AWWAD; SALEM; ABDEEN, 2013)
	<i>Musa paradisiaca (banana)</i>	casca	<i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i>	(IBRAHIM et al., 2015)

### 3.2.2.1.3 Aplicações e perspectivas de nanopartículas de prata biossintetizadas com extratos vegetais

As AgNPs são amplamente utilizadas na medicina. Por essa razão, é preciso a produção utilizando uma abordagem atóxica, altamente estável para essas aplicações (RAI; YADAV; GADE, 2009). As AgNPs biossintetizadas com extratos de plantas com potencial antimicrobiano podem ser empregadas em diferentes áreas, como no preparo de dispositivo na entrega de droga e em implantes (JEEVA et al., 2014; MUTHUKRISHNAN et al., 2015), em produtos agrícolas (BONATTO e SILVA, 2014), em antifúngicos (GANGADHARAN et al., 2010), em larvicidas (SANTHOSKUMAR et al., 2011) e em antiparasitários (SAMPATH et al., 2011).

No cenário atual, apesar do apelo ao uso de nanopartículas sintetizadas empregando a síntese verde, ainda é tímida a produção de produtos utilizando as suas formas biossintetizadas com extrato de planta. A literatura cita o uso de nanopartícula de ágar-prata biossintetizada com o extrato das folhas de *Ocimum sanctum* (extrato do manjericão) no desenvolvimento de um filme com atividade antimicrobiana, utilizado para conservação de frutas (ERENO, 2010; GUDADHE et al., 2013).

Um grupo de pesquisa da Embrapa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) está investigando a biossíntese de nanopartículas metálicas utilizando casca, semente, polpa e folha das espécies conhecidas popularmente como pequizeiro, cajuzinho-do-cerrado, mangabeira, sucupira e bureré. Este estudo visa empregar as nanopartículas em produtos como biossensores para detecção de vírus em plantas, controle de larvas de insetos, microorganismos, células tumorais e outras aplicações (ERENO, 2014).

A biossíntese de AgNPs a partir do extrato aquoso da casca da castanha do cajuzinho-do-cerrado (*Anacardium othonianum*) foi empregada no desenvolvimento de nanobiossensores para detecção de hormônios de crescimento e de células tumorais, além de vírus em plantas (BONATTO e SILVA, 2014). O extrato aquoso do fruto, casca, polpa da semente e folha da mangabeira (*Hancornia speciosa*) será utilizado para aplicação em superfícies plásticas como o poli (tereftalato de etileno), o conhecido PET, que será utilizado como um método alternativo para controle de larvas do mosquito *Aedes aegypti*, transmissor da dengue (ERENO, 2014).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em três etapas (Esquema 1): I – Seleção do método de extração promissor na biossíntese de AgNPs, por meio da formação das AgNPs indicadas pela alteração da cor e da análise de UV-vis e da atividade antimicrobiana das AgNPs determinada pela técnica de difusão em ágar; II – Seleção da AgNPs promissora por meio da caracterização dos extratos e das nanopartículas provenientes do método promissor de extração. Para a caracterização, foram empregadas técnicas espectrométricas e de quantificação; Etapa III – Atividade antimicrobiana da AgNPs promissora por meio da investigação da concentração de prata, utilizando os micro-organismos selecionados na etapa 1, determinados pela técnica de difusão em ágar e da Concentração Inibitória Mínima (CIM), para verificar o potencial antimicrobiano.

### Etapa I – Seleção do método de extração promissor na biossíntese de AgNPs

Esta etapa foi realizada para a escolha do método de extração promissor. Primeiramente, foi realizada seleção das AgNPs promissoras, biossintetizadas com os extratos aquosos de *L. puchury-major* obtidos das estruturas anatômicas da folha, galho, semente, cúpula, casca e raiz, pelos métodos de extração a frio (temperatura ambiente 25-27 °C), infusão (<100 °C por 15 min) e decocção (fervida a 100 °C por 15 min). 1- A formação das AgNPs foi indicada pela alteração das cores das soluções coloidais e pela análise de Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível (UV-vis) para verificar a banda plasmônica na região da prata. As AgNPs selecionadas nesta etapa foram investigadas a estabilidade após seis meses e o sistema de lavagem. 2 - A avaliação da atividade antimicrobiana foi determinada pela técnica de difusão em ágar contra os micro-organismos *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*.

### Etapa II – Caracterização dos extratos e das AgNPs obtidos pelo método de extração promissor (Infusão)

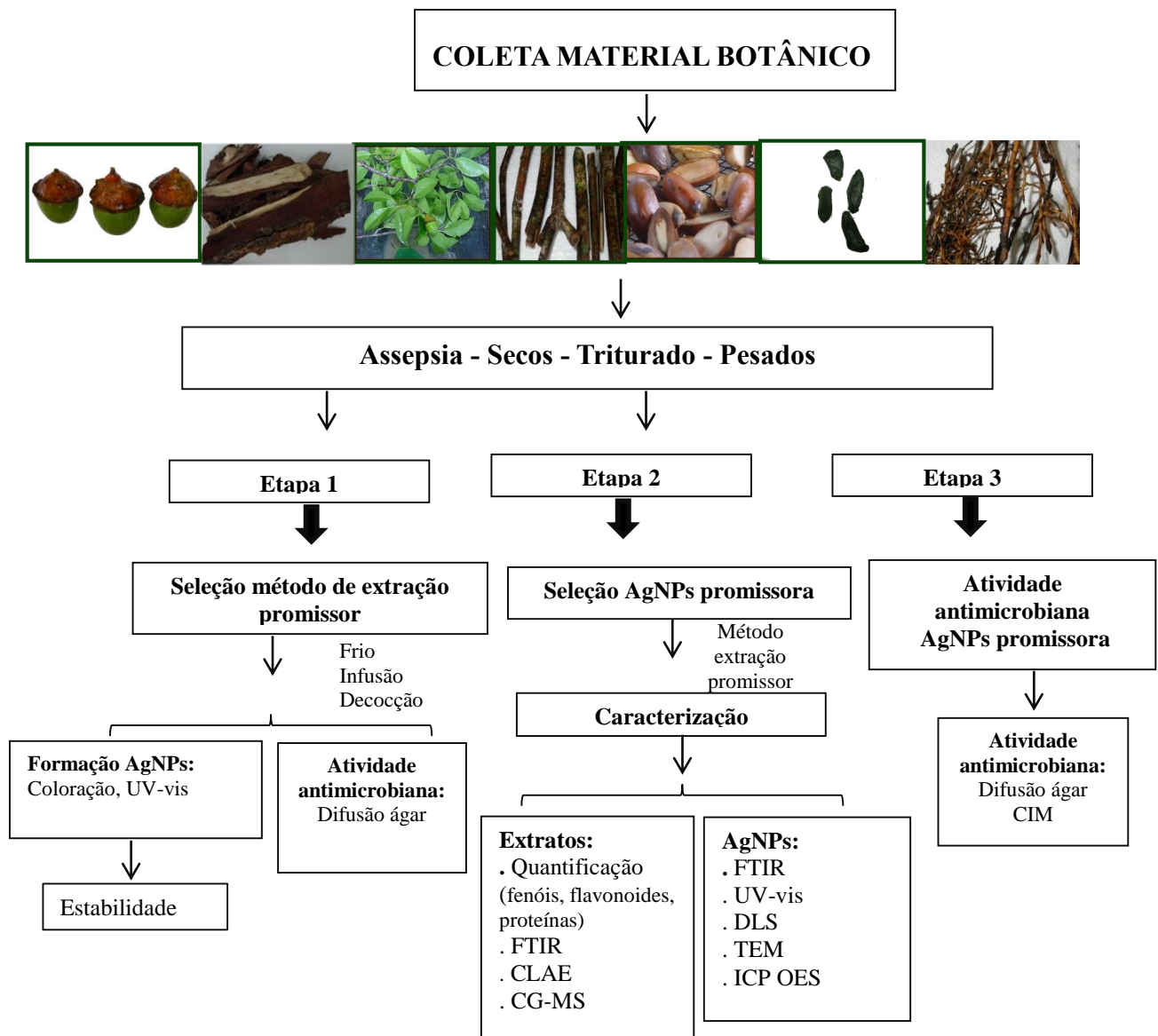
Nesta etapa, as AgNPs foram biossintetizadas com extratos produzidos pelo método de extração promissor selecionado na etapa I. Posteriormente, foram caracterizados os extratos e as AgNPs. 1 - Os extratos aquosos de *L. puchury-major* foram produzidos das estruturas anatômicas da folha, galho, cúpula, semente, semente abortada (incluída), raiz e casca. A caracterização dos extratos foi realizada por meio de técnicas preconizadas de quantificação (fenólicos totais, flavonoides totais e proteínas) técnicas de Espectroscopia de Infravermelho



com Transformada de Fourier – FTIR, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE, Espectrometria de Massa - EM para conhecer os constituintes que podem participar da formação e da estabilização das AgNPs; 2 - A caracterização das nanopartículas obtidas pelo método promissor de extração foi realizada pelas técnicas de FTIR, UV-vis, Espalhamento Dinâmico de Luz - DLS, Microscopia Eletrônica de Transmissão - TEM, Difração de Raio X - DRX e Espectroscopia de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado - ICP-OES.

### Etapa III – Atividade antimicrobiana da AgNPs promissora

Nesta etapa, foi investigada a concentração de prata da AgNPs promissora que inibiu os micro-organismos (na etapa 1), por meio da determinação da técnica de difusão em ágar e de CIM para verificar o potencial antimicrobiano.



**Esquema 1:** Fluxograma das etapas realizadas

#### 4.1 MATÉRIA-PRIMA

As amostras das estruturas vegetais de *L. puchury-major* (casca, cúpula, folha, galho, semente, semente abortada e raiz) foram coletadas no município de Borba-AM, em uma propriedade particular, a partir do comprovante de registro de coleta n.º 32281-1, código de autenticação n.º 34245655 e Autorização de Acesso ao Patrimônio Genético n.º 010233/2015-6. A planta foi autenticada e depositada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

Após a coleta, as estruturas anatômicas do vegetal foram submetidas à assepsia com água destilada para retirada das impurezas e foram desidratadas sob luz solar até ficarem completamente secas (HUANG et al., 2007). Em seguida, foram trituradas em moinho de facas de peneira (270 Mesh) (modelo: SL-31, marca: Solab, potência: 800 W). A Tabela 1 apresenta as características dos reagentes empregados neste trabalho.

**Tabela 1.** Características dos reagentes utilizados neste trabalho

Reagentes	Fórmula	Procedência	Pureza (%)
Nitrato de prata	AgNO <sub>3</sub>	Synth	99
Ácido gálico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> .H <sub>2</sub> O	CRQ	P.A.
Carbonato de sódio	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	CRQ	99
Hidróxido de sódio	NaOH	Sigma	
Folin-Ciocalteu's phenol – 2N	-	Sigma	-
Quercetina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> .2H <sub>2</sub> O	Sigma	-
Nitrito de sódio	NaNO <sub>2</sub>		
Cloreto de alumínio	AlCl <sub>3</sub>		
Ácido fórmico	HCOOH	Nuclear	96
Acetonitrila para HPLC	CH <sub>3</sub> CH	TEDIA	99,9
Acetato de celulose M <sub>n</sub> -29,000, grau de substituição 40 %	(C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub> ) <sub>n</sub>	Sigma-Aldrich	-
N,N Dimetilacetamida	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO	Merck	PA
Acetona	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	Synth	PA
Membrana de acetato de celulose (0,22 μ)	-	Sartorius	-
Ácido nítrico (10 %)	HNO <sub>3</sub>	Synth	64-66

As culturas bacterianas *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (CBAM 0001) e a levedura *C. albicans* (DPUA 1706) foram adquiridas da Coleção de Culturas DPUA/UFAM. Para os cultivos em meio sólido, foram utilizados os meios ágar Sabouraud e Müller Hinton Infusion (MH) ágar; e para o meio líquido foi utilizado o meio Müller Hinton Infusion (MH) caldo da marca Difco. Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15

minutos. A água deionizada (18,2 MΩ /cm), 25 °C, utilizada em todos os ensaios, foi adquirida do sistema de purificação de água Millipore, marca: Synergy® (Merck Millipore).

#### 4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DAS ESTRUTURAS ANATÔMICAS DE *Licaria puchury-major*

Os extratos foram obtidos a partir da casca, cúpula, folha, galho, semente, semente abortada e raiz, utilizando três métodos:

##### 4.2.1 Método de Extração por Infusão

Para obtenção dos extratos aquosos pelo método de infusão, foram preparados segundo metodologia de Ding et al. (2014), com modificações. Primeiramente, pesaram-se 10 g de pó das diferentes partes da planta de *L. puchury-major*; e foram adicionados 300 mL de água deionizada a 100 °C; em seguida, a mistura ficou em repouso por 15 minutos, em recipiente hermeticamente fechado; depois, foi filtrada com papel filtro Whatman n.º 1. Utilizou-se um sistema de filtração a vácuo. Posteriormente, os extratos filtrados foram passados em membrana de acetato de celulose, de porosidade 0,22 µm; o volume do extrato foi ajustado para 300 mL com água deionizada.

##### 4.2.2 Método de Extração a Frio

Para a obtenção dos extratos aquosos pelo método a frio (temperatura ambiente 25-27 °C) foi preparada pela adição de 10 g de pó de *L. puchury-major* para 300 mL de água deionizada; em seguida, o conteúdo foi triturado no liquidificador, filtrado com papel filtro Whatman n.º 1. Utilizou-se um sistema de filtração a vácuo. Posteriormente os extratos filtrados foram passados em membrana de acetato de celulose, de porosidade 0,22 µm; o volume do extrato foi ajustado para 300 mL com água deionizada (JEEVA et al., 2014; MIRI et al., 2015).

##### 4.2.3 Método de Extração por Decocção

Os extratos aquosos obtidos pelo método de decocção foram preparados pela adição de 10 g de pó de *L. puchury-major* com 300 mL de água deionizada, fervidos por 15 minutos a 100 °C; em seguida, foram filtrados com papel filtro Whatman n.º 1. Utilizou-se um sistema de

filtração a vácuo. Posteriormente os extratos filtrados foram passados em membrana acetato de celulose com porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$ ; o volume do extrato foi ajustado para 300 mL com água deionizada (DING et al., 2014).

#### 4.3 PREPARO DA BIOSÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs)

Para a biossíntese das AgNPs - (etapa I), foram adicionados 10 mL do extrato aquoso em 100 mL de uma solução de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) [1mM]; os frascos foram protegidos da luz e incubados em *shaker* na ausência de luz por 48 h, 35 °C, 150 rpm. Após o período reacional, foi coletada uma alíquota para ser analisada no UV-vis para verificar a formação das AgNPs.

O mesmo procedimento foi utilizado para preparação de AgNPs (na etapa II), com pequenas modificações: as amostras foram centrifugadas; a temperatura foi ambiente (25-27 °C); as formações das AgNPs foram monitoradas por UV-vis após 1 hora de reação até 36 horas. A síntese foi realizada em placa de agitação magnética (Ika – Werke – D – 79219).

##### 4.3.1 Processo de Lavagem (Purificação das Nanopartículas)

No processo de lavagem, primeiramente a reação é centrifugada (Beckman Coulter, inc. – Allegra™ X - 22R) a 13.000 rpm por 20 minutos, seguindo-se a remoção dos íons de prata em excesso por meio da lavagem do precipitado com água deionizada. Esse procedimento foi realizado três vezes. As soluções de nanopartículas da planta foram obtidas, quando estas foram redispersas em água (DING et al., 2014).

#### 4.4 NOMENCLATURA DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Para efeito de simplificação, as AgNPs obtidas com diferentes métodos de extração apresentam abreviação indicada na Tabela 2. Por exemplo, AgNPs obtidas do extrato da folha (F), utilizando o método de infusão (I), ficam abreviadas como AgNPs-FI.

O mesmo tipo de abreviação foi usado para os outros extratos obtidos a partir de diferentes partes da planta (Cúpula – C, Casca – Cs, Galho – G, Semente – S, Semente Abortada – Sab e Raiz – R).

**Tabela 2.** Abreviações para as nanopartículas de prata

<b>Materiais</b>	<b>Partes da planta</b>	<b>Método *</b>
<b>AgNPs-FI</b>	Folha	Infusão
<b>AgNPs-CsI</b>	Casca	Infusão
<b>AgNPs-RI</b>	Raiz	Infusão
<b>AgNPs-SI</b>	Semente	Infusão
<b>AgNPs-SabI</b>	Semente abortada	Infusão
<b>AgNPs-GI</b>	Galho	Infusão
<b>AgNPs-CI</b>	Cúpula	Infusão

\*Serão adotadas as mesmas abreviações para os métodos a Frio (F) e Decocção (D)

## 4.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

### 4.5.1 Caracterização dos Extratos

#### 4.5.1.1 Determinação de fenólicos totais

A determinação do conteúdo total de fenólicos presentes nos extratos (folha, galho, raiz, semente, semente abortada, cúpula e casca) obtidos a partir de *L. puchury-major* foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton e Rossi (1995).

Primeiramente foram preparadas três soluções principais e consequentes misturas e reações. As soluções foram preparadas conforme descrições a seguir:

i) Preparação da solução de carbonato de sódio a 10 %.

Em um béquer, pesaram-se 2,5 g de carbonato de sódio; logo após foram adicionados 20 mL de água deionizada; e agitou-se até completa solubilização. A essa solução foi adicionada água deionizada até o volume total de 25 mL.

ii) Soluções das amostras dos extratos

Os extratos das plantas (casca, cúpula, folha, galho, semente, semente abortada e raiz) foram diluídos dez vezes o seu volume. Os mesmos extratos liofilizados foram utilizados para CsI, RI, SabI e SI (concentração de 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), CI e GI (concentração de 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e FI (concentração de 75  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

iii) Preparação padrão de ácido gálico 1  $\text{mg.L}^{-1}$

A solução foi preparada a partir do padrão puro e sólido à temperatura ambiente. Foram pesados 10 mg de ácido gálico e em seguida foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL, originando uma solução de ácido gálico com concentração de 1  $\text{mg.mL}^{-1}$ . O próximo passo

foi diluir essa solução para  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  adicionando água deionizada. A preparação das diluições e curva de calibração para o ácido gálico segue o planejamento ilustrado na Tabela 3.

**Tabela 3.** Quantidades de reagentes e solventes usados para curva de calibração com ácido gálico

Conc. de ácido gálico ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	V <sub>ácido gálico</sub> ( $\mu\text{L}$ )	V <sub>H<sub>2</sub>O</sub> ( $\mu\text{L}$ )	V <sub>Folin</sub> ( $\mu\text{L}$ )	V <sub>sol.Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></sub>
1,0	10	4590	100	300
2,5	25	4575	100	300
4,0	40	4560	100	300
5,0	50	4550	100	300
6,5	65	4535	100	300
7,5	75	4525	100	300
9,0	90	4510	100	300
10	100	4500	100	300

A sequência de adição dos reagentes ocorre como mostra a Tabela 4. Primeiramente, adicionou-se ao balão volumétrico de 5 mL o volume de ácido gálico, a água deionizada e o reagente *Folin*, aguarda dez minutos; em seguida, acrescentou-se o volume de carbonato de sódio, e esperou-se em repouso por 1 h, protegido da luz, à temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi realizada após esse período, em UV-vis, no  $\lambda = 760 \text{ nm}$ . A água deionizada foi utilizada como branco, e a curva padrão de ácido gálico foi construída por meio do gráfico abs X concentração de ácido gálico  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

**Tabela 4.** Quantidades de reagentes e solventes usados para determinação de Fenólicos Totais nos extratos da planta

Extratos	V* <sub>extratos</sub> ( $\mu\text{L}$ )	V <sub>H<sub>2</sub>O</sub> ( $\mu\text{L}$ )	V <sub>Folin</sub> ( $\mu\text{L}$ )	V <sub>sol.Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></sub>
CI	50	4100	100	300
FI	50	4100	100	300
GI	50	4100	100	300
RI	50	4100	100	300
SI	40	4200	100	300
SabI	25	4350	100	300
CsI	20	4400	100	300

V\* - volume foi diluído 10 vezes o volume mostrado na tabela

A sequência de adição dos reagentes ocorre como mostra a Tabela 5. Primeiramente, adicionou-se ao balão volumétrico de 5 mL o volume de extrato, a água deionizada e o reagente Folin, aguardando-se dez minutos; em seguida, acrescentou-se o volume de carbonato de sódio, e esperou-se repouso por 1 h, protegido da luz, à temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi realizada após esse período, em UV-vis, no  $\lambda = 760$  nm. A água deionizada foi utilizada como branco, e a quantidade de fenólicos totais obtidos em  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  foi calculada com base na curva padrão de ácido gálico.

**Tabela 5.** Quantidades de reagentes e solventes usados para determinação de Fenólicos Totais nos extratos da planta liofilizada

Extratos	C $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	*V <sub>Ext.</sub> ( $\mu\text{L}$ )	V <sub>H<sub>2</sub>O</sub> ( $\mu\text{L}$ )	V <sub>Folin</sub> ( $\mu\text{L}$ )	V <sub>sol. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></sub>
CI	40; 50	200; 250	4400	100	300
Cs	20; 25	100; 125	4400	100	300
FI	75; 100	625; 500	4100	100	300
GI	40; 50	200; 250	4400	100	300
RI	20; 25	100; 125	4500	100	300
SI	20; 25	100; 125	4500	100	300
Sab	20; 25	100; 125	4500	100	300

\*V<sub>Ext.( $\mu\text{L}$ )</sub> - volume do extrato com concentração inicial de  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

A sequência de adição dos reagentes ocorre da mesma forma já descrita anteriormente para o extrato, sem liofilizar.

Para calcular o teor de fenólicos totais a partir do extrato liofilizado, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$TFT \left( \frac{\text{mg EAG}}{\text{g extrato}} \right) = \left[ \frac{1000 * EAG (\text{mg/L})}{C_{\text{amostra}} (\text{mg/L})} \right] = \left[ \frac{1000 * EAG (\mu\text{g/mL})}{C_{\text{amostra}} (\mu\text{g/mL})} \right]$$

Onde: EAG- concentração de ácido gálico equivalente e  $C_{\text{amostra}}$  – concentração da amostra analisada.

#### 4.5.1.2 Determinação de flavonoides totais

A quantificação de flavonoides dos extratos de *L. puchury-major* foi determinada usando a quercetina como padrão. A preparação das diluições e da curva de calibração para quercetina segue o planejamento da Tabela 6. Primeiramente foram preparadas as soluções: nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) a 5 %, cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) a 10 %, hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ )

1 mol.L<sup>-1</sup>, solução de quercetina a 1000 mg.L<sup>-1</sup> (dissolvida em metanol) e extrato da planta, diluído em água deionizada (1:10). Para determinação de quantidades de flavonoides nas diferentes partes da planta, foram adicionados ao balão volumétrico de 5 mL, 50 µL de extrato aquoso da planta; depois foram diluídos numa proporção de 1:10; em seguida, acrescentaram-se 2 mL de água deionizada e 150 µL de NaNO<sub>2</sub>; aguardou-se cinco minutos; depois foram agregados 150 µL de AlCl<sub>3</sub>; aguardou-se seis minutos, e acrescentou-se 1 mL de hidróxido de sódio; a mistura foi completada com água deionizada, e foi feita a leitura da absorbância a 510 nm em espectrofotômetro de duplo feixe UV-vis.

**Tabela 6.** Quantidades de reagentes e solventes usados para curva de calibração quercetina

<b>Conc. Quercetina (µg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>V<sub>quercetina</sub> (µL)</b>	<b>V<sub>H2O</sub> (µL)</b>	<b>V<sub>NaNO2</sub> (µL)</b>	<b>V<sub>AlCl3</sub> (µL)</b>	<b>V<sub>NaOH</sub> (mL)</b>
<b>2</b>	10	3690	150	150	1
<b>5</b>	25	3675	150	150	1
<b>10</b>	50	3650	150	150	1
<b>15</b>	75	3625	150	150	1
<b>20</b>	100	3600	150	150	1
<b>25</b>	125	3575	150	150	1
<b>30</b>	150	3550	150	150	1
<b>35</b>	175	3525	150	150	1
<b>40</b>	200	3500	150	150	1
<b>60</b>	300	3400	150	150	1

A Tabela 7 mostra quantidades dos reagentes utilizados para determinação de níveis de flavonoides na planta. A água deionizada foi utilizada como branco, e a quantificação de flavonoides foi obtida em µg.mL<sup>-1</sup>, calculada com base na curva padrão de quercetina.



**Tabela 7.** Quantidades de reagentes e solventes usados para determinação de flavonoides dos extratos da planta

<b>Extratos</b>	<b>V*extratos (µL)</b>	<b>V<sub>H2O</sub> (µL)</b>	<b>V<sub>NaNO2</sub> (µL)</b>	<b>V<sub>AlCl3</sub> (µL)</b>	<b>V<sub>NaOH</sub> (mL)</b>
<b>CI</b>	50	3200	150	150	1
<b>Cs</b>	25	3200	150	150	1
<b>FI</b>	50	3200	150	150	1
<b>GI</b>	50	3200	150	150	1
<b>RI</b>	50	3200	150	150	1
<b>SI</b>	50	3200	150	150	1
<b>SabI</b>	25	3200	150	150	1

V\* - volume foi diluído 10 vezes o volume mostrado na tabela

#### 4.5.1.3 Determinação de proteínas

A quantificação de proteína dos extratos de *L. puchury-major* foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando como padrão o soro de albumina bovino (BSA) de acordo com os dados da Tabela 8. A solução de Bradford foi preparada com 0,5 g de corante azul brilhante de Coomassie G-250 em 50 mL de etanol 95 %, sob constante agitação, e foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico a 85 %, agitados por duas horas, e foi completado o volume para 1 L com água deionizada, com agitação por mais seis horas (*overnight*). Em seguida foi filtrada e armazenada em frasco âmbar e deixada em repouso na geladeira por 24 horas. Para determinação de proteínas presentes no extrato aquoso de *L. puchury-major*, foram adicionados no *Eppendorf* 20 µL do extrato aquoso, diluídos em água (1:20), 1800 µL de água deionizada e 500 µL de solução de Bradford. Em seguida, o *Eppendorf* foi agitado por cinco segundos e deixado em repouso por dez minutos para ocorrer a reação. A água deionizada foi utilizada como branco. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm.

**Tabela 8.** Quantidades de reagentes e solventes usados para curva de calibração do BSA

<b>Conc. de BSA (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>	<b>V<sub>BSA</sub> (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>V<sub>H2O</sub> (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>V Bradford Reagent (5X) (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
<b>1</b>	20	1980	500
<b>2</b>	40	1960	500
<b>3</b>	60	1940	500
<b>4</b>	80	1920	500
<b>5</b>	100	1900	500
<b>6</b>	120	1880	500
<b>7</b>	140	1860	500
<b>8</b>	160	1840	500
<b>9</b>	180	1820	500
<b>10</b>	200	1800	500

#### 4.5.1.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho no modo Reflexão Total Atenuada (ATR) dos extratos de diferentes partes da planta (casca, cúpula, folha, galho, semente, semente abortada e raiz) foram obtidos em espectrofotômetro Agilent, nas seguintes condições: 32 acumulações por espectro; resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  e faixa espectral de  $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.5.1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os extratos das diferentes partes da planta *L. puchury-major* (casca, cúpula, folha, galho, raiz, semente e semente abortada) foram analisados por CLAE, por meio da injeção de  $20\ \mu\text{L}$  de amostra. A eluição foi realizada em modo gradiente da fase móvel composta por uma solução A (acetonitrila 0,1 %) e uma solução B (ácido fórmico 0,1 %) nestas condições: 0 min, 10 % de solução A, 90 % de solução B; 5 min, 20 % de solução A e 80 % de solução B; 10 min, 30 % de solução A e 70 % de solução B; 15 min, 40 % de solução A e 60 % de solução B; 20 min, 50 % de solução A e 50 % de solução B; 25 min, 60 % de solução A e 40 % de solução B; 30 min, 70 % solução de A e 30 % de solução B; 35 min, 80 % de solução A e 20 % de solução B; 40 min, 90 % de solução A e 10 % de solução B, operando nas seguintes condições: Coluna: Zorbax Eclipse Plus C-18, tamanho:  $4,6 \times 150\text{ mm}$  e 5 micron, à temperatura de  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , fluxo

de injeção de 0,1 mL/min. A detecção foi em 215, 254 e 280 nm. O tempo de retenção dos picos correspondentes aos compostos foi analisado por EM.

#### 4.5.1.6 Espectrometria de Massas (EM)

As análises dos extratos da planta (casca, cúpula, folha, galho, semente, semente abortada e raiz) foram realizadas em Espectrômetro de Massas (UPLC-MS BH C-18), marca Waters, modelo Quattro Micro, acoplado a um cromatógrafo líquido de ultraperformance marca Waters, modelo Acquity. As condições experimentais utilizadas foram estas: fluxo do solvente de 200  $\mu$ L/min, voltagem do cone 20-30 V, volume de injeção: 2  $\mu$ L, tamanho da partícula: 1,7 micro, comprimento da coluna: 2,1  $\times$  50 nm, solvente utilizado: ácido fórmico (1 %) e acetonitrila 90/10, tempo de análise: 14 min. Os espectros de massas foram adquiridos na faixa de  $m/z$  100 a 1000. Os picos escolhidos dessa análise, correspondentes aos compostos majoritários de cada extrato, foram analisados por EM com ionização por *electrospray* (ESI).

As condições utilizadas na fonte foram: voltagem do capilar: 4,5 kV, temperatura da fonte: 200 °C, temperatura do gás de dessolvatação: 300 °C, fluxo do gás de dessolvatação: 600 L/h e fluxo do gás do cone: 50 L/h. O volume de injeção foi de 2  $\mu$ L de amostra utilizando uma coluna C18 Marca Acquity BEH, de dimensões 5,1 por 50 mm e tamanho de partícula de 1,7  $\mu$ m. A eluição foi realizada por um gradiente composto por uma solução denominada A (água com 0,1 % de ácido fórmico) e uma solução denominada B (acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico) num gradiente linear que se iniciou com 90 % da solução A e foi até 10 % solução A, num tempo de 14 minutos. A temperatura da coluna foi mantida em 40 °C, e a vazão da fase móvel foi de 200  $\mu$ L/min. Foram obtidos cromatogramas de íons totais nos modos SCAN positivo e negativo dos extratos, utilizando as voltagens de cone de 20 V e 30 V; e os espectros de massas foram adquiridos num intervalo de razão massa/carga ( $m/z$ ) 100 a 1000 Da. Pelos cromatogramas obtidos, foi possível selecionar picos cromatográficos correspondentes aos compostos majoritários de cada extrato e obter os principais íons presentes nas amostras.

#### 4.5.2 Caracterização das Nanopartículas de Prata

##### 4.5.2.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os grupos funcionais presentes nos extratos e nas AgNPs foram caracterizados por FTIR, espectrofotômetro Agilent, no modo de ATR (Reflexão Total Atenuada), operando nas

condições: 32 acumulações por espectro; resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ ; e faixa espectral de 4000 a  $400 \text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.5.2.2 Espectroscopia na Região do Ultravioleta-visível (UV-vis)

Os espectros de UV-vis na região de 300 a 800 nm foram obtidos de suspensões contendo as AgNPs, em um AJX-6100 PC espectrofotômetro de duplo feixe UV-vis AJMicronal.

#### 4.5.2.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O diâmetro médio das AgNPs, suas distribuições por intensidade de tamanho e o potencial zeta foram também determinados pela técnica de DLS, no mesmo equipamento Nano ZS Zetasizer (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) – 3600, a um ângulo de detecção da luz espalhado e fixo em  $175^\circ$ , Laser Red He-Ne e temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . O instrumento Nano ZS usa um laser operando em  $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ . As amostras foram diluídas em concentrações inferiores a  $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  e colocadas em cubeta de acrílico. Para determinação do potencial, as AgNPs foram diluídas com uma solução de  $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  de KCl, e o potencial zeta ( $\zeta$ ) foi medido em célula capilar com um caminho ótico de 10 mm.

#### 4.5.2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas no equipamento Carl Zeiss Libra 120, operando a 80 kV, com fonte de tungstênio; uma câmera Olympus, controlada pelo *software* iTEM, foi usada para aquisição de imagens. Amostras das suspensões aquosas contendo AgNPs obtidas a partir de extratos de planta *L. puchury-major* foram gotejadas em uma grade de cobre de 400 *mesh*, contendo um filme fino de parlódio estabilizado com carbono, e foram secas à temperatura ambiente.

#### 4.5.2.5 Difração de Raios X (DRX)

As análises de difração de raios X das AgNPs foram realizadas em um difratômetro Shimadzu, modelo XRD 7000, operando com radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$ ), tensão de 40 kV, corrente de 30 mA, velocidade de varredura  $20 \text{ min}^{-1}$  e região de  $2\theta$  entre  $5^\circ$  e  $90^\circ$ .

#### 4.5.2.6 Espectrometria Óptica de Emissão por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES)

A concentração das AgNPs foi determinada ICP-OES (Perkin Elmer - Optima 8300), nebulizador concêntrico (Meinhard), câmara de nebulização ciclônica, injetor de alumina (2 mm i.d.), tocha de quartzo 1 *slot* para amostras aquosas, modelo padrão (Perkin Elmer), amostrador automático (modelo S10). Condições: vazão da amostra: 1 mL.min<sup>-1</sup>, tempo de *delay* até a leitura da amostra: 60 segundos, fluxo de argônio de nebulização: N<sub>2</sub>, gás plasma: argônio comercial, tempo de lavagem: 20 segundos com 2 % de HNO<sub>3</sub>.

Para determinar a quantidade de íons de prata, primeiramente foi utilizada uma solução estoque de AgNO<sub>3</sub> padrão, com concentração de 50 mg.L<sup>-1</sup>. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada ( $\geq 18,2$  M $\Omega$  cm), obtida de um sistema de purificação de água Milli-Q, Synergy® (Merck Millipore). As soluções de referência, contendo de 0,1 a 25 mg.L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub>, foram preparadas a partir da diluição da solução de estoque de 50 mg.L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub> e acidificadas com ácido nítrico 0,2 % (v/v). Essa solução de ácido nítrico 0,2 % (v/v) foi utilizada como branco. Os frascos de polipropileno, vidrarias e utensílios foram previamente limpos por imersão em solução de HNO<sub>3</sub> 10 % (v/v), durante 24 h, e lavados com água deionizada. Para determinar a quantidades de prata formada, foram preparadas três alíquotas de cada parte da planta, com diluição de 1:10.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada em duas etapas. A primeira foi determinada pela técnica de difusão em ágar frente aos micro-organismos *S. aureus*, *E. coli* e à levedura *C. albicans* (etapa I). A segunda foi realizada atividade antimicrobiana determinada pela técnica de difusão em ágar e CIM da AgNPs promissora (etapa II).

##### 4.6.1 Atividade Antimicrobiana Determinada pela Técnica de Difusão em Ágar

A atividade antimicrobiana das AgNPs biossintetizadas com o extrato de *L. puchury-major* pelas técnicas a frio, decocção e infusão foi determinada pela técnica de difusão em ágar frente às bactérias *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (CBAM 0001) e à levedura *C. albicans* (DPUA 1706), de acordo com metodologia de Mubarakali et al. (2011).

As soluções de AgNPs foram filtradas em membrana de acetato de celulose, de porosidade 0,22  $\mu$ m. Os micro-organismos foram reativados utilizando culturas puras crescidas

em meio sólido seletivo ou conforme recomendado para cada táxon. As bactérias-teste foram subcultivadas em ágar Mueller-Hinton, mantidas a 37°C por 12 horas. A *C. albicans* foi cultivada em ágar Sabouraud e mantida a 25°C por 48 horas. Nessas culturas foi preparada uma suspensão celular com turbidez semelhante à escala 0,5 de McFarland. Dessa suspensão foi retirada uma alíquota com alça de platina para inoculação em 5 mL de água destilada esterilizada em tubos de ensaio de 19,8 × 1,8 mm. Em seguida, a suspensão celular foi homogeneizada em *vortex*. De cada suspensão celular foram retirados 100 µL para inoculação na superfície de ágar Mueller-Hinton, em placa de Petri (90 mm × 18 mm), e semeados com *swab* esterilizado formando uma camada de 4 mm de espessura. Nesses cultivos foram feitas cavidades de 8 mm de diâmetro, onde foram inoculados 100 µL das soluções de AgNPs, padrão (AgNO<sub>3</sub> 1 mM), e controle positivo (cloranfenicol) para bactérias e (itraconazol) para levedura. Os cultivos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas (bactérias) e 25°C por 48 horas (levedura). A atividade antimicrobiana foi determinada pela zona de inibição medida em milímetro.

#### 4.6.2 Atividade Antimicrobiana Determinada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM da AgNPs promissora, foi determinada pela técnica de microdiluição em placa de 96 poços, revelada com Alamar Blue (MABA) com modificações (COLLINS e FRANZBLAU, 1997). As AgNPs foram testadas contra *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (CBAM 0001). Nesse ensaio, utilizou-se microplaca esterilizada de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambrigde, MA); no primeiro poço de cada orifício foram adicionados 100 µL de caldo Mueller-Hinton e 100 µL da solução de AgNPs. Em seguida, foram feitas diluições decimais em triplicata nas concentrações 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,1562; 0,0781 e 0,0390 µg/mL. Posteriormente, foram adicionados 50 µL da suspensão celular de cada micro-organismo correspondente a concentração de 0,5 da escala McFarland e incubados a 37°C, por 24 horas. E depois foram reveladas com 10 µL resazurina em todos os orifícios (Alamar Blue®). Os padrões utilizados foram: (nitrato de prata AgNO<sub>3</sub> 1 mM), controle positivo (cloranfenicol), controle negativo (caldo Mueller-Hinton e a solução de AgNPs). A CIM foi a menor concentração capaz de impedir a mudança da cor azul para rosa, ou seja, que inibiu a multiplicação de cerca de 90% dos micro-organismos (PALOMINO et al., 2002).

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos à análise estatística descritiva (média e desvio padrão); o diâmetro médio das nanopartículas foi avaliado pelo programa de análise de imagens *image J*.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

5.1 Etapa I - Seleção do método de extração na produção da biossíntese das AgNPs para caracterização por meio:

5.1.1 Mudança de coloração

5.1.2 Espectroscopia UV-vis

5.1.3 Estabilidade após seis meses de armazenamento sob refrigeração e após sistema de lavagem por análise de UV-vis

5.1.4 Atividade antimicrobiana determinada pela técnica de difusão em ágar

5.2 Etapa II - Caracterização do método promissor de extração na produção da biossíntese da nanopartículas de prata:

5.2.1 Caracterização dos extratos obtidos pelo método promissor (infusão)

5.2.2 Caracterização das AgNPs produzidas pela biossíntese obtidas pelo método promissor (infusão)

5.3 Etapa III - Atividade antimicrobiana da nanopartícula promissora obtida pelo método de infusão

5.3.1 Determinada pela técnica de difusão em ágar

5.3.2 Determinada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM)





















## 5.1 ETAPA I - SELEÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO PROMISSOR NA PRODUÇÃO DA BIOSÍNTESE DA NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs) PARA CARACTERIZAÇÃO

### 5.1.1 Formação das AgNPs Indicadas pela Alteração da Cor

A formação das AgNPs na mistura reacional pode variar de acordo com a espécie vegetal e com o método de extração utilizado para obtenção do extrato. Isso se deve aos diferentes tipos de extrações que também podem gerar diferentes grupos redutores da prata iônica. Para verificar a formação das AgNPs a partir da biossíntese dos extratos das diferentes estruturas anatômicas de *L. puchury-major*, primeiramente foram observadas as alterações das cores das soluções coloidais nos três métodos de extrações utilizados para a biossíntese (Tabela 9). As mudanças de colorações, com exceções dos extratos da casca e raiz, foram observadas para os demais extratos

**Tabela 9.** Mudança de coloração das soluções coloidais biossintetizados com diferentes extratos das diferentes estruturas anatômicas de *L. puchury-major* pelos métodos: a frio, decocção e infusão

M.	Folha	Galho	Semente	Cúpula	Casca	Raiz
<b>A Frio</b>						
<b>Decocção</b>						
<b>Infusão</b>						

M- métodos de extração

### 5.1.2 Análise por Espectroscopia na Região do Ultravioleta-visível (UV-vis)

Em seguida as soluções foram monitoradas por UV-vis para verificar a formação das AgNPs (ANDRADE et al., 2014). Esta técnica permite o estudo da absorção de luz UV-vis das soluções, em função do comprimento de onda (c.d.o.). Algumas nanopartículas metálicas apresentam bandas de absorção na região do ultravioleta-visível que são devidas à oscilação coletiva dos elétrons das nanopartículas em ressonância com a onda de luz, a qual é denominada por banda plasmônica de superfície - SPR (CREIGHTON e EADON, 1991). A Tabela 10 mostra a banda plasmônica de absorção das AgNPs obtidas pelos três métodos de extrações.

**Tabela 10.** Banda plasmônica das nanopartículas de prata biossintetizada com o extrato de *Licaria puchury-major* por diferentes métodos de obtenção

Estruturas Vegetais	Métodos de extração aquoso		
	A Frio <sup>a</sup>	Infusão <sup>b</sup> $\lambda$ (nm)	Decocção <sup>c</sup>
Folhas	280*	432	436
Galhos	436	456	509**
Cúpula	352*	351*	476**
Casca	300*	301*	301*
Sementes	482	486	300*
Raiz	NF	NF	NF

$\lambda$  - comprimento de ondas; NF - não formou nanopartículas; \* formou banda fora região da prata; \*\*AgNPs desestabilizou. a - Temperatura = 25-27 °C, b - <100 °C por 15 min), c - Fervida a 100 °C por 15 min

Os resultados mostraram que os extratos da raiz obtidos nos três métodos não biossintetizaram nanopartículas. Foram observadas, nos dados obtidos por meio dos espectros de UV-vis, as formações de bandas fora da região característica da prata, para as soluções obtidas dos extratos das estruturas anatômicas de *L. puchury-major* e seus respectivos métodos de extração: folha (a frio), semente (decocção), cúpula (a frio e infusão) e casca (a frio, decocção e infusão). Os extratos do galho (infusão) e da cúpula (decocção) biossintetizaram nanopartículas, no entanto essas soluções desestabilizaram.

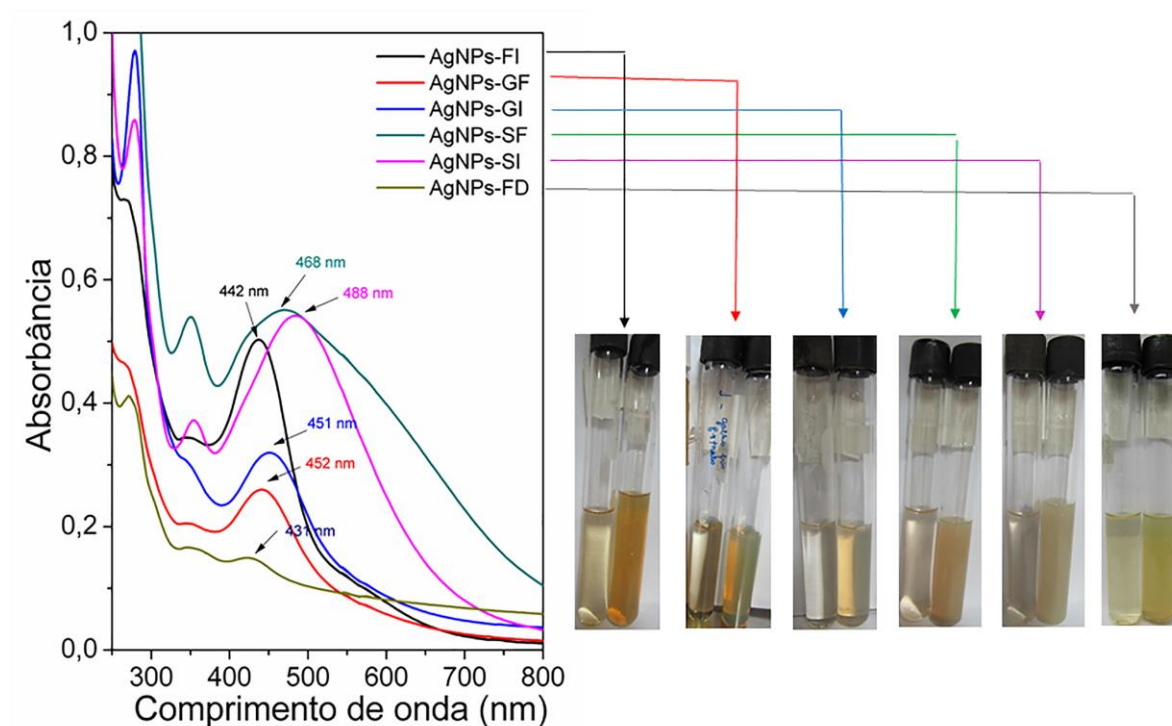
Por outro lado, os extratos da folha, galho e semente (infusão), galho e semente (a frio) e folha (decocção) biossintetizaram nanopartículas, o que pode ser observado pelos dados dos espectros de UV-vis. Essas soluções coloidais apresentaram bandas plasmônicas na região característica da prata, o que indica a formação de nanopartículas, as quais foram denominadas AgNPs-FI, AgNPs-GI, AgNPs-SI, AgNPs-GF, AgNPs-SF e AgNPs-FD, respectivamente.

Para essas nanopartículas, foram realizadas novas análises por meio do UV-vis de duplo feixe para aumentar a precisão dos resultados e para determinar a estabilidade.

Os novos resultados da formação das AgNPs obtidas pelo espectro de UV-vis são apresentados na Figura 10.

Foram observadas as alterações das cores para as tonalidades: amarelo (AgNPs-FI e AgNPs-GF), dourado (AgNPs-GI), dourado-opaco (AgNPs-SI e AgNPs-SF) e tom esverdeado (AgNPs-FD). Miri et al (2015) citou que as AgNPs exibem cor castanho-amarelada em solução aquosa devido à excitação vibracional das bandas plasmônicas de superfície.

São demonstradas as bandas plasmônicas de absorções das AgNPs em 442 nm (AgNPs-FI), 452 nm (AgNPs-GF), 451 nm (AgNPs-GI), 468 nm (AgNPs-SF), 488 nm (AgNPs-SI) e 431 nm (AgNPs-FD), que caracterizaram as formações de AgNPs.



**Figura 10.** Espectros de UV-vis de nanopartículas de prata selecionadas e mudança de coloração correlacionado com o comprimento de onda com a cor das nanopartículas.

Para os espectros de UV-vis das AgNPs biossintetizadas pelo método de infusão, foi observado para a AgNPs-SI a apresentação de duas bandas, sendo uma fora da região característica da prata, para AgNPs-GI baixa absorção e formação de banda plasmônica simétrica esta última característica foi observada também para a AgNPs-FI, os espectros indicaram para esta AgNPs a banda mais acentuada. De acordo com Philip et al (2011), isso pode ser indicativo de AgNPs com tamanho pequeno. É importante retratar que não há na

literatura relatos de biossíntese de AgNPs utilizando o extrato de planta pelo método de infusão, como foi investigado no trabalho proposto.

Para as AgNPs biossintetizadas pelo método a frio (25 a 27 °C), foi observado que a AgNPs-GF apresentou banda simétrica e baixa absorção, enquanto a AgNPs-SF apresentou também duas bandas conforme descrição feita anteriormente para a AgNP-SI, a banda de absorção, observada na região da prata foi larga e com deformidade. Esse resultado indicou a formação de agregados de nanopartículas que podem ter ocorrido em função de possíveis aglomerações e coalescência entre as partículas (ANDRADE et al., 2014).

Dados da literatura reportam inúmeros trabalhos de biossíntese de nanopartículas, pelo método a frio (25 a 27 °C), utilizando o pó das folhas de plantas que apresentaram bandas plasmônicas de absorção na faixa de 420-450 nm: *Prosopis farcta* (MIRI et al., 2015), *Caesalpinia coriaria* (JEEVA et al., 2014), *Ficus sycomorus* (SALEM et al., 2014), *Rhizophora apiculata* (DHAS; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2013), *Anacardium occidentale* (SHENY; MATHEW; PHILIP, 2011) e *Cynodon dactylon* (LOKINA e NARAYANAN, 2011), *Euphorbia hirta* (ELUMALAI et al., 2010).

A AgNPs-FD biossintetizada pelo método de decocção (100 °C) apresentou menor banda de absorção em 431 nm; resultado semelhante foi encontrado com AgNPs biossintetizadas pelo método de decocção utilizando o pó da folha das plantas *Ceropegia thwaitesii* (MUTHUKRISHNAN et al., 2015) e *Moringa oleifera* (PRASAD e ELUMALAI, 2011).

Para esse método, a literatura reporta bandas plasmônicas de absorção na faixa de 420-450 nm com as plantas *Cymodocea serrulata* (PALANIAPPAN; SATHISHKUMAR; SANKAR, 2015), *Momordica charantia* (AJITHA; REDDY; REDDY, 2015), *Melia azedarach* (SUKIRTHA et al., 2012), *Nelumbo nucifera* (SANTHOSHKUMAR et al., 2011), *Mentha piperita* (MUBARAKALI, et al., 2011) e *Memecylon edule* (ELAVAZHAGAN e ARUNACHALAM, 2011).

Não foram encontradas na literatura AgNPs biossintetizadas pelo método de infusão, como também não há relatos de trabalhos utilizando extratos aquosos das estruturas dos galhos e da semente pelo método a frio. No entanto foram encontradas AgNPs biossintetizadas com o extrato da semente pelo método de decocção, que apresentaram bandas plasmônicas de absorções em 419 nm: *Olea europaea sativa* (*Oleaceae*) e 440 nm *Calendula officinalis* (*Asteraceae*) (BAGHIZADEH et al., 2015).

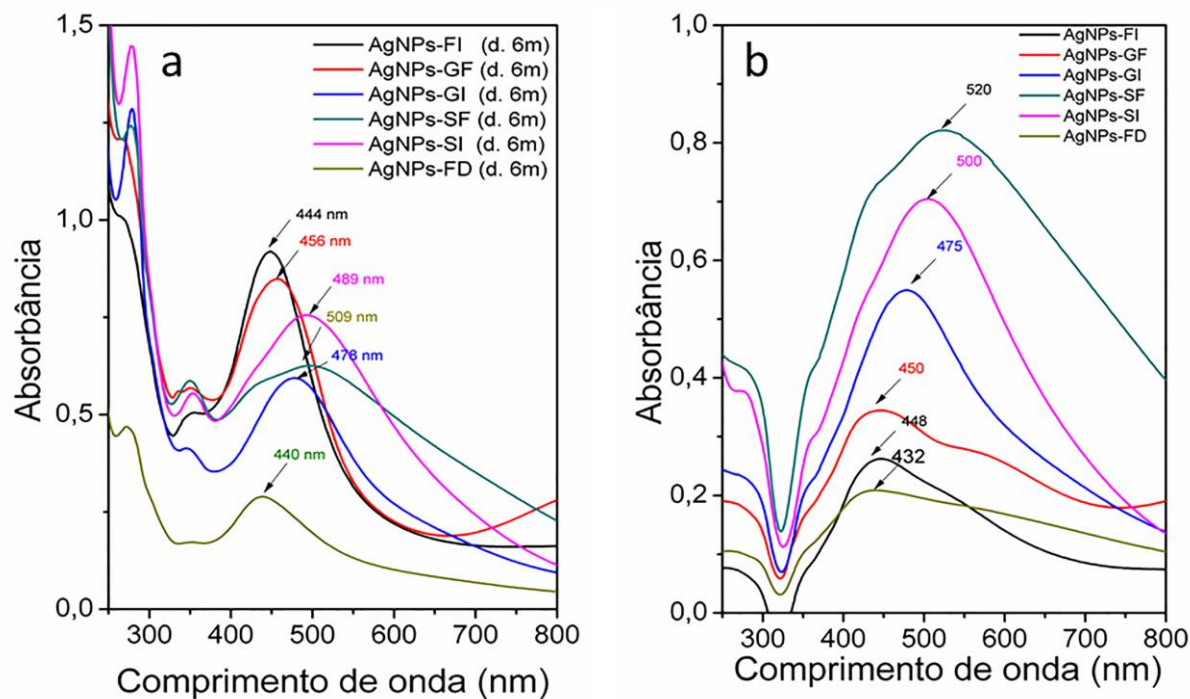
### 5.1.3 Estabilidade Após Seis Meses de Armazenamento sob Refrigeração e Após Sistema de Lavagem por Análise de UV-vis.

Para determinar a estabilidade das AgNPs formadas, visando selecionar o melhor método de extração, foram realizadas medidas de absorções por espectroscopia de UV-vis após seis meses de armazenamento sob refrigeração e após sistema de lavagem. Os resultados obtidos após esse período são apresentados na Figura 11-a. Os espectros obtidos por espectroscopia de UV-vis das nanopartículas AgNPs-FI, AgNPs-SI, AgNPs-FD e AgNPs-GF mostraram aumento de absorções, no entanto, não apresentaram considerável aumento no comprimento de onda (c.d.o.) e diferenças das bandas plasmônicas, o que pode indicar estabilidade.

Por outro lado, as nanopartículas AgNPs-GI e AgNPs-SF apresentaram diferença no c.d.o. de (451 para 478 nm) e de (468 para 478 nm) respectivamente. A diferença da banda plasmônica após seis meses, foi observado somente para AgNPs-SF. A variação do c.d.o. máximo das bandas SPR está relacionada com o tamanho médio das AgNPs, quando a banda sofre desvio para c.d.o. maiores, proporcionalmente, são obtidas partículas de maiores dimensões (MARTINEZ-CASTANON; NINO-MARTINEZ; MARTINEZ-GUTIERREZ, 2008).

Os espectros de UV-vis das nanopartículas após sistema de lavagem para retirada de possíveis impurezas (Figura 11-b), mostrou eficiência pela ausência das bandas fora da região característica da prata e pelo aumento de absorção para a maioria das AgNPs. No entanto foi observado alargamento das bandas plasmônicas para todas as AgNPs, o que pode ser decorrente da formação de agregados, indicando que houve perda de estabilidade e aumento do tamanho. Pelos resultados obtidos, pode-se inferir que o sistema de lavagem pode interferir na interação das moléculas presentes nas AgNPs responsáveis pela estabilidade.

O mecanismo para a redução da prata iônica  $\text{Ag}^+$  para  $\text{Ag}^0$  e a formação de AgNPs utilizando extratos de plantas ainda não foi bem elucidado. A literatura reporta extensivos estudos que abordam diferentes mecanismos para redução e formação de nanopartículas consoante a presença de grupos, de compostos ou até de uma substância, além dos fatores que influenciam na síntese, como a forma de preparo, a concentração do agente redutor, a temperatura e a velocidade da reação (MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013; OLIVEIRA et al., 2013; MUTHUKRISHNAN et al., 2015; PACIONI et al., 2015; PALANIAPPAN et al., 2015; RAMESH; KOKILA; GEETHA, 2015).



**Figura 11.** Espectros de UV-vis de nanopartículas de prata selecionadas na etapa I (a) após seis meses de preparação, (b) após sistema de lavagem.

As AgNPs que apresentaram estabilidade e características como bandas plasmônicas simétricas e acentuadas foram AgNPs-FI, AgNPs-GI, AgNPs-SI e AgNPs-GF. Os resultados mostraram que o método de infusão apresentou o maior número de amostras, sendo este considerado o melhor método para a extração utilizado na biossíntese de AgNPs.

#### 5.1.4 Atividade Antimicrobiana das AgNPs Determinadas pela Técnica de Difusão em Ágar

A biossíntese de AgNPs de *L. puchury-major* variou de acordo com o método de extração (a frio, decocção e infusão) e com os extratos das estruturas vegetais utilizadas (folha, galho, cúpula, semente, casca e raiz) originando diferentes padrões de inibição contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*. As medidas dos halos de inibição frente a *S. aureus* e a *E. coli* são apresentadas na Tabela 11; para *C. albicans*, não houve formação de halos.

No método de extração a frio, os extratos que sintetizaram AgNPs foram a semente (AgNPs-SF) e o galho (AgNPs-GF). Essas nanopartículas apresentaram ação expressiva contra *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente, e ação fungistática contra *C. albicans* (Tabela 12).

Os extratos da folha, cúpula e casca não sintetizaram AgNPs. As soluções apresentaram bandas plasmônicas fora da região característica da prata, o que pode ser atribuído à desestabilização da solução. No entanto, essas amostras foram também testadas contra os

micro-organismos válidos como testes. As soluções da casca, da folha, e da cúpula foram ativas contra *S. aureus*; sendo as duas últimas, contra *E. coli*. Porém nenhuma dessas soluções apresentou ação contra *C. albicans*.

**Tabela 11.** Atividade antimicrobiana das nanopartículas de *L. puchury-major* frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

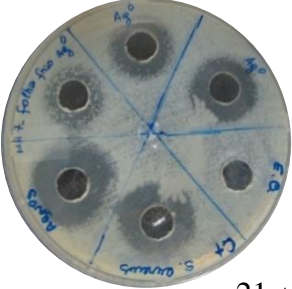
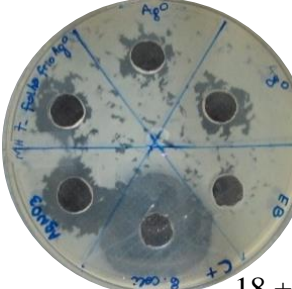

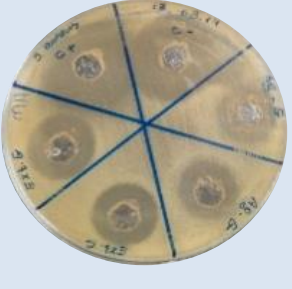

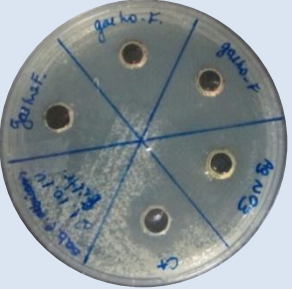
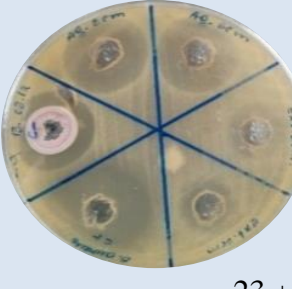

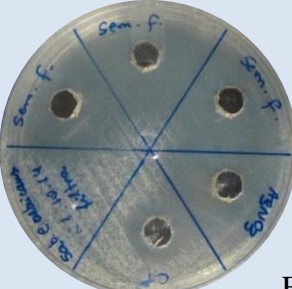
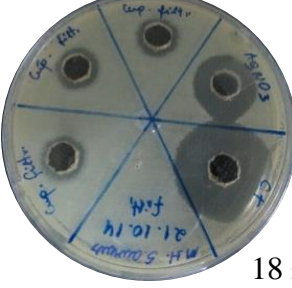
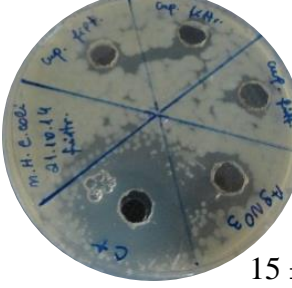
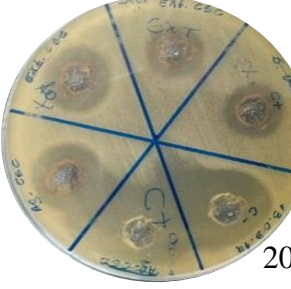
Estuturas Vegetais	Zona de inibição (nm)					
	A Frio <sup>a</sup>		Infusão <sup>b</sup>		Decocção <sup>c</sup>	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Folhas	21 ± 0,6	18 ± 2,9	19 ± 0,0	17 ± 0,0	11 ± 0,0	12 ± 0,0
Galhos	19 ± 1,0	17 ± 0,0	22 ± 0,0	12 ± 0,6	R	R
Cúpula	18 ± 0,0	15 ± 0,0	9 ± 1,0	10 ± 1,0	R	12 ± 0,0
Casca	20 ± 0,0	R	NF	NF	NF	NF
Sementes	23 ± 0,6	15 ± 3,0	10 ± 0,0	12 ± 1,0	15 ± 0,0	R
Raiz	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Controle (+)	27 ± 1,5	18 ± 1,0	36 ± 1,2	26 ± 1,5	25 ± 1,5	15 ± 1,0
Padrão	24 ± 1,0	18 ± 1,0	24 ± 1,0	26 ± 1,5	17 ± 1,2	15 ± 1,0

R - resistente; NF - não formou AgNPs; Controle (+) – cloranfenicol; Padrão - AgNO<sub>3</sub>

a - T = 25 - 27 °C, b - <100 °C por 15 min, c - Fervida a 100 °C por 15 min

Não foram encontrados trabalhos reportando a atividade antimicrobiana com AgNPs biossintetizadas com extratos do galho e da semente pelo método a frio. No entanto foram encontrados trabalhos com AgNPs biossintetizadas com o pó de folha pelo método a frio (25-27 °C), empregando a técnica de difusão em ágar, que mostraram ação contra *S. aureus* utilizando as plantas *Morinda citrifolia* (PAI et al., 2015) e *Caesalpinia coriaria* (JEEVA et al., 2014); esta última também apresentou ação contra *E. coli*.

**Tabela 12.** Atividade antimicrobiana das AgNPs biossintetizadas pelo método a frio e das soluções que não formaram AgNPs

Estrutura	Micro-organismo		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
<b>FOLHA</b>	 $21 \pm 0,6$ *	 $18 \pm 2,9$ *	 R *
<b>GALHO</b>	 $19 \pm 1,0$	 $17 \pm 0,0$	 F
<b>SEMENTE</b>	 $23 \pm 0,6$	 $15 \pm 3,0$	 F
<b>CÚPULA</b>	 $18 \pm 0,0$ *	 $15 \pm 0,0$ *	*
<b>CASCA</b>	 $20 \pm 0,0$ *	*	*

\* formou banda fora da região da prata; R - resistente; F - fungistática



A biossíntese utilizando os extratos das estruturas de *L. puchury-major* pelo método de decocção não foi bem-sucedida, sendo o extrato da folha o único que biossintetizou nanopartícula (AgNPs-FD) e apresentou banda na região característica da prata, e demonstrou baixa ação antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* (Tabela 13). Os extratos do galho e da cúpula sintetizaram, no entanto desestabilizaram com o tempo. E não foram capazes de inibir nenhum dos micro-organismos testados, com exceção da última, que apresentou baixa inibição contra *E. coli*. O extrato da raiz não formou AgNPs, e as soluções dos extratos da casca e da semente apresentaram bandas plasmônicas fora da região característica da prata. No entanto foi realizada a atividade antimicrobiana dessas soluções; a da semente apresentou baixa ação antimicrobiana contra *S. aureus*; e fungistática contra *C. albicans*.

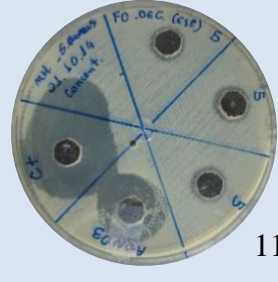
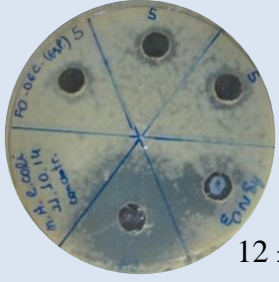


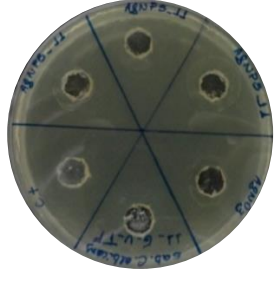
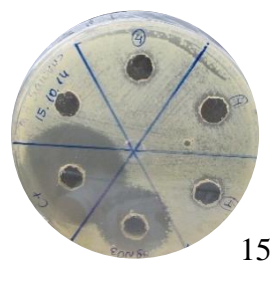
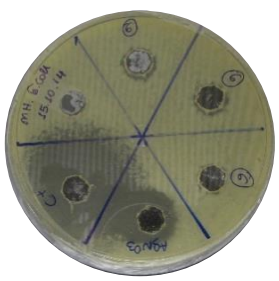
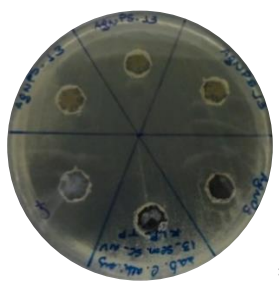
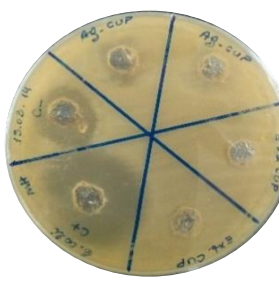
Para o método de decocção, foram encontrados trabalhos realizados empregando a técnica de difusão em ágar, com AgNPs biossintetizadas com pó das folhas de *Moringa Oloifera* (PRASAD e ELUMALAI, 2011) e *Mentha piperita* (MUBARAKALI et al., 2011). As AgNPs obtidas dessas plantas apresentaram ação contra *S. aureus*; e somente a última, contra *E. coli*.

No método de extração por infusão, os extratos obtidos das estruturas do vegetal que biossintetizaram AgNPs foram a folha (AgNPs-FI), o galho (AgNPs-GI) e a semente (AgNPs-SI). Nesse método as AgNPs que apresentaram elevada ação contra *S. aureus* e *E. coli* foram a AgNPs-FI e AgNPs-GI. Enquanto que a AgNPs-SI apresentou baixa ação contra essas duas bactérias. Todas apresentaram ação fungistática contra *C. albicans* (Tabela 14). A solução obtida do extrato da cúpula apresentou banda plasmônicas fora da região característica da prata. No entanto, foi realizada a atividade antimicrobiana e não apresentou ação contra *S. aureus* e *E. coli*, mas fungistática contra *C. albicans*.

Não foram encontrados na literatura trabalhos reportando atividade antimicrobiana pelo método de infusão com AgNPs biossintetizadas com pó de folhas ou de outra estrutura anatômica de alguma planta pelo método proposto.

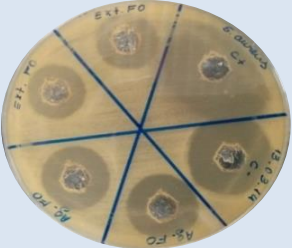
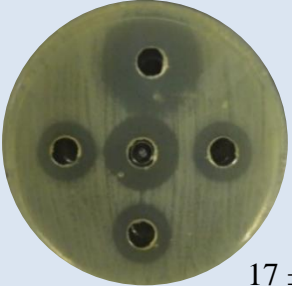
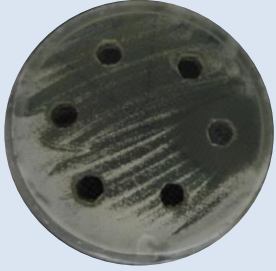
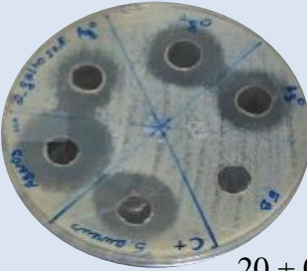
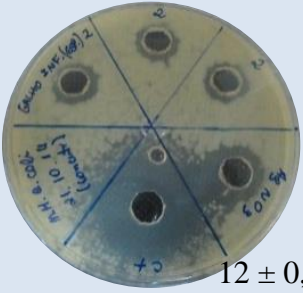
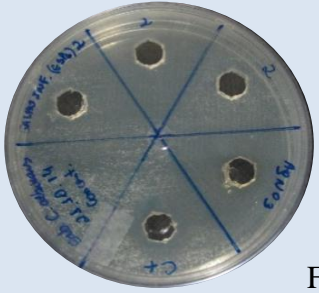
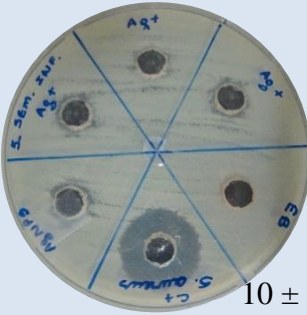
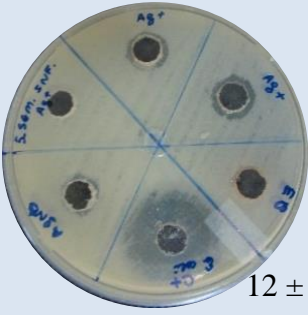

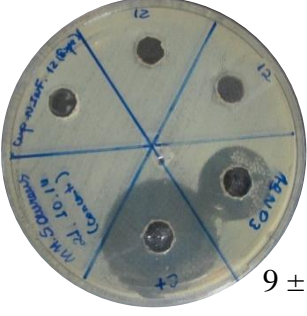
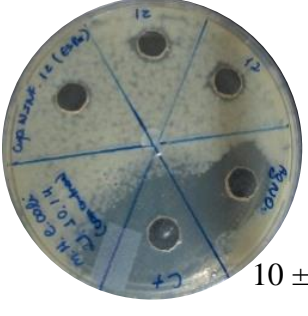
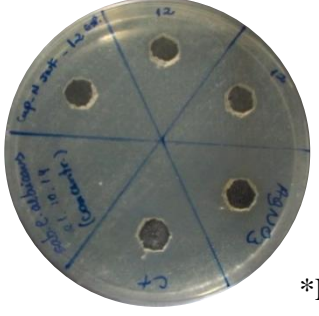
A literatura reporta poucos trabalhos utilizando extratos da semente na biossíntese de AgNPs. No entanto foi encontrado o trabalho de KHADRI et al., (2013), que utilizou o pó da semente de *Olea europaea sativa* na biossíntese de AgNPs pelo método de decocção e determinou atividade antimicrobiana pela técnica de difusão em ágar com diferentes micro-organismos dos que foram testados neste trabalho.

**Tabela 13.** Atividade antimicrobiana das AgNPs biossintetizadas pelo método de decocção e das soluções que não formaram AgNPs

Estrutura	Micro-organismos		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
<b>FOLHA</b>	 $11 \pm 0,0$	 $12 \pm 0,0$	 F
<b>GALHO</b>	D; R	 D; R	 D; F
<b>SEMENTE</b>	 * $15 \pm 0,0$	 *R	 *; F
<b>CÚPULA</b>	D; R	 D $12 \pm 0,0$	D; R

\* formou banda fora região da prata; D - AgNPs desestabilizou; R - resistente; F - fungistática

**Tabela 14.** Atividade antimicrobiana das AgNPs biossintetizadas pelo método de infusão e das soluções que não formaram AgNPs

Estrutura	Micro-organismos		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Encherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
FOLHA	 22 ± 0,6	 17 ± 0,0	 F
GALHO	 20 ± 0,0	 12 ± 0,6	 F
SEMENTE	 10 ± 0,0	 12 ± 1,0	 R
CÚPULA	 9 ± 0,6 *	 10 ± 1,0 *	 *F

\* formou banda fora região da prata; D - AgNPs desestabilizou; R - resistente; F - fungistática

Vale ressaltar que não foi encontrada na literatura a biossíntese de nanopartículas com extratos do galho por algum método. Foi observado que as AgNPs biossintetizadas por *L. puchury-major* nos três métodos de extração não apresentaram halo de inibição quando testadas contra *C. albicans*. Ibrahim et al. (2015) também verificou baixa ação de AgNPs biossintetizadas com o extrato de casca de banana contra essa levedura, corroborando os

resultados apresentados no presente estudo. Alterações na parede celular causadas por AgNPs variam de acordo com o micro-organismo empregado (PAREDES; ORTIZ; TORRES, 2014).

De acordo com os resultados obtidos nos três métodos de extração na biossíntese de AgNPs utilizando extratos obtidos das diferentes estruturas de *L. puchury-major*, as AgNPs obtidas pelo método de infusão apresentaram maior número de amostras com ação inibitória contra *S. aureus* (bactéria Gram-positiva), *E. coli* (bactéria Gram-negativa) e fungistática contra *C. albicans*.

## 5.2 ETAPA II – CARACTERIZAÇÃO DO MÉTODO PROMISSOR DE EXTRAÇÃO NA PRODUÇÃO DA BIOSSÍNTESE DA NANOPARTÍCULA DE PRATA

Para conhecer os constituintes presentes nos extratos aquosos obtidos pelo método de infusão das diferentes estruturas anatômicas de *L. puchury-major* que podem participar do processo de redução de prata, formação e estabilização das nanopartículas, foram realizados estudos preliminares de caracterização dos extratos por meio de testes que fornecem informações antes da realização do isolamento da substância. As técnicas utilizadas para a bioprospecção fitoquímica foram: quantificação de compostos dos metabólitos (fenólicos totais, flavonoides totais e proteínas), FTIR, CLAE, MS, as quais são baseadas em marcadores como a correlação de teores comparados com substâncias padrão, presença de grupos funcionais, tempo de retenção e registro do pico do íon molecular em ( $m/z$ ) respectivamente.

### 5.2.1 Caracterização dos Extratos Obtidos pelo Método Promissor (Infusão)

#### 5.2.1.1 Determinações dos teores de fenólicos totais, flavonoides totais e proteínas

Na tentativa de determinar os possíveis componentes bioativos que podem desempenhar um papel significativo na biorredução, na formação e na estabilização das AgNPs, foram investigados o perfil metabólico, por meio de testes para quantificar os teores de fenólicos totais, flavonoides totais e proteínas; os resultados obtidos estão representados na Tabela 15.

As concentrações dos metabólitos investigados para cada um dos extratos obtidos das diferentes estruturas anatômicas de *L. puchury-major*, foram obtidos pelos valores de absorvância correlacionados com a curva de um padrão conhecido para cada ensaio.

**Tabela 15.** Concentração de fenólicos totais (liofilizado e não liofilizado), flavonoides totais e proteínas obtidos dos extratos das diferentes partes da planta *Licaria puchury-major*

Extratos	Fenol (L)	Fenol (nL)	Flavonóide	Proteína
	TFT mg.g <sup>-1</sup>	C µg.mL <sup>-1</sup>	C µg.mL <sup>-1</sup>	C µg.mL <sup>-1</sup>
<b>CI</b>	153 ± 1	67 ± 2	119 ± 6	50 ± 1
<b>CsI</b>	351 ± 3	73 ± 3	267 ± 2	52 ± 1
<b>FI</b>	55 ± 1	63 ± 4	57 ± 9	15 ± 3
<b>GI</b>	129 ± 5	75 ± 4	174 ± 2	30 ± 4
<b>RI</b>	304 ± 4	54 ± 2	158 ± 1	60 ± 5
<b>SI</b>	230 ± 1	77 ± 1	437 ± 1	81 ± 6
<b>SabI</b>	388 ± 5	70 ± 3	447 ± 3	116 ± 8

L - liofilizado; nL - não liofilizado; TFT – teor de fenóis totais; C – concentração; CI – cúpula infusão; CsI – casca infusão; FI – folha infusão; GI – galho infusão; RI – raiz infusão; SI – semente infusão; SabI – semente abortada infusão

Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos nas formas simples ou de polímeros. Nos vegetais ocorrem de formas livres ou complexadas a açúcares (glicosídeos) e proteínas (VIEIRA e AGOSTIN-COSTA, 2007). Constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos. E podem ser divididos em seis subclasses baseado na sua estrutura química: ácidos fenólicos (C6-C1), flavonóides (C6-C3-C1), estilbenos (C6-C2-C6), lignanas (C6-C3)<sub>2</sub>, tâninos (C6-C3-C6)<sub>n</sub> e cumarinas (C6-C3) (SOARES, 2002; TAPIERO et al., 2002).

O teor de fenólicos totais dos extratos obtidos pelo método de infusão das diferentes estruturas anatômicas de *L. puchury-major*, foi correlacionado com a curva padrão do ácido gálico (Figura 12), que foi previamente determinado por meio da equação linear baseada na curva de calibração  $Y = 0,0311 + 0,0866x$ ,  $R^2 = 0,9988$ , e determinado em µg.mL<sup>-1</sup> para os extratos aquosos sem liofilizar; e em mg.g<sup>-1</sup> para os extratos aquosos liofilizados. No presente estudo, o teor de fenólicos totais foi o único investigado na forma líquida e liofilizada, por ser a classe mais abrangente.

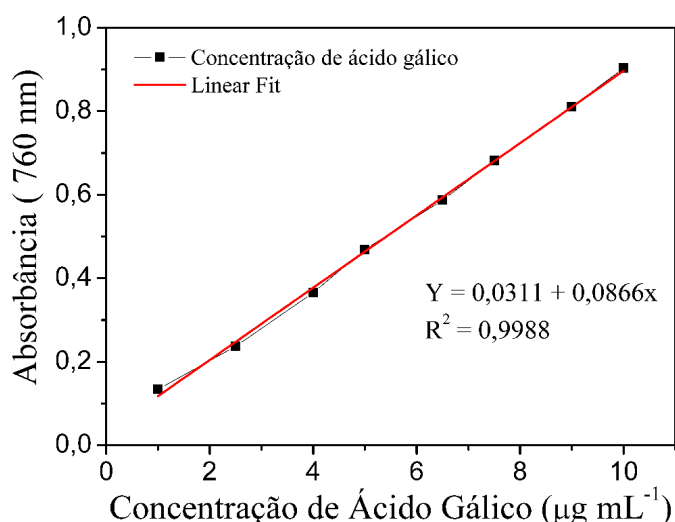
Os resultados das análises desenvolvidos pelos extratos (Tabela 15) evidenciaram para SabI (388 ± 5 mg.g<sup>-1</sup>), CsI (351 ± 3 mg.g<sup>-1</sup>) e RI (304 ± 4 mg.g<sup>-1</sup>), esses extratos apresentaram maiores teores de compostos fenólicos quando liofilizados. Para os extratos sem liofilizar, os maiores teores foram o SI (77 ± 1 µg.mL<sup>-1</sup>), GI (75 ± 4 µg.mL<sup>-1</sup>), CsI (73 ± 3 µg.mL<sup>-1</sup>) e SabI (70 ± 3 µg.mL<sup>-1</sup>).

Foram observados elevados teores de fenólicos totais nos extratos obtidos das diferentes estruturas de *L. puchury-major*, com exceção do extrato da folha que apresentou baixos teores nas formas líquida e liofilizada.

A presença de compostos fenólicos já foi observada na espécie em estudo realizado com a semente, no extrato hexânico (HIMEJIMA e KUBO, 1992), no extrato etanólico (UCHIYAMA et al., 2009) e nos óleos essenciais (SILVA e MAIA, 1973; CARLINI; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 1983; MAIA; RAMOS; LUZ, 1985).

Santos e Blatt (1998) ressaltaram que os vegetais superiores sintetizam e acumulam uma diversidade de compostos fenólicos, no metabolismo de planta, onde o mecanismo ainda não foi totalmente elucidado. Os quais sugerem que pode estar relacionado a interação da planta com o ambiente abiótico como irradiação solar, luz UV, seca, nutrientes, estações do ano além de fatores artificiais como poluentes, que podem influenciar no metabolismo e na produção desses compostos (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

A presença dos compostos fenólicos em plantas tem sido muito estudada por apresentarem atividades farmacológica, nutricional, inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos, além de participarem de processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma em vários alimentos (VIEIRA e AGOSTIN-COSTA, 2007).



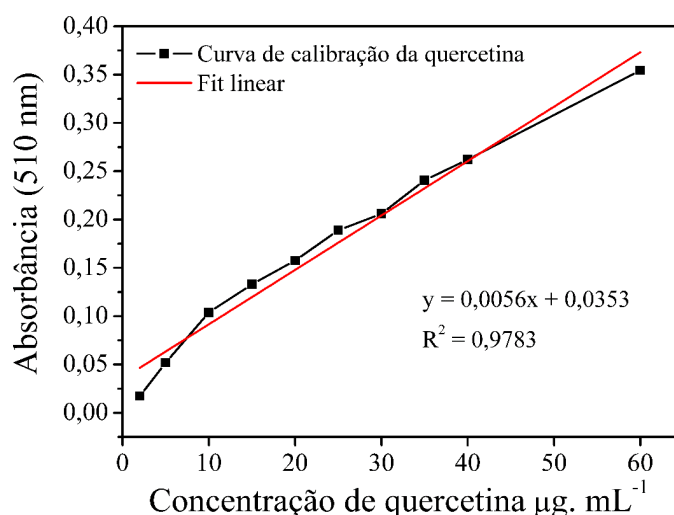
**Figura 12.** Curva padrão de ácido gálico

Na quantificação de flavonoides, os valores de absorbância obtidos para cada um dos extratos foram correlacionados com a curva padrão de quercetina (Figura 13) e expressos em  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , como mostrados anteriormente na Tabela 15. Os extratos que apresentaram maiores

teores de flavonoides foram SabI ( $447 \pm 3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), SI ( $437 \pm 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e CsI ( $267 \pm 2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Esses extratos também apresentaram maiores teores de fenóis totais, mostrando uma relação entre esses dois testes, mesmo porque os flavonoides pertencem à classe de fenóis.

Rossi e Kasum (2002), citam que os flavonoides representam a maior classe de compostos fenólicos, podendo ser divididos em outras subclasses de acordo com as variações que ocorrem no seu anel heterocíclico.

Foi observado, que a quantificação de flavonoides foi mais eficiente quando comparada aos demais testes não liofilizados, o que pode ser atribuído ao método de extração utilizado. Esses resultados estão de acordo com trabalhos realizados com extratos obtidos pelo método de decocção, onde foi observado também elevada concentração de flavonoides, os quais atribuíram a eficiência da extração, devido a alta temperatura empregada no processo, o que pode ter contribuído com o aumento da solubilidade e os coeficientes de difusão dos compostos através da célula (SANTOS-BUELGA et al., 2012; DIAS et al., 2015).

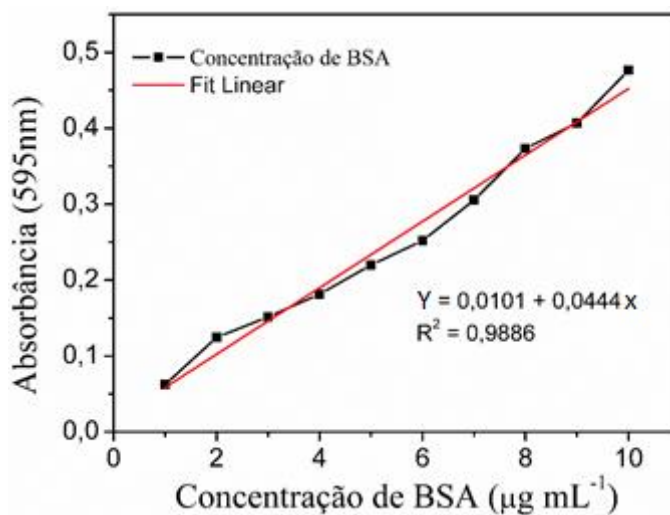


**Figura 13.** Curva de calibração da quercetina

A presença dos metabólitos primários representa a maior ocorrência nas plantas, como as proteínas, polissacarídeos, açúcares e gorduras, os quais desempenham funções básicas vitais e essenciais no vegetal, tais como fotossíntese, respiração e o transporte de nutrientes (GOBBONETO e LOPES, 2007; FERREIRA e PINTO, 2010).

O teor de proteína foi determinado com base na curva padrão de BSA, conforme a Figura 14; os teores de proteínas presentes nos extratos aquosos (Tabela 15). As maiores concentrações de proteína foram observadas nas sementes ( $116 \pm 8$  e  $81 \pm 6 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para SabI e SI, respectivamente), seguidas pelas raízes ( $60 \pm 5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

De um modo geral, foi observado baixo teor de proteína na maioria dos extratos das diferentes estruturas de *L. puchury-major*. Esses resultados estão de acordo com estudo realizado por Osborne (1924), que citou que a proteína em tecido vegetal, apresentam-se em pequenas quantidades.



**Figura 14.** Curva padrão de soros de albumina bovina

A quantificação de teores de fenólicos totais, flavonoides totais e proteínas encontrados nas diferentes estruturas de *L. puchury-major* corroboram com os resultados da espécie *Ocotea catharinensis* (MEZ.) Pertencente a família Lauraceae (RESCAROLLI, 2011).

De acordo com busca na literatura de trabalhos realizados com extratos de plantas na biossíntese de nanopartículas, foi observado que os autores ressaltaram a importância dos compostos responsáveis na redução da prata, formação e estabilização das nanopartículas, no entanto pouco são os trabalhos que investigam a quantificação dos compostos presentes nos extratos.

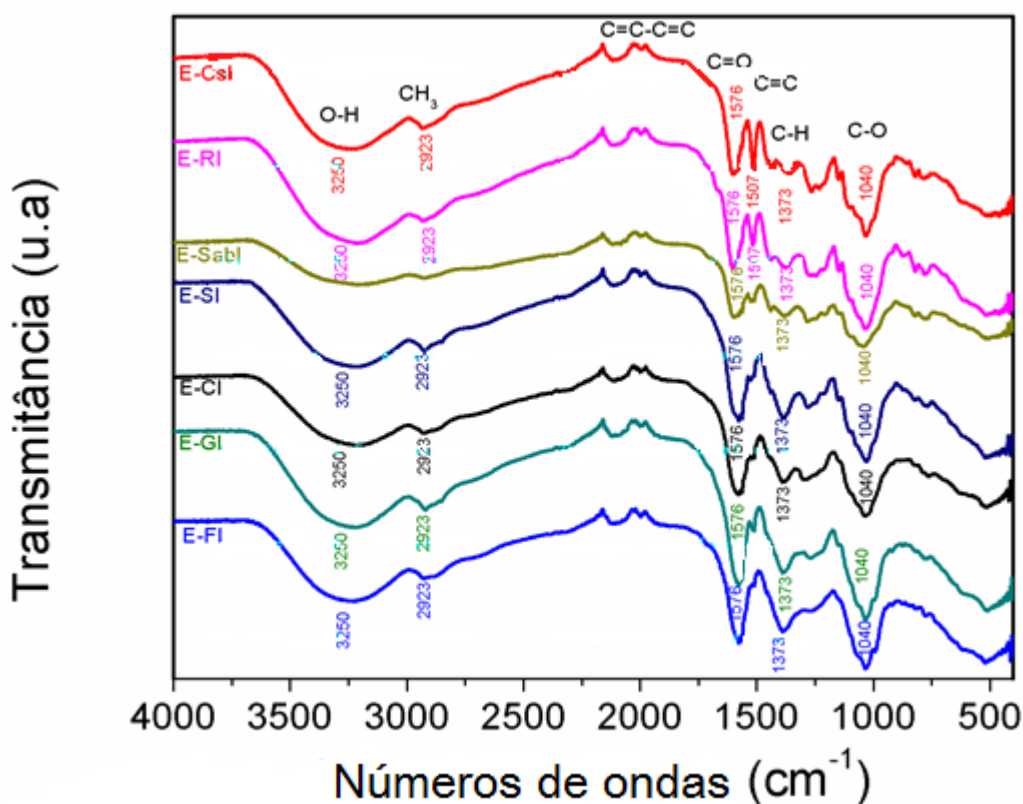
#### 5.2.1.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos extratos de *Licaria puchury-major*

A técnica de FTIR permite determinar quais os grupos funcionais estão presentes na amostra. A maioria dos compostos químicos apresentam espectro com picos bem definidos a determinadas frequências, o que corresponde as vibrações de grupos funcionais específicos ou a determinados tipos de ligações (JUNG, 2008).

Os espectros de FTIR dos extratos aquosos de *L. puchury-major* são apresentados na Figura 15. Para os extratos E-FI, E-GI, E-CI, E-SI, E-SaBI, E-R e E-Cs foram observadas as



absorções em  $3250\text{ cm}^{-1}$ , representando uma banda larga com deformação axial característica de OH. Em  $2923\text{ cm}^{-1}$ , representam uma banda de deformação axial de carbono ligado a hidrogênio de metila ( $\text{CH}_3$ ). A região de  $2000$  a  $1667\text{ cm}^{-1}$ , apresentam deformação harmônica ou frequência de combinações de compostos aromáticos ( $\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}$ ). Em  $1616\text{ cm}^{-1}$ , representam banda que pode ser atribuída ao grupo de  $\text{C}=\text{O}$  de carbonina presente no extrato. Na região  $1507$  representam banda de  $\text{C}=\text{C}$ . Na região de  $1373\text{ cm}^{-1}$ , podem ser atribuídos às vibrações de reflexões de  $\text{C}-\text{H}$  de grupos de metilas  $\text{CH}_3$  quando estão próximos de grupos carbonílicos  $\text{C}=\text{O}$ . A banda em  $1040\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída a grupo de  $\text{C}-\text{O}$  de fenóis, de acordo com Silverstein e Webster (2000); as vibrações de  $\text{C}-\text{O}$  de álcoois produzem uma banda forte entre  $1260$  a  $1000\text{ cm}^{-1}$ . Para E-CsI e E-RI, foram observadas banda em  $1507\text{ cm}^{-1}$ , o que diferencia seus espectros dos demais extratos.



**Figura 15.** Espectro de FTIR dos extratos aquosos pelo método de infusão

Os espectros no infravermelho obtidos dos extratos de *L. puchury-major* apresentaram absorções na faixa dos valores encontrados por outros autores. Para a absorção em  $3250\text{ cm}^{-1}$ , que pode ser atribuída ao grupo  $\text{O}-\text{H}$  de álcoois e fenólicos ( $3200-3550$ ), foram encontradas as absorções em  $3230\text{ cm}^{-1}$  (DING et al., 2014),  $3280\text{ cm}^{-1}$  (KUMAR; PALANICHAMY;

ROOPAN, 2014), 3320  $\text{cm}^{-1}$  (AJHITA et al., 2015), 3411  $\text{cm}^{-1}$  (IBRAHIM et al., 2015), 3417  $\text{cm}^{-1}$  (KONJARI et al., 2015) e 3425  $\text{cm}^{-1}$  (KARUPPIAH e RAJMOHAN, 2013).

Para absorção em 2923  $\text{cm}^{-1}$ , que pode ser atribuída ao grupo  $\text{CH}_3$ , foram encontradas absorções em 2917  $\text{cm}^{-1}$  (PHILIP et al., 2011), 2920  $\text{cm}^{-1}$  (KUMAR; PALANICHAMY; ROOPAN, 2014), 2920  $\text{cm}^{-1}$  (RANI e RAJASEKHARREDDY, 2011), 2922  $\text{cm}^{-1}$  (KARUPPIAH e RAJMOHAN, 2013), 2932  $\text{cm}^{-1}$  (IBRAHIM et al., 2015), 2940  $\text{cm}^{-1}$  (AJHITA et al., 2015).

Para absorção em 1616  $\text{cm}^{-1}$ , pode ser atribuída ao grupo carbonila ( $\text{C}=\text{O}$ ) (1620-1850), foram encontradas absorções em 1600  $\text{cm}^{-1}$  (DING et al., 2014), 1616  $\text{cm}^{-1}$  (JEEVA et al., 2014), 1680  $\text{cm}^{-1}$  (KUMAR; PALANICHAMY; ROOPAN, 2014), 1714  $\text{cm}^{-1}$  (KARUPPIAH e RAJMOHAN, 2013).

Para absorção em 1373  $\text{cm}^{-1}$ , pode ser atribuída aos grupo  $\text{CH}_3$ ; o resultado está próximo da absorção de 1384  $\text{cm}^{-1}$  encontrado por Huang et al. (2007).

Para absorção em 1040  $\text{cm}^{-1}$ , que pode ser atribuída ao grupo  $\text{C}-\text{O}$ , foram encontradas absorções em 1010  $\text{cm}^{-1}$  (KUMAR; PALANICHAMY; ROOPAN, 2014), 1042  $\text{cm}^{-1}$  (HUANG et al., 2007), 1046  $\text{cm}^{-1}$  (JEEVA et al., 2014).

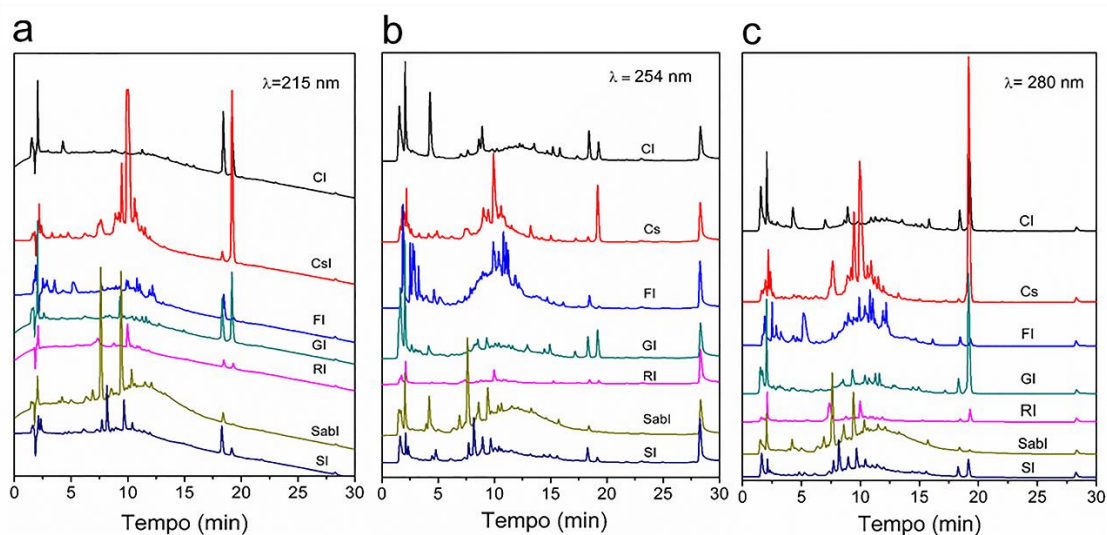
### 5.2.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos extratos de *Licaria puchury-major*

A CLAE é uma técnica utilizada com frequência em bioquímica e química analítica para identificar e quantificar compostos (contidos na fase móvel) baseados nas suas polaridades e interações com a fase estacionária da coluna cromatográfica. Onde a fase móvel pode interagir com a fase estacionária por adsorção, partição, exclusão molecular e troca iônica (WILSON e WALKER, 2000).

A composição química dos extratos de *L. puchury-major* foi efetuada num sistema de CLAE equipado com uma coluna C18. Por não haver estudos fitoquímicos com os extratos aquosos de *L. puchury-major*, esta análise foi realizada utilizando diferentes parâmetros para investigar o melhor tempo de retenção e comprimento de onda para separação dos constituintes presentes nos extratos.

A Figura 16 (a, b, c) apresenta os cromatogramas nos comprimentos de ondas de 215, 254 e 280 nm, no tempo de 30 minutos. De acordo com os resultados, foi observado que o método de eluição do gradiente (acetato: ácido fórmico) funcionou, o que foi comprovado pela separação dos picos. Pelas características apresentadas nos cromatogramas, observa-se que o

comprimento de onda em 215 nm apresentou melhor absorção, pois o cromatograma ficou mais evidente, enquanto os comprimentos de onda em 254 e 280 nm sofreram influência do solvente pela ocorrência de ruído. O tempo de retenção que apresentou maior número de picos foi de cinco a dez minutos para todos os cromatogramas. As melhores condições foram utilizadas para análise de MS. Esta análise foi baseada de acordo trabalho realizado por Cruz et al. (2010).



**Figura 16.** Cromatogramas dos extratos de diferentes partes da planta *Licaria puchury-major* obtidos em diferentes comprimentos de onda. (a) 215 nm, (b) 254 nm e (c) 280 nm.

#### 5.2.1.4 Espectrômetro de Massas (EM) dos extratos de *Licaria puchury-major*

Parte dos resultados obtidos nos cromatogramas de EM está apresentada na Tabela 16. Os espectros de massas apresentaram os picos dos íons moleculares em  $m/z$  192 e 458  $[M]^-$  em todas as amostras, e pela abundância dos picos; pode-se inferir que são correspondentes aos constituintes majoritários. Por outro lado, foi registrado os picos dos íons moleculares em  $m/z$  153  $[M]^+$ , 282 e 502  $[M]^-$  somente nos extratos da folha, galho, cúpula e sementes. Os íons moleculares em  $m/z$  326 e 328  $[M]^-$ , foram apresentados somente no extrato da folha.

**Tabela 16.** Íons moleculares presentes no extrato aquoso de *Licaria puchury-major*

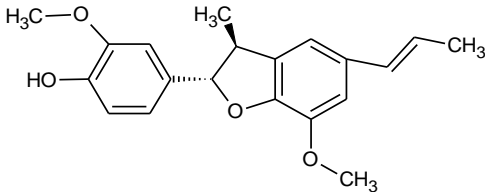
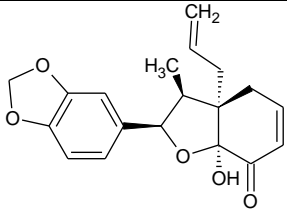
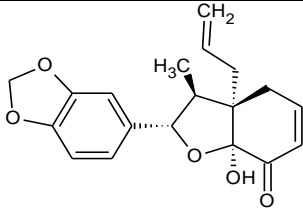
$m/z$	M	E-FI	E-GI	E-CI	E-SI	E-SabI	E-CsI	E-RI
192	[M] <sup>-</sup>	+	+	+	+	+	+	+
458	[M] <sup>-</sup>	+	+	+	+	+	+	+
153	[M] <sup>+</sup>	+	+	+	+	+		
282	[M] <sup>-</sup>	+	+	+	+	+		
502	[M] <sup>-</sup>	+	+	+	+	+		
326	[M] <sup>-</sup>	+						
328	[M] <sup>-</sup>	+						

[M]<sup>-</sup> - modo negativo; [M]<sup>+</sup> - modo positivo; E-FI - extrato folha infusão; E-GI - extrato galho infusão; E-SI - extrato semente infusão; E-SabI - extrato semente abortada infusão; E-CsI - extrato casca infusão; E-RI - extrato raiz infusão.

Os íons moleculares em ( $m/z$ ) apresentados no extrato da folha sugerem a presença das substâncias licarina A ( $m/z = 326,3863$ ) e dos isômeros ferrearina B ( $m/z = 328,3591$ ) e ferrearina C ( $m/z = 328,3591$ ) (Tabela 17). Tais substâncias foram isoladas do extrato em etanol das sementes de *L. puchury-major* no trabalho de Uchiyama et al. (2009), com  $m/z$  semelhantes aos encontrados neste trabalho. Os resultados encontrados também estão em consonância com o de Funasaki et al. (2009), que encontraram as neolignanas ferrearina B e C na espécie *Ocotea catharinensis*, pertencente à família Lauraceae. Estudos complementares são necessários para comprovação.

Gottlieb e Yoshida (1989) citaram que as espécies de Lauraceae são conhecidas pelo acúmulo de derivados fenilpropanoídicos, sendo as lignanas e as neolignanas seus principais marcadores químicos. A literatura reporta a ocorrência de neolignanas presentes na família Lauraceae, nas espécies de *L. puchury-major* (UCHIYAMA et al., 2009), *Ocotea catharinensis* (FUNASAKI et al., 2009), *C. australe* (CARBONEZI et al., 2004), e *O. lancifolia* (CAMARGO et al., 2013).

**Tabela 17.** Possíveis moléculas presentes nos extratos aquosos de *Licaria puchury-major* obtidas por espectrômetro de massas (EM) no modo negativo

$t_r$ (min)	$m/z$ [ $M^+H$ ] <sup>-</sup>	Molécula	Estrutura Química
5,769	326,3863	Licarina A	
5,769	328,3591	Ferrearina B	
5,769	328,3591	Ferrearina C	

## 5.2.2 Caracterização das Nanopartículas de Prata Produzidas pela Biossíntese pelo Método de Infusão

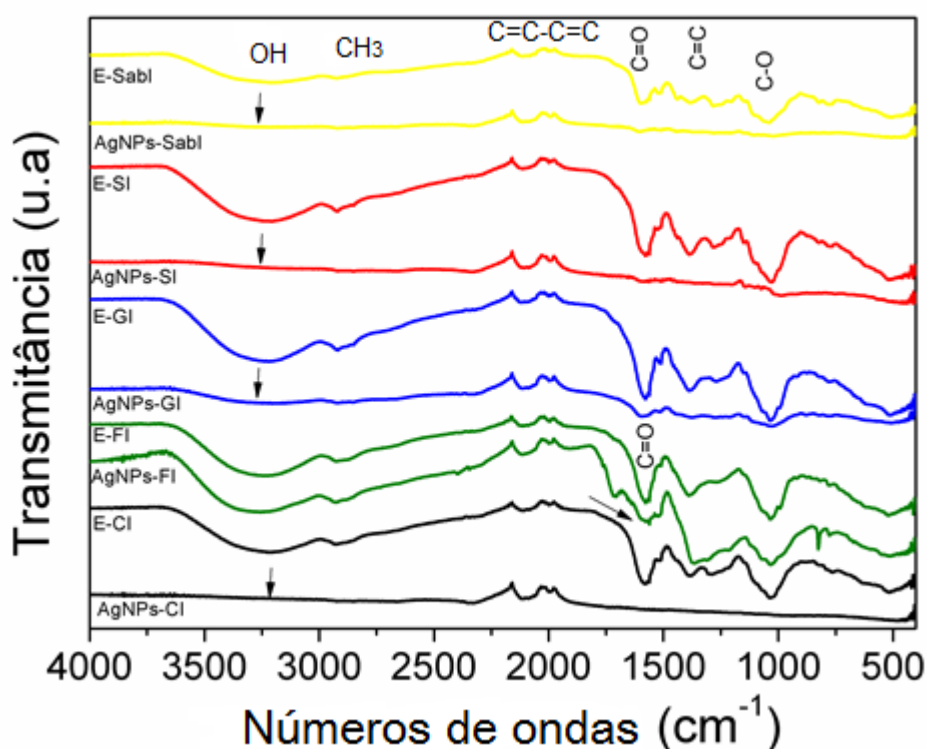
O estudo de caracterização dos extratos é necessário para entender as classes de substâncias e grupos funcionais envolvidos no processo de redução da prata  $Ag^+$  para  $Ag^0$ , além da formação e da estabilização das AgNPs.

### 5.2.2.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) das AgNPs

Para investigar a interação química entre o extrato e as AgNPs formadas, essa análise foi realizada primeiramente dos extratos, apresentados anteriormente (Figura 15); e comparados com os espectros das AgNPs biossintetizadas.

Os perfis espectrais obtidos a partir dos dados de FTIR foram comparados os extratos e as AgNPs. A Figura 17 apresenta os principais sinais espectrais ( $onda.cm^{-1}$ ) detectados nos extratos, nas AgNPs e os grupos funcionais. E as possíveis mudanças químicas envolvidas no processo de biorredução dos íons de prata.

Os dados obtidos mostraram as semelhanças das bandas apresentadas nos espectros das AgNPs e dos extratos obtidos das diferentes estruturas de *L. puchury-major*. Para as AgNPs-Sabl, AgNPs-SI, AgNPs-GI e AgNPs-CI, foram observados que a interação entre a prata e o extrato ocorre sempre na banda de hidroxila devido a seu desaparecimento após biorredução em  $3200\text{ cm}^{-1}$ . Foi notado apenas para AgNPs-FI que a formação das AgNPs pode ser atribuída à carbonila pela presença da absorção em  $1616\text{ cm}^{-1}$ , que apresenta deformidade após a biorredução. Foi observada também para essas AgNPs a absorção na região de  $824\text{ cm}^{-1}$ , que é atribuída às vibrações de N-O de nitritos ( $\text{NO}_3^-$ ); nesse caso, o sal de nitrato de prata utilizado como precursor na biossíntese das nanopartículas (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000; HUANG et al., 2007).



**Figura 17.** Espectros FTIR dos extratos aquosos obtidos pelo método de infusão

A literatura cita que a presença de hidroxila ou de carbonila em extratos que contenham carboidratos, flavonoides, terpenoides e compostos fenólicos é considerada como agentes redutores e podem ser responsáveis pela biorredução na síntese de nanopartículas (DING et al., 2014; AJITHA; REDDY; REDDY, 2015).

### 5.2.2.2 Espectroscopia na Região do Ultravioleta-visível (UV-vis)

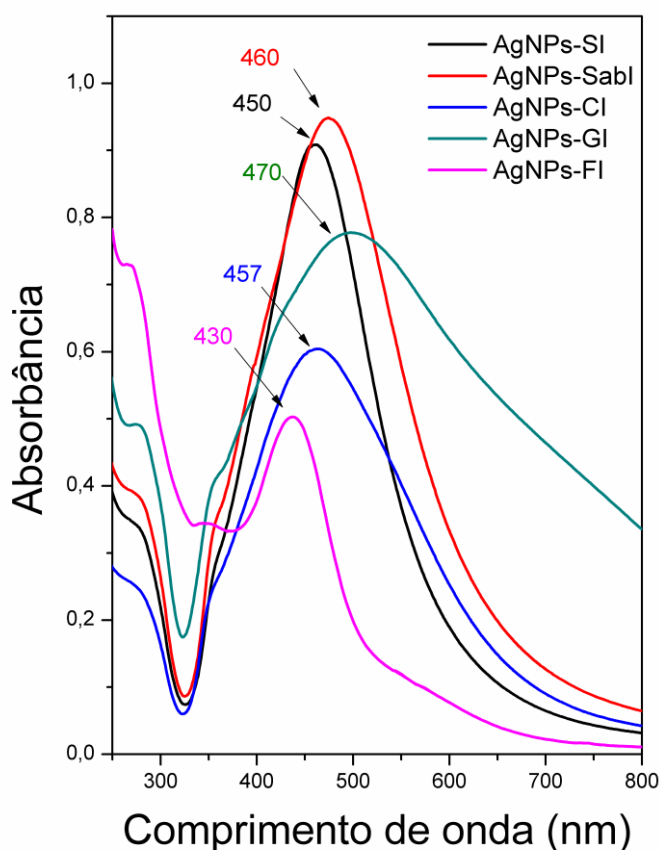
Nesta etapa, para a realização de UV-vis das AgNPs obtidas pelo método de infusão, foi acrescentada a estrutura anatômica da semente abortada, visando aplicações futuras, na substituição pelas sementes que germinam naturalmente, visto que essas são disputadas pelos coletores, pelos animais e pela própria natureza, que precisa se reproduzir. Foram melhorados alguns parâmetros, como a centrifugação, visando a resultados positivos para as amostras que não formaram AgNPs na Etapa I. Foi também investigado o tempo de formação das AgNPs, visando menor período de redução.

A Figura 18 mostra os espectros de absorções de UV-vis das AgNPs biossintetizadas pelo método de infusão. As nanopartículas AgNPs-FI, AgNPs-SI, AgNPs-SabI, AgNPs-GI e AgNPs-CI apresentaram bandas plasmônicas de absorções na região característica da prata para AgNPs biossintetizadas com extrato de plantas (VEERASAMY et al., 2011; PATIL; MANGESH; SANJAY, 2012; AHMED et al., 2016). As AgNPs de acordo com o seu tamanho podem aparecer numa região de c.d.o. de 350-550 nm (JANA; SAL; PAL, 1999).

As características apresentadas pelas bandas plasmônicas das AgNPs-FI, AgNPs-SI e AgNPs-SabI foram simétricas, sendo as duas últimas mais acentuadas. A AgNPs-GI apresentou deformidade e banda larga. Essa característica foi observada também para a AgNPs-CI. Autores citam que a largura da banda esta relacionada com a distribuição de tamanhos da AgNPs (PAL; TAK; SONG, 2007; MARTINEZ-CASTANON; NINO-MARTINEZ; MARTINEZ-GUTIERREZ, 2008).

Foi observado que o sistema de centrifugação ajudou na estabilização das AgNPs-CI, o que não ocorreu na Etapa I. O extrato obtido da raiz não biossintetizou nanopartícula; e o da casca, apesar de biossintetizar, após uma hora, desestabilizou-se; esses resultados também foram obtidos na Etapa I. A presença de sedimentos nos extratos dessas estruturas pode ter influenciado no sistema de biossíntese das AgNPs.

O tempo de reação para a formação das nanopartículas AgNPs-SI e AgNPs-SabI foi de 1 hora de reação, enquanto, para as AgNPs-CI, AgNPs-GI e AgNPs-FI, foi observado a partir de 16 horas de reação. O alto teor de fenólicos e flavonoides totais presente nas sementes pode ter contribuído no tempo de redução da prata para essas AgNPs. Diante dos resultados obtidos, pode-se inferir que o tempo de reação de 48 horas é desnecessário, como realizado na Etapa I.



**Figura 18.** Espectros de UV-vis das AgNPs biossintetizadas pelo método de infusão

Com o intuito de tentar entender a participação dos constituintes presentes nos extratos de *L. puchury-major*, que atuam no processo de redução de prata e, por conseguinte, na formação das AgNPs, foram feitas algumas correlações com os resultados obtidos na caracterização dos extratos.

Foi observado no espectro de FTIR apresentado anteriormente que a AgNPs-FI se difere das demais amostras, o que pode ser atribuído à presença da carbonila (-C=O) e de hidroxila (-OH) no extrato da folha. A literatura cita que esses grupos funcionais participam da biorredução da prata (KASTHURI; VEERAPANDIAN; RAJENDIRAN, 2009; SHARMA; YNGARD; LIN, 2009; CRUZ et al., 2010; AJITHA; REDDY; REDDY, 2015).

Esses resultados podem ser atribuídos também à diferença observada nos cromatogramas de EM do extrato da folha pela presença dos íons moleculares em  $m/z$  326 e 328. Essas massas foram observadas nas substâncias isoladas do extrato etanólico das



sementes de *L. puchury-major*. Nas estruturas dessas substâncias é observada a hidroxila na licarina A; e a carbonila nas substâncias ferrearina B e C (UCHIYAMA et al., 2009).

A formação das nanopartículas AgNPs-SI, AgNPs-SabI, AgNPs-GI e AgNPs-CI pode ser atribuída à presença da hidroxila presente nesses extratos, como observado no espectro de FTIR. Ou pode ser atribuída à presença dos íons moleculares em  $m/z$  153, 282 e 502, mostradas nos cromatogramas de EM. Foi observada a presença desses íons moleculares somente nos extratos que biossintetizaram AgNPs.

A não formação das AgNPs das estruturas anatômicas da casca e da raiz pode ser atribuída à presença dos constituintes de seus extratos, que apresentaram absorção em  $1507\text{cm}^{-1}$ , como observado no espectro de FTIR. Ou a ausência dos íons moleculares em  $m/z$  153, 282 e 502 nesses extratos, observada nos cromatogramas de EM.

Pelos valores encontrados de quantificação dos teores de fenólicos e flavonoides, infere-se que somente a presença e a quantidade desses grupos nos extratos da planta não são os únicos responsáveis para a biorredução da prata e a formação de AgNPs. Essas observações estão em consonância com relatos da literatura (AJITHA; REDDY; REDDY, 2015). É preciso que ocorra a combinação e a interação das biomoléculas (AHMED et al., 2016), em função da complexidade dos extratos, por conterem diferentes concentrações e combinações de agentes redutores orgânicos (MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013). Outros fatores também influenciam e desempenham um papel crucial no processo de síntese, como a temperatura (SONG e KIM, 2009; PALANIAPPAN; SATHISHKUMAR; SANKAR, 2015), o tempo de reação (MUTHUKRISHNAN et al., 2015), o pH (SATHISHKUMAR et al., 2009) e a concentração do sal de metal (RAMESH; KOKILA; GEETHA, 2015).

A literatura reporta uma diversidade de substâncias responsáveis pela redução da prata e pela formação das AgNPs. Diversos autores atribuíram aos compostos orgânicos solúveis em água presentes nos grupos funcionais os responsáveis pela redução imediata dos íons, como os alcaloides, os compostos fenólicos, os terpenoides (MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013), além dos componentes heterocíclicos (HUANG et al., 2007). Outros citam a presença de flavonas, ácidos orgânicos e quinonas (SATHISHKUMAR et al., 2009; SATHISHKUMAR; SNEHA; YUN, 2010; PHILIP et al., 2011; SALEM et al., 2014; PALANIAPPAN; SATHISHKUMAR; SANKAR, 2015; SADEGHI e GHOLAMHOSEINPOOR, 2015; VELUSAMY et al., 2015), dos ácidos ascórbico, cítrico, elágico, gálico e retinoico (SATHISHKUMAR et al., 2009; SATHISHKUMAR; SNEHA; YUN, 2010; PRABHU e POULOSE, 2012; SALEM et al., 2014; RAJAN et al., 2015).

Os maiores números de citações são atribuídos à presença de diversos compostos no extrato, como grupos fenólicos, flavonoides, alcaloides, terpenoides, coenzimas, proteínas, aminoácidos, enzimas, polissacárideos, taninos, saponinas, vitaminas, flavonas, compostos alcoólicos, triterpenoides, grupos metóxi e esteroides. (HUANG et al., 2007; SATHISHKUMAR et al., 2009; SHARMA; YNGARD; LIN, 2009; AHMAD et al., 2010; DHAS; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2013; MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013; JEEVA et al., 2014; KATHIRAVAN et al., 2015; MUTHUKRISHNAN et al., 2015; RAJAN et al., 2015; SADEGHI e GHOLAMHOSEINPOOR, 2015; AHMED et al., 2016). Há ainda os que reportam a presença de uma substância específica, como epicatequina galato, filantina, pinocembrin e teaflavina (RAJAN et al., 2015).

### 5.2.2.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A técnica de DLS (do inglês Dynamic Light Scattering) utilizando o Zetasizer nano® é útil e versátil para medição de nanopartículas na forma de soluções e utiliza o mesmo equipamento para as medidas do diâmetro médio das AgNPs, suas distribuições por intensidade de tamanho e a carga superficial. Essas medidas foram realizadas para as AgNPs biossintetizadas com os extratos de *L. puchury-major*, pelo método de infusão. As análises de DLS mostraram os valores obtidos das dimensões de tamanhos (nm), polidispersividade (Pdi) e medida do potencial zeta (mV), respectivamente (Tabela 18).

**Tabela 18.** Análises de DLS - diâmetro, potencial zeta e polidispersividade das nanopartículas de prata biossintetizadas pelo método de infusão

Estruturas Vegetais	Diâmetro (nm)	Polidispersividade (PDI)	Potencial Zeta (mV)
AgNPs-FI	64,2	0,280	-30,7
AgNPs-GI	152,9	0,210	-33,2
AgNPs-CI	142,4	0,543	-35,1
AgNPs-SI	139,1	0,349	-43,4
AgNPs-SabI	130,2	0,204	-39,1

A medida do diâmetro médio das nanopartículas pelo método de DLS envolve direcionar um feixe de laser para uma amostra altamente diluída e contabilizar a luz espalhada em um fotomultiplicador posicionado em um determinado ângulo (URBAN e TAKAMURA, 2002). O diâmetro médio apresentado para as AgNPs-FI, AgNPs-GI, AgNPs-CI, AgNPs-SI e

AgNPs-SabI foram de 64,2, 152,9, 142,4, 139,1 e 130,2 nm, respectivamente (Tabela 18). A AgNPs-FI apresentaram menor tamanho, enquanto as AgNPs-GI demonstraram maior tamanho. Esses resultados estão em consonância com os dados apresentados pelo UV-vis.

Vilchis-Nestor et al (2008) citaram que a concentração inicial de prata e o tempo de reação têm um papel importante nas propriedades ópticas e no tamanho das AgNPs. Estudo realizado com o extrato da folha de *Ceropegia thwaitesii* foi avaliado o tempo de redução em 72 horas; e foi observado que o aumento do tempo de reação aumenta o processo de redução das AgNPs, o qual corresponde à vibração transversal e longitudinal das bandas plasmônicas (MUTHUKRISHNAN et al., 2015).

O potencial zeta é uma medida indireta da carga da superfície de uma partícula, quanto maior o valor do potencial zeta, maior a repulsão entre as partículas equivalentes, e mais estável a dispersão coloidal (FENNEL e WENNERSTROM, 1999). A maioria das partículas dispersas em um sistema aquoso adquirem carga na superfície, por meio da ionização ou adsorção de grupos presentes na solução. As cargas de superfície modificam a distribuição dos íons na interface, resultando em uma camada ao redor da partícula que se difere da solução (TRIERWEILER, 2009).

O potencial zeta das AgNPs foram determinados, após diluição em KCl. As medições das AgNPs-FI, AgNPs-GI, AgNPs-CI, AgNPs-SI e AgNPs-SabI apresentaram carga superficial de -30.7, -33.2, -35.1, -43.4 e -39.1 mV, respectivamente (Tabela 18). Todas as AgNPs apresentaram valores de potencial zeta negativo menor que -30 mV, indicando que são estáveis, sem tendência à aglomeração (TRIERWEILER, 2009).

Os resultados obtidos estão dentro da faixa de valores medidas de potencial zeta para AgNps biossintetizadas com extratos de plantas, descritos na literatura pelo método de decoção de - 51,8 mV para *Momordica charantia* Cucurbitaceae, (pó folha) (AJITHA; REDDY; REDDY, 2015), -36,61 mV para *Lantana camara* (folha esmagada) (SINGH et al., 2015), -27,1 mV para *Ocimum tenuiflorum* Lamiaceae (folha fresca cortada) (PATIL; MANGESH; SANJAY, 2012) e -24,9 mV para *Melia azedarach* Meliaceae (pó folha) (SUKIRTHA et al., 2012).

Foi encontrado na literatura o potencial zeta de AgNPs biossintetizadas com plantas pelo método a frio de -41,12 mV para *Rhizophora apiculata* Rhizophoraceae (pó folha) (DHAS; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2013) e -30,0 mV para *Rosa rugosa* Rosaceae (folha fresca cortada) (DUBEY; LAHTINEN; SILLANPA, 2010).

Trierweiler (2009), citou que partículas com alto potencial zeta e mesmo sinal de carga, seja positivo ( $> +30$  mV) ou negativo ( $< -30$  mV), irão se repelir. Para moléculas e partículas

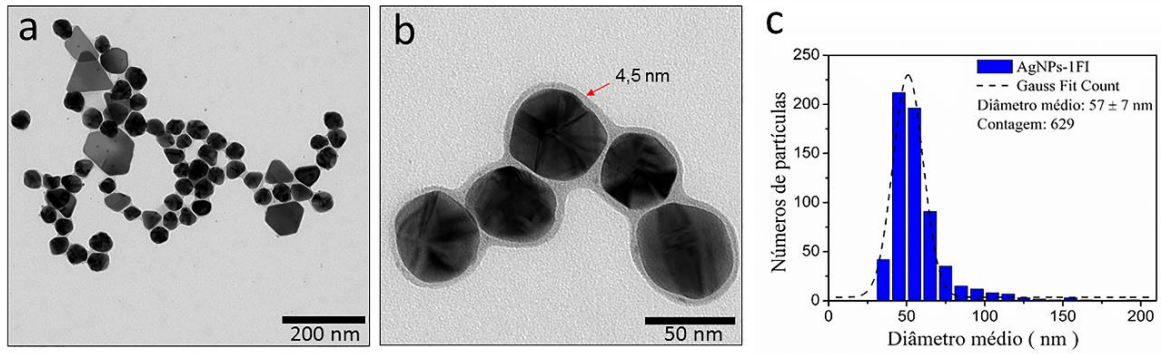
pequenas e com densidade baixa o suficiente para permanecerem em suspensão, um alto potencial zeta confere estabilidade, ou seja, a solução ou dispersão terá menor tendência à agregação. O valor do potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (SONVICO et al., 2006).

A polidispersão é um parâmetro calculado da análise em função de autocorrelação em medidas de espalhamento dinâmico de luz (TRIERWEILER, 2009). Os resultados apresentados pelos índices de polidispersão das AgNPs-FI, AgNPs-GI e AgNPs-SabI foram de 0,280, 0,210 e 0,204 Pdi, respectivamente. Os resultados indicam que essas AgNPs apresentaram populações polidispersas, o que corrobora para a não formação de agregados, o que pode ser comprovado a partir dos resultados obtidos pelo TEM. Trierweiler (2009), citou que índices de polidispersão inferiores a 0,300 indicam homogeneidade na distribuição de tamanhos das partículas.

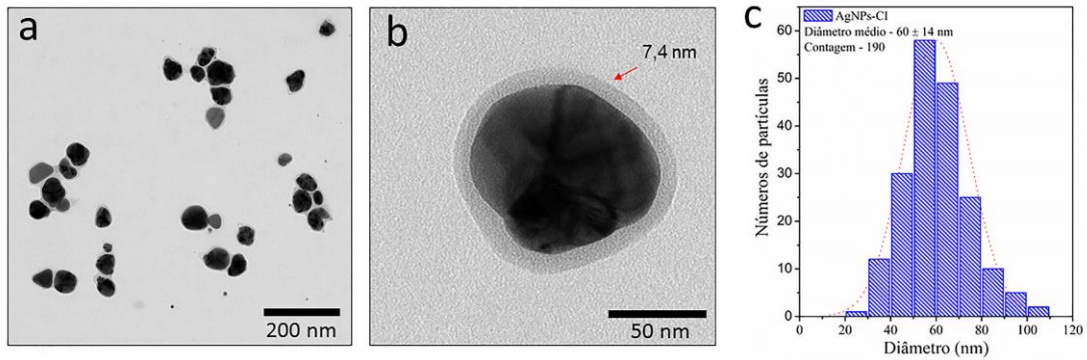
Os resultados obtidos estão de acordo com os reportados na literatura, realizados com as plantas *C. camphora* (HUANG et al., 2007), *Lawsonia inermis* (GUPTA; ANDERSON; RAI, 2015) e *L. camara* (AJITHA; REDDY; REDDY, 2015). Por outro lado, as AgNPs-CI e AgNPs-SI demonstraram valores acima de 0,300 Pdi, que pode ser um indicativo de baixa polidispersividade.

#### 5.2.2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

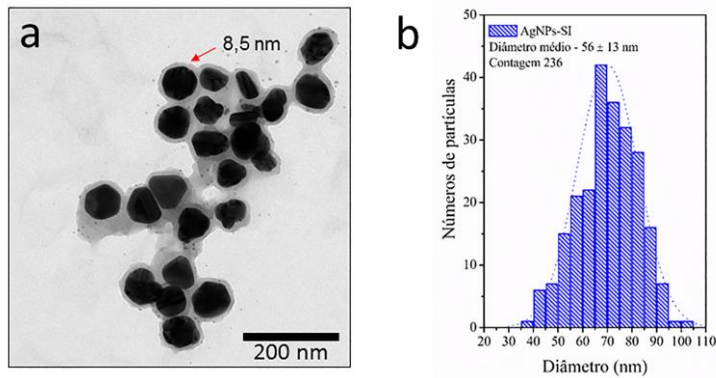
A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) é normalmente usada para obter imagens de alta resolução e análise nanoestrutural de uma amostra. As informações topográficas obtidas são quase ao nível da resolução atômica e podem ser utilizadas para a caracterização estrutural e identificação das diversas fases dos nanomateriais. As imagens recolhidas pelo TEM permitem distinguir claramente formas e tamanhos das nanopartículas (WANG, 2000). As micrografias representadas nas Figuras 19-a, 20-a, 21-a e 22-a mostraram diferentes morfologias, tais como triangular, triangular-truncada, elipsoidal e pseudoesférica entre outras formas. Isso pode estar associado a diferentes formas de nucleação das partículas de prata, decorrente do meio em que formam serem complexas.



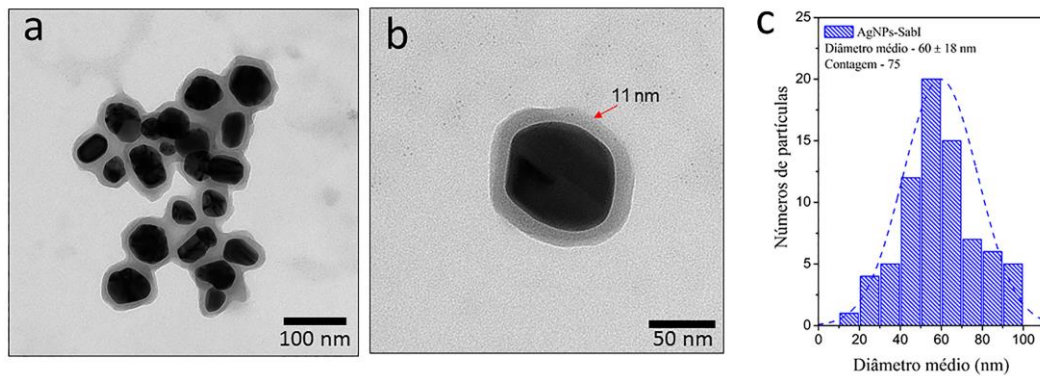
**Figura 19.** (a e b) Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanopartículas de prata e (c) histograma da distribuição de tamanho de AgNPs-FI



**Figura 20.** (a e b) Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanopartículas de prata e (c) histograma da distribuição de tamanho de AgNPs-CI



**Figura 21.** (a) Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanopartículas de prata e (c) histograma da distribuição de tamanho de AgNPs-SI



**Figura 22.** (a e b) Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanopartículas de prata e (c) histograma da distribuição de tamanho de AgNPs-SaBI

As diferentes formas obtidas estão de acordo com a formação das bandas plasmônicas apresentadas pelo UV-vis em 430-470 nm. Bandas nessa faixa podem ser atribuídas a diferentes formas apresentadas pelas AgNPs (PAL; TAK; SONG, 2007; MARTINEZ-CASTANON; NINO-MARTINEZ; MARTINEZ-GUTIERREZ, 2008).

Os resultados obtidos foram comparados com AgNPs biossintetizadas por outros métodos, como já mencionado, a literatura não reporta AgNPs biossintetizadas com extratos de planta obtidos pelo método de infusão. As formas quase esférica e elipsoidal também foram encontradas por Huang et al. (2007), nas AgNPs biossintetizadas com extrato aquoso das folhas de *C. camphora*, pertencente a Lauraceae, mesma família da *L. Puchury-major*.

As formas esférica e triangular foram encontradas por Santhoshkumar et al. (2011) nas AgNPs biossintetizadas pelo método de decocção com extratos aquosos das folhas de *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae).

Vale ressaltar que AgNPs biossintetizadas com extratos de plantas pelo método de decocção utilizando pó de folhas é mais comum encontrar a forma esférica: *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) (AJITHA; REDDY; REDDY, 2015), *C. thwaitesii* (Asclepiadaceae) (MUTHUKRISHNAN et al., 2015), *M. piperita* (Lamiaceae) (MUBARAKALI et al., 2011), *M. Oloifera* (Moringaceae) (PRASAD e ELUMALAI, 2011), *C. serrulata* (Cymodoceaceae) (PALANIAPPAN; SATHISHKUMAR; SANKAR, 2015) e *M. azedarach* (Meliaceae) (SUKIRTHA et al., 2012).

Para AgNPs biossintetizadas pelo método de decocção com extratos aquosos da semente, foi encontrada a forma esférica *O. europaea sativa* (Oleaceae) (KHADRI et al., 2013) e *C. officinalis* (Asteraceae) (BAGHIZADEH et al., 2015). Vale ressaltar que não foram encontrados trabalhos de AgNPs biossintetizadas com a estrutura anatômica da cúpula.

As AgNPs estão envolvidas por um material com características diferentes, provavelmente orgânico. Que poderá atuar como estabilizador e prevenir a aglomeração, como observado anteriormente nas Figuras 19-b, 20-b, 21-a e 22-b, em que se observa uma camada em torno das nanopartículas AgNPs-FI, AgNPs-CI, AgNPs-SI e AgNPs-SabI, as quais apresentaram tamanho médio de 4,5; 7,4; 8,5 e 11 nm, respectivamente. Essa camada pode ser atribuída à presença de proteína nos extratos da planta. Os resultados de determinação de proteínas mostraram os teores de 15,3  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , 50  $\pm$  1  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , 81  $\pm$  6  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e 116  $\pm$  8  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente. Foi observado que o diâmetro da camada foi aumentando proporcionalmente com a quantidade de proteína presente nos extratos. Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos pelas medidas de potencial zeta, a carga negativa dos valores encontrados responsáveis pela estabilidade, pode ser atribuída às camadas que envolvem as nanopartículas.

Sadeghi e Gholamhoseinpoor (2015) citaram que o grupo amida presente nas proteínas pode ligar-se ao metal e formar a camada que cobre as extremidades das nanopartículas metálicas e, com isso, evita a aglomeração, estabilizando o meio. Outros autores também sustentam que o revestimento da camada que envolve as nanopartículas é formado por proteína (ELAVAZHAGAN e ARUNACHALAM, 2011; MUBARAKALI et al., 2011; ARRUDA et al., 2015).

As distribuições de tamanhos foram determinadas a partir dos histogramas (Figuras 19-c, 20-c, 21-c e 22-c); as AgNPs apresentaram uma distribuição de tamanho relativamente estreita. Os diâmetros apresentados pelas AgNPs foram de  $57,0 \pm 7$  nm (AgNPs-FI),  $60 \pm 14$  nm (AgNPs-CI),  $56 \pm 13$  nm (AgNPs-SI) e  $60 \pm 18$  nm (AgNPs-SabI), respectivamente. Os resultados obtidos estão de acordo os de Prasad e Elumalai (2011), que encontraram diâmetro de 57 nm nas AgNPs biossintetizadas com o extrato aquoso da folha de *M. Oloifera* (Moringaceae) pelo método de decocção. Esse método apresenta AgNPs com diâmetros que variam de 16 a 100 nm, não sendo esse método considerado um parâmetro para determinar o diâmetro das nanopartículas: 16 nm para *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) (AJITHA; REDDY; REDDY, 2015), 25-80 nm para *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae) (SANTHOSHKUMAR et al., 2011), 50-90 nm para *Memecylon edule* (Melastomatacea) (ELAVAZHAGAN e ARUNACHALAM, 2011), 78 nm para *Melia azedarach* (Meliaceae) (SUKIRTHA et al., 2012), 90 nm para *Mentha piperita* (Lamiaceae) (MUBARAKALI, et al., 2011), 100 nm para *Cymodocea serrulata* (Cymodoceaceae) (PALANIAPPAN; SATHISHKUMAR; SANKAR, 2015) e *Ceropegia thwaitesii* (Asclepiadaceae) (MUTHUKRISHNAN et al., 2015).

Os diâmetros encontrados para AgNPs biossintetizadas pelo extrato aquoso das sementes foram de  $56 \pm 13$  nm (AgNPs-SI) e  $60 \pm 18$  nm (AgNPs-SabI), os quais foram maiores que os descritos na literatura para AgNPs biossintetizadas pelo método de decocção, que apresentaram diâmetro de 30 nm para *Olea europaea sativa* (Oleaceae) (KHADRI et al., 2013) e 7,5 nm para *Calendula officinalis* (Asteraceae) (BAGHIZADEH et al., 2015).

Foram observadas diferenças nos diâmetros das nanopartículas apresentados pelo TEM quando comparados com os resultados encontrados por DLS que apresentaram valores maiores. A diferença encontrada foi também observada por outros trabalhos descritos na literatura (PAREDES; ORTIZ; TORRES, 2014; MUTHUKRISHNAN et al., 2015).

#### 5.2.2.5 Difração de Raio X (DRX)

As AgNPs foram investigadas por difração de raios X. A maioria dos materiais inorgânicos são cristalinos, e o conhecimento da sua estrutura permite o entendimento das suas propriedades físicas e químicas. A difração de raios-X é uma técnica analítica que permite determinar o carácter cristalino de uma amostra, o tamanho médio e a organização estrutural dos cristais presentes (HERRERA e HARTEL, 2000).

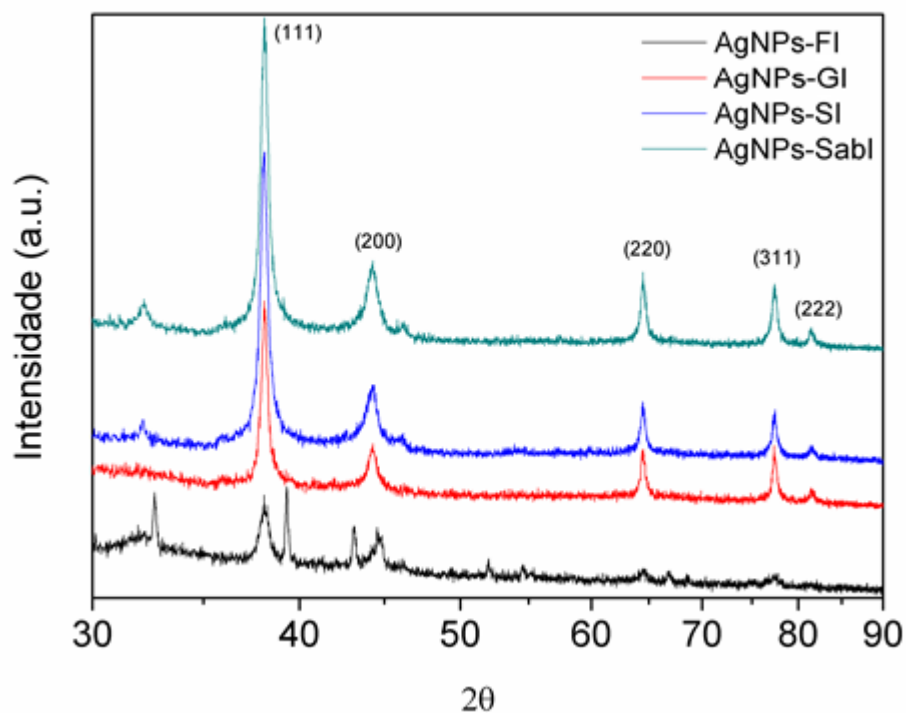
Melato (1997), citou que esta técnica não é destrutiva e está associada à dispersão de raios-X pelas unidades de um sólido cristalino que possuem distâncias reticulares da mesma ordem de grandeza da radiação X.

Os difratogramas de DRX das AgNPs-FI, AgNPs-CI, AgNPs-SI e AgNPs-SabI representam o número de contagens de incidência de radiação em função do ângulo, que incidiu em cada amostra (Figura 23). As AgNPs-GI não foi apresentada, devido ao pouco rendimento após liofilização.

As caracterizações dos picos das nanopartículas estão em concordância com os cinco picos característicos da prata, as reflexões de Bragg a  $2\theta = 37,8^\circ$ ;  $43,8^\circ$ ;  $64,2^\circ$ ;  $77,3^\circ$ ; e  $81,5^\circ$ , que correspondem aos planos cristalinos 111, 200, 220, 311 e 222, respectivamente, pertencentes a uma estrutura cristalina cúbica de faces centradas (FCC - Face Centered Cubic).

Os difratogramas de DRX confirmaram a estrutura cristalina das AgNPS. Esses resultados estão de acordo com os trabalhos descritos na literatura (HUANG et al., 2007; SATHISHKUMAR; SNEHA; YUN, 2009, 2010; SANTHOSHKUMAR et al., 2011; JEEVA et al., 2014; SALEM et al., 2014).





**Figura 23.** DRX – Espectro das nanopartículas de prata

#### 5.2.2.6 Espectrômetro de Emissão Óptica por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES)

A Tabela 19 apresenta as concentrações das AgNPs biossintetizadas pelo método de infusão. A técnica de ICP-OES é empregada para conhecer a concentração da prata após a redução e a formação de AgNPs. É utilizada para calcular uma determinada concentração que se pretende testar nos diversos ensaios, como antimicrobiano, citotoxicidade, antioxidante, entre outros (ARRUDA et al., 2015).

**Tabela 19.** Concentração da prata obtida por ICP-OES

ICP-OES	
Nanopartículas	Concentração da prata mg.L <sup>-1</sup>
AgNPs-FI	17,58 ± 1,67
AgNPs-GI	18 ± 0,72
AgNPs-CI	22,71 ± 1,29
AgNPs-SI	62,09 ± 0,53
AgNPs- SabI	27,13 ± 1,25

De acordo com Arruda et al. (2015) as análises estatísticas de caracterização das AgNPs, não são realizadas devido a certas limitações, como a necessidade de várias repetições, para que possa ser representativa, o que não é possível, em razão do alto custo das técnicas empregadas.

Na etapa II, a AgNPs-FI foi selecionada como promissora por apresentar bons resultados de caracterização e ação antimicrobiana. Durán et al. (2010) citaram que a caracterização das nanopartículas é importante para verificar as propriedades e entender a interação do mecanismo entre a ação das AgNPs sobre os micro-organismos.

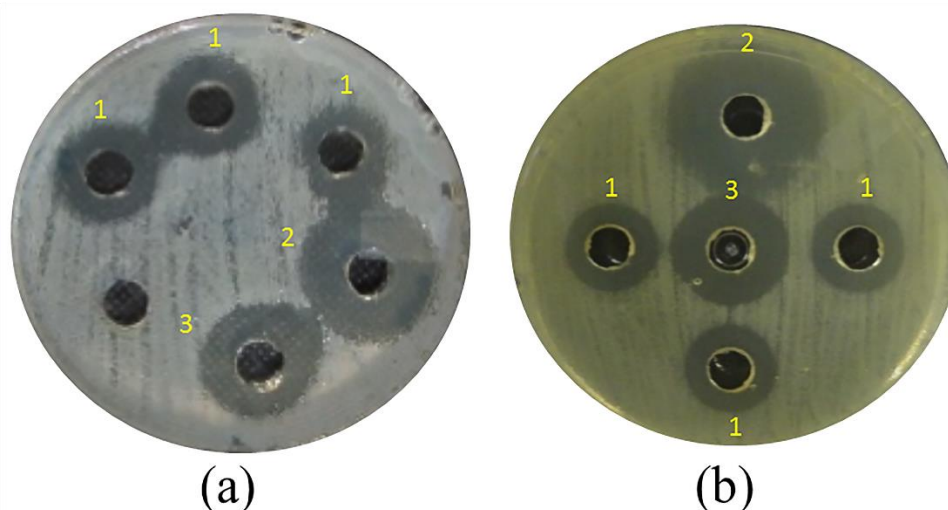
### 5.3 ETAPA III – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA NANOPARTÍCULA PROMISSORA OBTIDA PELO MÉTODO DE INFUSÃO

#### 5.3.1 Determinação pelo Método de Difusão em Ágar

A concentração da atividade inibidora da AgNPs-FI foi também determinada pelo método de difusão em ágar frente às bactérias Gram-positiva (*S. aureus*) e Gram-negativa (*E. coli*). Os valores dos diâmetros das zonas de inibição média da AgNPs-FI na concentração de  $17,58 \pm 1,67 \text{ mg.L}^{-1}$  são ilustrados na Tabela 20 e evidenciados na Figura 24. Os resultados demonstraram as zonas de inibição de  $19 \pm 0,0 \text{ mm}$  para *S. aureus* e  $17 \pm 0,0 \text{ mm}$  para *E. coli*. Foi observada maior atividade para *S. aureus* utilizando a técnica de difusão em ágar.

**Tabela 20.** Atividade antimicrobiana da AgNPs promissora determinada pela técnica de difusão em ágar

Microorganismos	Zona de Inibição (mm) (10 $\mu\text{L}$ )		
	Cloranfenicol (10 $\text{mg.L}^{-1}$ )	AgNO <sub>3</sub> (1 mM)	AgNPs-FI (17,23 $\text{mg.L}^{-1}$ )
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	27 $\pm$ 1,5	21 $\pm$ 1,0	19 $\pm$ 0,0
<i>Escherichia coli</i> (CBAM 0001)	29 $\pm$ 1,5	22 $\pm$ 1,0	17 $\pm$ 0,0

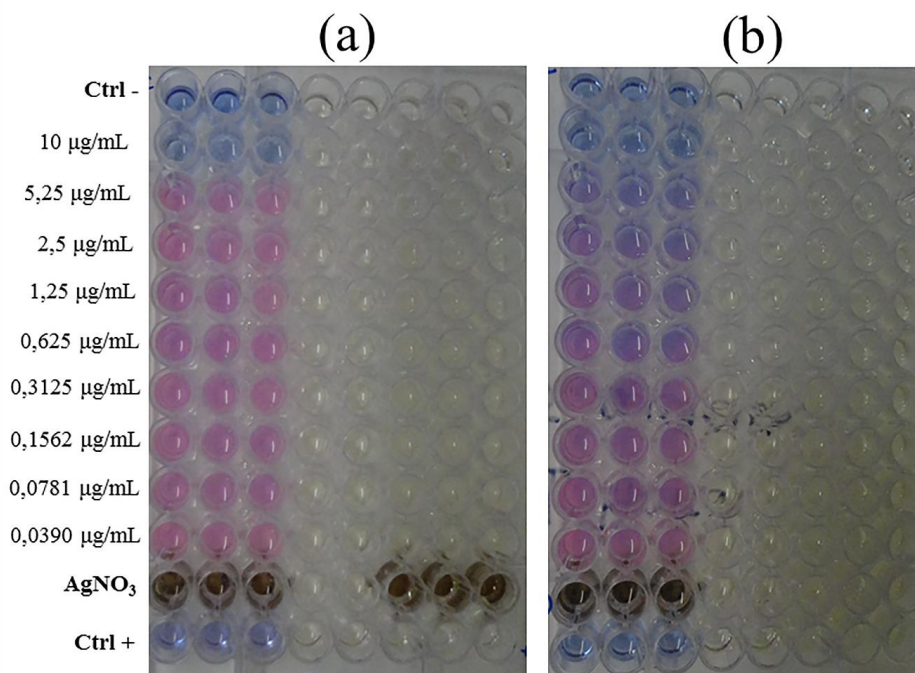


**Figura 24.** Zona de inibição da AgNPs promissora (AgNPs-FI) após 24 horas frente às bactérias *Staphylococcus aureus* (a) e *Escherichia coli* (b). AgNPs-FI (1), Controle positivo: Cloranfenicol (2), Padrão: AgNO<sub>3</sub> (3)

Não foram encontrados na literatura trabalhos de avaliação de atividade antimicrobiana determinada pela técnica de difusão em ágar, que investigaram a concentração de AgNPs biossintetizadas com as mesmas condições e técnicas experimentais utilizadas neste trabalho. Por outro lado, foram encontrados trabalhos com AgNPs biossintetizadas pelo método de decocção, utilizando a mesma técnica empregada, porém sem informar a concentração das AgNPs necessárias para formar o halo de inibição. No entanto, relataram atividade positiva contra *S. aureus* das AgNPs obtidas de *M. piperita* (MUBARAKALI, et al., 2011) e *M. oloifera* (PRASAD et al., 2011); e contra *E. coli* das AgNPs obtidas de *M. piperita* (MUBARAKALI et al., 2011).

### 5.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM é definida como a menor concentração da droga ou antibiótico que inibe o crescimento de um organismo (PAREDES et al., 2014). Os valores da CIM da AgNPs-FI que inibiram o crescimento bacteriano corresponderam a 10 µg/mL contra *S. aureus*; e de 0,625 µg/mL contra *E. coli* (Figura 25-a e 25-b).



**Figura 25.** Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da AgNPs promissora (AgNPs-FI) após 24 horas frente às bactérias (a) *Staphylococcus aureus* e (b) *Escherichia coli*

Não foram encontrados na literatura trabalhos que demonstrassem o valor da CIM de AgNPs biossintetizadas com o pó da folha, utilizando as condições e técnicas experimentais realizadas no presente estudo. No entanto, a literatura reporta a CIM de AgNPs biossintetizada com extrato do pó de plantas determinadas por outras técnicas. Muthukrishnan et al. (2015), encontraram a CIM para *S. aureus* de 50 µg/mL (11 mm), e para *E. coli* 100 µg/mL (10 mm). E Jeeva et al. (2014) de 125 µg/ml para *S. aureus* (11 mm) e para *E. coli* (9,6 mm) utilizando a técnica de disco de difusão em ágar.

Foi observado que a CIM determinada, no presente estudo pela técnica de microdiluição em microplaca, revelada com Alamar Blue (MABA), foi mais baixa, quando comparada com outras técnicas.

Nascimento et al. (2007), citaram que os métodos de atividade antimicrobiana determinados por diferentes técnicas, não são necessariamente comparáveis, por exemplo, o método de diluição disponibiliza dados quantitativos, enquanto que o de difusão constitui qualitativo. Os resultados obtidos podem diferir devido a fatores intrínsecos aos testes como condições de cultivo relacionados ao tempo de incubação, temperatura, meio de cultura, concentração das substâncias testadas, dispersão entre outros.

A CIM de AgNPs biossintetizada com planta da família Lauraceae, foi encontrado apenas o trabalho de Sathishkumar et al. (2009), que determinaram a CIM de 50 mg.L<sup>-1</sup>, pela técnica de densidade ótica em espectrofotômetro contra a cepa bacteriana de *E. coli* utilizando

AgNPs biossintetizada com o extrato do pó da casca de *Cinnamon zeylanicum* obtida pelo método de decocção. Vale ressaltar que os autores encontraram similaridade da CIM com AgNPs biossintetizada com extrato da raiz de *Curcuma longa* pertencente a família Zingiberaceae (SATHISHKUMAR; SNEHA; YUN, 2010).

A atividade antimicrobiana da AgNPs-FI pode ser atribuída às suas características apresentadas pelo TEM, que revelaram maior população de AgNPs com diâmetro de  $57,0 \pm 7$  nm, e diferentes formas, com destaque para a triangular-truncada, que já possui atividade antimicrobiana comprovada.

Pal et al. (2007) investigaram as interações das AgNPs com diferentes formas contra a bactéria Gram-negativa *E. coli* e seus resultados mostraram que nanopartículas de forma triangulares “truncadas” apresentaram forte ação quando comparadas com nanopartículas de formas esféricas e de hastes. As nanopartículas geometricamente triangulares, que possuem muitos vértices e arestas, apresentam maior capacidade em danificar as células alvo (HUANG et al., 2007; JEEVA et al., 2014).

Outros autores atribuem o efeito antibacteriano ao tamanho das AgNPs. Quanto menor o diâmetro maior sua ação contra os micro-organismos, devido à facilidade de penetração nas células (HUANG et al., 2007; KUMAR; PALANICHAMY; ROOPAN, 2014).

No estudo da CIM, foi observado que a AgNPs-FI foi mais ativa contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*. Esses resultados, estão de acordo com os trabalhos reportados na literatura, utilizando AgNPs biossintetizadas pelo método de decocção com os extratos do pó das folhas de *Mentha piperita* (MUBARAKALI, et al., 2011) e folhas cortadas de *Lantana camara* (SINGH et al., 2015). E de AgNPs biossintetizadas pelo método a frio com o pó das folhas de *Caesalpinia coriaria* (JEEVA et al., 2014).

As bactérias Gram-negativas possuem parede celular delgada, e são mais suscetíveis a ação das nanopartículas sintetizadas por vegetais, em comparação com as bactérias Gram-positivas como *S. aureus* que possuem parede celular espessa (SATHISHKUMAR et al., 2009; RAMAR et al., 2015).

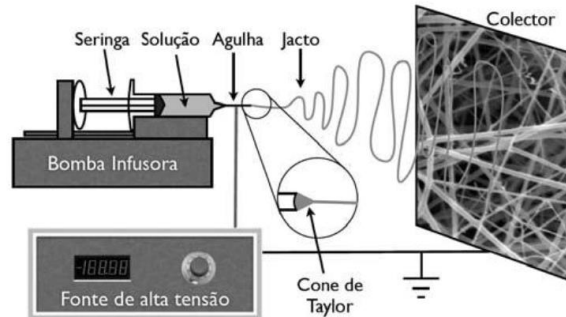
Diferentes mecanismos têm sido propostos para explicar a elevada atividade bactericida de AgNPs. A grande área de superfície das nanopartículas proporciona um maior contato com os micro-organismos. As AgNPs atuam como reservatórios para o agente bactericida  $Ag^+$  e têm a capacidade de se fixar na superfície da célula de carga negativa, alterando as propriedades físicas e químicas das membranas celulares. Além de perturbar funções importantes, como permeabilidade, osmoregulação, transporte de elétrons e respiração (MARAMBIO-JONES et al., 2010).

## CONCLUSÕES

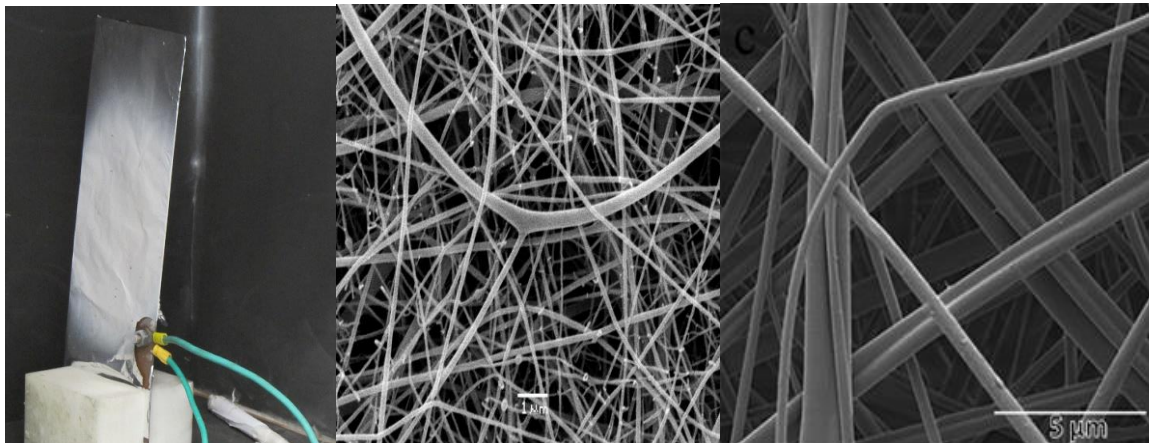
- O presente estudo confirmou a formação de AgNPs, utilizando o extrato aquoso de *L. puchury-major* das estruturas anatômicas da folha, galho, cúpula e sementes;
- O método de extração por infusão foi o mais eficiente na biossíntese de AgNPs e na ação antimicrobiana;
- A AgNPs-FI foi mais ativa contra *E. coli*;
- As morfologias das AgNPs-FI, AgNPs-CI, AgNPs-SI e AgNPs-SabI apresentadas pelo TEM apresentaram diferentes formas como triangular, triangular truncado e pseudo-esférica;
- As AgNPs não apresentaram consideráveis diferenças de diâmetros:  $57,0 \pm 7$  nm (AgNPs-FI),  $60 \pm 14$  nm (AgNPs-CI),  $56 \pm 13$  nm (AgNPs-SI) e  $60 \pm 18$  nm (AgNPs-SabI);
- O diâmetro da camada em torno das AgNPs, foi aumentando proporcionalmente com a quantidade de proteína presente nos extratos;
- Os íons moleculares em  $m/z$  192 e 458 foram evidenciados em todos os extratos;
- A ausência íons moleculares em  $m/z$  153, 282, 502 nos extratos da raiz e da casca podem ter sido os responsáveis pela não formação e desestabilização das nanopartículas, respectivamente. Possivelmente não apresentam substâncias fenólicas;
- Os íons moleculares em  $m/z$  326 e 328 nos extratos das folhas sugerem a presença de licarina A, Ferrearin B e C;
- Somente a presença dos fenólicos totais e flavonoides totais não são atributos suficientes para redução da prata, e por conseguinte, formação das AgNPs;
- A proteína pode ser a responsável pela estabilização das AgNPs formadas;
- O tempo de redução da prata variou de 1 hora para AgNPs-SI e AgNPs-SabI. E de 16 horas para as AgNPs-CI, AgNPs-GI e AgNPs-FI.

## PERSPECTIVAS

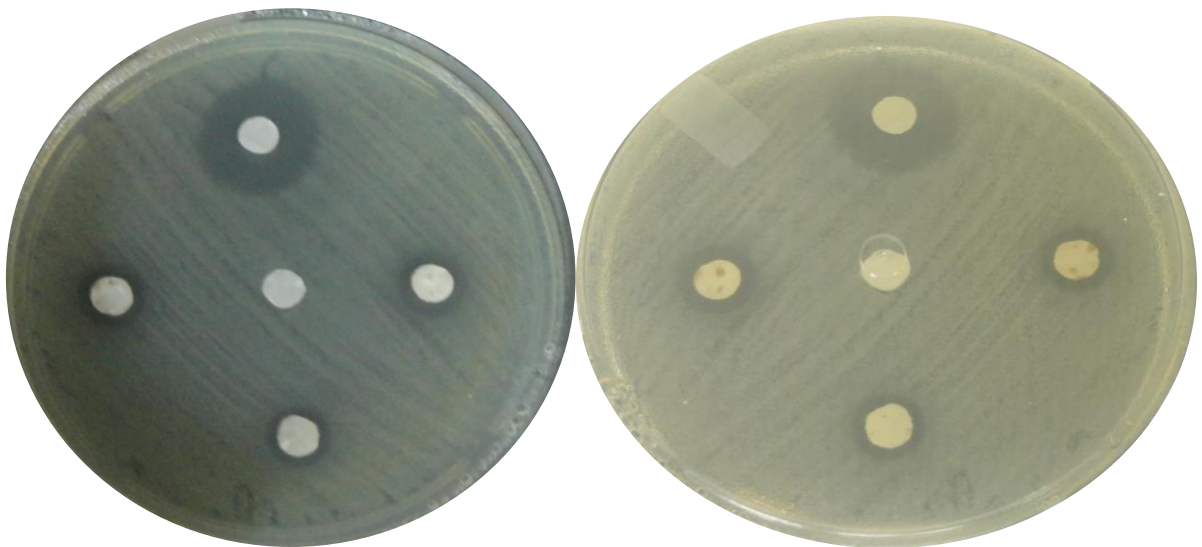
**Produto de Invenção:** Nanofibra antimicrobiana eletrofiada com AgNPs biossintetizada com o extrato aquoso das folhas de *L. puchury-major* e Acetato de Celulose.



Representação esquemática da montagem típica na técnica de eletrofição  
Fonte: Franco et al., 2009



**Figura.** Nanofibra eletrofiada com nanopartículas de prata biossintetizada com extrato aquoso das folhas de *Licaria puchury-major* e Acetato de Celulose (CA-AgNPs-FI)



**Figura.** Avaliação da atividade antimicrobiana da nanofibra eletrofiada com nanopartículas de prata biossintetizada com o extrato aquoso das folhas de *Licaria puchury-major* e Acetato de Celulose (CA-AgNPs-FI) frente às bactérias (a) *Staphylococcus aureus* e (b) *Escherichia coli*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, N.; SHARMA, S.; ALAM, M. K.; SINGHC, V.N.; SHAMSI, MEHTA, S.F.; B.R.; FATMA, A. Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried medicinal plant of basil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, p. 81-86, 2010.
- AHMED, S.; AHMAD, M.; SWAMI, B. L.; IKRAM, S. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 1, p. 17-28, 2016.
- ANDRADE, P. F.; FARIA, A. F.; SILVA, D. S.; BONACIN, J. A.; GONÇALVES, M. C. Structural and morphological investigations of  $\beta$ -cyclodextrin-coated silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 118, p. 289-297, 2014.
- AJITHA, B.; REDDY, Y. A. K.; REDDY, P. S. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Momordica charantia* leaf broth: Evaluation of their innate antimicrobial and catalytic activities. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 146, p. 1-9, 2015.
- AKHTAR, M. S.; PANWAR, J.; YUN, Y. Biogenic Synthesis of Metallic Nanoparticles by Plant Extracts. **ACS (American Chemical Society) Sustainable Chemistry & Engineering**, p. 591-602, 2013.
- ALVES, A. S.; HIDALGO, A. de F.; OLIVEIRA JÚNIOR, A.; SOUZA, B.; TREIN, C.; PIMENTEL, E. C.; PINHEIRO, E. do S. R.; PENA, F.; ALONSO, J. R.; HOLGUÍN, J. M.; UDHE, M. Plantas Mediciniais - Recursos Naturais para o Bem-Estar da Humanidade. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 5, n. 2, 2006.
- ANDRADE, P. F.; FARIA, A. F.; SILVA, D. S.; BONACIN, J. A.; ALVES, M. C. G. Structural and morphological investigations of  $\beta$ -cyclodextrin-coated silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.118, p. 289-297, 2014.
- ARRUDA, S. C. C.; SILVA, A. L. D.; GALAZZI, R. M.; AZEVEDO, R. A.; ARRUDA, M. A. Z. Nanoparticles applied to plant science: A review. **Talanta**, v. 131, p. 693-705, 2015.
- ASTRUC, D. M. C., "Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis and Nanotechnology". **Chemical Reviews**, v. 104, p. 293-346, 2004.
- AWWAD, A. M.; SALEM, N. M.; ABDEEN A. O. Green synthesis of silver nanoparticles using carob leaf extract and its antibacterial activity. **International Journal of Industrial Chemistry**, v. 4, p. 29, 2013.
- BAGHIZADEH, A.; RANJBAR, S.; GUPTA, V. K.; ASIF, M.; POURSEYEDI, S.; KARIMI, M. J.; MOHAMMADINEJAD, R. Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Calendula officinalis* in liquid phase. **Journal of Molecular Liquids**, v. 207, p. 159-163, 2015.



BAHAJI, A.; LI, J.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, Á. M.; BAROJA-FERNÁNDEZ, E.; MUÑOZ, F. J.; OVECKA, M.; ALMAGRO, G.; MONTERO, M.; EZQUER, I.; ETXEBERRIA, E.; POZUETA-ROMERO, J. Starch biosynthesis, its regulation and biotechnological approaches to improve crop yields. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 01, p. 87-106, 2014.

BAGHIZADEH, A.; RANJBAR, S.; GUPTA, V. K.; ASIF, M.; POURSEYEDI, S.; KARIMI, M. J.; MOHAMMADINEJAD, R.. Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Calendula officinalis* in liquid phase. **Journal of Molecular Liquids**, v. 207, p. 159-163, 2015.

BANERJEE, PRIYA; SATAPATHY, M.; MUKHOPAHAYAY, A.; DAS, P. Leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles from widely available Indian plants: synthesis, characterization, antimicrobial property and toxicity analysis. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 1, n. 3, p. 1-10, 2014.

BELTRÃO, J. F. A arte de curar dos profissionais de saúde popular em tempo de cólera: Grão-Pará do século XIX. **História, Ciências, Saúde, Manguinhos**, v. 6 (VI), p. 833-66, 2000.

BELTRÃO, J. F. A arte de curar em tempo de cólera ou o uso da homeopatia durante o flagelo - Grão-Pará, século XIX. **Revista da Sociedade Brasileira de História da Ciência**, v. 18, p. 17-38, 1997.

BELTRÃO, J.F. **Cólera, flagelo da Belém do Grão-Pará**. 1999. 112 p. Tese de doutorado (Departamento de História do Instituto de Filosofia e Ciências Humanas) - Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP –SP.

BERG, V. D., M. E. **Plantas medicinais na Amazônia - Contribuição ao seu conhecimento sistemático**. CNPq. Trop. Úmido/ MPEG. Belém-PA, 1993.

BERG, V. D. **Contribuição ao conhecimento da flora medicinal do Maranhão**. Na 1 sip. Tropical Úmido, Maranhão. EMBRAPA/CPATU, 2, 1986.

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.

BORASE, H. P.; SALUNKE, B. K.; SALUNKHE, R. B.; PATIL, C. D.; HALLSWORTH, J. E., KIM, B. S.; PATIL, S. V. Plant Extract: A Promising Biomatrix for Ecofriendly Controlled Synthesis of Silver Nanoparticles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, p. 1-29, 2014.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CARBONEZI, C. A.; LOPES, M. N.; SILVA, D. H. S.; ARAÚJO, Â. R.; BOLZANI, V. S. Derivado Cinamófico com Atividade no Reparo de DNA e outras Substâncias de *Cinnamomum australe* (Lauraceae). **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 196-198, 2004.

CARLINI, E. A.; OLIVEIRA, A. B.; OLIVEIRA, G. G. Psychopharmacological effects of the essential oil fraction and of the hydrolate obtained from the seeds of *Licaria- puckury-major*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 8, p. 225-236, 1983.

CAMARGO, M. J.; MIRANDA, M. L. D.; KAGAMIDA, C. M.; RODRIGUES, E. D.; GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S. Sesquiterpenos de *Ocotea lancifolia* (Lauraceae). **Quimica Nova**, v. 36, n. 7, p. 1008-1013, 2013.

CHANG, S.; CHEN, K.; HUA, Q.; MA, Y.; HUANG, W. Evidence for the growth mechanisms of silver nanocubes and nanowires. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, p. 7979-7986, 2011.

CHANDRAN, S. P.; CHAUDHARY, M.; PASRICHA, R.; AHMAD, A.; AND SASTRY, M. Synthesis of Gold Nanotriangles and Silver Nanoparticles Using *Aloe Wera* Plant Extract. **Biotechnology Progress** v. 22, n. 2, 2006.

COLLINS, L. A.; FRANZBLAU, S. G., Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for High-Throughput Screening of Compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 1004-1009, 1997.

COE TEIXEIRA, B. **Lauráceas do gênero Ocotea do Estado de São Paulo**. Rio de Janeiro: Rodriguésia, n. 52, Rio de Janeiro, 1980.

CREIGHTON, J. A.; EADON, D. G. Ultraviolet-visible absorption spectra of the colloidal metallic elements. **Journal of the Chemical Society**, p. 3881-3891, 1991.

CRONQUIST, A. **Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

CRUZ, D.; FALÉ, P. L.; MOURATO, A.; VAZ, P. D.; SERRALHEIRO, M. L.; LINO, A. R. L. Preparation and physicochemical characterization of Ag nanoparticles biosynthesized by *Lippia citriodora* (Lemon Verbena). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, p. 67-73, 2010.

DALPOZZO, R. Magnetic nanoparticle supports for asymmetric Catalysts. **Green Chemistry**, v. 287, p. 137-156, 2015.

DHAS, S. P.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Synergistic effect of biogenic silver nanocolloid in combination with antibiotics: a potent therapeutic agent. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 1, p. 292-295, 2013.

DIAS, M. I.; BARROS, L.; M. OLIVEIRA, B. P. P.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I. L. C. F. R. Phenolic profile and antioxidant properties of commercial and wild *Fragaria vesca* L. roots: A comparison between hydromethanolic and aqueous extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 125-132, 2015.

DING Q.; SUN W.; CHEN Y.; ZHOU J.; LIU C. Synthesis and in vitro antineoplastic evaluation of silver nanoparticles mediated by *Agrimoniae herba* extract. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1871-1882, 2014.

DUBEY S.; LAHTINEN, M.; SILLANPA, 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, p. 34-41, 2010.

DUKE, J. A. On tropical the sedling, systems and systematics. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 56, n. 2, p. 125-161, 1947.

DURÁN, N.; MARCATO, P.; CONTI, R.; ALVES, O., L.; COSTA, F. T. M.; BROCCIB, M. Potential Use of Silver Nanoparticles on Pathogenic Bacteria, their Toxicity and Possible Mechanisms of Action. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 6, p. 949-959, 2010.

DURÁN, N.; MARCATO, P. D.; ALVES, O. L.; SOUZA, G. I. H.; ESPOSITO, E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of Nanobiotechnology**, v.3, n. 8, 2005.

ELAVAZHAGAN, T.; ARUNACHALAM, K. D. *Memecylon edule* leaf extract mediated green synthesis of silver and gold nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 1265-1278, 2011.

ELUMALAI, E. K.; PRASAD, T. N. V. K. V.; HEMACHANDRAN, J.; VIVIYAN THERASA, S.; THIRUMALAI, T.; DAVID, E. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using leaves of *Euphorbia hirta* and their antibacterial activities. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 9, p. 549-554, 2010.

ERENO, D. 2014. Nanopartículas verdes <<http://revistapesquisa.fapesp.br>> Acesso em: 21 agosto de 2015.

FENNEL, E. D.; WENNERSTROM, H. **The colloidal domain: where physics, chemistry, biology and technology meet**. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 1999.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A Fitoterapia no mundo atual. **Quimica Nova**, v. 33, n. 9, p. 1829, 2010.

FUNASAKI, M.; LORDELLO, A. L. L.; VIANA, A. M.; SANTA-CATARINA, C.; FLOH, E. I. S.; YOSHIDA, M.; KATO, M. J. Neolignans and Sesquiterpenes from Leaves and Embryogenic Cultures of *Ocotea catharinensis* (Lauraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 5, p. 853-859, 2009.

GADE, A; INGLE, A; WHITELEY, C; RAI, M. Mycogenic metal nanoparticles: progress and applications. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 5, p. 593-600, 2010.

GARDEA-TORRESDEY, J. L.; GOMEZ, E.; PERALTA-VIDEA, J. R.; PARSONS, J. G.; TROIANI, H.; JOSE-YACAMAN, M. **Langmuir**, v. 19, p. 1357-1361, 2003.

GANGADHARAN, D., HARSHVARDAN, K., GNANASEKAR, G., DIXIT, D., POPAT, K.M., ANAND, P.S. Polymeric microspheres containing silver nanoparticles as a bactericidalagent for water disinfection. **Water Research**, v. 44, p. 5481- 5548. 2010.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOTTLIEB, O. R. **Estudo do óleo essencial da fava do puxuri**. Rio de Janeiro: Boletim do Instituto de Química Agrícola, n. 43, p. 14-23, 1956.

GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M. **Natural Product of Wood Plants**. Berlin: Rowe, J. W., ed. Springer-Verlag, p. 439-511, 1989.

GRAÇA, R. R. **Avaliação da atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de espécies Amazônica *Licaria puchury-major* (MART.) KOSTERM.** 2010. 146 p. Dissertação de Mestrado (Biotecnologia e Recursos Naturais) - Universidade do Estado do Amazonas-UEA, Manaus-AM.

GRAÇA, R.R. **Puxuri uma potencialidade do município de Borba**. 2003. 50 p. Monografia (Tecnologia Florestal) - Universidade de Tecnologia da Amazônia-UTAM. Manaus-AM.

GRILLO, R.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Engineered nanoparticles and organic matter: A review of the state-of-the-art. **Chemosphere**, v. 119, p. 608-619, 2015.

GUDADHE, J. A.; YADAV, A.; GADE, A.; MARCATO, P. D.; DURÁN N.; RAI, M. Preparation of an Agar-Silver Nanoparticles (A-Agnp) Film for Increasing the Shelf-Life of Fruits. **The Institution of Engineering and Technology**, 2013.

GUPTA, I. R.; ANDERSON, A. J.; RAI, M. Toxicity of fungal-generated silver nanoparticles to soil-inhabiting *Pseudomonas putida* KT2440, a rhizospheric bacterium responsible for plant protection and bioremediation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 286, p. 48-54, 2015.

HEBBALALU, D.; LALLEY, J.; NADAGOUDA, M. N.; VARMA, R. S. Greener Techniques for the Synthesis of Silver Nanoparticles Using Plant Extracts, Enzymes, Bacteria, Biodegradable Polymers, and Microwaves. **ACS (American Chemical Society) Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 1, p. 703-712, 2013.

HERRERA, M.L.; HARTEL, R.W. Effect of Processing Conditions on Crystallization Kinetics of a Milk Fat Model System. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 77, p. 1177-1187, 2000.

HIMEJIMA, M.; KUBO, I. Antimicrobial agents from *licaria puchuri-major* and their synergistic effect with polygodial, **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 5, p. 620-625, 1992.

HUANG, J.; LIN, L.; LI, Q.; SUN, D.; WANG, Y.; LU, Y.; HE, N.; YANG, K.; YANG, X.; WANG, H.; WANG, W.; LIN, W. Continuous-Flow Biosynthesis of Silver Nanoparticles by Lixivium of Sundried *Cinnamomum camphora* Leaf in Tubular Microreactors. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 47, p. 6081-6090, 2008.

HUANG, J.; LI, Q.; SUN, D.; LU, Y.; SU, Y.; YANG, X.; WANG, H.; WANG, Y.; SHAO, W.; HE, N. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. **Nanotechnology**, v. 18, n. 11, p. 105-104, 2007.

IBRAHIM, H. M. M. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *banana peel* extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. **Journal of radiation Research and applied Science**, v. 08, n. 03, p. 265-275, 2015.

JANA, N. R.; SAL, T. K.; PAL, T. Growing small silver particle as redox catalyst. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 1, p. 115-121, 1999.

JEEVA, K.; THIYAGARAJAN, M.; ELANGO VAN, V.; GEETHA, N.; VENKATACHALAM, P. *Caesalpinia coriaria* leaf extracts mediated biosynthesis of metallic silver nanoparticles and their antibacterial activity against clinically isolated pathogens. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 714-720, 2014.

JUNG, C. Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to study structural properties of cytochromes P450 (CYPs). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 392, n. 6, p. 1031-1058, 2008.

KARUPPIAH, M.; RAJMOHAN, R. Green synthesis of silver nanoparticles using *Ixora coccinea* leaves extract. **Materials Letters**, v. 97, p. 141-143, 2013.

KASTHURI, J.; VEERAPANDIAN, S.; RAJENDIRAN, N. Biological synthesis of silver and gold nanoparticles using apiin as reducing agente. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 68, p. 55-60, 2009.

KATHIRAVAN, V.; RAVI, S.; ASHOKKUMAR, S.; S. VELMURUGAN; ELUMALAI, K.; KHATIWADA, C. P. Green synthesis of silver nanoparticles using *Croton sparsiflorus morong* leaf extract and their antibacterial and antifungal activities. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 139, p. 200-205, 2015.

KHADRI, H.; ALZOHAIKY, M.; JANARDHAN, A.; PRAVEEN KUMA, A., NARASIMHA, G. Green Synthesis of Silver Nanoparticles with High Fungicidal Activity from Olive Seed Extract. **Advances in Nanoparticles**, v. 2, p. 241-246, 2013.

KIM, Y.; ZHANG, D.; YANG, D. Biosynthesis and biotechnological production of ginsenosides. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 06, p. 717-735, 2015.

KONJARI, R. S.; JACOB, A. A.; RAMALINGAM, J, S., C.; ETHIRAJ, A. S. Investigation of biogenic silver nanoparticles green synthesized from *carica papaya*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 3, p. 107-110, 2015.

KOYYATI, R.; NAGATI, V.; MERUGU, R. E MANTHURPADIGYA, P. Biological synthesis of silver nanoparticles using *raphanus sativus var. Longipinnatus* leaf extract and evaluation of their antioxidant and antibacterial activity. **International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 4, 2013.

KRISHNARAJ C.; E. G. JAGAN, S.; RAJASEKAR, P.; SELVAKUMAR, P. T.; KALAICHELVAN, N. MOHAN. Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, p. 50-56, 2010.

KUMAR, D. A.; PALANICHAMY, V.; ROOPAN, S. M. Green synthesis of silver nanoparticles using *Alternanthera dentata* leaf extract at room temperature and their antimicrobial activity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 127, p. 168-171, 2014.

LÊ COINTE, P. **Árvores e Plantas Úteis (indígenas e aclimatas). Amazônia Brasileira**. 2 Ed. São Paulo: Edição Nacional, 506 p. 1947.

LI, D.; ZUOJI, L.; YUAN, Y.; LIU, Y., NIU, F. Green synthesis of gallic acid-coated silver nanoparticles with high antimicrobial activity and low cytotoxicity to normal cells. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 357-366, 2015.

LINSINGER, T. P. J.; ROEBBEN, G.; GILLILAND, D.; CALZOLAI, L; ROSSI, F.; GIBSON, N.; KLEIN, C.. Requirements on measurements for the implementation of the European Commission definition of the term. **European Comission**, p. 1-56, 2012.

LOGESWARI, P.; SILAMBARASAN, S.; JAYANTHI, A. Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 19, p. 311-317, 2015.

LOGESWARI, P.; SILAMBARASAN, S.; ABRAHAM, J. Ecofriendly synthesis of silver nanoparticles from commercially available plant powders and their antibacterial properties. **Scientia Iranica**, v. 20, n. 3, p. 1049-1054, 2013.

LOKINA, S.; NARAYANAN, V. Synthesis of Silver Nanoparticles using Cynodon dactylon Plant Extract and Evaluation of their Antimicrobial Activities and Cytotoxicity. **Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE)**, p. 205-210, 2011. (www.ieee.org)

MAHMOUDI, M.; MENG, J.; XUE, X.; LIANG, X. J.; RAHMAND, M.; PFEIFFER, C.; HARTMANN, R.; PILAR, R. G.; PELAZE, B.; PARAK, W. J.; DEL PINO, P.; CARREGAL-ROMERO, S.; KANARAS, A. G.; SELVAN, S. T. Interaction of stable colloidal nanoparticles with cellular membranes. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 679-692, 2014.

MAIA, J. G. S., Estudo químico de plantas amazônicas: *Eugenia biflora*, *Myrcia citrifolia*, *Licaria puchury-major*, *Licaria macrophylla*, *Licaria áurea*. 1973. 89 p. Tese de Doutorado (Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro.

MAIA, J. G. S.; RAMOS, L.S.; LUZ, A. I. R. Estudo essencial do puxuri por cromatografia de gás / espectrometria de massa (CG/EM). **Acta Amazônia**, v. 15, n. 1-2, p. 179-82, 1985.

MARAMBIO-JONES, C.; HOEK, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 5, p. 1531-1551, 2010.

MARTINEZ-CASTANON, G. A.; NINO-MARTINEZ, N.; MARTINEZ-GUTIERREZ, F. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, n. 8, p. 1343-1348, 2008.

MASKOS, M.; STAUBER, R. H. Characterization of Nanoparticles in Biological Environments, in: Comprehensive. **Biomaterials**, p. 329-339, 2011.

MELATO, A. I. **Deposição electroless em materiais não condutores**. 1997. Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

MELO, A. C.; CARLINI, E. A. Behavioral observations on compounds found in nutmeg. **Psychopharmacologia**, v. 31, p. 349-363, 1973.

MIRI, A.; SARANI, M.; BAZAZ, M.; DARROUDI, M. Plant-mediated biosynthesis of silver nanoparticles using *Prosopis farcta* extract and its antibacterial properties. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 141, p. 287-291, 2015.

MITTAL, A. K.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 02, p. 346-356, 2013.

MO, Y. Y.; TANG, Y.; WANG, S.; LIN, J.; ZHANG, H.; LUO, D. Green synthesis of silver nanoparticles using eucalyptus leaf extract. **Materials Letters**, v. 144, p. 165-167, 2015.

MOHANTY, S.; MISHRA, S.; JENA, P.; JACOB, B.; SARKAR, B.; SONAWANE, A. An investigation on the antibacterial, cytotoxic, and antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 8, n. 6, p. 916-924, 2011.

MONDAL, S.; ROY, N.; LASKAR, R. A.; SK, I.; BASU, S.; MANDAL, D.; BEGUM, N. A. Biogenic synthesis of Ag, Au and bimetallic Au/Ag alloy nanoparticles using aqueous extract of *mahogany* (*Swietenia mahogani* JACQ.) leaves. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, p. 497-504, 2011.

MUBARAKALI, D.; THAJUDDIN, N.; JEGANATHAN, K.; GUNASEKARAN, M. Plant extract mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and its antibacterial activity against clinically isolated pathogens. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, p. 360-365, 2011.

MUTHUKRISHNAN, S.; BHAKYA, S.; SENTHIL KUMAR, T.; RAO, M. V. Biosynthesis, characterization and antibacterial effect of plant-mediated silver nanoparticles using *Ceropegia thwaitesii* – An endemic species. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 119-124, 2015.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JR., A. M.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NIEMEYER, C. M. **Nanobiotechnology**. Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine. 2006.

OLIVEIRA, H. P.; CAVALCANTI, L. S.; CAVALCANTE, N. B.; NASCIMENTO, I. K. S.; PASCHOLATI, S. F.; GUSMÃO, L. F. P.; MACEDO, A. G. C.; COSTA, M. M. Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by the fungus *Curvularia inaequalis*. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 20, p. 2917-2923, 2013.

OSBORNE, T. B. **The vegetable protein**. 2nd. London, In: Longmans, Green and Co., p. 154, 1924.

PACIONI, N. L.; BORSARELLI, C. D.; REY, V.; VEGLIA, A. V. **Synthetic Routes for the Preparation of Silver Nanoparticles**. Ed. Springer International Publishing Switzerland, 2015.

PAI, A. R.; KAVITHA, S.; SHWETA RAJ, S.; PRIYANKA, P.; VRINDA, A.; VIVIN, T. S.; SASIDHARAN, S. Green synthesis and characterizations of silver nanoparticles using fresh leaf extract of *morinda citrifolia* and its anti-microbial activity studies. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 3, p. 459-461, 2015.

PALANIAPPAN, P.; SATHISHKUMAR, G.; SANKAR, R. Fabrication of nano-silver particles using *Cymodocea serrulata* and its cytotoxicity effect against human lung cancer A549 cells line. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 138, p. 885–890, 2015.

PALOMINO, C.; MARTIN, A.; CAMACHO, C.; GUERRA, H; SWINGS, J., PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial agentes and Chemotherapy**, v. 46, p. 2720-2722, 2002.

PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1712-1720, 2007.

PAREDES, D.; ORTIZ, C.; TORRES, R. Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effect of Ag nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1717-1729, 2014.

PATIL, H. B.; BORSE, S. V.; PATIL, D. R.; PATIL, U. K.; PATIL, H. M. Synthesis of Silver Nanoparticles by Microbial Method and Their Characterization. **Archives of Physics Research**, v. 2, n. 3, p. 153-158, 2012.

PATIL, R. S.; MANGESH, R. K.; SANJAY, S. K. Bioinspired synthesis of highly stabilized silver nanoparticles using *Ocimum tenuiflorum* leaf extract and their antibacterial activity. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 91, p. 234-238, 2012.

PHILIP D. *Mangifera Indica* leaf-assisted biosynthesis of well-dispersed silver nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 78, p. 327-331, 2011.

PHILIP, D.; UNNI, C. Extracellular biosynthesis of gold and silver nanoparticles using Krishna tulsi (*Ocimum sanctum*) leaf. **Physica E**, v. 43, p. 1318-1322, 2011.

PHILIP, D.; UNNI, C.; ASWATHY, A. S.; VIDHU, V. K. *Murraya Koenigii* leaf-assisted rapid green synthesis of silver and gold nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v.78, n.2, p.899-904, 2011.

PONARULSELVAM, S.; PANNEERSELVAM, C.; MURUGAN, K.; AARTHI, N.; KALIMUTHU, K.; THANGAMANI, S. Synthesis of silver nanoparticles using leaves of



*Catharanthus roseus* Linn. G. Don and their antiplasmodial activities. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 574-580, 2012.

PRASAD, T. N. V. K. V.; ELUMALAI, E. K. Biofabrication of Ag nanoparticles using *Moringa oleifera* leaf extract and their antimicrobial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 439-442, 2011.

PRASAD, K. S.; PATHAK, D.; PATEL, A.; DALWADI, P.; PRASAD, R.; PATEL, P.; SELVARAJ, K. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using *Nicotiana tobaccum* leaf extract and study of their antibacterial effect. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 41, p. 8122-8130, 2011.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 76-83, 2009.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Current Trends in Phytosynthesis of Metal Nanoparticles. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, p. 277-284, 2008.

RAJAKUMAR, G.; RAHUMAN, A. A. Larvicidal activity of synthesized silver nanoparticles using *Eclipta prostrata* leaf extract against filariasis and malaria vectors. **Acta Tropica**, v. 118, p. 196–203, 2011.

RAJAN, R.; CHANDRAN, K.; HARPER, S. L.; YUN, S.; KALAICHELVAN, P. T. Plant extract synthesized silver nanoparticles: An ongoing source of novel biocompatible materials. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 356-373, 2015.

RAMAR, M; MANIKANDAN, B; RAMAN, T; ARUNAGIRINATHAN, K; PRABHU, N. M.; BASU, M. J.; PERUMAL, M.; PALANISAMY, S.; MUNUSAMY, A. Biosynthesis of silver nanoparticles using ethanolic petals extract of *Rosa indica* and characterization of its antibacterial, anticancer and anti-inflammatory activities. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 138, p. 120-129, 2015.

RAMESH, P. S.; KOKILA, T.; GEETHA, D. Plant mediated green synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles using *Embllica officinalis* fruit extract. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 142, p. 339-343, 2015.

RANI, P. U.; RAJASEKHARREDDY, P. Green synthesis of silver-protein (core-shell) nanoparticles using *Piper betle* L. leaf extract and its ecotoxicological studies on *Daphnia magna*. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 389, p. 188-194, 2011.

RAVEENDRAN, P.; FU J.; WALLEN, S. L. Completely “green” synthesis and stabilization of metal nanoparticles. **Journal American Chemical Society**, v. 125, n. 46, p. 13940-13941, 2003.

RESCAROLLI, C. L. S. **Embriogênese secundária, caracterização bioquímica e histoquímica de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* (mez.) (Lauraceae)**. 2011. 167 p. Dissertação de Mestrado (Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis-SC.

ROURE-BERTRAND, **Fils Bulletin**. Paris, In: Chem. Abs., v. 14, p. 35, 1920.

ROSSI, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 19-34, 2002.

ROY, A.; KALYANI, K.; ANJAN, M.; NANDAN, B. Highly cytotoxic (PA-1), less cytotoxic (A549) and antimicrobial activity of a green synthesized silver nanoparticle using *Mikania cordata* L. **International Journal of Advanced Research**, v. 1, n. 5, p. 193-198, 2013.

SADEGHI, B.; GHOLAMHOSEINPOOR, F. *Ziziphora tenuior* soxle A study on the stability and green synthesis of silver nanoparticles using *Ziziphora tenuior* (Zt) extract at room temperature. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 134, p. 310-315, 2015.

SALEM, W. M.; HARIDY, M.; SAYED, W.F.; HASSAN, N. H. Antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized from latex and leaf extract of *Ficus sycomorus*. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 228-234, 2014.

SAMPATH, M.; ABDUL, A. R.; GOVINDASAMY, R.; THIRUNAVUKKARASU, S.; ARIVARASAN, V.; CHI-DAMBARAM, J.; ASOKAN, B.; ABDUL, A.Z.; GANDHI, E.; CHINNAPERUMAL, K. Evaluation of green synthesized silver nanoparticles against parasites. **Parasitology Research**, v. 108, p. 1541-1549, 2011.

SANTHOSHKUMAR, T.; RAHUMAN, A. A.; RAHUMAN; RAJAKUMAR, G.; MARIMUTHU, S.; BAGAVAN, A.; JAYASEELAN, C.; ZAHIR, A. A.; ELANGO, G.; KAMARAJ, C. Synthesis of silver nanoparticles using *Nelumbo nucifera* leaf extract and its larvicidal activity against malária and *filariasis* vectors. **Parasitology Research**, v. 108, p. 693-702, 2011.

SANTOS-BUELGA, C.; GONZALEZ-MANZANO, S.; DUENAS, M.; GONZALEZ-PARAMAS, A. M. Extraction and isolation of phenolic compounds. **Methods in Molecular Biology**, v. 864, p. 427-464, 2012.

SANTOS, R. M. M.; FIALHO, S. L. Nanopartículas: uma alternativa para a administração de biofármacos. **Biociência**, v. 37, p. 52-59, 2007.

SANTOS, M. D.; BLATT, C. T. T. Teor de flavonoides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. **Brazilian Journal of Botany**, v. 21, n. 2, 1998.

SARKAR, A.; KAPOOR, S.; MUKHERJEE, T. Synthesis of silver nanoprisms in formamide. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 287, p. 496-500, 2005.

SATHISHKUMAR, M.; SNEHA, K.; YUN, Y. Immobilization of silver nanoparticles synthesized using *Curcuma longa* tuber powder and extract on cotton cloth for bactericidal activity. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7958-7965, 2010.

SATHISHKUMAR, G.; GOBINATH, C.; KARPAGAM, K.; HEMAMALINI, V.; PREMKUMAR, K.; SIVARAMAKRISHNAN, S. Phyto-synthesis of silver nanoscale particles using *Morinda citrifolia* L: and its inhibitory activity against human pathogens. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95, p. 235-240, 2012.

SATHISHKUMAR, M.; SNEHA, K.; WON, S. W.; CHO, C. W.; KIM, S.; YUN, Y. S. *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, p. 332-338, 2009.

SAVITHRAMMA, N.; LINGA, R.M.; RUKMINI, K.; SUVARNALATHA, D. P. Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by using medicinal plants. **International Journal of Chem Tech Research**, v. 3, p. 1394, 2011.

SAXENA, A.; TRIPATHI, R. M.; ZAFAR, F.; SINGH, P. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous solution of *Ficus benghalensis* leaf extract and characterization of their antibacterial activity. **Materials Letters**, v. 67, p. 91-94, 2012.

SEABRA, M. L.; MAIA, J. G. S.; REZENDE, A. M.; GOTTLIEB, O. R. Estudo do óleo essencial de “puxuri” por cromatografia gás-líquido. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v. 26, p. 73-78, 1967.

SHAMELI, K.; AHMAD, M. B.; JAFFAR, A. E. A.; IBRAHIM, N. A.; SHABANZADEH, P.; RUSTAIYAN, A.; ABDOLLAHI, Y.; BAGHERI, S.; ABDOLMOHAMMADI, S.; USMAN, M, S.; ZIDAN, M. Green Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Callicarpa Maingayi* Stem Bark Extraction. **Molecules**, v. 17, p. 8506-8517, 2012.

SHANKAR, S. S.; RAI, A.; AHMAD, A.; SASTRY, M. Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core–Ag shell nanoparticles using *Neem* (*Azadirachta indica*) leaf broth. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, 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, 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**, v. 79, p. 254–262, 2011.

SILVA, M. L.; MAIA, J. G. S. Arylpropanoids from *Licaria puchury-major*, **Phytochemistry**, v. 12, p. 471-472, 1973.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, New York, John Wiley & Sons, Inc. 2000.

SINGH, A.; JAIN, D.; KHANDELWAL, M. K.; UPADHYAY, N.; VERMA, H. N. Green synthesis of silver nanoparticles using *Argemone mexicana* leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, n. 2, p. 483-489, 2010.

SINGH, P. K.; BHARDWAJ, A. B.; KIRTI, D.; PARUL, B.; PRABHUNE, A. UV-assisted size sampling and antibacterial screening of *Lantana camara* leaf extract synthesized silver nanoparticles. **RSC (Royal Society of Chemistry) Advances**, v. 5, p. 24513–24520, 2015.

SLEPICKA, P.; KASALKOVA, N. S.; SIEGEL, J.; KOLSKA, Z.; BACAKOVA, L.; SVORCIK, V. Nano-structured and functionalized surfaces for cytocompatibility improvement and bactericidal action. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1120-1129, 2015.

SMITHA, S. L.; PHILIP, D.; GOPCHANDRAN, K. G. Green synthesis of gold nanoparticles using *Cinnamomum zeylanicum* leaf broth. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 74, p. 735–739, 2009.

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**, v.15, n.1, p.71-81, 2002.

SONG, J. Y.; KIM, B. S. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, p. 79-84, 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. 10, n. 33, p. 159-164, 2010.

SONVICO, F.; CAGNANI, A.; ROSSI, A.; MOTTA, S.; DI BARI, M. T.; CAVATORTA, F.; ALONSO, M. J.; DERIU, A.; COLOMBO, P. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 324, p. 67-73, 2006.

SUBRAMANIAN, V.; SUJA, S. Green synthesis of silver nanoparticles using *Coleus amboinicus* lour, antioxidant activity and in vitro cytotoxicity against *Ehrlich's* Ascite carcinoma. **Journal of Pharmacy Research**, 2012.

SUKIRTHA, R.; PRIYANKA, K. M.; ANTONY, J. J.; KAMALAKKANNAN, S.; THANGAM, R.; GUNASEKARAN, P.; KRISHNAN, M.; ACHIRAMAN, S. Cytotoxic effect of Green synthesized silver nanoparticles using *Melia azedarach* against in vitro HeLa cell lines and lymphoma mice model. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 273–279, 2012.

SURESH, G.; GUNASEKAR, P. H.; KOKILA, D.; PRABHU, D.; DINESH, D.; RAVICHANDRAN, N.; RAMESH, B.; KOODALINGAM, A.; SIVA, G. V. Green synthesis of silver nanoparticles using *Delphinium denudatum* root extract exhibits antibacterial and mosquito larvicidal activities. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 127, p. 61-66, 2014.

TAPIERO, H.; TEW, K.D.; NGUYEN, B. G.; MATHE, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies. **Biomed Pharmacother**, v. 56, p. 200-207, 2002.

TRIERWEILER, L. F. **Nanopartículas: como produzi-las em escala industrial**. 2009. 214 p. Tese de Doutorado (Engenharia Química) – Universidade do Rio Grande do Sul – UFRS, Porto Alegre-RS.

UCHIYAMA, T.; TABATA, K.; NOMURA, S.; KANEKO, Y.; FUJIMOTO, Y.; SUZUKI, T. Induction of Apoptosis in Human Leukemia Cell (Jurkat) by Neolignans Isolated from Seeds of *Licaria puchury-major*, **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, p. 1749-1753, 2009.

UDAYASOORIAN, C.; KUMAR, V. K.; JAYABALAKRISHNAN, R. M. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Cassia auriculata*. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 6, n. 1, p. 279-283, 2011.

URBAN, D.; TAKAMURA, K. **Polymer Dispersions and their Industrial Applications**. 2002. 408 p. Wiley-VCH Verlag GmbH e Co.

VANAJA, M.; GURUSAMY, A. *Coleus aromaticus* leaf extract mediated synthesis of silver nanoparticles and its bactericidal activity. **Applied Nanoscience**, v. 3, p. 217–223, 2013.

VEERASAMY, R; XIN, T. Z; GUNASAGARAN S; XIANG T. F. W.; YANG, E. F. C.; JEYAKUMAR, N. Biosynthesis of silver nanoparticles using *mangosteen* leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, p. 113-20, 2011.

VELUSAMY, P.; DAS, J.; PACHAIAPPAN, R.; VASEEHARAN, B.; PANDIAN, K. Greener approach for synthesis of antibacterial silver nanoparticles using aqueous solution on neem gum (*Azadirachta indica L.*). **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 103-109, 2015.

VENGADESH, K.; SUNDARAMOORTHY, G.; SAURABH, G.; KARTHICK, K.; TAMISELVI, N. Production and characterization of antibiotics from soil-isolated actinomycetes. **International Research Journal of Pharmacy (IRJP)**, v. 2, n. 4, p. 114-118, 2011.

VERMA, S M.; ROGOWSKI, J. L.; JONES, L.; GU, F. X. Colorimetric biosensing of pathogens using gold nanoparticles. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 666-680, 2015.

VIEIRA, R. F.; AGOSTIN-COSTA, T.S. **Caracterização Química de Metabólitos Secundários em Germoplasma Vegetal**. Brasília, In: NASS, L.L. p. 343-376, 2007.

VILCHIS-NESTOR, R.; SÁNCHEZ-MENDIETA, V.; CAMACHO-LOPEZ, M. A.; GÓMEZ-ESPINOSA, R. M.; CAMACHO-LÓPEZ, Z. R.; ARENAS, J. A. Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camellia sinensis* extract. **Materials Letters**, v. 62, p. 3103-3105, 2008.

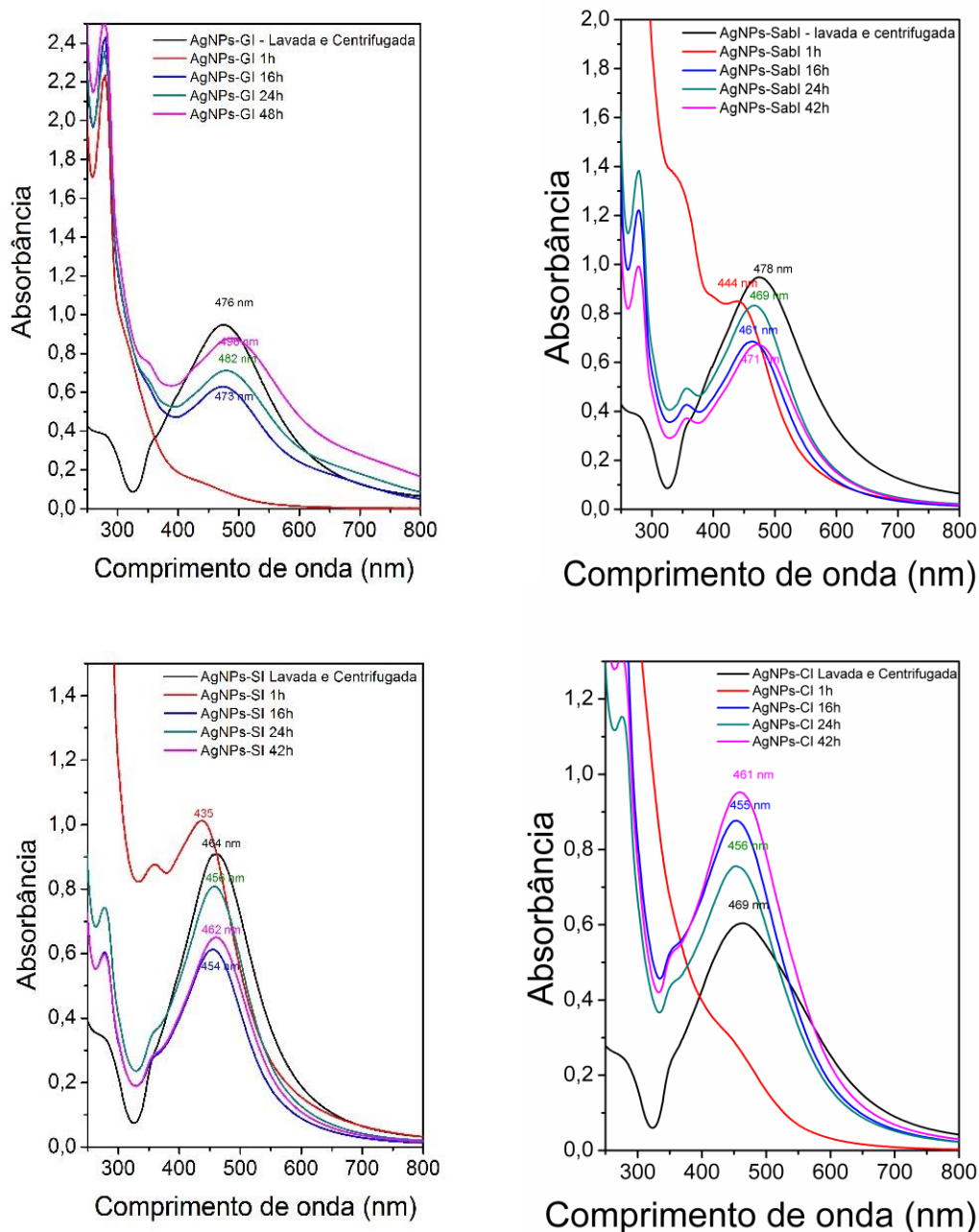
WANG ZL, in: **Characterization of Nanophase Materials**, Ed: Z. L. Wang, Wiley-VCH, Weinheim, cap. 3, p. 37–80, 2000.

WILSON, K.; WALKER. **Principles and Techniques of Practical Biochemistry**. 2000. Cambridge University Press.

**APÊNDICE**

## RESULTADOS NÃO APRESENTADOS

### Espectroscopia na Região do Ultravioleta-visível (UV-vis)



**Figura.** Espectros de UV-vis de nanopartículas de prata obtidas pelo método de infusão: (a) AgNPs-GI; (b) AgNPs- Sabl; (c) AgNPs-SI; (c) AgNPs-CI

### Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

**Tabela.** Análises de DLS – diâmetro, potencial zeta e polidispersividade das nanopartículas de prata

Estruturas Vegetais	DLS		
	Tamanho (d.nm)	Polidispersividade (Pdi)	Potencial Zeta (mV)
AgNPs-FI	40.8	0,280	-30,7
AgNPs-GF	67.00	0,285	-34,3
AgNPs-GI	89.71	0,323	-23,6
AgNPs-SF	93.22	0,177	-23,5
AgNPs-SI	104.2	0,104	-16,9
AgNPs-FD	123	0,243	-27,2

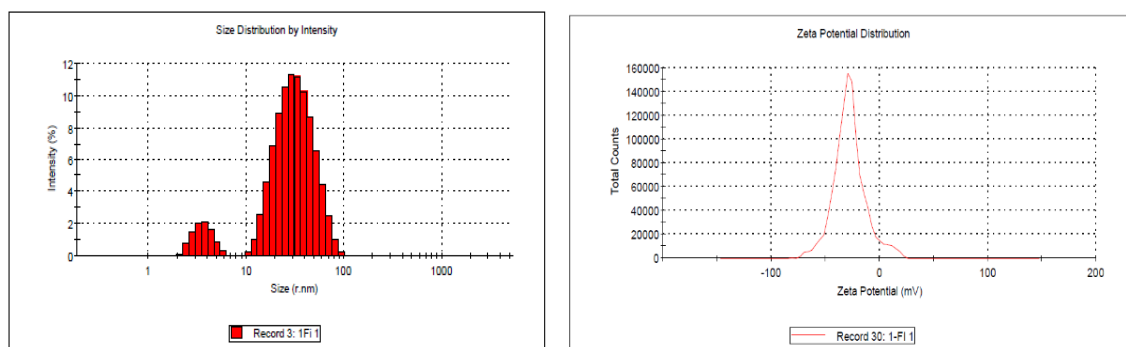
**Tabela.** Análises de DLS – diâmetro, potencial zeta e polidispersividade das nanopartículas de prata – após seis meses

Estruturas Vegetais	DLS		
	Tamanho (d.nm)	Polidispersividade (Pdi)	Potencial Zeta (mV)
AgNPs-FI	65,71	0,278	-27,4
AgNPs-GF	67,48	0,284	-36,7
AgNPs-GI	101,8	0,249	-5,56
AgNPs-SF	115,5	0,164	-3,86
AgNPs-SI	112,6	0,143	-31,5
AgNPs-FD	94,33	0,374	-25,3

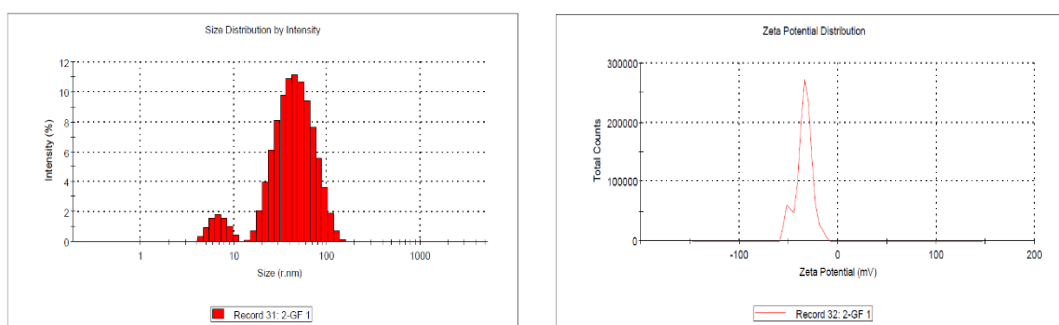


**Tabela.** Análises de DLS – diâmetro, potencial zeta e polidispersividade das nanopartículas de prata – após seis meses de preparação e sistema de lavagem.

Estruturas Vegetais	DLS		
	Tamanho (d.nm)	Polidispersividade (Pdi)	Potencial Zeta (mV)
AgNPs-FI	126,6	0,228	-26,3
AgNPs-GF	183,2	0,239	-24,4
AgNPs-GI	161,9	0,238	-22,1
AgNPs-SF	170,6	0,181	-24,7
AgNPs-SI	223,3	0,303	-24,2
AgNPs-FD	228,0	0,251	-20,4

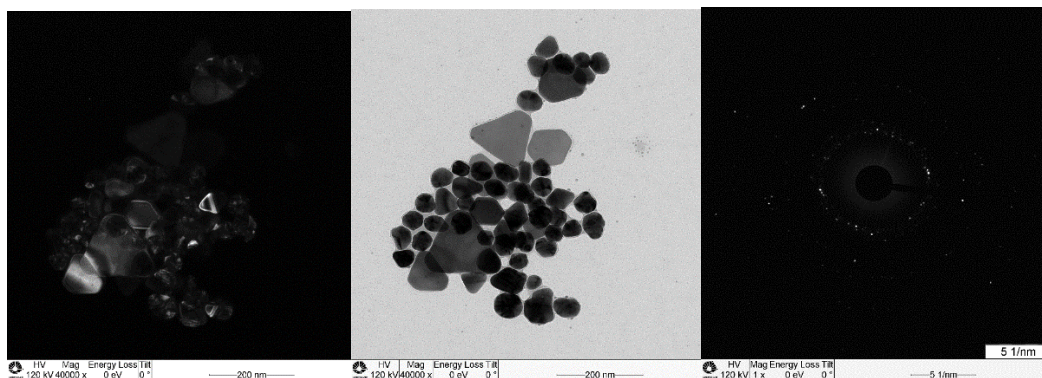


**Figura.** Histogramas das nanopartículas biossintetizada pelo método de infusão - AgNPs-FI (a) distribuição de tamanho (b) medida do Potencial zeta.

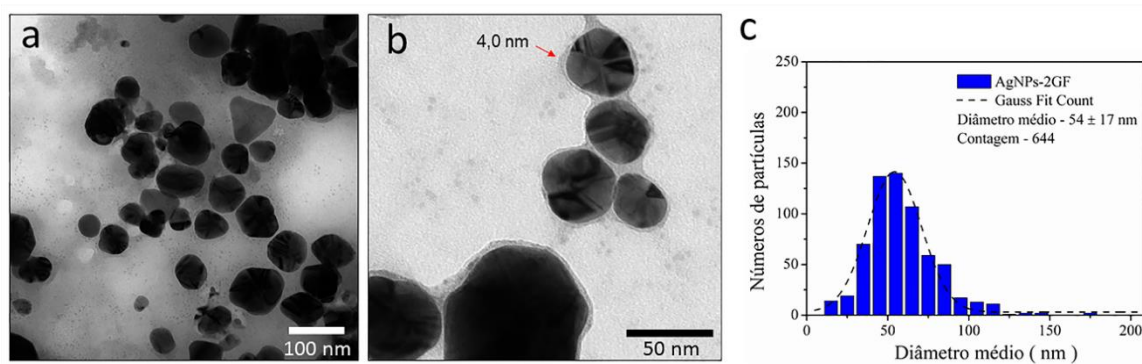


**Figura.** Histogramas das nanopartículas biossintetizada pelo método a frio – AgNPs-GF (a) distribuição de tamanho (b) medida do Potencial zeta

## Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

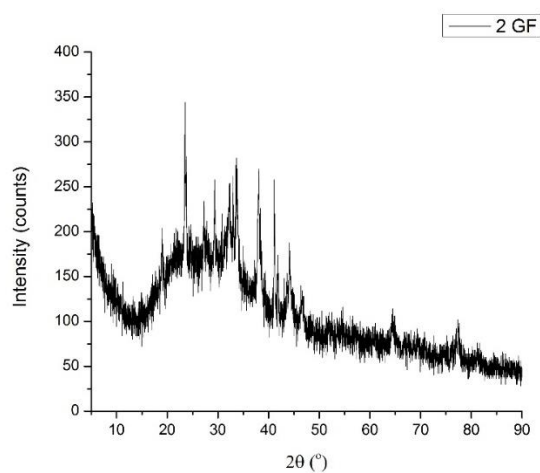


**Figura.** Micrografias das AgNPs-FI: (a) *dark-field* e (b) *bright-field* (c) difratometria



**Figura.** (a e b) Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de prata e (c) histograma da distribuição de tamanho de AgNPs-GF.

### Difração de Raios X (DRX)



**Figura.** Difração de Raio X - AgNPs-GF.

### Antimicrobiano – Técnica de Difusão em ágar

**Tabela.** Atividade antimicrobiana dos extratos aquosos de *L. puchury-major* frente a *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*.

Estruturas vegetais	Método de extração	Micro-organismos testados		
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
Folha	A frio	S	R	R
	Infusão	R	R	R
	Decocção	R	R	R
Galho	A frio	S	R	R
	Infusão	R	R	R
	Decocção	R	R	R
Semente	A frio	S	R	R
	Infusão	R	R	R
	Decocção	R	R	R
Cúpula	A frio	S	R	R
	Infusão	R	R	R
Casca	A frio	S	R	R

Gram-positivos (*S. aureus*), negativos (*E. coli*) e levedura (*C. albicans*). R=Resistente; S= Sensível.

**Tabela 3:** Atividade Antimicrobiana dos Extratos Aquosos e das nanopartículas de *Licaria puchury-major*

Amostras testadas			<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
			Zona de Inibição (mm)		
<b>Folha</b>	Triturado à frio	AgNPs-FF	21±0,6	18±2,9	10±0,0
		Extrato-FF	18±0,0	10±0,0	10±0,0
	Infusão	AgNPs-FI	19±0,0	17±0,0	R
		Extrato-FI	R	R	R
	Decocção	AgNPs-FD	11±0,0	12±0,0	R
		Extrato-FD	R	R	R
<b>Galho</b>	Triturado à frio	AgNPs-GF	19±1,0	17±0,0	10±0,0
		Extrato-GF	18±0,6	10±0,0	10±0,0
	Infusão	AgNPs-GI	22±0,0	12±0,6	R
		Extrato-GI	R	R	R
	Decocção	AgNPs-GD	R	12±0,0	R
		Extrato-GD	R	R	R
<b>Semente</b>	Triturado à frio	AgNPs-SF	23±0,6	15±3,0	10±0,0
		Extrato-SF	15±0,0	10±0,0	10±0,0
	Infusão	AgNPs-SI	10±0,0	12±1,0	R
		Extrato-SI	R	R	R
	Decocção	AgNPs-SD	15±0,0	R	R
		Extrato-SD	R	R	R
<b>Cúpula</b>	Triturado à frio	AgNPs-CF	18±0,0	15±0,0	11±0,0
		Extrato-CF	15±0,0	R	10±0,0
	Infusão	AgNPs-CI	9±1,0	10±1,0	R
		Extrato-CI	R	R	R
<b>Casca</b>	Triturado à frio	AgNPs-Cs-F	20±0,0	R	10±0,0
		Extrato- Cs-F	16±0,6	10±0,0	10±0,0
<b>Controle + (cloranfenicol)</b>			29±1,5	29±1,5	-
<b>Controle + (itraconazol)</b>			-	-	27±2,5
<b>Controle – (AgNO<sub>3</sub>)</b>			22±1,0	22±1,0	22±1,0

R = resistente