

**Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro
com resina de *Virola oleifera* e avaliação do seu
efeito antibacteriano**

Bárbara Altoé Milaneze

Dissertação de Mestrado em Bioquímica e Farmacologia

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Setembro de 2015

Bárbara Altoé Milaneze

Síntese e Caracterização de Nanopartículas de ouro com resina de Virola Oleifera e avaliação do seu efeito antibacteriano

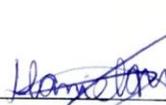
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Farmacologia na área de concentração Farmacologia Bioquímica e Molecular.

Aprovado em 02 de setembro de 2015.

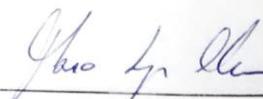
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Marco Cesar C. Guimarães - UFES



Prof.^a Dr.^a Daniela Amorim M. G. do Bem –
Departamento de Ciências Farmacêuticas -
UFES



Prof. Dr. Fábio Lopes Olivares -
UENF/CBB/LBCT

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

M637s Milaneze, Bárbara Altoé, 1990-
Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro com
resina de Virola oleifera e avaliação do seu efeito
antibacteriano/Bárbara Altoé Milaneze– 2015.
94f. : il.

Orientador: Marco Cesar Cunegundes Guimarães.

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

1. Nanopartículas. 2. Nanotecnologia. 3. Anti-infecciosos. 4.
Antioxidantes. I. Guimarães, Marco Cesar
Cunegundes. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro
de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

"Peçam, e será dado; busquem, e encontrarão; batam, e a porta será aberta.
(Mateus 7:7)

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos e amados pais, Sandra e José Antônio, e aos meus tios Maria de Fátima e Ademar, pela oportunidade da vida, dos estudos, da formação, pela base e pelo apoio em toda e qualquer decisão. A memória da minha querida e sempre amada avó Leila que continua a guiar meus passos e a me fazer uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser meu refúgio em todos os momentos desta grande caminhada, por atender às minhas preces, me dar forças, me dar paz e por abençoar a minha vida profissional.

A minha família, pais, irmãs e tios pela base sólida que são e pelo porto seguro.

Ao meu namorado Victor, por ter estado sempre comigo, tanto nos momentos de alegrias, quanto nos de desespero, me apoiando e me dando forças para continuar.

Ao Professor Dr. Marco César Cunegundes Guimarães que me orientou na realização deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica, em especial Wanderson, Ingrid pelo apoio e auxílio na realização de algumas etapas do estudo.

Ao professor Dr. Ricardo pelo apoio nos ensaios microbianos.

Ao professor Dr. André Romero, do IFES, pelas análises de potencial zeta, apoio e orientações.

A professora Dra. Denise pelas amostras de resina de *Virola oleifera*.

Ao IFES pelas análises de EDS;

Ao LabPetro pelas análises de ICP-MS;

Ao Geraldo, aluno de mestrado da Biotecnologia orientado pelo professor Dr. Ricardo, pelo apoio, treinamento, auxílio nos ensaios bacterianos.

Aos técnicos do LUCAR, em especial ao Jairo, pelo apoio, orientação e incentivo no decorrer do trabalho.

Aos colegas da turma de mestrado deste programa de pós-graduação que tão companheiros foram durante o cumprimento dos créditos de disciplinas.

A todos os colegas do Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, o LUCCAR, em especial: Brunelli, Wanderson, Ingrid, Hugo, Afrânio, Jairo, Tadeu, Flávia, Débora, Rayssa, Murilo, Lorryne, e ao professor Dr. Breno, pelo aprendizado, apoio técnico, companheirismo, diversão, convivência, aniversários e comemorações durante todo o tempo do mestrado. Ao longo de 2 anos criamos vínculos que vão muito além de uma simples amizade de laboratório.

A FAPES pela concessão da bolsa de estudos durante o mestrado.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Nanotecnologia	19
1.2 Colóides metálicos - nanopartículas	20
1.2.1 Síntese de nanopartículas	23
1.3 Métodos de Caracterização de Nanopartículas	27
1.3.1 Espectroscopia UV - Visível.....	27
1.3.2 Potencial Zeta.....	28
1.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	30
1.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) - EDS	31
1.3.5 Espectroscopia de Infravermelho (IV).....	31
1.3.6 Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma (ICP-MS).....	32
1.4 Aplicações biológicas	32
1.4.1 Atividade antioxidante.....	32
1.4.2 Potencial Antimicrobiano de Nanopartículas de Ouro	33
1.4.2.1 Microrganismos Gram positivos e Gram negativos.....	33
1.4.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	35
1.4.2.3 <i>Escherichia coli</i>	37
1.4.2.4 Resistência Microbiana.....	38
2 JUSTIFICATIVA	40
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivos Gerais	40
3.2 Objetivos Específicos	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Otimização de síntese de nanopartículas de ouro com resina de <i>Virola oleifera</i>	41
4.1.1 Planejamento fatorial	42
4.2 Síntese das Nanopartículas de Ouro com citrato de sódio	42
4.3 Atividade Antioxidante (DPPH e ABTS⁺)	43
4.4 Caracterização das Nanopartículas	44
4.4.1 Espectroscopia UV - Visível.....	44
4.4.2 Potencial Zeta.....	45

4.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	45
4.4.3.1 Distribuição de Tamanho das Nanopartículas	45
4.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) - EDS	46
4.4.5 Espectroscopia de Infravermelho (IV).....	46
4.4.6 Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma (ICP-MS).....	46
4.5 Avaliação do Potencial Antimicrobiano	46
4.5.1 Teste de esterilidade das AuNP's	46
4.5.2 Cepas Utilizadas	47
4.5.3 Teste de Interação Rápida.....	47
4.5.4 Atividade antibacteriana.....	47
4.5.5 Análise Ultraestrutural da Interação entre AuNP's e as Bactérias	49
5 RESULTADOS.....	50
5.1 Otimização da Síntese Verde	50
5.2 Atividade Antioxidante	53
5.3 Caracterização das AuNp's	55
5.3.1 UV-Vis.....	55
5.3.2 Potencial Zeta.....	56
5.5.3. MET	57
5.5.4 EDS	61
5.5.5 Infravermelho.....	63
5.5.6 ICP-MS	64
5.6 Atividade Antimicrobiana	65
5.6.1 Teste de esterilidade.....	65
5.6.2 Interação Rápida	65
5.6.3 MIC	70
5.6.4 Análise ultraestrutural	75
6 DISCUSSÕES.....	76
7 CONCLUSÕES	83
8 REFERÊNCIAS.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ouro coloidal. (Imagem própria).....	21
Figura 2. Efeito de Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada (RPSL). (Imagem própria).....	22
Figura 3. Principais fatores relacionados às características das nanopartículas (ALBERNAZ, 2014).....	23
Figura 4. Etapas de síntese de nanopartículas metálicas.	25
Figura 5. Formas de estabilização de nanopartículas. A: estabilização eletrostática; B: estabilização estérica (MARANGONI, 2012)	26
Figura 6. Potencia Zeta. Interfaces da nanopartícula. NP: Nanopartícula; PZ: Potencial Zeta. Imagem própria.	29
Figura 7. a - Estrutura celular de Gram positivos; b - Estrutura celular de Gram negativos (CABEEN; JACOBS-WAGNER, 2005).	34
Figura 8. A - Solução de H _{Au} Cl ₄ na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L; B - Solução de resina de <i>Virola oleifera</i> na concentração de 1 g/L.	41
Figura 9. Absorbância solução de ouro na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L.	50
Figura 10. Espectro de Absorbância da solução de resina de <i>Virola oleifera</i> nas concentrações utilizadas nas sínteses	51
Figura 11. UV-Vis AuNP com resina de <i>Virola oleifera</i> . Experimento 1: 10mL de solução de Au na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 1 mL de solução de resina de <i>Virola oleifera</i> na concentração de 1g/L, por 10 minutos; Experimento 2: 10mL de solução de Au na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 1 mL de solução de resina de <i>Virola oleifera</i> na concentração de 1g/L, por 20 minutos; Experimento 3: 10mL de solução de Au na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 1 mL de solução de resina de <i>Virola oleifera</i> na concentração de 1g/L, por 30 minutos; Experimento 4: 10mL de solução de Au na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 2 mL de solução de resina de <i>Virola oleifera</i> na concentração de 1g/L, por 10 minutos; Experimento 5: 10mL de solução de Au na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 2 mL de solução de resina de <i>Virola oleifera</i> na concentração de 1g/L, por 20 minutos; Experimento 6: 10mL de solução de Au na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 2 mL de solução de resina de <i>Virola oleifera</i> na concentração de 1g/L, por 30 minutos; Experimento 7: 10mL de solução de Au na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 3 mL de solução de resina de <i>Virola oleifera</i> na concentração de 1g/L, por 10 minutos; ; Experimento 8: 10mL de solução de Au na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 3 mL de solução de resina de <i>Virola oleifera</i> na concentração de 1g/L, por 20 minutos; ; Experimento 9: 10mL de solução de Au na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 3 mL de solução de resina de <i>Virola oleifera</i> na concentração de 1g/L, por 30 minutos; Solução de resina de <i>Virola oleifera</i> na concentração de síntese utilizada como branco para cada leitura.	52

Figura 12. Gráfico de Superfície Resposta e Gráfico de Pareto do planejamento fatorial 3 ² para AuNP's com resina de <i>Virola oleifera</i> ; p < 0,05.....	53
Figura 13. Atividade Antioxidante (AA%) das AuNP's sintetizadas com resina de <i>Virola oleifera</i> em comparação ao material vegetal puro. Ensaio de ABTS e DPPH.	54
Figura 14. Absorbância das AuNP's sintetizadas com citrato de sódio em comparação às AuNP obtidas pela síntese verde. [AuNP com resina de <i>Virola oleifera</i> 1mL]: Experimento 1 - 10mL de solução de Au na concentração de 2,5 x 10 ⁻⁴ mol/L + 1 mL de solução de resina de <i>Virola oleifera</i> na concentração de 1g/L, por 10 minutos; [AuNP com resina de <i>Virola oleifera</i> 2mL]: Experimento 4 - 10mL de solução de Au na concentração de 2,5 x 10 ⁻⁴ mol/L + 2 mL de solução de resina de <i>Virola oleifera</i> na concentração de 1g/L, por 10 minutos; [AuNP com resina de <i>Virola oleifera</i> 3mL]: Experimento 7 - 10mL de solução de Au na concentração de 2,5 x 10 ⁻⁴ mol/L + 3 mL de solução de resina de <i>Virola oleifera</i> na concentração de 1g/L por 10 minutos; [AuNP com citrato de sódio]: 10mL de solução de Au na concentração de 2,5 x 10 ⁻⁴ mol/L + 1 mL de citrato de sódio a 1%.	55
Figura 15. Ouro coloidal. 1 - AuNP sintetizada com 1mL de solução de resina de <i>Virola oleifera</i> 1g/L; 2 - AuNP sintetizada com 2mL de solução de resina de <i>Virola oleifera</i> 1g/L; 3 - AuNP sintetizada com 3mL de solução de resina de <i>Virola oleifera</i> 1g/L; 4 - AuNP sintetizada com 1 mL de citrato de sódio 1%.....	56
Figura 16. [A]: Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) da amostra 1 (10mL solução de ouro a 2,5 x 10 ⁻⁴ mol/L + 1mL de solução de <i>Virola oleifera</i> a 1g/L, sob agitação de 600 rpm por 10 minutos). [B]: Histograma com distribuição de tamanho das nanopartículas.	57
Figura 17. [A]: Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) da amostra 4 (10mL solução de ouro a 2,5 x 10 ⁻⁴ mol/L + 2mL de solução de <i>Virola oleifera</i> a 1g/L, sob agitação de 600 rpm por 10 minutos). [B]: Histograma com distribuição de tamanho das nanopartículas.	58
Figura 18. [A]: Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) da amostra 7 (10mL solução de ouro a 2,5 x 10 ⁻⁴ mol/L + 3mL de solução de <i>Virola oleifera</i> a 1g/L, sob agitação de 600 rpm por 10 minutos). [B]: Histograma com distribuição de tamanho das nanopartículas.	59
Figura 19. [A]: Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de AuNP's sintetizadas com citrato de sódio. (10mL solução de ouro a 2,5 x 10 ⁻⁴ mol/L + 1 mL de solução de citrato de sódio 10 ⁻³ g/mL , sob agitação de 600 rpm por 10 minutos). [B]: Histograma com distribuição de tamanho das nanopartículas.....	60
Figura 20. EDS AuNP com resina de <i>Virola oleifera</i>	61
Figura 21. EDS AuNP com citrato de sódio.....	62
Figura 22. Espectro de Infravermelho do extrato de <i>Virola oleifera</i> (preto) e das nanopartículas de ouro funcionalizadas com resina de <i>Virola oleifera</i> (azul).	64
Figura 23. Controle: imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão de <i>Staphylococcus aureus</i> sem processamento.	66

Figura 24. Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão em diferentes aumentos, para interação entre <i>Staphylococcus aureus</i> e AuNP's com <i>Virola oleifera</i> , sem processamento.....	67
Figura 25. Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão em diferentes aumentos, para interação entre <i>Staphylococcus aureus</i> e AuNP's com citrato, sem processamento.....	68
Figura 26. Controle: imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão de <i>E. coli</i> , sem processamento.....	69
Figura 27. Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão em diferentes aumentos, para interação entre <i>E. coli</i> e AuNP's com <i>Virola oleifera</i> , sem processamento.....	69
Figura 28. Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão em diferentes aumentos, para interação entre <i>E. coli</i> e AuNP's com citrato de sódio, sem processamento.....	70
Figura 29. Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> . Absorbância referente a taxa de crescimento; [<i>S. aureus</i>]: Crescimento máximo; [AuNP <i>Virola</i> 1mL]: Crescimento de <i>S. aureus</i> frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com 1 mL da solução de resina de <i>Virola oleifera</i> ; [AuNP <i>Virola</i> 2mL]: Crescimento de <i>S. aureus</i> frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com 2 mL da solução de resina de <i>Virola oleifera</i> ; [AuNP <i>Virola</i> 1mL]: Crescimento de <i>S. aureus</i> frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com 2 mL da solução de resina de <i>Virola oleifera</i> ; [AuNP citrato]: Crescimento de <i>S. aureus</i> frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com citrato de sódio.....	71
Figura 30. Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> . Absorbância referente a taxa de crescimento; [<i>S. aureus</i>]: Crescimento máximo; [AuNP <i>Virola</i> 1mL]: Crescimento de <i>S. aureus</i> frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com 1 mL da solução de resina de <i>Virola oleifera</i> . [<i>V. oleifera</i> 1mL]: Crescimento de <i>S. aureus</i> frente solução de resina de <i>Virola oleifera</i> (1mL resina + 10mL de água ultrapura); [AuNP <i>Virola</i> 2mL]: Crescimento de <i>S. aureus</i> frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com 2 mL da solução de resina de <i>Virola oleifera</i> . [<i>V. oleifera</i> 2mL]: Crescimento de <i>S. aureus</i> frente solução de resina de <i>Virola oleifera</i> (2mL resina + 10mL de água ultrapura); [AuNP <i>Virola</i> 3mL]: Crescimento de <i>S. aureus</i> frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com 3 mL da solução de resina de <i>Virola oleifera</i> . [<i>V. oleifera</i> 3mL]: Crescimento de <i>S. aureus</i> frente solução de resina de <i>Virola oleifera</i> (3mL resina + 10mL de água ultrapura);.....	72
Figura 31. Crescimento de <i>E. coli</i> . Absorbância referente a taxa de crescimento do microrganismo; [<i>E. coli</i>]: Crescimento máximo; [AuNP <i>Virola</i> 1mL]: Crescimento de <i>E. coli</i> frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com 1 mL da solução de resina de <i>Virola oleifera</i> ; [AuNP <i>Virola</i> 2mL]: Crescimento de <i>E. coli</i> frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com 2 mL da solução de resina de <i>Virola oleifera</i> ; [AuNP <i>Virola</i> 1mL]: Crescimento de <i>E. coli</i> frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com 2 mL da solução de resina de <i>Virola oleifera</i> ; [AuNP citrato]: Crescimento de <i>E. coli</i> frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com citrato de sódio.....	73

Figura 32. Crescimento de *E. coli*. Absorbância referente a taxa de crescimento do microrganismo; [E. coli]: Crescimento máximo; [AuNP Virola 1mL]: Crescimento de *E. coli* frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com 1 mL da solução de resina de *Virola oleifera*; [V. oleifera 1mL]: Crescimento de *E. coli* frente solução de resina de *Virola oleifera* (1mL resina + 10mL de água ultrapura); ; [AuNP Virola 2mL]: Crescimento de *E. coli* frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com 2 mL da solução de resina de *Virola oleifera*; [V. oleifera 2mL]: Crescimento de *E. coli* frente solução de resina de *Virola oleifera* (2mL resina + 10mL de água ultrapura); ; [AuNP Virola 3mL]: Crescimento de *E. coli* frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com 3 mL da solução de resina de *Virola oleifera*; [V. oleifera 3mL]: Crescimento de *E. coli* frente solução de resina de *Virola oleifera* (3mL resina + 10mL de água ultrapura).74

Figura 33. Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão de *S. aureus* após processamento e utilização de contraste.75

Figura 34. Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão de AuNP *Virola* com *S. aureus*.76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação entre valores de potencial zeta grau de agregação do colóide. Adaptado de: (BRUNELLE, 1980; LU; KESSLER, 2006).....	30
Tabela 2. Planejamento fatorial 3 ² , com três níveis (1, 2 ou 3 mL de agente redutor; 10, 20 ou 30 minutos) e 2 variáveis (tempo de síntese e concentração do agente redutor).....	42
Tabela 3. Nanopartículas testadas nos ensaios bacterianos.....	49
Tabela 4. Concentração Inibitória 50% (IC50) - concentração necessária para inibir em 50% as espécies reativas – de AuNP com resina de <i>Virola oleifera</i> , de <i>Virola oleifera</i> e do padrão Trolox® para ensaios de DPPH e ABTS.....	54
Tabela 5. Estabilidade das nanopartículas com base em valores de potencial zeta.	57
Tabela 7. Concentração de AuNP's (mg/L) por análise de ICP-MS.....	65
Tabela 8. Potencial Antimicrobiano de AuNP's e de solução redutora contra <i>S. aureus</i> . Média dos valores de absorvância com relação ao crescimento de <i>S. aureus</i> frente a diferentes nanopartículas sintetizadas com solução de resina de <i>Virola oleifera</i> e somente com o agente redutor. Desvio padrão da média com relação à absorvância. % de redução com relação ao crescimento 100% de <i>S. aureus</i> . Abs* - Absorvância.	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

ANOVA: Análise de Variância.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

AgNP: Nanopartícula de Prata

AuNP: Nanopartícula de Ouro

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

EDS: Energy Dispersive Spectroscopy

ICP - MS: Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma

IV: Espectroscopia de Infravermelho

L: Litro

LSPR: Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada

MBC: Mínima Concentração Bacteriostática

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MDR: Multi Drogas Resistente

MIC: Mínima Concentração Inibitória

mL: Mililitros

µL: Microlitro

MRSA: *S. aureus* Resistentes à Meticilina

NaCl: Cloreto de sódio

NP: Nanopartícula

NP's: Nanopartículas

OMS: Organização Mundial da Saúde.

PBPs: Proteínas Ligadoras de Penicilina

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

RPSL: Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada

SPR: Ressonância de Plasmon de Superfície

SCCmec: Cassete Cromossômico Estafilocócico mec

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UVV: Universidade de Vila Velha

RESUMO

Introdução: O uso da nanotecnologia vem modificando a forma com que diversos tipos de materiais são utilizados. A síntese coloidal é um método extremamente versátil, de custo relativamente baixo comparado a outros métodos de produção de nanopartículas metálicas (NP's). Seu comportamento está relacionado ao ambiente em que se encontra, estabilidade, composição química, grau de agregação, morfologia e tamanho, e por isso modulações no momento da síntese são determinantes para a atividade biológica. Grande parte das rotas tradicionalmente utilizadas para a produção de nanopartículas metálicas, partem de solventes tóxicos, que acabam dando origem a resíduos nocivos à saúde e ao meio ambiente. Estudos com NP's vêm mostrando que elas têm grande potencial como agentes antimicrobianos, entrega de drogas, dentre outros. O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia sustentável para a síntese de nanopartículas de ouro, utilizando como agente redutor solução de resina de *Virola oleifera*, e posterior avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante. **Métodos:** As nanopartículas de ouro (AuNP's) foram sintetizadas por oxi-redução, com base em um planejamento fatorial 3^2 onde as variáveis foram o tempo e a concentração do agente redutor. A caracterização foi realizada com análises de UV-Vis, Microscopia, Potencial Zeta, ICP-MS e Infravermelho. O potencial antioxidante foi avaliado tanto para a resina quanto para as AuNP's. A atividade antibacteriana foi testada contra *Staphylococcus aureus* 1117 e *Escherichia coli* DH5 α pela técnica de microdiluição em caldo, e a interação rápida por agitação, seguidas de análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão. **Resultados:** A resina de *Virola oleifera* foi capaz de reduzir o ouro de modo tão eficaz quanto o citrato de sódio (agente redutor tradicionalmente utilizado). Dentre as variáveis apenas a concentração do agente redutor foi relevante para determinar as características das nanopartículas. O pico de absorvância ocorreu entre 520 e 540nm. Juntamente com tais dados as imagens de microscopia confirmam a presença de nanopartículas de ouro. A partir da síntese verde as AuNP's tinham formas variadas e potencial zeta mostrou que as AuNP's eram estáveis. As análises de ICP-MS mostraram que a concentração de ouro reduzida com a síntese verde foi maior que com citrato. As nanopartículas de ouro apresentaram potencial antioxidante e foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus* por interação com a membrana. **Conclusões:** A resina de *Virola oleifera* se

mostrou uma ótima alternativa para a síntese de AuNP's, dando origem a partículas com atividade antioxidante, e eficazes na inibição de *S. aureus*.

Palavras – chave: Nanopartículas; Nanotecnologia; potencial antimicrobiano; potencial antioxidante

ABSTRACT

Introduction: The use of nanotechnology is changing the way different types of materials are used. Colloidal synthesis is an extremely versatile method, relatively low cost compared to other methods of production of metal nanoparticles (NP's). Their behavior is related to the environment in which it finds itself, stability, chemical composition, degree of aggregation, morphology and size, so modulations at the time of synthesis are crucial for biological activity. Much of the route traditionally used for the production of metal nanoparticles, start from toxic solvents that end up giving rise to harmful wastes to health and the environment. NP's studies have shown that they have great potential as antimicrobial agents, drug delivery, among others. This study aimed to develop a sustainable methodology for the synthesis of gold nanoparticles using as reducing agent *Virola resin solution oleifera*, and further evaluation of antimicrobial and antioxidant activity. **Methods:** The gold nanoparticles (AUNP's) were synthesized by oxidation-reduction, based on a factorial design 3^2 where variables were time and concentration of reducing agent. The characterization was performed with UV-Vis analysis, microscopy, Zeta potential, ICP-MS and IR. The antioxidant potential was evaluated for both the resin and for the AUNP's. The antibacterial activity was tested against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* DH5 α 1117 by microdilution technique in broth, and rapid interaction by shaking, followed by transmission electron microscopy analyzes. **Results:** The resin *ferrule oleifera* was able to reduce as efficiently as gold sodium citrate (reducing agent used traditionally). Among the varying only the concentration of the reducing agent it was important to determine the characteristics of nanoparticles. The peak absorbance between 520 and 540nm occurred. Together with such the microscopy imaging data confirm the presence of gold nanoparticles. From Green synthesis had the AUNP's various forms and zeta potential showed that AUNP's were stable. The ICP-MS analysis showed that the concentration and reduced with green gold synthesis was

higher than with citrate. The gold nanoparticles had antioxidant potential and were able to inhibit the growth of *S. aureus* by interaction with the membrane.

Conclusions: Ferrule oleifera resin showed an excellent alternative to AUNP's synthesis, yielding particles with antioxidant activity, and effective in the inhibition of *S. aureus*.

Keywords: Nanoparticles; Nanotechnology; Green synthesis; Potential Antimicrobial; Antioxidant potential.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Nanotecnologia

A nanociência pode ser definida como uma área da ciência dedicada ao estudo e a manipulação dos materiais na escala atômica, molecular e macromolecular, que conduzem à construção de estruturas na escala nanométrica, em geral até 100nm, interessantes por possuírem propriedades únicas (MOGHIMI; HUNTER; MURRAY, 2005). A nanotecnologia engloba ainda a compreensão da física fundamental, química, biologia e tecnologia de objetos em escala reduzida (IOP - Science - Nanotechnology, 2014).

Nos últimos anos, grande parte do mundo tem voltado sua atenção para a ciência e tecnologia em nanoescala (DURAN; DE MORAIS; MATTOSO, 2006). O uso da nanotecnologia vem modificando substancialmente a forma como os diversos tipos de materiais são utilizados. Em escala nanométrica os materiais apresentam comportamento distinto de suas conhecidas propriedades físico-químicas em escalas maiores, principalmente no que tange as características mecânicas, biológicas, reatividade química, atividade catalítica, condutividade térmica e absorção óptica (se refere ao comportamento das partículas sob a ação da luz - infravermelho ou ultravioleta) (BOGUNIA-KUBIK; SUGISAKA, 2002; DANIEL; ASTRUC, 2004; IRAVANI, 2011; PANIGRAHI et al., 2004; ZHAROV et al., 2005). Outra característica diretamente relacionada ao tamanho reduzido, é que tal fato faz com que as nanopartículas tenham um aumento na sua área superficial, melhorando sua eficiência, por exemplo na entrega de drogas (MOGHIMI; HUNTER; MURRAY, 2005).

A síntese de nanopartículas metálicas tem atraído diversos pesquisadores pela expectativa de que tais materiais podem trazer benefícios, bem como melhorar a qualidade de vida, já que suas características permitem inúmeras aplicações (GUSZMÁN; DILLE; GODET, 2009).

1.2 Colóides metálicos - nanopartículas

São chamadas de dispersões coloidais, aquelas formadas por duas fases, sendo uma de partículas em tamanho extremamente reduzido, e uma segunda composta por um dispersante, de modo que a olho nu aparente ser uma solução (KARAMAN, 2004; RANGEL, 2006).

A síntese de nanopartículas por meio de redução do íon metálico dá origem então a um colóide. Diversas pesquisas envolvem nanopartículas de materiais distintos. Dentre os mais utilizados estão o ouro (BADWAIK et al., 2011; BURYGIN et al., 2009; SALUNKE et al., 2014), a prata (BAGHIZADEH et al., 2015; KAVIYA; SANTHANALAKSHMI; VISWANATHAN, 2011; SALUNKE et al., 2014), o ferro (BESWICK et al., 2015; KHARISSOVA et al., 2013; LI et al., 2015; MORILLO; PÉREZ; VALIENTE, 2015; SATHYANARAYANAN et al., 2013) e o cobre (DAS; SRIVASTAVA, 2015; WANG et al., 2015; YANG et al., 2015).

As nanopartículas de ouro (AuNP's) têm atraído a atenção devido as suas propriedades. O ouro é um material inerte, resistente à oxidação, o que faz com que seu uso seja interessante em tecnologias e dispositivos em nanoescala (BINDHU; UMADEVI, 2014). Vários estudos têm mostrado que possui potencial para uma variedade de aplicações biológicas, incluindo: conjugação de anticorpos (LOO et al., 2004), entrega de drogas (MOGHIMI; HUNTER; MURRAY, 2005), proteção contra raios UV (GANESAN; PRABU, 2015), purificação de água (BINDHU; UMADEVI, 2014), para fins de diagnóstico, como agente antimicrobiano (GANESAN; PRABU, 2015), dentre outros.

O ouro vem sendo utilizado como símbolo de nobreza à milhares de anos a.C. (DANIEL; ASTRUC, 2004). Apesar de tanto valor, inicialmente, por se tratar de um metal inerte, o ouro não despertou tanto interesse dos pesquisadores, no entanto, com o advento da nanotecnologia e a possibilidade de alterar as propriedades dos materiais fez com que este metal seja fonte de milhares de pesquisas (BONIFÁCIO, 2006). O uso do ouro coloidal vem desde a idade média. Inicialmente era utilizado tanto para fins estéticos (decoração de cerâmicas) quanto para curativos (problemas

de coração, disenteria, epilepsia e tumores). Em 1618 foi publicado o primeiro livro que detalha as utilizações do ouro coloidal pelo médico e filósofo Francisci Antonii (DANIEL; ASTRUC, 2004).

Pesquisas com nanopartículas metálicas têm aumentado desde a publicação do trabalho de Michael Faraday, no século XIX, onde foi feito um estudo das propriedades óticas de filmes finos preparados com nanopartículas de ouro. Em 1951, Turkevich e colaboradores publicaram um método de síntese com base em reações de oxi-redução, utilizando citrato de sódio como agente redutor e estabilizante (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951; TURKEVICH, 1985)

Soluções coloidais de nanopartículas de metais nobres como o cobre, prata e ouro mostram uma cor característica e muito intensa, a qual está ausente no material em grande escala, bem como para os átomos individuais (LINK; EL-SAYED, 1999). Ao contrário do ouro metálico conhecido por sua cor amarelo, o ouro coloidal se apresenta na coloração vermelho, quando tem tamanho médio de 20nm (Figura 1). Conforme vai aumentando de tamanho, a coloração do colóide passa para roxo, ficando mais escuro até se tornar azul e cinza escuro (BONIFÁCIO, 2006). Tal fato se dá devido à oscilação coletiva dos elétrons livres nas nanopartículas, induzidos por um campo magnético, também chamado de Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada (LINK; EL-SAYED, 1999).



Figura 1. Ouro coloidal. (Imagem própria)

A Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado (RPSL) é uma propriedade óptica de metais nobres, tais como o ouro, que se manifesta na região do visível (400 - 700nm) do espectro eletromagnético (PEREIRA, 2009). As propriedades ópticas das nanopartículas têm íntima relação com seu tamanho. Os metais possuem propriedades dirigidas por suas bandas de energia, no entanto, em escala nanométrica, o comportamento varia, de modo que o caminho livre médio dos elétrons excede o raio da partícula, de modo que podem ser excitados pela luz visível. A interação dos elétrons com a radiação eletromagnética causa oscilação coletiva dos elétrons livres nas nanopartículas metálicas, dando origem a uma densidade de carga em sua superfície. Uma força de compensação é gerada, dando origem a um comprimento de onda ressonante único, a banda plasmon de superfície (Figura 2) (PEREIRA, 2009; PETRYAYEVA; KRULL, 2011a). A ressonância de plasmon para as nanopartículas de ouro se dá por volta de 520nm, podendo variar na faixa de 500 a 600nm conforme seu tamanho e grau de agregação (PETRYAYEVA; KRULL, 2011b; PISSUWAN et al., 2010).

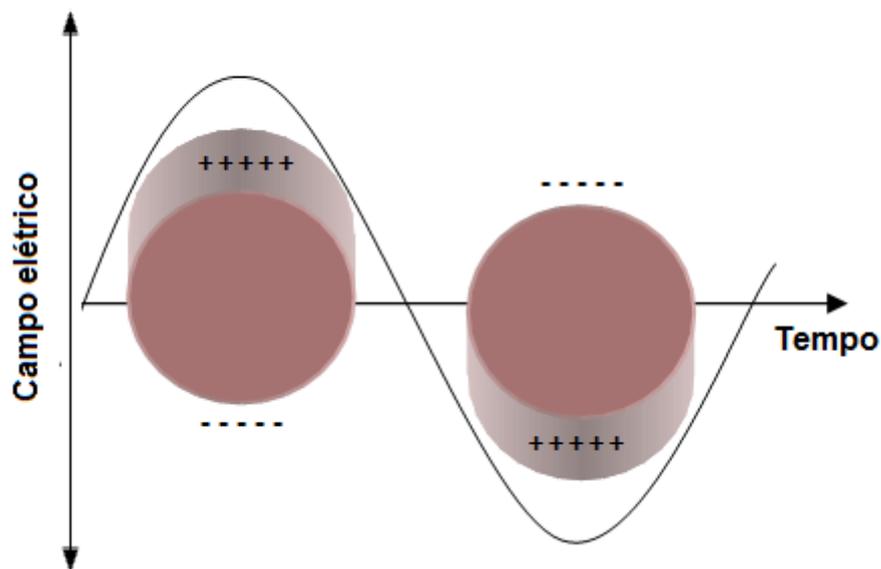


Figura 2. Efeito de Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada (RPSL). (Imagem própria)

As nanopartículas não se comportam de forma semelhante. Seu comportamento está relacionado ao ambiente em que se encontra, estabilidade, composição química, grau de agregação, morfologia e tamanho (MOGHIMI; HUNTER; MURRAY,

2005). A Figura 3 ilustra os principais fatores relacionados às características das nanopartículas.

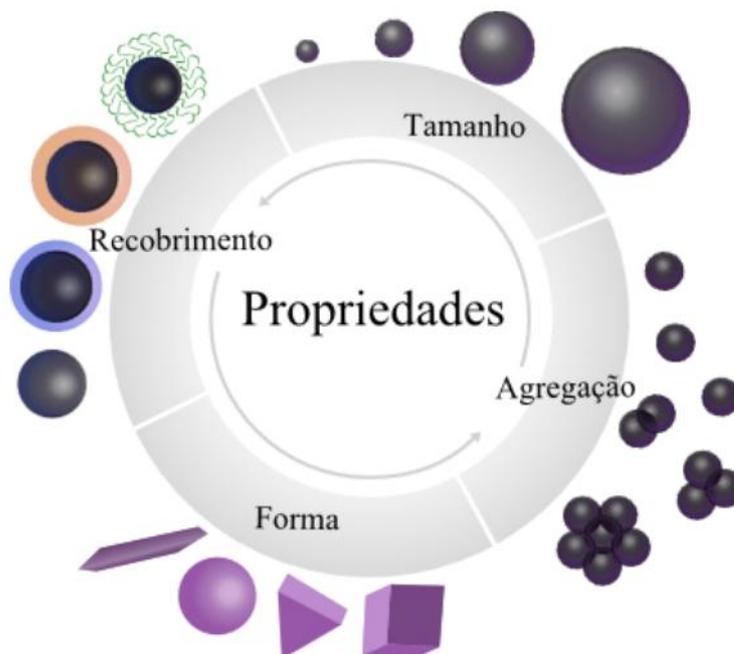


Figura 3. Principais fatores relacionados às características das nanopartículas (ALBERNAZ, 2014).

O agente redutor e as condições de síntese são pontos cruciais, uma vez que ditam como serão os processos de nucleação e crescimento, e por isso, definem a forma, tamanho, estabilidade e conseqüentemente as características ópticas das nanopartículas (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951).

1.2.1 Síntese de nanopartículas

Existem vários métodos de síntese conhecidos para a obtenção de materiais em escala nanométrica, dentre os quais se destacam os métodos físicos, onde as nanopartículas são obtidas utilizando ouro metálico como precursor e reduzindo suas dimensões (*Top-Down*); e os métodos químicos (*Bottom-up*), que se baseiam na construção de estruturas e nanomateriais a partir de átomos e moléculas individuais. Atualmente os métodos baseados em reações químicas de oxi redução são mais empregados, levando a formação de colóides, em geral por via aquosa

(OLIVEIRA, M. M, 2005; NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2011; MARANGONI, 2012). A síntese coloidal é um método extremamente versátil, de custo relativamente baixo comparado a outros métodos de produção de nanoestruturas metálicas e que pode, a princípio, ser adaptado para produção em larga escala (ZANCHET, 2000). As nanopartículas de metais sintetizadas por via aquosa são as mais estudadas, com destaque para as nanopartículas de ouro, amplamente utilizadas (AHMAD et al., 2013; LIU et al., 2012; PAL et al., 2013; PRADO et al., 2014; ZHAO et al., 2010).

Um dos métodos primordiais e mais utilizados baseia-se na redução de íons AuCl_4^- por citrato em meio aquoso através do método desenvolvido por Turkevitch, em 1951 (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951; TURKEVICH, 1985). Frens, em 1973, reportou pela primeira vez a possibilidade de controlar o tamanho médio das nanopartículas através da modulação da razão Au/Citrato. Os íons citrato atuam tanto na redução quanto na passivação (estabilização) das AuNP's, evitando a agregação, graças a alta densidade de carga negativa proporcionada pelos grupos carboxilato ancorados na superfície.

A síntese de nanopartículas de ouro (AuNP's), por reação de oxi-redução, parte de uma solução aquosa de ouro e um agente redutor. Ambas as soluções são misturadas e durante a agitação, os íons de ouro são reduzidos à Au^0 (metálico). O processo passa pelas etapas de nucleação e crescimento, dando origem às nanopartículas (Figura 4).

Nucleação pode ser definida como o processo inicial de redução do ouro. Os átomos reduzidos colidem, formando um núcleo estável e dando origem a uma nova fase ao sistema até então homogêneo. A etapa de crescimento responsável pelo tamanho das nanopartículas consiste em um processo adicional à nucleação, onde ocorrem depósitos de materiais sobre a partícula, de modo que esta aumenta de volume (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951). Em alguns casos pode ainda ocorrer o processo de agregação, que se dá quando o colóide não é estável o suficiente, e as nanopartículas se aproximam de modo a se aglomerarem (BONIFÁCIO, 2006; DU et al., 2012; WANG; SUN, 2006).

Em geral faz-se uso de agentes estabilizadores. Os estabilizadores (também chamados de passivadores), são moléculas utilizadas para evitar a agregação das nanopartículas, e deixar o colóide termodinamicamente estável, formando uma cobertura, geralmente uma monocamada, sobre a superfície das partículas, impedindo o contato entre elas. Além de importantes no controle de tamanho, os passivadores também podem funcionalizá-las (SHON; CHOO, 2003).

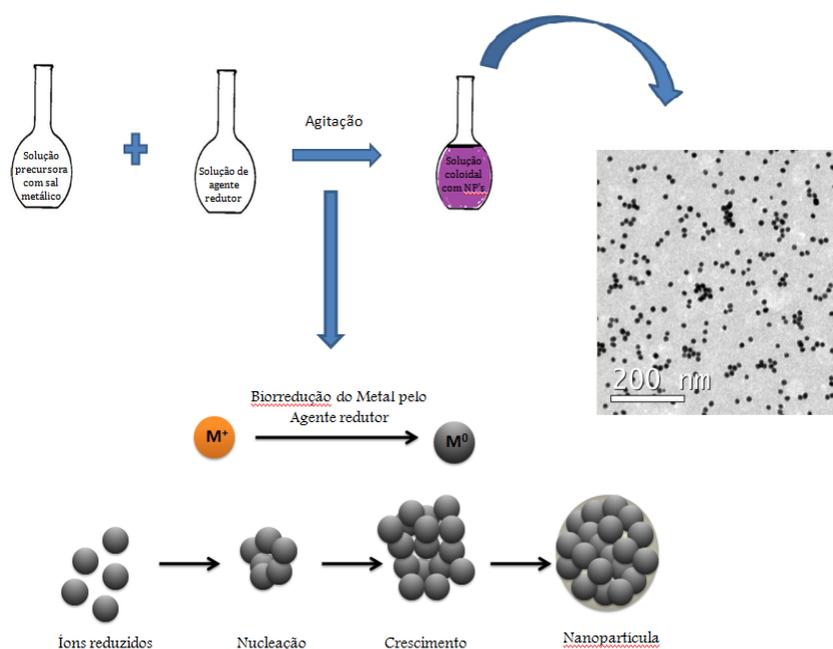


Figura 4. Etapas de síntese de nanopartículas metálicas. (Imagem própria)

A estabilidade de soluções coloidais depende intimamente da natureza e magnitude da interação entre as nanopartículas constituintes com o meio. Basicamente, existem dois mecanismos de estabilização de nanopartículas coloidais: a estabilização eletrostática (Figura 5-A), na qual as nanopartículas se repelem devido à presença de moléculas carregadas na superfície; e a estabilização estérica (Figura 5-B), onde ocorre adsorção de aditivos poliméricos em volta das nanopartículas, de modo que as cadeias longas ou polímeros impedem a aproximação de umas com as outras (HANG et al., 2009; LOURENCO et al., 1996). A este respeito, as propriedades elétricas da interface sólido/líquido são essenciais na determinação da estabilidade das suspensões, de modo que o potencial eletro cinético e a espessura

da camada elétrica é fundamental para manter a estabilidade do sistema (ARIAS et al., 2009).



Figura 5. Formas de estabilização de nanopartículas. A: estabilização eletrostática; B: estabilização estérica (MARANGONI, 2012).

As nanopartículas são termodinamicamente instáveis, principalmente devido a sua alta superfície de contato, e por isso têm tendência natural de crescer e se agregar, de modo que parte do desafio está na síntese de nanomateriais que sejam estáveis, ou seja, que mantenham o mesmo tamanho, forma e grau de dispersão (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951). O fenômeno de agregação pode ocorrer tanto na etapa de síntese quanto posteriormente. A busca por novos métodos de síntese tem se tornado foco de estudos de diversos pesquisadores, que buscam nanopartículas cada vez mais estáveis e menos tóxicas aos humanos e ao ambiente (BADWAIK et al., 2011; BAGHIZADEH et al., 2015; DAS; BRAR, 2013; MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013; SALUNKE et al., 2014).

Grande parte das rotas tradicionalmente utilizadas para a produção de nanopartículas metálicas que acabam dando origem a resíduos nocivos à saúde e ao meio ambiente, uma vez que utilizam solventes tóxicos (CAUERHFF; CASTRO, 2013; SALAM et al., 2012). As recentes pesquisas relacionadas à síntese de nanomateriais utilizando extratos de plantas abriu uma nova era de métodos rápidos e não tóxicos para a produção de nanopartículas (IRAVANI, 2011). Tal método, também designado de síntese verde, visa a utilização de compostos naturais como agentes redutores, tendo assim uma alternativa sustentável. Tende a utilizar solventes de baixa toxicidade, levando a um baixo impacto ambiental (ALBERNAZ, 2014; IRAVANI, 2011).

Nos últimos anos, os extratos vegetais estão sendo amplamente utilizados como uma estratégia rápida e prática para a síntese de nanopartículas, substituindo o uso de solventes tóxicos (NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2011b). Uma grande vantagem no uso de materiais vegetais como agentes redutores, é que além de levar a formação do colóide, também realizam a estabilização e em alguns casos a funcionalização das nanopartículas (IRAVANI, 2011; NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2011b; SADEGHI; MOHAMMADZADEH; BABAKHANI, 2015a).

(SADEGHI; MOHAMMADZADEH; BABAKHANI, 2015b) utilizando extrato da folha de *Stevia rebaudian* obteve nanopartículas de ouro esféricas, com tamanho de 5-20 nm. Análises de UV-Vis, mostraram um pico de absorbância em 550nm, característico de AuNP's. A medida da estabilidade foi feita por meio de potencial zeta, e os valores foram próximos a - 50 mV, confirmando a alta estabilidade de colóides formados a partir de síntese verde. Vários pesquisadores vêm obtendo sucesso na síntese com extratos vegetais para nanopartículas de prata (BAGHIZADEH et al., 2015; DUBEY; LAHTINEN; SILLANPÄÄ, 2010; ISAAC; SAKTHIVEL; MURTHY, 2013; KAVIYA; SANTHANALAKSHMI; VISWANATHAN, 2011; VILLANUEVA-IBÁÑEZ et al., 2015), ouro (BINDHU; UMADEVI, 2014; DUBEY; LAHTINEN; SILLANPÄÄ, 2010; ISAAC; SAKTHIVEL; MURTHY, 2013; MILANEZE et al., 2014; UMA SUGANYA et al., 2015) e outros materiais. A síntese de nanopartículas monodispersas, com tamanho e forma controlada ainda tem sido um grande desafio (NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2011b). A otimização de novas metodologias de síntese é fundamental.

1.3 Métodos de Caracterização de Nanopartículas

1.3.1 Espectroscopia UV - Visível

A espectroscopia de UV - Visível é uma técnica amplamente utilizada para caracterização de nanopartículas (MULVANEY, 1996; SADEGHI; MOHAMMADZADEH; BABAKHANI, 2015b; UMA SUGANYA et al., 2015; VILLANUEVA-IBÁÑEZ et al., 2015). Está relacionada a absorção da radiação ultravioleta/visível (180 a 780nm) pelo material, levando a promoção de elétrons do

estado fundamental ao estado excitado. O espectro é obtido pela irradiação da luz através da amostra (líquida e diluída) e o espectro de absorção se dá pela razão entre a intensidade da radiação que passa pela amostra e pela referência (SKOOG, 2002).

Em geral são utilizados comprimentos de onda de 300 a 800nm para caracterização de nanopartículas metálicas na gama de 2 a 100nm. A absorbância (RPSL) é extremamente sensível a natureza do material, dimensão, forma e grau de agregação das nanopartículas (SCOTT; SMITH; THOMPSON, 1953). Para AuNP's, o pico de absorção máxima se dá no intervalo de 500 - 600nm, de modo que se desloca para a direita com o aumento do tamanho (PETRYAYEVA; KRULL, 2011b; PISSUWAN et al., 2010; SONG; JANG; KIM, 2009). Diâmetros médios de 14nm mostram pico máximo em 520nm, já partículas de 99nm têm pico de absorbância em 575nm (LINK; EL-SAYED, 1999). Já quando a formação de agregados é observada, são geradas ressonâncias em energias menores, levando ao surgimento de banda característica por volta de 650nm (BONIFÁCIO, 2006; DU et al., 2012; WANG; SUN, 2006).

1.3.2 Potencial Zeta

Diversos fatores influenciam na estabilidade de um colóide. Um bom parâmetro para tal medida é a análise de Potencial Zeta (PZ), ou seja o estudo de potencial de superfície (LU; KESSLER, 2006). O PZ corresponde ao potencial no plano de cisalhamento, que está à uma determinada distância da superfície. Este corresponde ao plano que separa as parcelas de fluido que se movem em direções opostas em fenômenos físicos como a eletroforese e a eletrosmose (ABREU, 2011).

Em geral, todo material quando em contato com um meio líquido tende a adquirir carga elétrica em sua superfície. A carga líquida na superfície da partícula afeta a distribuição de íons na sua vizinhança, levando assim a um aumento na concentração de contra íons, formando assim, uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido, conforme ilustrado na Figura 6.

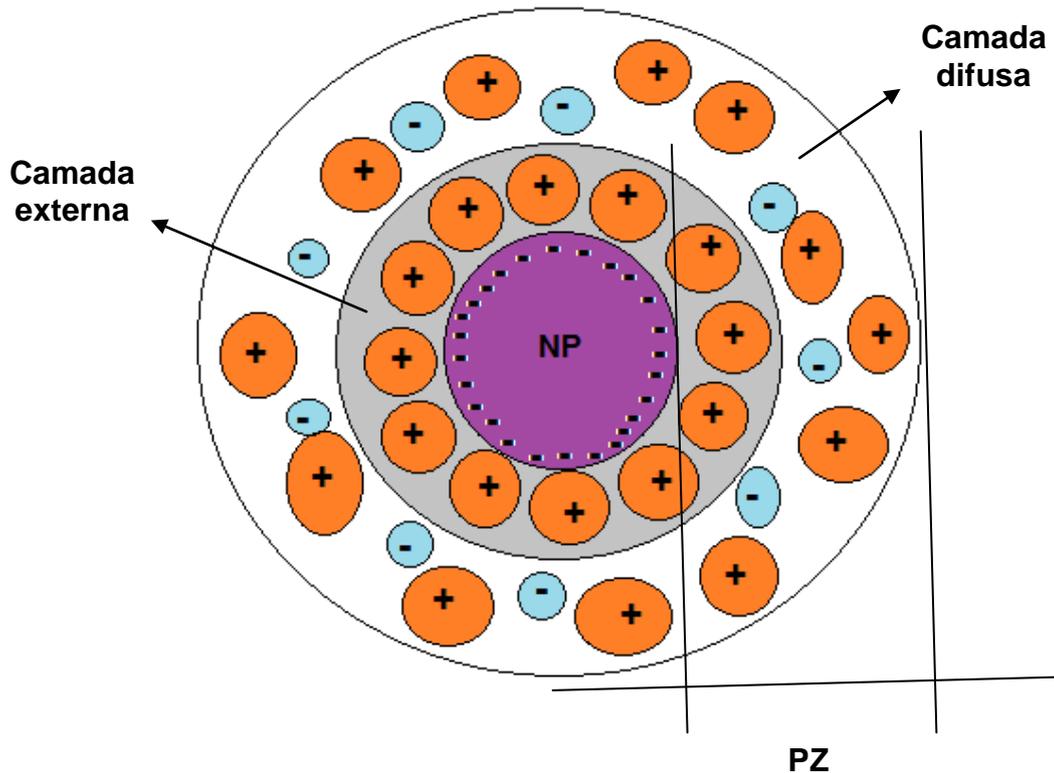


Figura 6. Potencia Zeta. Interfaces da nanopartícula. NP: Nanopartícula; PZ: Potencial Zeta. Imagem própria.

Essa dupla camada possui duas regiões, uma mais interna, que inclui os íons fortemente ligados à superfície, que não é afetada por agitação térmica, e uma camada externa (Stern Layer), que neutraliza a maior parte da carga superficial. Embora a maior parte das cargas sejam neutralizadas, o restante é capaz de atrair íons para o colóide, com menos intensidade, e a uma distância maior da superfície, formando a camada difusa (Diffuse Layer). A camada difusa é facilmente afetada por agitação térmica, concentração de sais, dentre outros. A estabilidade da partícula coloidal é determinada pela carga que o colóide exerce sobre a camada difusa, e a distância dos íons entre as mesmas. Ou seja, se a carga da superfície do colóide e a distância entre os íons de superfície é grande, o colóide será estável, de modo que outras partículas não se aproximarão (BRUNELLE, 1980).

Desse modo, o Potencial Zeta se dá em função da carga superficial da partícula e a composição do meio que a circunda. Pode ser determinado de modo experimental, de forma que reflete a carga efetiva das partículas, ou seja, pode ser correlacionado com a repulsão eletrostática entre elas e conseqüentemente com a estabilidade da

suspensão. A medida do PZ é realizada de forma indireta de modo que pode-se estimar o valor do potencial na superfície, onde a técnica mais usada e mais aceita é através da mobilidade eletroforética. Introduce-se uma suspensão coloidal diluída em uma cuba com dois eletrodos e aplica-se um potencial elétrico à suspensão. As espécies carregadas eletricamente irão se mover na direção do eletrodo de carga contrária, tão mais rapidamente quanto maior a sua carga elétrica e maior o campo elétrico aplicado (ABREU, 2011; BRUNELLE, 1980).

O valor considerado bom pode variar de autor para autor. Segundo LU; KESSLER, 2006, o valor absoluto do PZ deve ser superior a 25mV, para que o colóide seja considerado estabilizado. A Tabela 1 mostra os valores de PZ e a estabilidade correspondente.

Tabela 1. Relação entre valores de potencial zeta grau de agregação do colóide. Adaptado de: (BRUNELLE, 1980; LU; KESSLER, 2006)

Potencial Zeta (mV)	Agregação coloidal
$\geq \pm 30$	Pouca ou nenhuma
$\geq \pm 15 > \pm 30$	Agregação moderada
$< \pm 15$	Agregação severa

1.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Dentre as técnicas de microscopia, a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) tem sido a mais amplamente utilizada para caracterização morfológica de nanopartículas, tornando possível a determinação da forma e tamanho. De um modo geral, a técnica permite a aquisição de imagens com resolução superior às obtidas com microscópios ópticos.

A amostra é irradiada por um feixe de elétrons de corrente uniforme. O feixe de elétrons é gerado por um canhão de elétrons por meio da emissão termo-iônica (aquecimento de um filamento de tungstênio) ou emissão de campo (pontas de filamento de tungstênio), e atravessa a amostra, sofrendo diferentes tipos de espalhamento que dependem das características do material. Ao atravessar a

amostra, diferentes tipos de radiação são produzidos. Os elétrons transmitidos são então analisados por um detector, que traduz o sinal de imagem (RAMOS, 2013).

1.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) - EDS

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma ferramenta bastante utilizada tanto nas áreas de materiais quanto biológicas. Fornece informações sobre a morfologia e permite a identificação de elementos químicos de uma amostra sólida - quando acoplado ao EDS (Energy Dispersive X-Ray Detector). Seu funcionamento se assemelha ao MET. Consiste em um feixe de elétrons que incide sob a amostra, ponto a ponto, fazendo varreduras, de modo que o sinal é transmitido a um detector. A imagem resulta na interação entre o feixe de elétrons com a superfície da amostra (RAMOS, 2013).

1.3.5 Espectroscopia de Infravermelho (IV)

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) trata-se de uma técnica muito utilizada na análise orgânica qualitativa, principalmente nas áreas de síntese, transformações orgânicas e química de produtos naturais. Juntamente com a espectroscopia de UV-Vis, de massas e ressonância magnética nuclear (RMN) constituem os principais métodos para identificação de compostos (LOPES; FASCIO, 2004). Um feixe de fótons incide sobre a amostra (I_0) com moléculas que apresentam energia de vibração incompatível com a energia dos fótons, desse modo, nenhuma energia é absorvida, e todos os fótons passam pela amostra. O feixe (I), que atravessa a amostra tem a mesma intensidade do I_0 . No entanto, se a energia dos fótons forem compatíveis com a energia vibracional, cada molécula absorve um fóton, aumentando assim seu movimento vibracional. Desse modo, menos fótons atravessam a amostra, e I_0 passa a ser maior de I . Quanto maior o número de moléculas, menor é a intensidade do I , pois mais fótons podem ser absorvidos (SKOOG, 2001).

1.3.6 Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma (ICP-MS)

O ICP-MS é um dos métodos mais utilizados para determinação da composição química de pequenas amostras e vem sendo utilizada por diversos autores (SONG; JANG; KIM, 2009), além de ser sensível a concentrações na escala de ng/L (LABORDA et al., 2013). A amostra é vaporizada, produzindo nuvens de íons gasosos no plasma, que podem então ser medidos por meio de sinais detectados pelo espectrômetro de massa. A intensidade do sinal é determinada pelo tamanho da partícula, e a frequência das ondas é diretamente proporcional à concentração das nanopartículas (DEGUELDRE; FAVARGER; WOLD, 2006).

1.4 Aplicações biológicas

1.4.1 Atividade antioxidante

O processo de oxidação faz parte de qualquer metabolismo, seja animal ou vegetal, e leva a produção de energia, essencial à manutenção das células (ROESLER et al., 2007; TIVERON, 2010). Os radicais livres do elemento Oxigênio, juntamente com seus elétrons não pareados são capazes de interagir com qualquer tipo de molécula encontrada no organismo, dando origem a uma molécula estável e um novo radical, iniciando uma cadeia de eventos que levam a destruição dos tecidos (RUFINO et al., 2007). Os oxidantes são compostos produzidos pelo próprio metabolismo, que podem levar aos danos teciduais.

Diversas pesquisas têm relacionado os oxidantes e radicais livres como os principais responsáveis pelo câncer, envelhecimento, disfunções cerebrais, envelhecimento, e outros (ROESLER et al., 2007; RUFINO et al., 2007; SOUSA et al., 2007). Diversos estudos têm mostrado que os vegetais têm grande atividade antioxidante, ou seja, atuam contra tais radicais (GÜLÇİN; BERASHVILI; GEPIREMEN, 2005; LIU et al., 2012; SOUSA et al., 2007; TIVERON, 2010).

1.4.2 Potencial Antimicrobiano de Nanopartículas de Ouro

As nanopartículas de ouro têm atraído o interesse científico significativo como uma nova geração de agentes antimicrobianos por causa do aumento da resistência de bactérias em relação a antibióticos (MISHRA et al., 2014). Estudos mostram que as bactérias têm maior dificuldade para adquirir resistência a elas (CUI et al., 2012).

Diversos trabalhos vêm confirmando que as AuNP's são uma boa alternativa no controle de microrganismos. AuNP's obtidas por síntese verde (extrato do fruto de *A. comosus* como agente redutor) foram capazes de reduzir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosas* (BINDHU; UMADEVI, 2014).

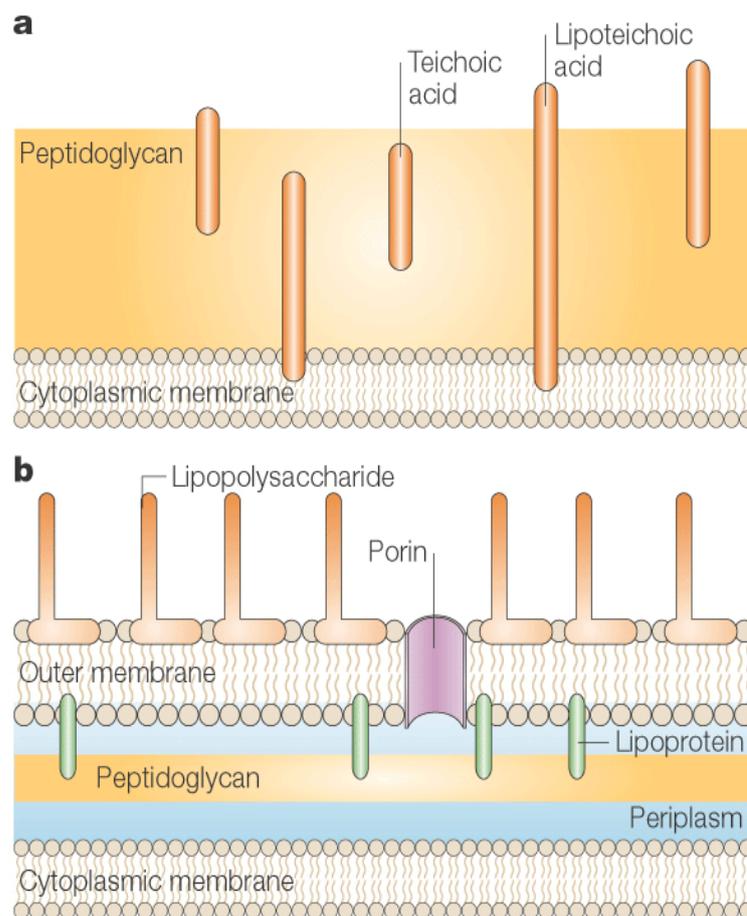
Yan Cui e colaboradores, em 2012, realizaram um trabalho com atividade antimicrobiana de NP's de ouro e confirmaram a ação bactericida, com Concentração Inibitória Mínima (MIC) de 4µg/mL e Concentração Bacteriostática Mínima (MBC) de 12 – 16µg/mL contra *E. coli*. A combinação de nanopartículas de ouro sintetizadas por uma rota verde com ofloxacina foi capaz de potencializar o efeito antibacteriano do antibiótico (AYAZ AHMED et al., 2014).

O efeito antibacteriano das nanopartículas de ouro pode se dar por vários motivos. Quando carregadas, podem ser atraídas pela carga negativa das bactérias; AuNPs menores são capazes alcançar o interior das bactérias, levando à morte celular; (BINDHU; UMADEVI, 2014)

1.4.2.1 Microrganismos Gram positivos e Gram negativos

A parede celular de bactérias forma uma estrutura rígida a redor da célula, e é responsável por sua morfologia (cocos, hastes, espiral). Formada basicamente de peptidoglicano (constituído por unidades repetidas de dissacárido de ácido N-acetil murâmico glucosamina-N-actyl, que são reticulados por cadeias laterais pentapeptídicas (VOLLMER; BLANOT; DE PEDRO, 2008), envolve a membrana plasmática e todo aparato celular. (SALTON MRJ AND KIM KS., 1996). Existem

diferenças na organização da parede celular dentre as classes, distinguidas pela primeira vez, a mais de um século atrás, por Hans Christian Gram, que classificou dois grupos gerais de parede celular tomando por base a diferença de retenção de cristal violeta (CABEEN; JACOBS-WAGNER, 2005; SALTON MRJ AND KIM KS., 1996). Um grupo foi então denominado de Gram positivo, por reter a coloração, e outro de Gram negativo, por não ter a mesma capacidade. A base para a então denominada coloração de Gram se dá basicamente por diferenças estruturais fundamentais no envelope celular destes dois grupos de bactérias (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010).



Nature Reviews | **Microbiology**

Figura 7. a - Estrutura celular de Gram positivos; **b** - Estrutura celular de Gram negativos (CABEEN; JACOBS-WAGNER, 2005).

A Figura 7 mostra as diferenças na estrutura das Gram positivas e Gram negativas. Em Figura 7-a, a parede celular de microrganismos Gram positivos, que é composta

por múltiplas camadas de peptidoglicano (20 a 80nm), ligados à ácidos teicóicos e ácidos lipoteicóicos, que se estendem até a membrana plasmática. Estes polissacarídeos aniônicos são essenciais para a viabilidade, além de contribuírem para a morfologia das células (CABEEN; JACOBS-WAGNER, 2005; SALTON MRJ AND KIM KS., 1996). Já em Figura 7-b, observa-se a parede celular de Gram negativos, composta por uma fina camada de peptidoglicano, localizado dentro de um espaço periplasmático, entre a membrana interna e externa. Esta segunda membrana, externa, é ligada ao peptidoglicano por lipoproteínas (7,5 a 10 nm de espessura). A membrana externa é ligada a lipopolissacarídeos que se estende para o espaço extracelular, e possui porinas, que permitem a passagem de pequenas moléculas hidrossolúveis (CABEEN; JACOBS-WAGNER, 2005; VOLLMER; BLANOT; DE PEDRO, 2008).

1.4.2.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é uma bactéria que se apresenta como cocos Gram-positivos e que pertence à família Staphylococcaceae. Possuem de 0,5 a 1,5µm de diâmetro, e se encontram isoladas, aos pares, ou em pequenas cadeias (3 ou 4 células) de forma regular na forma de cachos, ou de forma irregular. Esses microrganismos são imóveis, anaeróbios facultativos, resistentes à bacitracina, não formam esporos, normalmente, produzem a enzima catalase, são capazes de crescer em até 10% de cloreto de sódio (NaCl). Sua temperatura ótima de crescimento se encontra entre 30°C e 37°C (HOLT et al., 1994; BANNERMAN & PEACOCK, 2007; JAMALI et al., 2015)

Sua parede celular consiste basicamente de ribitol, ácido tecóico, ligados covalentemente ao peptidoglicano. O ácido lipotecóico é um polímero de fosfato de glicerol ligado a um terminal de glicolípídios ancorado na membrana citoplasmática. O peptidoglicano (subunidades alternadas de polissacarídeos) compõe 50 % da parede e pode estimular a liberação de citocinas por macrófagos, ativação do sistema complemento e agregação plaquetária (FRANKLIN D. LOWY, 1998).

Desde a sua descoberta em 1880, *Staphylococcus aureus* têm assumido papel de destaque no que tange ao desenvolvimento de infecções. Podem afetar vários locais como corrente sanguínea, trato respiratório, pele, tecidos moles, bem como causar infecções de feridas pós operatórias, pneumonia necrotizante, e bacteremia associada à cateter central (DEURENBERG et al., 2007; SCHITO, 2006), além de ser uma das principais causas mundiais de surtos de doenças relacionadas com o consumo de alimentos (JAMALI et al., 2015; NEMA et al., 2007). Trata-se de uma das principais causas de hospitalização e infecções adquiridas na comunidade, e pode resultar em conseqüências graves (MONTAZERI et al., 2015; SCHITO, 2006). Sua importância enquanto patógeno humano está relacionada não só a sua capacidade de causar várias doenças, mas também ao seu grande potencial para desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos (FRANKLIN D. LOWY, 1998; SCHITO, 2006), o que aumenta a demanda pela descoberta de novos antibióticos.

A resistência do *S. aureus* está relacionada principalmente a produção de β -lactamase (penicilinase). Atualmente cerca de 90% dos isolados produzem tal enzima, que é capaz de inativar os antibióticos β -lactâmicos. Como alternativa, em 1961 foi introduzido a Meticilina (penicilina resistente à penicilinase) (FRANKLIN D. LOWY, 1998; WOODFORD, 2005), mas rapidamente a resistência foi relatada (MP, 1961). Essas cepas foram denominadas de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e são resistentes a todos os antimicrobianos β -lactâmicos.

O mecanismo de ação dos β -lactâmicos está relacionado a capacidade de se ligar a proteínas que participam da síntese da parede celular (PBPs - Proteínas Ligadoras de Penicilina), impedindo assim a formação de parede, resultando em lise e morte bacteriana (CHAMBERS, 1997). A resistência à metilina está relacionada ao desenvolvimento de uma PBP2a, que não têm afinidade pelo antimicrobianos. A codificação dessas proteínas torna o patógeno resistente, e está relacionada à aquisição do gene mecA "Cassete Cromossômico Estafilocócico mec - SCCmec" (elemento genômico), detectável em isolados de MRSA (CHAMBERS, 1997; WOODFORD, 2005).

1.4.2.3 *Escherichia coli*

Theodor Escherich, um bacteriologista alemão, apresentou em 1885 uma palestra denominada "As bactérias intestinais do recém nascido e da criança" à Sociedade de Morfologia e Fisiologia, onde ele descreveu pela primeira vez uma população bacteriana até então denominada "comuna coli bactéria", mais tarde denominada *Escherichia coli* (*E. coli*) (MANNING, 2010).

Escherichia coli é um membro da família Enterobacteriaceae, gram-negativo, muitas vezes referidos como entéricas por residirem no trato gastrointestinal (MANNING, 2010; OLIPHANT; EROSCHENKO, 2015).

Trata-se de um tipo de bactéria de pequeno tamanho, que vive em vários ambientes distintos. São encontradas no solo, na água, bem como em organismos vivos (MANNING, 2010). Em humanos, a *E. coli* é tipicamente comensal, ou seja, que raramente causam doenças, exceto em hospedeiros imunocomprometidos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; LEVINE, 1984; MANNING, 2010). As cepas patogênicas diferem a partir de estirpes não patogênicas ou comensais pela produção de fatores de virulência (OLIPHANT; EROSCHENKO, 2015). Normalmente, a *E. coli* coloniza o trato gastrointestinal de bebês poucas horas após o nascimento, se tratando do mais abundante anaeróbio facultativo presente na microflora intestinal humana (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; SWEENEY et al., 1996).

Desde a sua descoberta, é um dos microrganismos mais estudados. Isto se deve ao fato de que tal bactéria não é apenas um habitante inofensivo do trato intestinal, mas também um patógeno de grande importância clínica (HACKER; BLUM-OEHLER, 2007). Existem vários clones que vieram a adquirir virulência, o que os confere maior capacidade de se desenvolver em diferentes ambientes, e causar um amplo espectro de doenças. Estas características de virulência são em geral codificadas em elementos genéticos que podem ser transmitidos, criando novas combinações (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). É responsável por diversas doenças, infecções intra-abdominais, bacteremia e sépsis. Chega a ser responsável por 75% dos casos de infecções do trato urinário em pacientes não complicados de UTIs e 65% dos complicados (FLORES-MIRELES et al., 2015). O tratamento de infecções

secundárias é cada vez mais dificultado devido ao aumento da incidência e resistência aos antibióticos (OLIPHANT; EROSCHENKO, 2015).

1.4.2.4 Resistência Microbiana

Até o início dos anos 1970 os médicos acreditavam que todas as infecções bacterianas eram tratáveis utilizando os antibióticos disponíveis, no entanto, cepas resistentes começaram a se disseminar (COHEN, 1992; LOWY, 2003; TOMASZ, 1992). No início dos anos 1940, quando a penicilina G foi introduzida, cerca de 85-90% das cepas de *S. aureus* isoladas em hospitais eram suscetíveis (MORTON N. SWARTZ, 1997; SCHITO, 2006). A resistência começou a aparecer após cerca de 3 anos de seu uso (SCHITO, 2006). Por volta de 1948, cerca de 50% das amostras já eram resistentes, e no fim da década de 1950 esse número já passava de 75% (GOOTZ, 1990; MORTON N. SWARTZ, 1997; SCHITO, 2006). Ao longo das décadas as cepas resistentes se espalharam rapidamente para a comunidade, e foram responsáveis por 90% dos achados tanto em isolados hospitalares como na comunidade (MORTON N. SWARTZ, 1997). Juntamente com as cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* outras foram surgindo, tais como de *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Mycobacterium tuberculosis* (COHEN, 1992; LOWY, 2003; TOMASZ, 1992).

O desenvolvimento da resistência microbiana é um fenômeno natural, que é acelerado pelo uso abusivo de antimicrobianos em seres humanos e animais, e tal fato acontece, devido ao poderoso efeito seletivo, em que bactérias mais resistentes sobrevivem após o tratamento antibiótico (COLLIS; HALL, 1995; MORTON N. SWARTZ, 1997; WHO, 2014). O evento ocorre por vários fatores, que vão desde o uso excessivo em várias partes do mundo, a falta de tratamento adequado até ao fracasso em completar o tratamento, seja por falta de recursos ou de informação (SCHITO, 2006). No Brasil, em 2011, a Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, adotou a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 20, com o intuito de reduzir o uso indiscriminado de antimicrobianos. Tal documento trás critérios para a prescrição, dispensação, controle, embalagem e rotulagem de medicamentos a base de antimicrobianos, além de exigir a retenção da receita no momento da dispensação (BRASIL, 2011).

Um fator importante para o surgimento desse fenômeno é a aquisição de genes de resistência a antibióticos pelos principais patógenos (TOMASZ, 1992). Pode se desenvolver por meio de mutação cromossômica, aquisição de um plasmídeo de resistência, e outros (COLLIS; HALL, 1995). Dentre os microrganismos resistentes, existem ainda as bactérias multi drogas resistentes (MDR), que são definidas como aquelas que apresentam resistência a dois ou mais antibióticos aos quais esta bactéria normalmente é considerada susceptível (COUTO, 2003).

Durante várias décadas, a resistência antimicrobiana tem sido uma ameaça crescente para o tratamento de cada vez mais um número maior de infecções causadas por bactérias, parasitas, vírus e fungos (WHO, 2014). A magnitude do problema a nível mundial quanto ao impacto dos microrganismos resistentes sobre a saúde humana, bem como os custos e impacto social ainda são desconhecidos (WHO, 2014). O mau uso constante de agentes antibacterianos em diversos setores, que vão desde a prática clínica até a grande liberação de agentes antibióticos na agricultura, pecuária e pesca, continuam favorecendo a seleção de bactérias resistentes a cada vez mais um número maior de antimicrobianos (TOMASZ, 1992). Sendo assim, existe a necessidade de utilização de drogas que não gerem resistência e apresentem uma boa propriedade bactericida, de modo que para enfrentar tal desafio global, são necessários trazer novos antibióticos para o mercado (GEETHALAKSHMI; SARADA, 2013; SO et al., 2011)

2 JUSTIFICATIVA

Estudos mostram a possibilidade de utilizar material vegetal como agente redutor, de modo que permita ainda a estabilização e funcionalização das nanopartículas para atividade biológica, no entanto o potencial redutor da resina de *Virola oleifera* ainda não foi avaliado.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Otimização e caracterização da síntese verde de nanopartículas de ouro com resina de *Virola oleifera* e investigação do possível efeito antioxidante e antibacteriano contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver uma metodologia de síntese de nanopartículas de ouro (AuNP's) utilizando solução de resina de *Virola oleifera* como agente redutor, bem como otimizar uma condição de síntese com base em um planejamento fatorial;
- Avaliar o potencial antioxidante do material vegetal antes e após a síntese das nanopartículas de ouro;
- Síntese de nanopartículas de ouro (AuNP's) utilizando citrato de sódio como agente redutor;
- Caracterização físico-químicas das nanopartículas;
- Investigar uma possível interação e atividade antimicrobiana das nanopartículas frente a uma bactéria Gram positiva e Gram negativa.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4. 1 Otimização de síntese de nanopartículas de ouro com resina de *Virola oleifera*

As nanopartículas de ouro foram sintetizadas pelo método de oxi-redução, utilizando solução de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L de HAuCl_4 (Sigma-Aldrich) (Figura 8-A) e solução de resina de *Virola oleifera* (Laboratório de Produtos naturais - UVV) na concentração de 1g/L como agente redutor (Figura 8-B). A *Virola oleifera* foi escolhida por ser rica em compostos fenólicos, importantes por reduzirem os íons metálicos, bem como por possuir boa atividade antioxidante, que confere funcionalização as partículas formadas.

Para evitar qualquer tipo de contaminação e interferência química, todas as vidrarias e materiais utilizados foram previamente lavados 3 vezes em solução de água régia (1:3 HCl/HNO_3) e posteriormente 5 vezes com água destilada e secos em temperatura ambiente. Todas as soluções foram preparadas utilizando balança semi-analítica e água ultrapura.

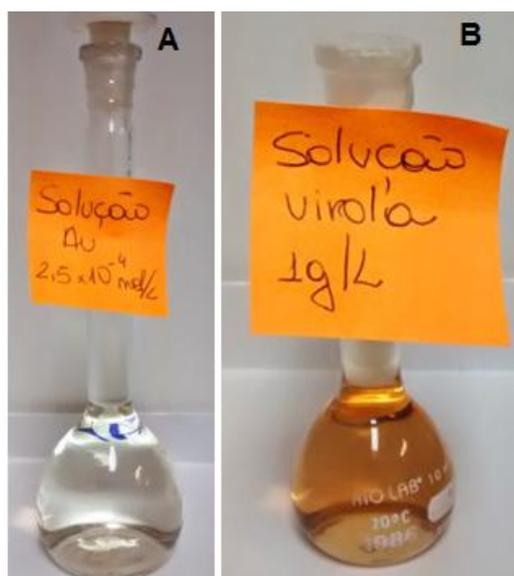


Figura 8. **A** - Solução de HAuCl_4 na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L; **B** - Solução de resina de *Virola oleifera* na concentração de 1g/L.

4.1.1 Planejamento fatorial

Para verificar o efeito das variáveis sobre a reação, bem como encontrar as condições mais favoráveis para a síntese das nanopartículas, foi proposto um planejamento fatorial do tipo 3^2 , com três níveis (3 variações de concentração e de tempo) e duas variáveis (concentração e tempo de síntese), conforme Tabela 2 tais variáveis foram estudadas pois interferem no tamanho e na concentração das nanopartículas. A concentração de ouro foi fixada em $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L.

Tabela 2. Planejamento fatorial 3^2 , com três níveis (1, 2 ou 3 mL de agente redutor; 10, 20 ou 30 minutos) e 2 variáveis (tempo de síntese e concentração do agente redutor).

Experimento	Volume de solução de <i>Viola oleifera</i> /massa adicionada	Volume solução de ouro	Tempo de Síntese
1	1 mL (0,09mg)	10mL	10min
2	1 mL (0,09mg)	10mL	20min
3	1 mL (0,09mg)	10mL	30min
4	2mL (0,16mg)	10mL	10min
5	2mL (0,16mg)	10mL	20min
6	2mL (0,16mg)	10mL	30min
7	3mL (0,32mg)	10mL	10min
8	3mL (0,32mg)	10mL	20min
9	3mL (0,32mg)	10mL	30min
10	2mL (0,16mg)	10mL	20min
11	2mL (0,16mg)	10mL	20min

Os dados experimentais foram processados empregando o programa Statistica (Statistica for Windows, Statsolft, Inc, 1999. Tulsa, OK, EUA). A significância dos efeitos das variáveis e das possíveis interações entre elas foi checada pela aplicação da análise de variância (ANOVA). Foi considerado $p < 0,05$ como significância. Foram utilizados também gráficos de superfície resposta e de Pareto para análise dos resultados.

4. 2 Síntese das Nanopartículas de Ouro com citrato de sódio

Neste trabalho, as nanopartículas de ouro (AuNP's) foram sintetizadas por redução química de sais, de modo a obter ouro coloidal. Para fins de comparação, as AuNP's foram sintetizadas utilizando citrato de sódio, um agente redutor tradicionalmente

utilizado, e solução de ouro (ácido tetracloroáurico - HAuCl_4 Sigma-Aldrich) conforme proposto por TURKEVICH *et al.*, 1951, seguindo algumas modificações. Assim como para as AuNP's sintetizadas com resina de *Virola oleifera*, todas as vidrarias e materiais utilizados foram previamente lavados 3 vezes em solução de água régia (1:3 de Ácido Clorídrico e Ácido Nítrico) e posteriormente lavados 5 vezes com água destilada e secos em temperatura ambiente. Bem como, todas as soluções foram preparadas utilizando balança semi-analítica e água ultrapura.

O volume de 10 mL da solução de HAuCl_4 na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L foi adicionado a um erlenmeyer e mantido sob agitação 600 rpm e aquecimento até ebulição. Nesse momento foi adicionado 1 mL da solução de citrato de sódio 10^{-3} g/mL em água e mantido a agitação e o aquecimento por cerca de 10 minutos. O aparecimento da cor vermelho confirmou a formação das nanopartículas.

4.3 Atividade Antioxidante (DPPH e ABTS⁺)

Com objetivo de avaliar o potencial antioxidante da resina de *Virola oleifera* antes e após a síntese de nanopartículas de ouro, foram realizados os ensaios de DPPH e ABTS. Ambas as metodologias são baseadas na capacidade de os compostos da amostra seqüestrarem os radicais DPPH 2,2-difenil-1-picril-hidrazila e ABTS⁺ 2,2' – azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico).

A atividade antioxidante contra ABTS⁺ foi determinada utilizando um método modificado descrito originalmente por (RE *et al.*, 1999). Inicialmente, uma mistura aquosa de ABTS (Sigma) (7 mM) e per sulfato de potássio (Sigma) (2,45 mM) foi incubada a temperatura ambiente no escuro durante 16 horas. A solução formada foi diluída em etanol para gerar uma absorbância de 0,7 a 734 nm. Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 300 μl de ABTS⁺ juntamente com 3 μL das amostras em diferentes concentrações (0.05 to 1.6 $\mu\text{g/ml}$). Após 5 minutos, as medições espectrofotométricas foram efetuadas em 734 nm usando iMark® Microplate Absorbance Reader, da Bio Rad Laboratories (Washington, EUA).

O ensaio espectrofotométrico de DPPH foi realizado utilizando uma solução de DPPH na concentração de 0,004% (massa/volume) (Sigma) em etanol, seguindo um método modificado descrito originalmente por Gulcin et al. (2005)(GÜLÇİN; BERASHVILI; GEPIREMEN, 2005). Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 100 µl de cada amostra com as várias concentrações (1.56 to 50 µg/ml) e 200 µl de solução de DPPH. Após 15 minutos à temperatura ambiente, a absorbância foi medida com o auxílio de um leitor de microplaca, a 540 nm. Leituras espectrofotométricas com 200 µl de solução de DPPH e 100 µl de etanol foram usadas como uma referência de absorção máxima (controle).

Para ambos os testes o Trolox® foi utilizado como substância padrão, devido a sua alta atividade antioxidante conhecida. Os ensaios foram realizados em triplicata, com repetições em dias distintos. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição (% Δ), e 50% de concentração eficaz - CE 50 (concentração necessária para inibir 50% do radical). A porcentagem de inibição foi calculada pela equação $\Delta = (A_0 - A/A_0)*100$, onde A_0 é a absorbância do controle (sem a amostra) e A é a absorbância da amostra.

4.4 Caracterização das Nanopartículas

4.4.1 Espectroscopia UV - Visível

Foram feitas leituras de absorbância das amostras de nanopartículas utilizando Espectrofotômetro Evolution® 300 Thermo Scientific do Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares - Labiom da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. A leitura foi feita de 400 a 700 nm, com intervalo de 1 nm em 1nm, e velocidade de varredura de 600nm/min. Como branco foi utilizado a solução de agente redutor, na concentração utilizada para cada condição de síntese. O resultado foi expresso por meio de gráficos de absorbância por comprimento de onda (nm) obtidos pelo software OriginPro 8.5 (Versão Trial).

4.4.2 Potencial Zeta

Cerca de 2 mL do colóide foi analisado em um analisador de partículas Microtrac Zetatrac pertencente do Instituto Federal do Espírito Santo – IFES, de Aracruz/ES. Os valores são referentes a média de 10 leituras, e foram expressos em mV.

4.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As nanopartículas foram examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão (JEM-1400, JEOL, USA inc.), operando a 120 kv. Cerca de 5µL das amostras foram gotejadas sobre grades de cobre de 400 mesh, contendo um filme suporte de resina formvar e secas a temperatura ambiente.

As imagens do MET foram obtidas em diferentes aumentos (25 000X; 150 000X; 300 000X) visando obter informações gerais da amostra, e imagens mais detalhadas das nanopartículas quanto a forma e tamanho.

4.4.3.1 Distribuição de Tamanho das Nanopartículas

As imagens obtidas do MET foram analisadas utilizando o software livre Image J para avaliar o diâmetro. O programa dá informações de área de cada nanopartícula. Os valores foram transferidos para o Excel, e por meio de fórmulas matemáticas inicialmente o raio foi calculado (1) e posteriormente o diâmetro (2).

$$A = \pi r^2 \quad (1)$$

$$d = \frac{\sqrt{r^2}}{2} \quad (2)$$

Todos os valores de diâmetro foram transferidos para o software OriginPro 8.5 (Versão Trial), onde foi montado o histograma de distribuição de tamanho e frequência para cada imagem.

4.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) - EDS

As amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm por 30 minutos e posteriormente destinadas à desidratação utilizando evaporador centrífugo CentriVap® da LABCONCO. Após secas, as amostras foram destinadas às análises, que foram realizadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura (ZEISS , EVO MA10) com área de dispersão de energia espectroscopia de raios -X (Oxford Instruments - EDS);

4.4.5 Espectroscopia de Infravermelho (IV)

As amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm por 30 minutos e posteriormente destinadas à desidratação utilizando evaporador centrífugo CentriVap® da LABCONCO. A análise de infravermelho foi realizada no modo ATR em FT-IR/FT-NIR Spectrum 400 PerkinElmer. Todas as bandas foram analisados por software Origin Pro 8.5 (Versão Trial).

4.4.6 Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma (ICP-MS)

Foi realizado o mesmo procedimento descrito no item 4.4.5 para secagem do material. Após secas, as nanopartículas foram destinadas à análise, onde foi utilizado um Espectrômetro de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) modelo NEXION300D (PerkinElmer) pertencente ao LabPetro, da Universidade Federal do Espírito Santo. A concentração das nanopartículas de ouro foi determinada (Limite de detecção 8,19 ng/L). Os resultados foram expressos em mg/L.

4.5 Avaliação do Potencial Antimicrobiano

4.5.1 Teste de esterilidade das AuNP's

As amostras foram incubadas em meio sólido (ágar Muller Hinton) e meio líquido (caldo BHI), e após 24 horas à 37°C, foi verificado visualmente o crescimento bacteriano.

4.5.2 Cepas Utilizadas

Duas cepas de microrganismos foram selecionadas, sendo uma Gram positiva (*Staphylococcus aureus* 1117) e uma Gram negativa (*Escherichia coli* DH5 α).

4.5.3 Teste de Interação Rápida

Para avaliar a interação a curto prazo das nanopartículas de ouro com as bactérias, foi utilizado a metodologia de (CHWALIBOG et al., 2010) com algumas modificações. O inóculo de cada microrganismo foi preparado pelo método de crescimento em placa de ágar. Uma alíquota de suspensão da bactéria foi transferida para uma placa de ágar Muller Hinton, e incubada em estufa bacteriológica por 24 horas à temperatura de 37°C. Posteriormente, algumas colônias foram tocadas com o auxílio de uma alça estéril, e transferidas para um tubo com salina 0,9% estéril, até atingir a turbidez semelhante à escala 0,5 de McFarland, equivalente a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).

Em um espendorff estéril, foram adicionados 200 μ L de suspensão bacteriana e 800 μ L do colóide de nanopartícula de ouro. Para controle, 200 μ L de suspensão bacteriana foi adicionado a 800 μ L de água ultrapura. Com o auxílio de um vórtex, a mistura foi agitada a 500 rpm por 15 minutos. Logo após, cerca de 5 μ L foi gotejado sobre uma grade de cobre 400 mesh, coberta com um filme suporte de resina formvar e secas a temperatura ambiente e analisadas por microscopia eletrônica.

4.5.4 Atividade antibacteriana

A ação das nanopartículas de ouro contra as bactérias *E. coli DH5α* e *S. aureus* 1117 foi avaliada utilizando a técnica de microdiluição em caldo, de acordo com adaptações na metodologia proposta por NCCLS, 2003. Inóculos de cada microrganismo foram preparados pelo método de crescimento em placa de ágar Muller Hinton. Com o auxílio de alça estéril, o inóculo foi transferido para uma placa de Ágar nutriente e incubado em estufa bacteriológica, por 24 horas a 37 °C (temperatura ótima de crescimento). Após 24 horas, cerca de 4 a 5 colônias foram tocadas com o auxílio de uma alça de platina e transferidas para salina estéril, cuja turbidez foi ajustada de modo visual, até coincidir com a da solução padrão de MacFarland 0,5, correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

A concentração do inóculo foi ajustada em caldo Muller Hinton para cerca de 10^4 UFC/mL. A solução estoque de cada nanopartícula estava na concentração resultante após a síntese (Tabela 6). Em uma microplaca de 96 poços, 100 µL da mistura de caldo e bactéria foi adicionada nos poços juntamente com 100 µL de cada colóide nas devidas concentrações. Para garantir que a possível atividade antimicrobiana se deu devido as nanopartículas, as soluções redutoras foram testadas nas mesmas concentrações utilizadas na síntese. Poços contendo apenas meio e bactéria foram destinados ao controle positivo e considerados como crescimento 100%. Poços com meio e nanopartículas foram destinados ao controle de esterilidade das mesmas, e poços contendo nanopartícula e água como branco para a leitura da absorbância (ZHAO et al., 2010).

A placa foi incubada em um agitador shaker, com aquecimento, a 37°C, por 24 horas a 200 rpm. A leitura dos resultados se deu inicialmente de forma visual, e posteriormente pela leitura da absorbância dos poços a 600nm por um leitor de placa de ELISA (EZ READ 400 – BIOCHROM). Todo experimento foi realizado no mínimo em quadruplicata, e dados foram expressos em média de crescimento \pm desvio padrão da média (LEE et al., 2015).

Tabela 3. Nanopartículas testadas nos ensaios bacterianos

Nanopartículas testadas
AuNP com resina de <i>Virola oleifera</i> (1mL)
AuNP com resina de <i>Virola oleifera</i> (2mL)
AuNP com resina de <i>Virola oleifera</i> (3mL)
AuNP com citrato

4.5.5 Análise Ultraestrutural da Interação entre AuNP's e as Bactérias

As amostras foram então transferidas dos poços para eppendorfs e lavadas 3 vezes em PBS (temperatura ambiente) para remover o meio de cultura. Todas as lavagens foram feitas a 6000 rpm, por 1 minuto. O material foi então fixado com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M, por 2 horas em temperatura ambiente. Após fixado, foram realizadas 3 novas lavagens com tampão cacodilato 0,1M (10 min cada banho). A seguir, foi adicionando Tetróxido de Ósmio (OsO₄) em cacodilato 0,1M, para a pós fixação. A mistura foi deixada em capela, no escuro por 1 hora. Percorrido o tempo necessário, foi realizado uma nova seqüência de lavagens: 1 em tampão cacodilato 0,1 (pH 7,2-7,4) e 2 vezes em água destilada, sendo que cada banho foi de 10 min. Após tal processo, o material foi desidratado com banhos de acetona em concentrações crescentes (30, 50, 70, 90 e 100%), de 10 minutos cada. Após a desidratação, a amostra foi infiltrada com acetona 100% e Epon, na proporção de 1:1, por cerca de 24 horas. Após, foi feito a inclusão em epon puro, por 12 horas, para enfim ser emblocado em tubo beam, em estufa 60°C por 24 horas.

O material foi então cortado com o auxílio de um ultramicrotomo. Os cortes foram colocados sobre uma grade 400 mesh e contrastados.

Para *E. coli*, a contrastação se deu com 20 minutos de acetato de uranila 2% e 5 minutos com citrato de chumbo. Já para *S. aureus* 5 minutos com acetato de uranila 2% e 2 minutos com citrato de chumbo.

As grades foram então destinadas à Microscopia Eletrônica de Transmissão, e as imagens foram feitas em diferentes aumentos, a 120kV.

5 RESULTADOS

5.1 Otimização da Síntese Verde

O otimização da síntese verde se deu com base no planejamento fatorial, e a escolha dos parâmetros de síntese foram determinados com base na absorbância. A Figura 9 trata-se de um gráfico de absorção do ouro na sua forma iônica. Não ocorre absorção no visível, e por isso não será considerado nos gráficos de absorção das nanopartículas. Já a Figura 10 trás os valores de absorbância da solução de resina de *Virola oleifera* nas três concentrações utilizadas para a síntese (1, 2 e 3mL/10mL). Apesar de não muito intenso, com o aumento da concentração ocorre absorção na faixa de 500 a 540nm, e por isso, tais soluções foram utilizadas como branco para as leituras das AuNP's.

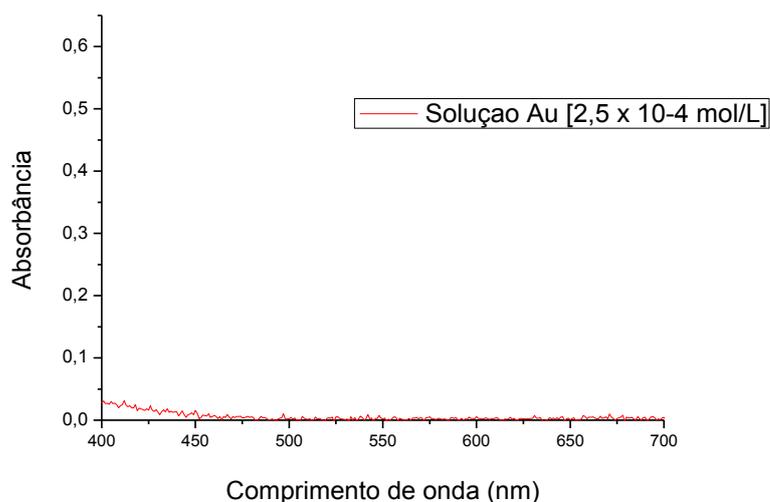


Figura 9. Absorbância solução de ouro na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L.

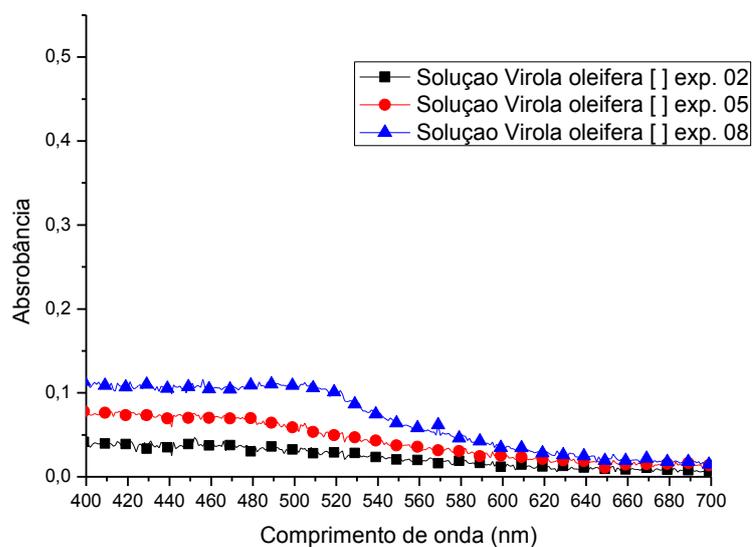


Figura 10. Espectro de Absorbância da solução de resina de *Virola oleifera* nas concentrações utilizadas nas sínteses

A Figura 11 ilustra o espectro de varredura dos 9 experimentos, onde foram variados o tempo de síntese e a concentração do agente redutor. Em complemento a este gráfico, utilizando os valores de absorbância como variável resposta, a análise estatística revela que apenas a concentração foi significativa para a reação. As variações de tempos utilizadas não levaram a diferenças estatisticamente significativas (Figura 12).

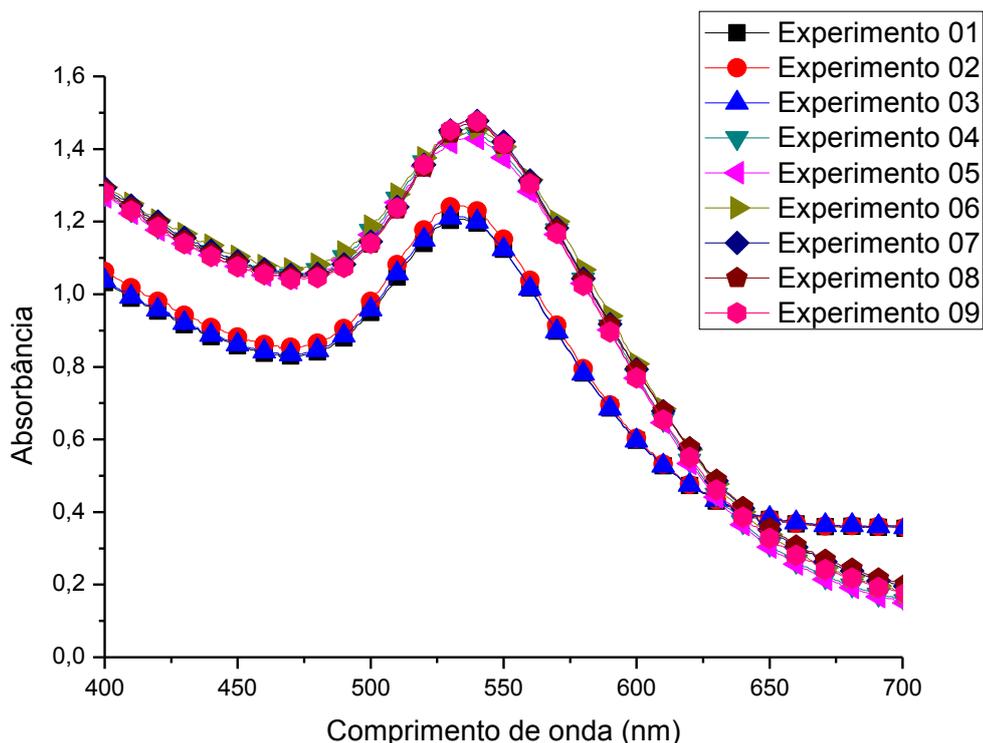


Figura 11. UV-Vis AuNP com resina de *Virola oleifera*. **Experimento 1:** 10mL de solução de Au na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 1 mL de solução de resina de *Virola oleifera* na concentração de 1g/L, por 10 minutos; **Experimento 2:** 10mL de solução de Au na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 1 mL de solução de resina de *Virola oleifera* na concentração de 1g/L, por 20 minutos; **Experimento 3:** 10mL de solução de Au na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 1 mL de solução de resina de *Virola oleifera* na concentração de 1g/L, por 30 minutos; **Experimento 4:** 10mL de solução de Au na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 2 mL de solução de resina de *Virola oleifera* na concentração de 1g/L, por 10 minutos; **Experimento 5:** 10mL de solução de Au na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 2 mL de solução de resina de *Virola oleifera* na concentração de 1g/L, por 20 minutos; **Experimento 6:** 10mL de solução de Au na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 2 mL de solução de resina de *Virola oleifera* na concentração de 1g/L, por 30 minutos; **Experimento 7:** 10mL de solução de Au na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 3 mL de solução de resina de *Virola oleifera* na concentração de 1g/L, por 10 minutos; ; **Experimento 8:** 10mL de solução de Au na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 3 mL de solução de resina de *Virola oleifera* na concentração de 1g/L, por 20 minutos; ; **Experimento 9:** 10mL de solução de Au na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 3 mL de solução de resina de *Virola oleifera* na concentração de 1g/L, por 30 minutos; Solução de resina de *Virola oleifera* na concentração de síntese utilizada como branco para cada leitura.

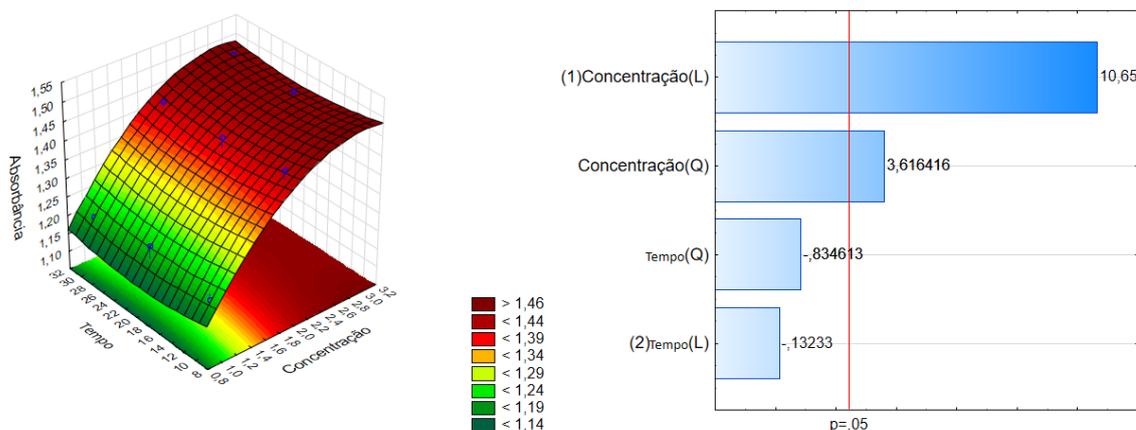


Figura 12. Gráfico de Superfície Resposta e Gráfico de Pareto do planejamento fatorial 3^2 para AuNP's com rerina de *Virola oleifera*; $p < 0,05$.

Segundo a análise de variância e os gráficos (Figura 12) tem-se que a variável tempo não foi significativa, enquanto a variável concentração foi significativa para todos os experimentos.

5.2 Atividade Antioxidante

Os resultados mostram que a resina de *Virola oleifera* tem grande atividade antioxidante contra os radicais estudados, em especial contra o DPPH, muito próxima ao observado pelo padrão Trolox ®. Tal fato pode estar diretamente relacionado aos compostos fenólicos presentes no material vegetal, em especial os taninos e flavonóides. A Tabela 4 ilustra os resultados para o ensaio de DPPH e ABTS.

Tabela 4. Concentração Inibitória 50% (IC50) - concentração necessária para inibir em 50% as espécies reativas – de AuNP com resina de *Virola oleifera*, de *Virola oleifera* e do padrão Trolox® para ensaios de DPPH e ABTS.

Amostra	IC50 (µg/ml) - DPPH	IC50 (µg/ml) – ABTS
AuNP com <i>V. oleifera</i>	34,61 ± 4,00	Nd
<i>V. oleifera</i>	8,80 ± 0,54	Nd
Trolox®	4,6 ± 0,82	1,08 ± 0,05

A Figura 13 ilustra a relação de inibição dos radicais por concentração de nanopartícula ou resina de *Virola oleifera*. Com o aumento na concentração observa-se aumento na atividade antioxidante. Após atuar da redução do ouro para a formação das nanopartículas o material vegetal perdeu parte de sua atividade antioxidante (AA%), no entanto as nanopartículas ainda têm AA% considerável. Observando o ensaio de DPPH, para a concentração de 50 µg/L, a resina pura inibiu 94,14% dos radicais DPPH, enquanto que o colóide inibiu 67,06%.

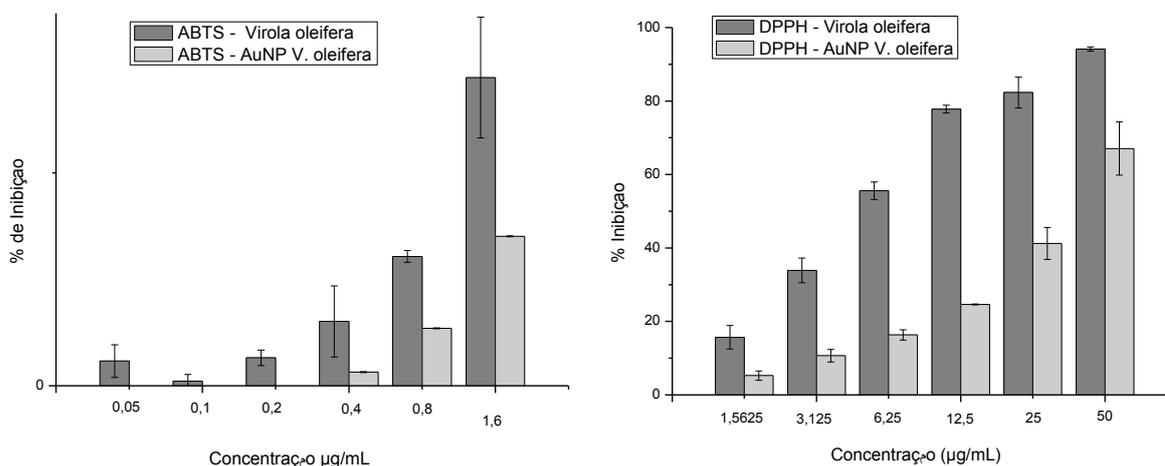


Figura 13. Atividade Antioxidante (AA%) das AuNP's sintetizadas com resina de *Virola oleifera* em comparação ao material vegetal puro. Ensaio de ABTS e DPPH.

5.3 Caracterização das AuNP's

5.3.1 UV-Vis

Uma vez que o tempo não foi significativo, apenas as variações de concentração foram levadas em consideração, e o tempo foi fixado em 10 minutos. A Figura 14 faz ai uma comparação entre os espectros obtidos pela síntese verde e pela rota tradicional. O padrão do espectro foi semelhante, as nanopartículas de ouro tiveram pico de absorbância em comprimentos de onda próximo, de modo que com a resina o pico variou de 532 a 540nm, e com citrato foi de 521nm. No entanto a intensidade de pico foi maior nas nanopartículas obtidas pela rota verde. Já quanto a base do gráfico (Figura 14), as AuNP's obtidas com o material vegetal apresentaram uma base mais alargada, e maior absorção por volta de 650nm, indicativos de maior variação de tamanho e possíveis aglomerados de partículas.

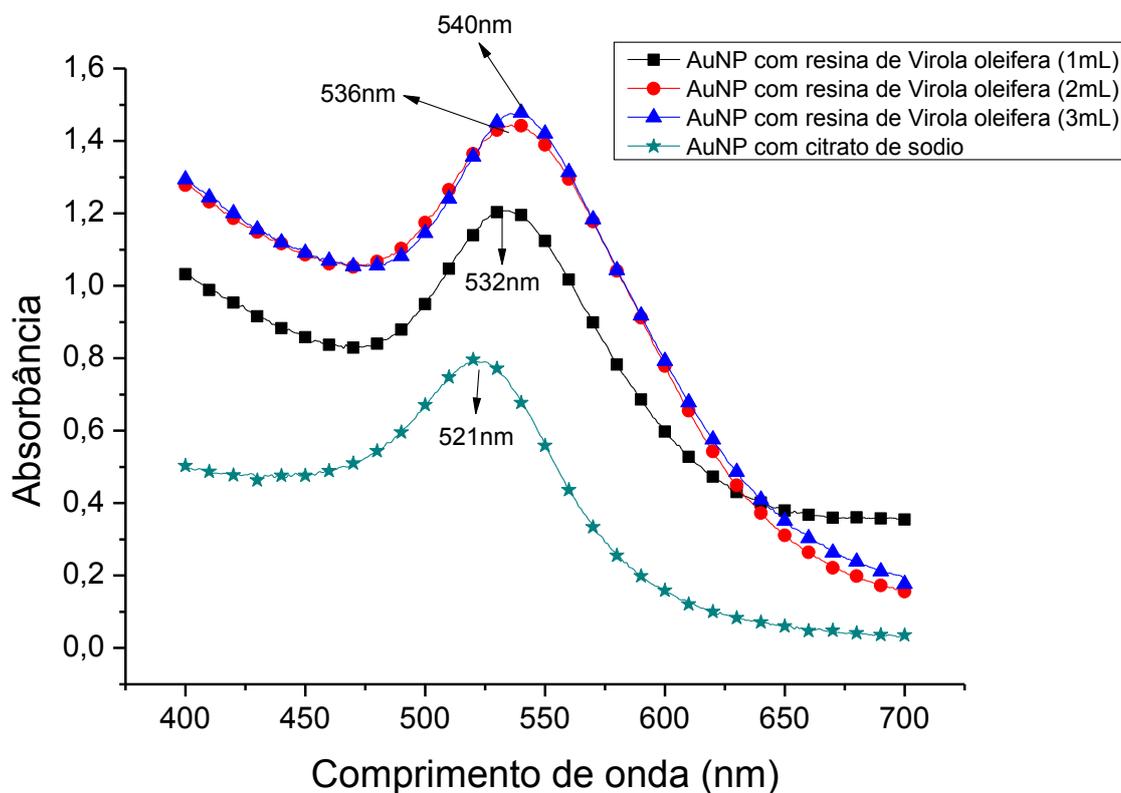


Figura 14. Absorbância das AuNP's sintetizadas com citrato de sódio em comparação às AuNP obtidas pela síntese verde. **[AuNP com resina de *Virola oleifera* 1mL]:** Experimento 1 - 10mL de solução de Au na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 1 mL de solução de resina de *Virola oleifera* na concentração de 1g/L, por 10 minutos; **[AuNP com resina de *Virola oleifera* 2mL]:** Experimento 4 - 10mL de solução de Au na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 2 mL de solução de resina de *Virola*

oleifera na concentração de 1g/L, por 10 minutos; **[AuNP com resina de *Virola oleifera* 3mL]:** Experimento 7 - 10mL de solução de Au na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 3 mL de solução de resina de *Virola oleifera* na concentração de 1g/L por 10 minutos; **[AuNP com citrato de sódio]:** 10mL de solução de Au na concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 1 mL de citrato de sódio a 1%.

A Figura 15 ilustra a diferença visual entre os colóides formados pela rota tradicional (citrato de sódio como agente redutor) e a rota verde (resina de *Virola oleifera* como agente redutor). As AuNP's sintetizadas com citrato deram a formação de colóide vermelho vivo, bem intenso, enquanto que o obtido com o material vegetal obteve tons mais próximos ao roxo.

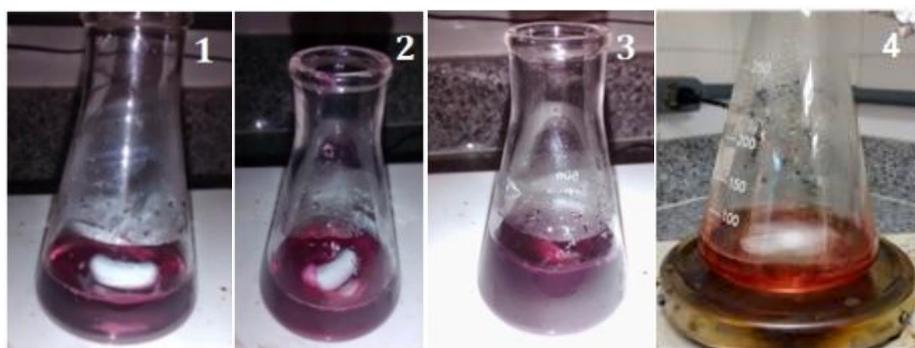


Figura 15. Ouro coloidal. 1 - AuNP sintetizada com 1mL de solução de resina de *Virola oleifera* 1g/L; 2 - AuNP sintetizada com 2mL de solução de resina de *Virola oleifera* 1g/L; 3 - AuNP sintetizada com 3mL de solução de resina de *Virola oleifera* 1g/L; 4 - AuNP sintetizada com 1 mL de citrato de sódio 1%.

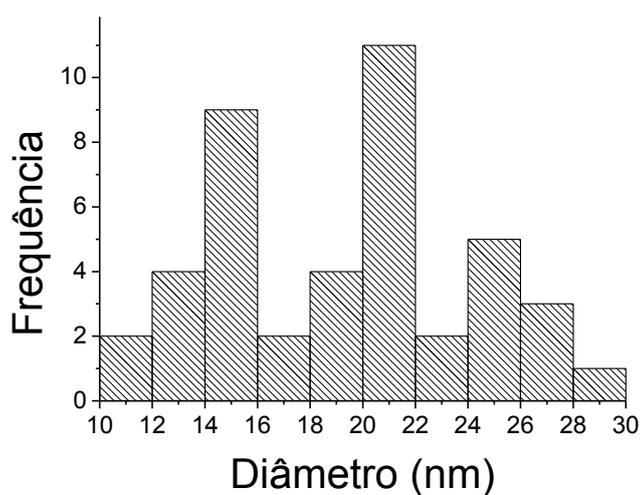
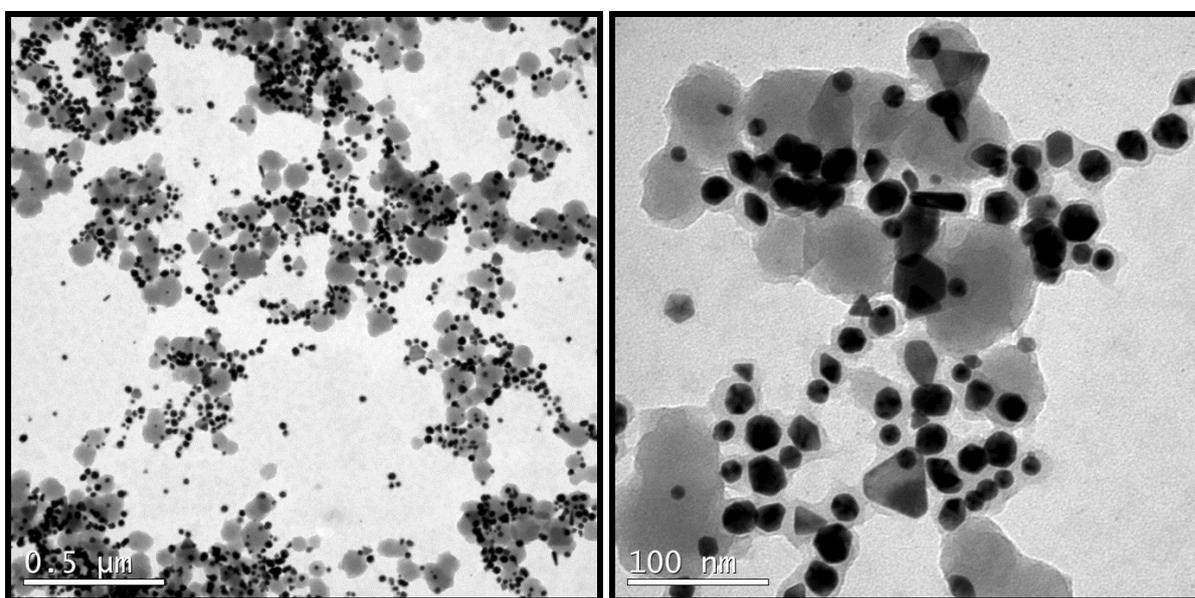
5.3.2 Potencial Zeta

As análises de Potencial Zeta (PZ) mostram que as nanopartículas possuem estabilidade moderada (SKOOG, 2002), e que as AuNP's sintetizadas com 1mL de *V. oleifera* pouca ou nenhuma agregação (-31,4 mV), seguidas pela de 2mL, citrato de sódio e 3mL (BRUNELLE, 1980). A Tabela 5 se refere aos valores de potencial zeta encontrados. Com o aumento da concentração do material vegetal ocorreu redução nos valores do potencial zeta.

Tabela 5. Estabilidade das nanopartículas com base em valores de potencial zeta.

Nanopartícula	Potencial Zeta (mV)
AuNP com resina de <i>Virola oleifera</i> (1mL)	- 31,40
AuNP com resina de <i>Virola oleifera</i> (2mL)	- 21,89
AuNP com resina de <i>Virola oleifera</i> (3mL)	- 16,96
AuNP com citrato	21,10

5.5.3. MET

**Figura 16.** [A]: Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) da amostra 1 (10mL solução de ouro a $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 1mL de solução de *Virola oleifera* a 1g/L, sob agitação de 600 rpm por 10 minutos). [B]: Histograma com distribuição de tamanho das nanopartículas.

As imagens de Microscopia confirmam a presença das nanopartículas metálicas. As AuNP's formadas com 1ml de agente redutor *V. oleifera* tiveram tamanho médio de 14-22nm. Já com 2 mL o tamanho médio foi de 12-18nm e com 3 mL de 10-24nm.

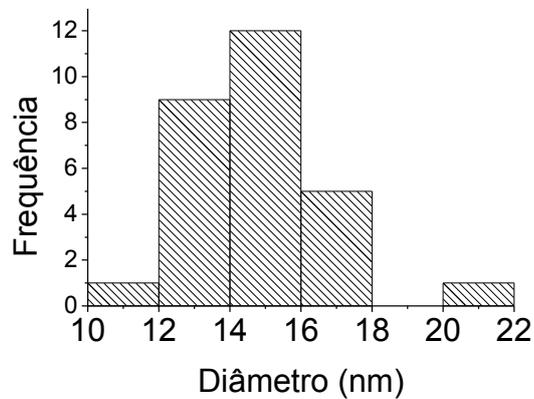
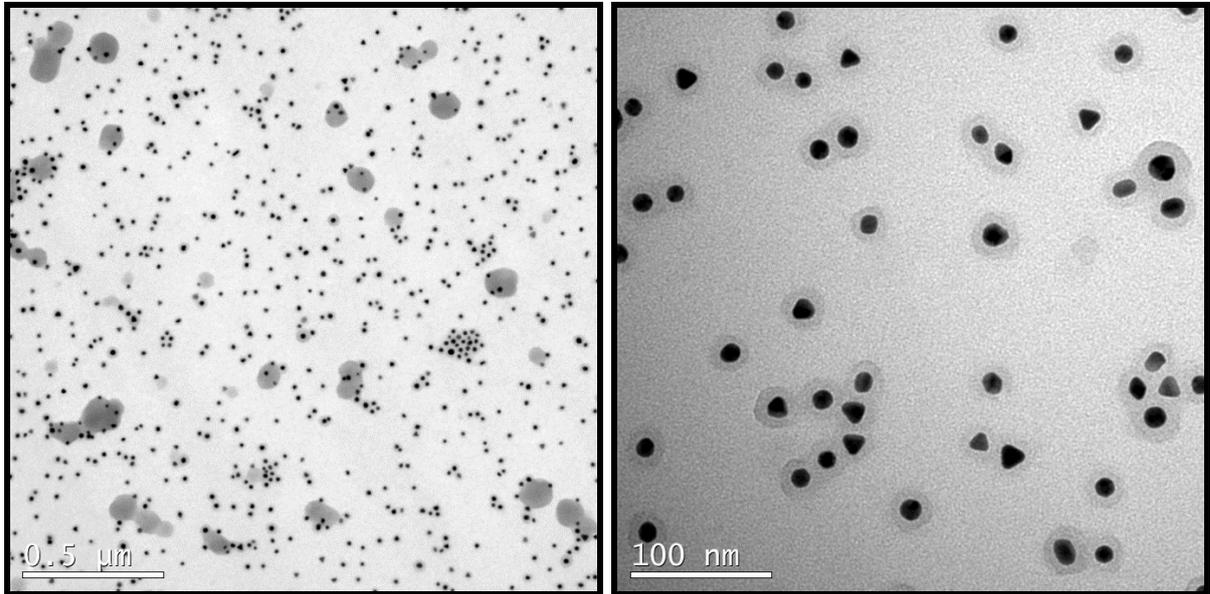


Figura 17. [A]: Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) da amostra 4 (10mL solução de ouro a $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 2mL de solução de *Virola oleifera* a 1g/L, sob agitação de 600 rpm por 10 minutos). **[B]:** Histograma com distribuição de tamanho das nanopartículas.

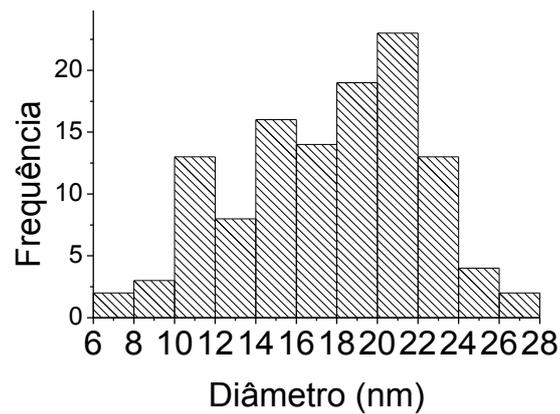
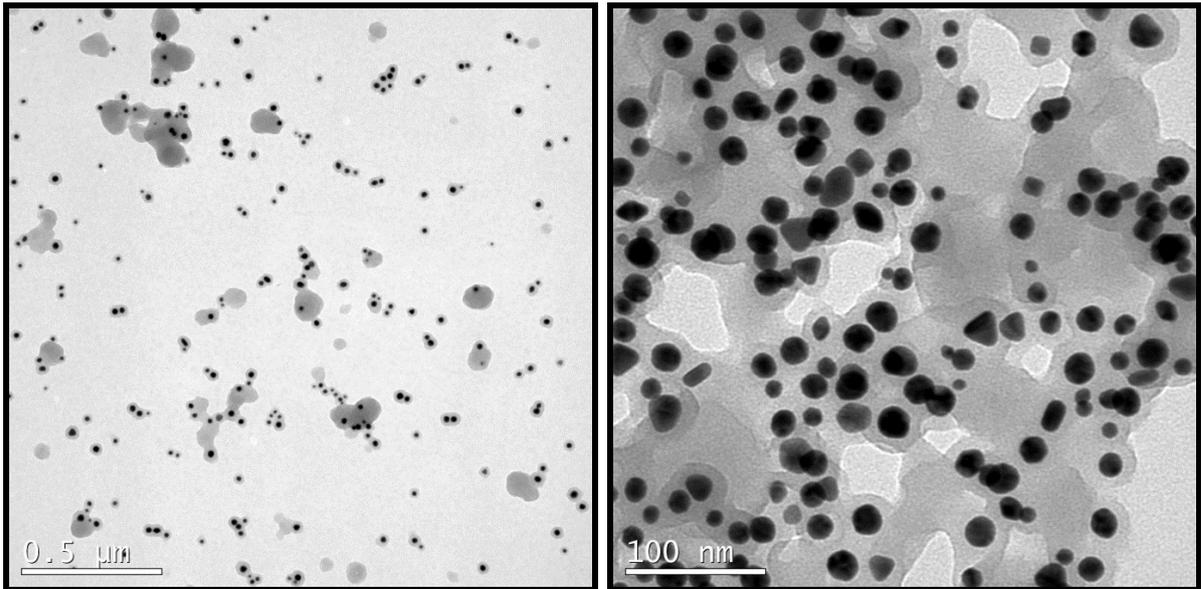


Figura 18. [A]: Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) da amostra 7 (10mL solução de ouro a $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 3mL de solução de *Viola oleifera* a 1g/L, sob agitação de 600 rpm por 10 minutos). [B]: Histograma com distribuição de tamanho das nanopartículas.

Em todas as condições de síntese, o uso da *V. oleifera* levou a formação de nanopartículas em formatos de esferas, triângulos, bastões, dentre outros. Dentre as AuNP's obtidas pela síntese verde, as menores partículas foram formadas com 2 mL do agente redutor, enquanto que as maiores com 1mL.

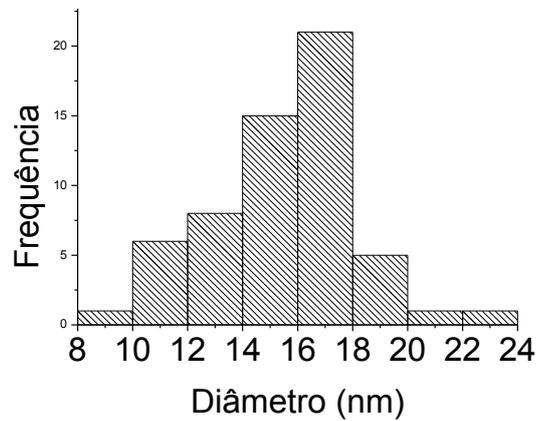
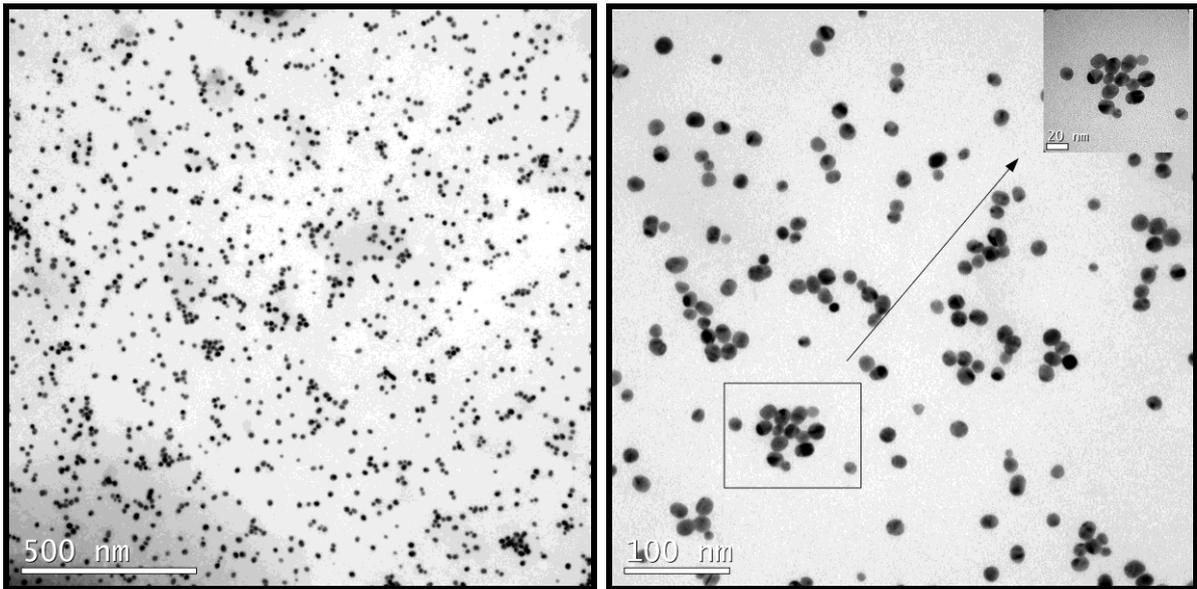


Figura 19. [A]: Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de AuNP's sintetizadas com citrato de sódio. (10mL solução de ouro a $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L + 1 mL de solução de citrato de sódio 10-3 g/mL , sob agitação de 600 rpm por 10 minutos). **[B]:** Histograma com distribuição de tamanho das nanopartículas.

As imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão mostram que as nanopartículas de ouro sintetizadas com citrato de sódio eram esféricas, estavam dispersas, sem a formação de aglomerados, e com pequena variação de tamanho. Possuíam tamanho médio de 16 nm, com variação de 8 a 24 nm, sendo que a maioria se encontra na faixa de 14 a 18nm.

5.5.4 EDS

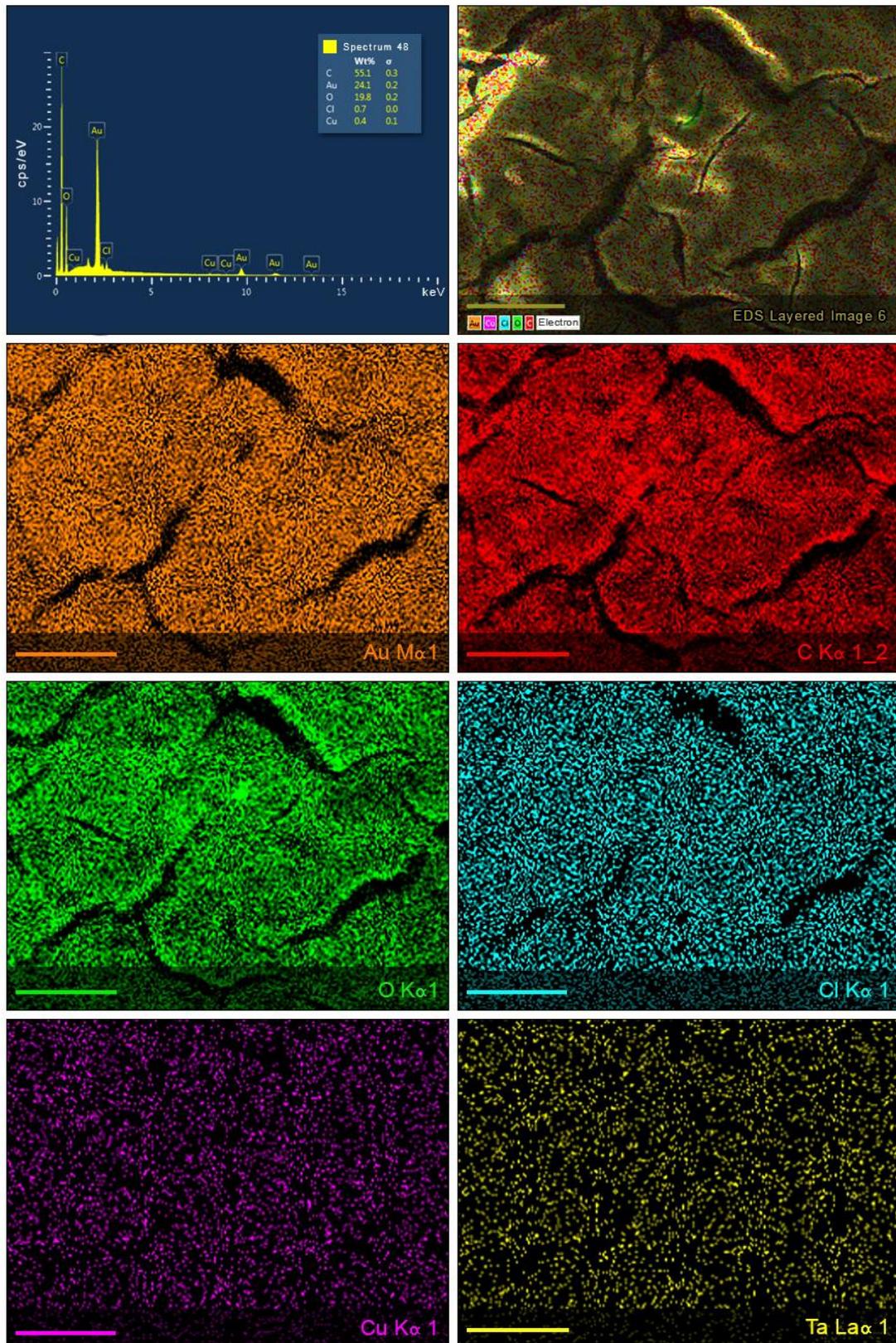


Figura 20. EDS AuNP com resina de *Virola oleifera*.

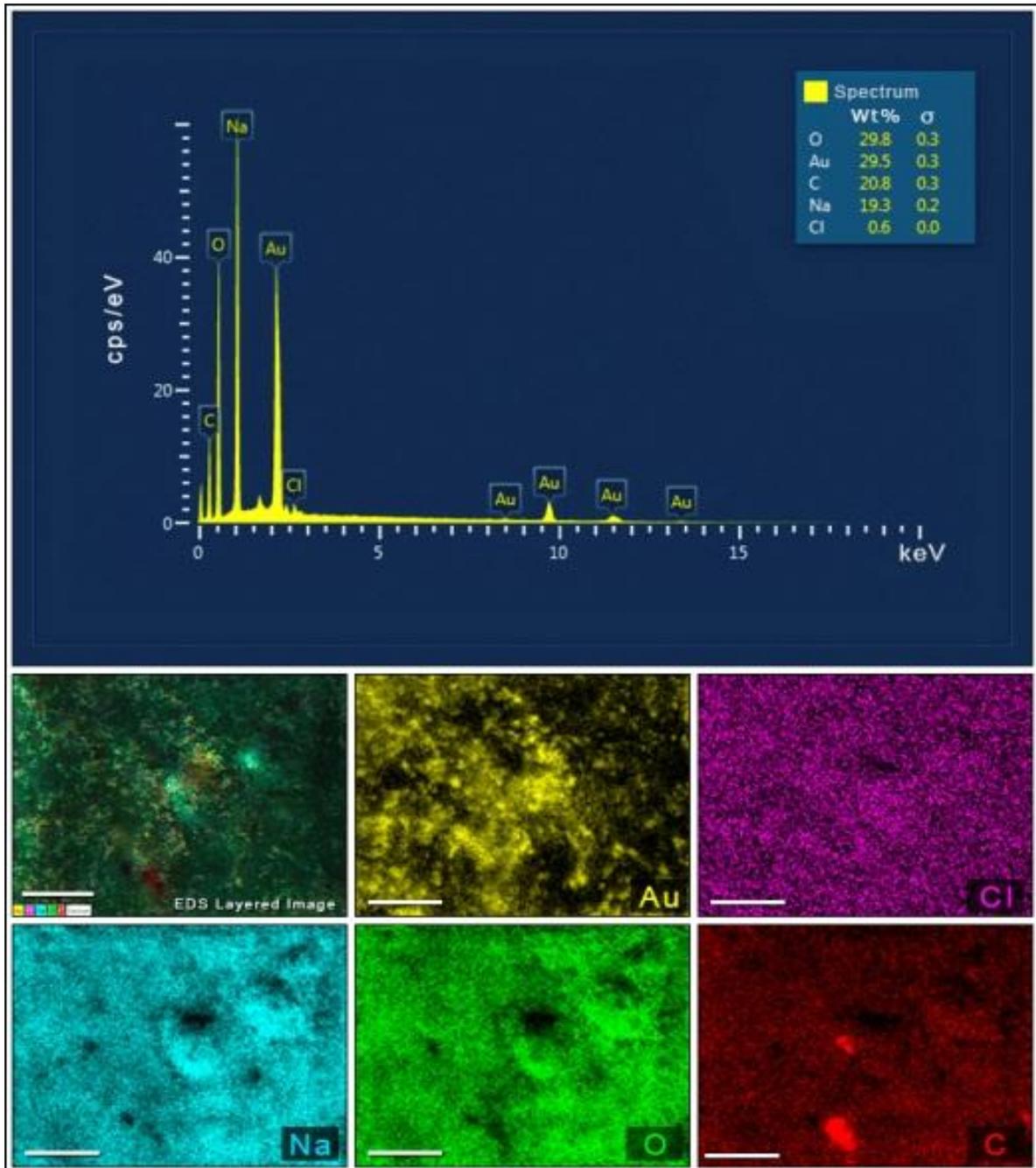


Figura 21. EDS AuNP com citrato de sódio.

As imagens do EDS mostram picos referentes ao Au, além de outros, com menor intensidade. Na Figura 20 também foram observados picos característicos dos elementos C, O, Cu, e Cl, assim como o observado na Figura 21 onde foram observados os elementos C, O, Na e Cl. Em ambas as AuNP's (*Virola oleifera* e

Citrato) foram observados picos por volta de 2,2 keV e outros de menor intensidade do elemento Au.

5.5.5 Infravermelho

A fim de investigarmos as possíveis interações entre as NP's e o extrato vegetal da *Virola oleifera*, foram realizadas análises de FTIR. A Figura 22 apresenta os espectros de FT-IR (sobreposta) das duas amostras, uma do extrato aquoso de resina de *Virola oleifera* e outra das nanopartículas metálicas reduzidas com o material vegetal. Uma análise comparativa entre os espectros na região do infravermelho indica a presença das principais bandas, com algumas pequenas distinções oriundas do processo de coordenação. A presença da absorção em 1044 cm^{-1} possivelmente está relacionada com vibrações de flexão C-H (Stuart 2004), já a banda em 1099 cm^{-1} está relacionada com o grupamento éster conforme descrito por (ALBUQUERQUE et al., 2003; MUTHUVEL et al., 2014). As bandas 1197 e 1280 cm^{-1} são referente ao estiramento vibracional C-O das ligações de álcoois que ocorrem em 1120 a 1205 cm^{-1} (TAVARES; PEREIRA, 2011). Outra banda é verificada em 1438 cm^{-1} que é atribuída a deformação axial dos grupos C-H alifáticos, conforme anteriormente relatado por (COSTA et al., 2014), assim como a banda 1517 cm^{-1} confirma a presença de estruturas aromáticas C=C (LOPES; FASCIO, 2004). A banda em 1600 cm^{-1} é característica de vibrações de flexão do grupo hidroxila (ROEGES, 1994, VIEN, Lin D et al, 1991), mas também pode estar relacionado a um grupo carbonila (STUART, 2004a). Um alongamento aromático é observado nas bandas 2666 e 2933 cm^{-1} , também observado por (KARTHISHWARAN et al., 2010; STUART, 2004b). A larga banda encontrada entre 3000 e 3400 cm^{-1} possivelmente está relacionada com vibrações de alongamento O-H ou uma amida primária CO-NH (STUART, 2004b). É válido lembrar que alguns deslocamentos encontrados em algumas bandas de absorção podem ser indicativo da coordenação do ligante ao íon metálico via oxigênio carbonílico.

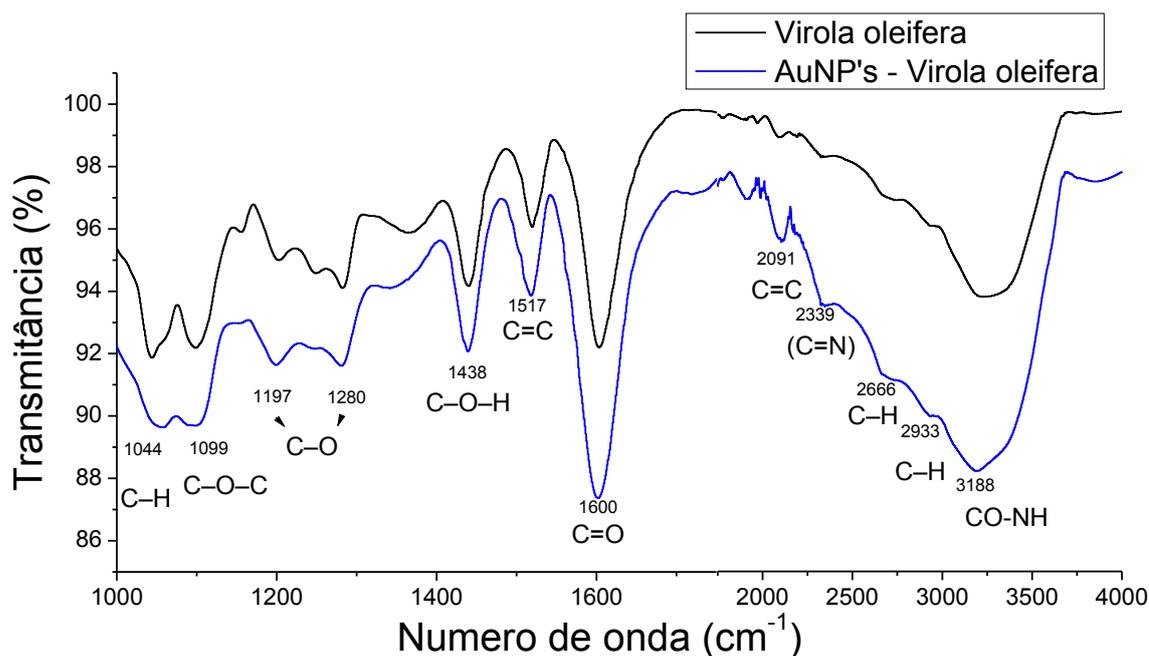


Figura 22. Espectro de Infravermelho do extrato de *Virola oleifera* (preto) e das nanopartículas de ouro funcionalizadas com resina de *Virola oleifera* (azul).

5.5.6 ICP-MS

Dentre as nanopartículas de ouro sintetizadas com resina de *Virola oleifera*, foi observado que conforme ocorreu aumento na concentração do agente redutor a concentração de ouro metálico foi menor (Tabela 6). A maior concentração de Au⁰ (56,6 mg/L) foi obtido na síntese com 1mL da solução de resina de *Virola oleifera*, seguido de 48,9mg/L (2 mL de *V. oleifera*) e 40,9 mg/L (3 mL de *V. oleifera*). Quando se compara a eficiência da síntese verde com a redução pelo citrato de sódio, nota-se que uma maior concentração (mg/L) de nanopartículas foi formada utilizando o material vegetal. A síntese com citrato de sódio levou a formação de apenas 20,6 mg/L de ouro metálico (Tabela 6), cerca de metade da concentração obtida com a síntese verde.

Tabela 6. Concentração de AuNP's (mg/L) por análise de ICP-MS

Amostra	Concentração mg/L
AuNP com resina de <i>Virola oleifera</i> (1mL)	56,6
AuNP com resina de <i>Virola oleifera</i> (2mL)	48,9
AuNP com resina de <i>Virola oleifera</i> (3mL)	40,9
AuNP com citrato	20,6

5.6 Atividade Antimicrobiana

5.6.1 Teste de esterilidade

Nenhuma amostra de nanopartícula e de agente redutor estava contaminada.

5.6.2 Interação Rápida

Foi observado que existe forte interação entre as nanopartículas e as bactérias. Com o curto espaço de tempo foi observado que as AuNP's sintetizadas com *Virola oleifera* tendem a se aproximarem da membrana dos microrganismos. A Figura 23 é referente ao controle da bactéria gram positiva. É possível observar o formato circular característico, a organização em cachos, e a integridade da mesma. O controle da bactéria gram negativa está ilustrado na Figura 26. Foi observado formato característico de bastão, tamanho médio de 1,5 a 2nm, e que se encontravam de forma isolada.

A Figura 24 mostra a interação rápida (5 min, 500rpm) entre AuNP's sintetizadas com resina de *Virola oleifera* e *Staphylococcus aureus*. Nota-se uma tendência de aproximação entre a bactéria e as nanopartículas, que permanecem aderidas ou bem próximas. Um comportamento semelhante foi observado frente à bactéria Gram negativa (Figura 27). Em relação à AuNP obtida com citrato, um comportamento semelhante foi observado frente à *S. aureus* e *E. coli*. Na Figura 25 nota-se que as nanopartículas, no curto espaço de tempo também se aglomeraram ao redor da

membrana da bactéria. Já frente a bactéria Gram negativa, as bactérias se apresentaram próximas ao microrganismo, apesar de a interação com a membrana ser aparentemente menor (Figura 28).

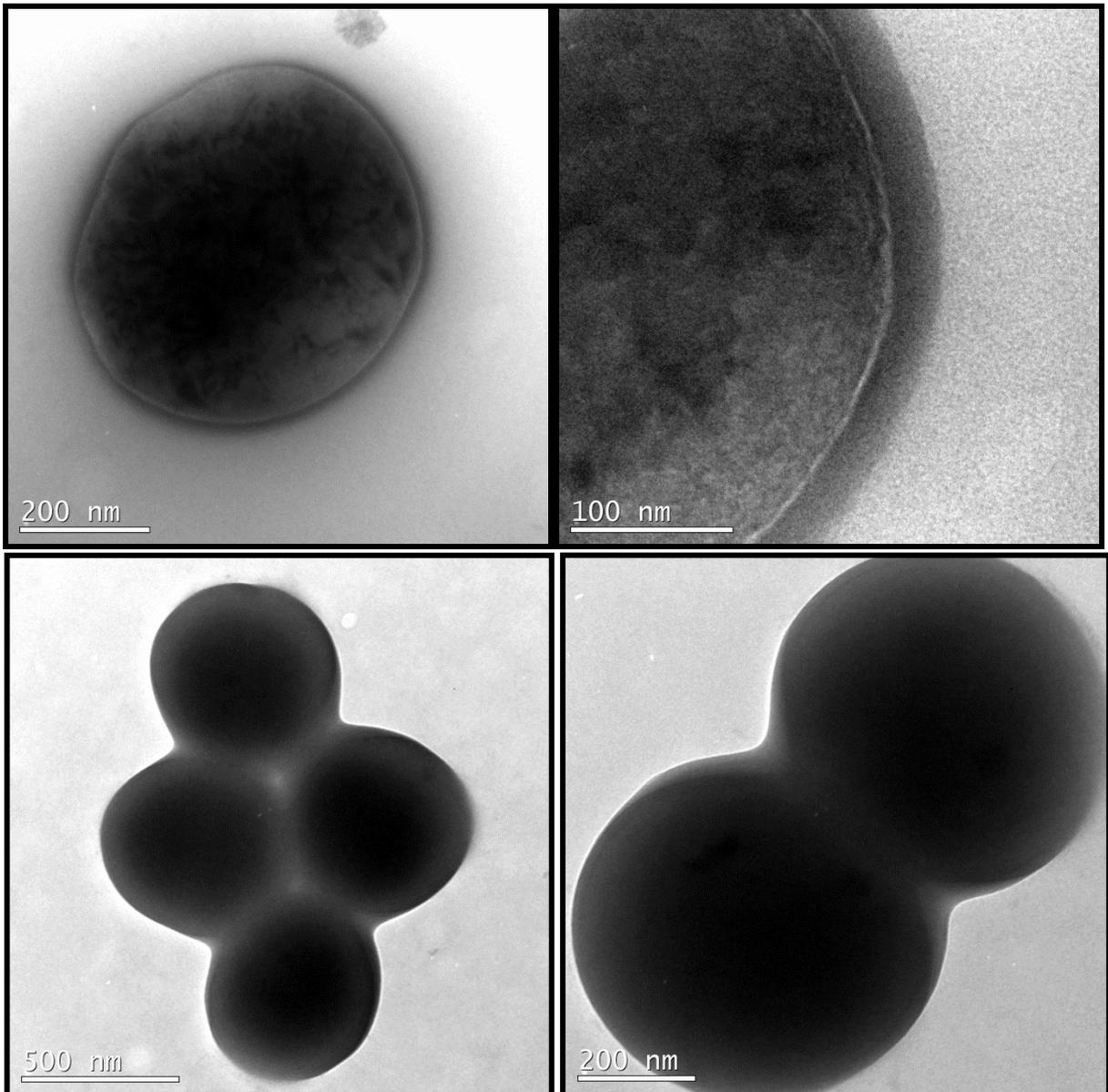


Figura 23. Controle: imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão de *Staphylococcus aureus* sem processamento.

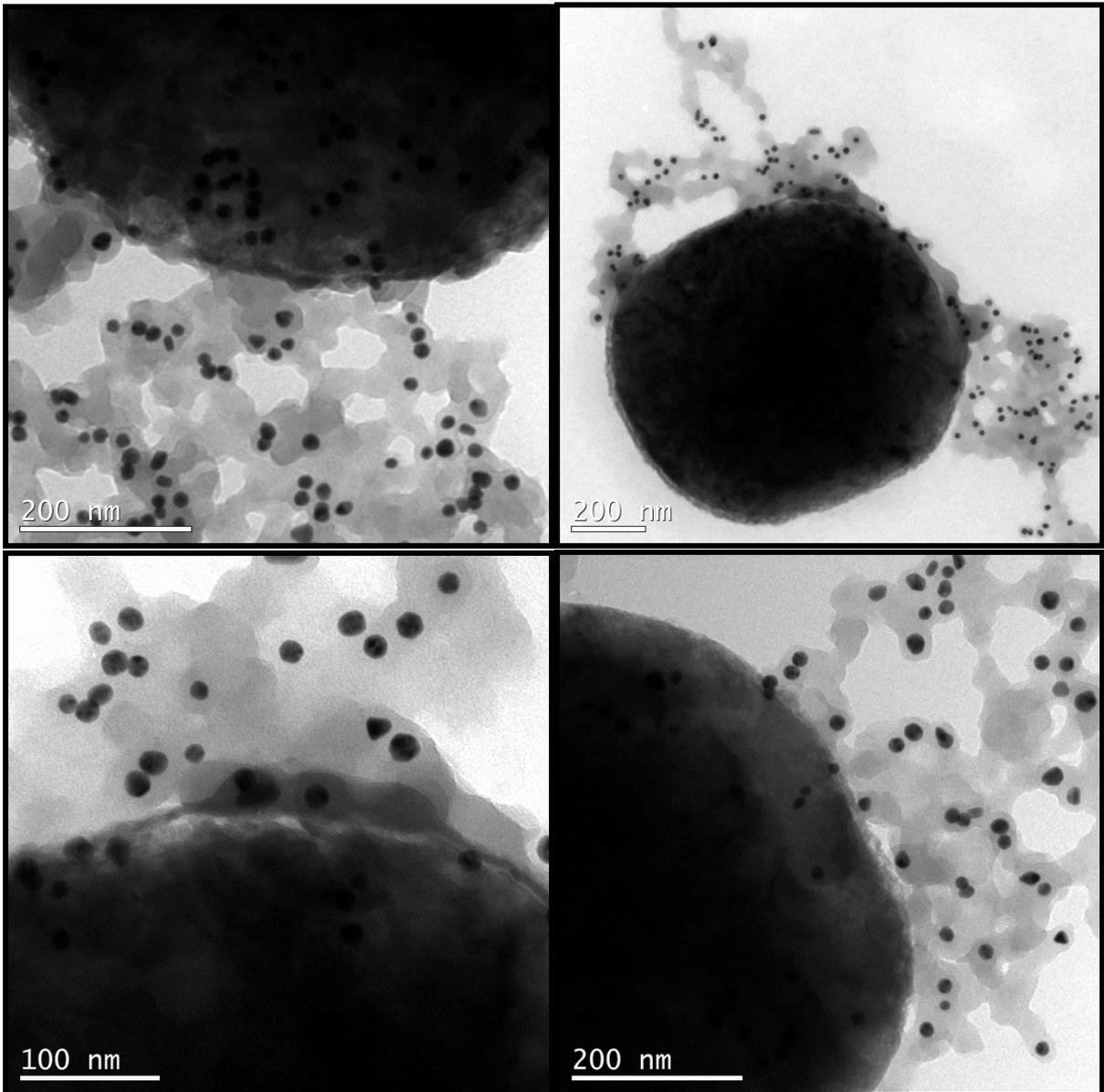


Figura 24. Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão em diferentes aumentos, para interação entre *Staphylococcus aureus* e AuNP's com *Virola oleifera*, sem processamento.

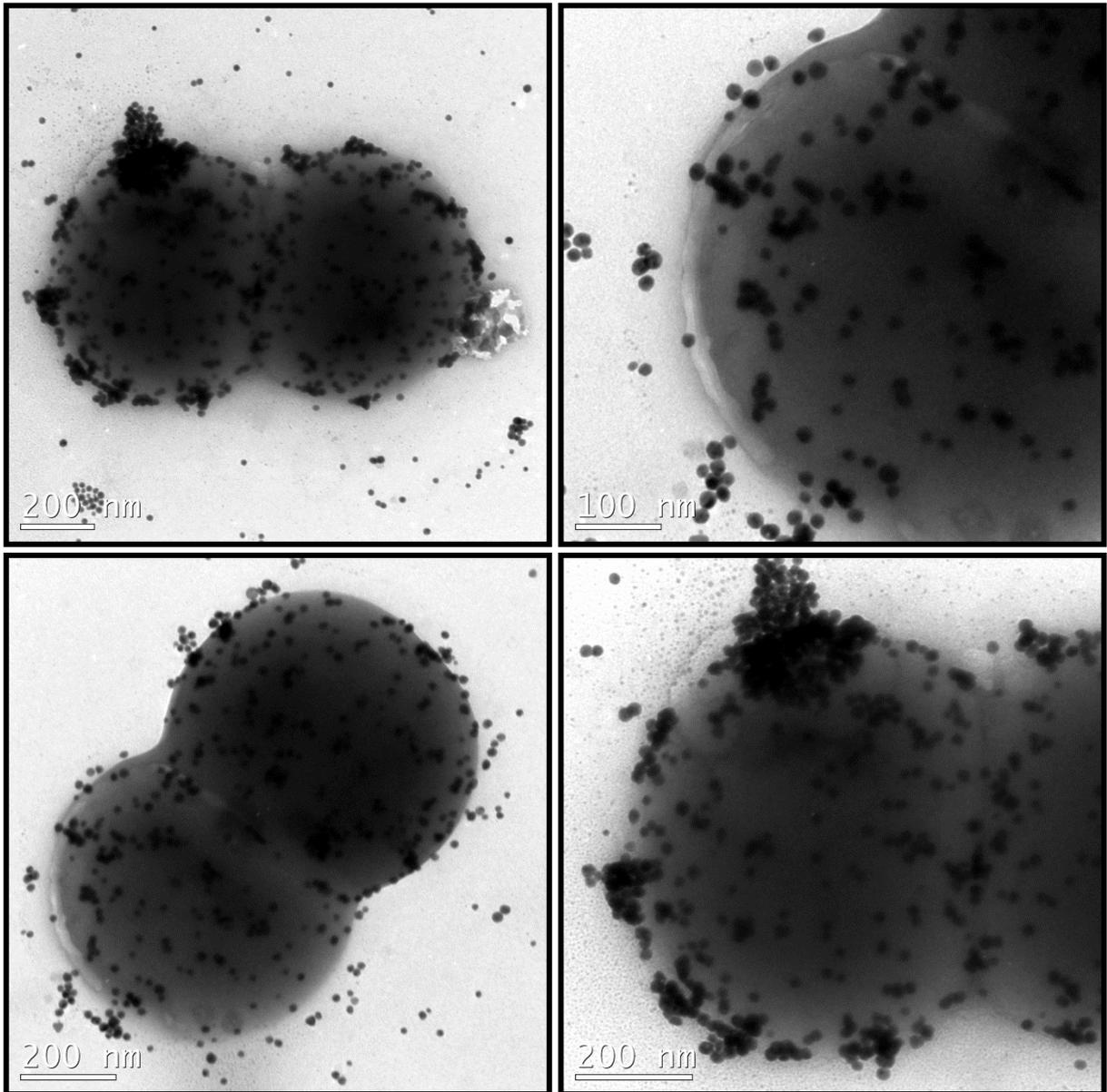


Figura 25. Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão em diferentes aumentos, para interação entre *Staphylococcus aureus* e AuNP's com citrato, sem processamento.

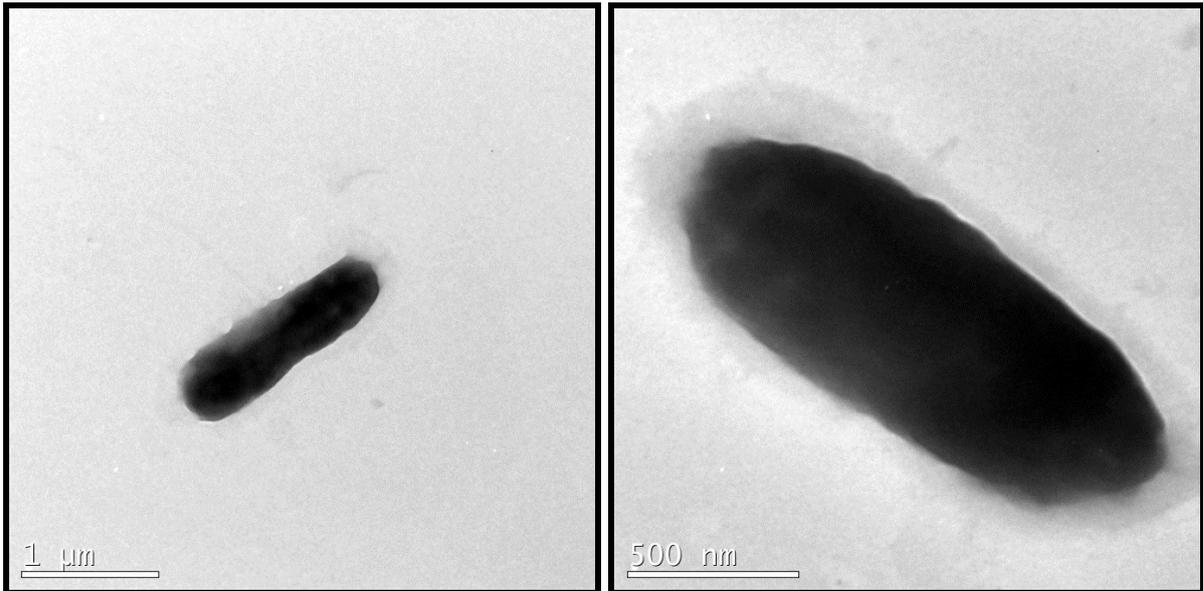


Figura 26. Controle: imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão de *E. coli*, sem processamento.

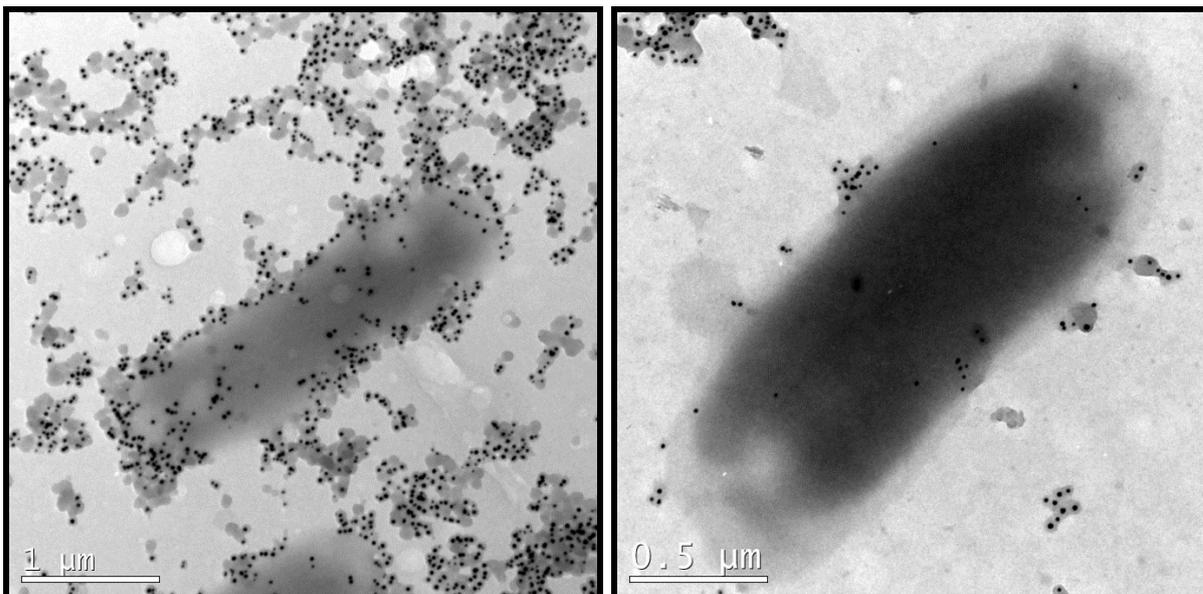


Figura 27. Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão em diferentes aumentos, para interação entre *E. coli* e AuNP's com *Virola oleifera*, sem processamento.

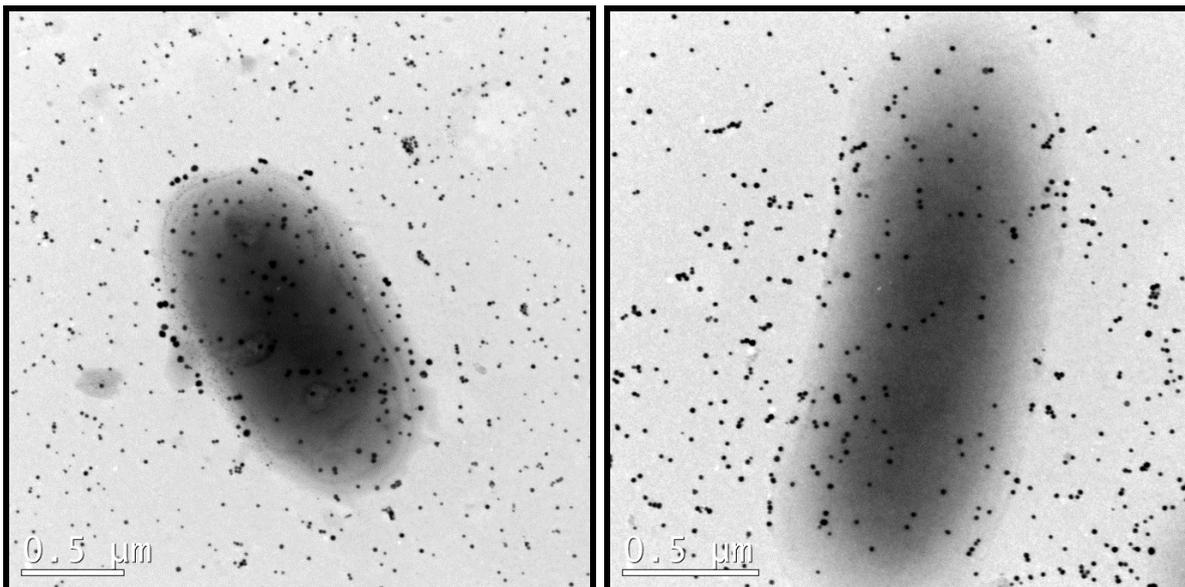


Figura 28. Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão em diferentes aumentos, para interação entre *E. coli* e AuNP's com citrato de sódio, sem processamento.

5.6.3 MIC

A atividade antibacteriana foi observada apenas para *S. aureus*. A Figura 29 mostra os valores de absorvância obtidos em vários tratamentos em comparação ao controle positivo (crescimento máximo, 100% de *S. aureus*). As nanopartículas sintetizadas com citrato de sódio não inibiram o crescimento nem do microrganismo Gram negativo, nem do Gram positivo. Dentre as nanopartículas obtidas pela síntese verde, observou que com o aumento na concentração de *Virola oleifera* utilizada, maior foi a inibição do crescimento de *S. aureus*, de modo que quando se utilizou apenas 1 mL da solução de agente redutor não foi observado inibição considerável (10,56%). Com 2 mL, a inibição foi de cerca de 65,99%. Já com AuNP's sintetizadas com 3mL de resina, a inibição foi de cerca de 80% do crescimento da *S. aureus* (Tabela 7). A Figura 30 compara a inibição da nanopartícula com a do material vegetal puro, na mesma concentração da utilizada para a síntese. Observa-se que ambas inibem com a mesma intensidade o crescimento da bactéria, com exceção da condição de 1 mL, onde foi observado que o extrato sozinho inibe cerca de 42,49% do crescimento, enquanto que a nanopartícula apenas 10,56% . Já a Figura 31 mostra o crescimento de *E. coli* frente as nanopartículas testadas. Nenhuma nanopartícula foi capaz de inibir o

crescimento do microrganismo. Com base na Figura 32, observamos que nem mesmo o extrato sozinho foi capaz de reduzir ou inibir o crescimento da bactéria.

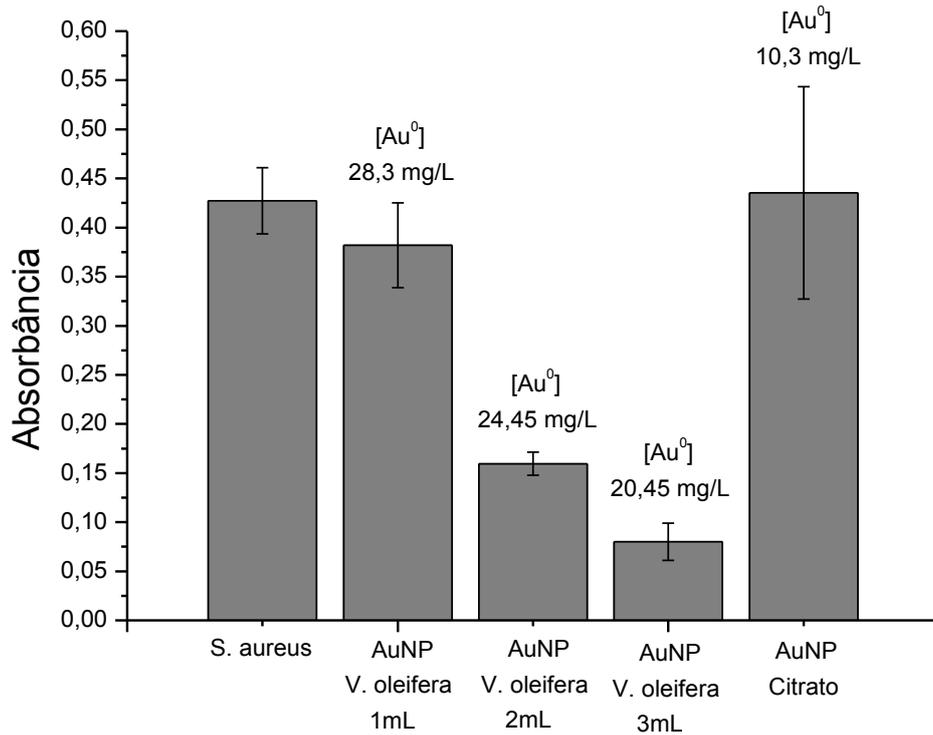


Figura 29. Crescimento de *Staphylococcus aureus*. Absorbância referente a taxa de crescimento; [**S. aureus**]: Crescimento máximo; [**AuNP Virola 1mL**]: Crescimento de *S. aureus* frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com 1 mL da solução de resina de *Virola oleifera*; [**AuNP Virola 2mL**]: Crescimento de *S. aureus* frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com 2 mL da solução de resina de *Virola oleifera*; [**AuNP Virola 1mL**]: Crescimento de *S. aureus* frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com 2 mL da solução de resina de *Virola oleifera*; [**AuNP citrato**]: Crescimento de *S. aureus* frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com citrato de sódio.

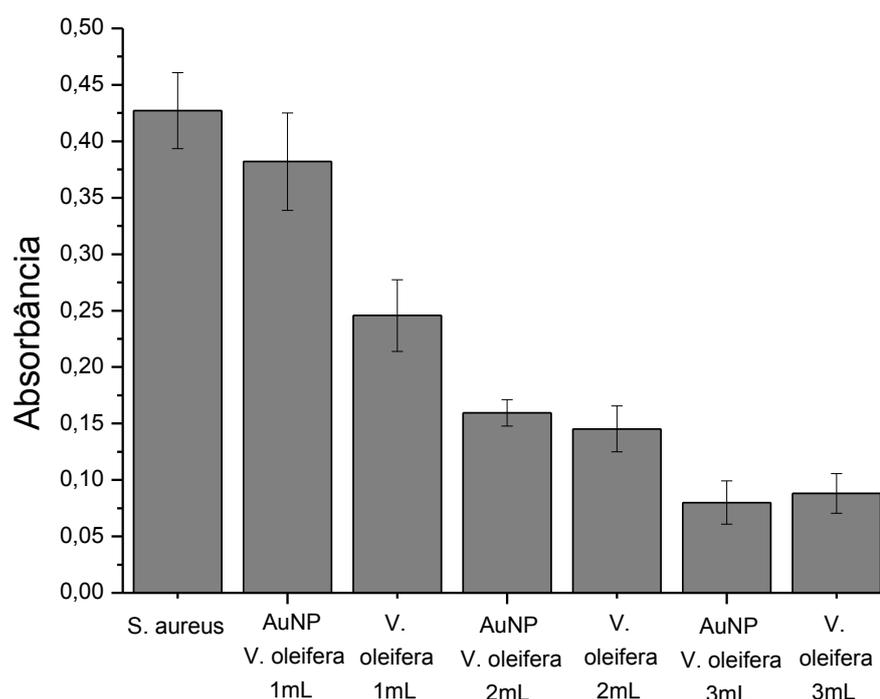


Figura 30: Crescimento de *Staphylococcus aureus*. Absorbância referente a taxa de crescimento; [**S. aureus**]: Crescimento máximo; [**AuNP Virola 1mL**]: Crescimento de *S. aureus* frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com 1 mL da solução de resina de *Virola oleifera*. [**V. oleifera 1mL**]: Crescimento de *S. aureus* frente solução de resina de *Virola oleifera* (1mL resina + 10mL de água ultrapura); [**AuNP Virola 2mL**]: Crescimento de *S. aureus* frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com 2 mL da solução de resina de *Virola oleifera*. [**V. oleifera 2mL**]: Crescimento de *S. aureus* frente solução de resina de *Virola oleifera* (2mL resina + 10mL de água ultrapura); [**AuNP Virola 3mL**]: Crescimento de *S. aureus* frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com 3 mL da solução de resina de *Virola oleifera*. [**V. oleifera 3mL**]: Crescimento de *S. aureus* frente solução de resina de *Virola oleifera* (3mL resina + 10mL de água ultrapura);

Tabela 7. Potencial Antimicrobiano de AuNP's e de solução redutora contra *S. aureus*. Média dos valores de absorbância com relação ao crescimento de *S. aureus* frente a diferentes nanopartículas sintetizadas com solução de resina de *Virola oleifera* e somente com o agente redutor. Desvio padrão da média com relação à absorbância. % de redução com relação ao crescimento 100% de *S. aureus*. Abs* - Absorbância.

Amostra	Abs*	Desvio Padrão	% Redução
AuNP <i>V. oleifera</i> 1mL	0,382	± 0,043067	10,56482
<i>V. oleifera</i> 1 mL	0,245625	± 0,031825	42,49342
AuNP <i>V. oleifera</i> 2mL	0,1595	± 0,011756	62,6573
<i>V. oleifera</i> 2mL	0,14525	± 0,020303	65,99356
AuNP <i>V. oleifera</i> 3mL	0,08	± 0,019056	81,27012
<i>V. oleifera</i> 3mL	0,088125	± 0,017602	79,36787

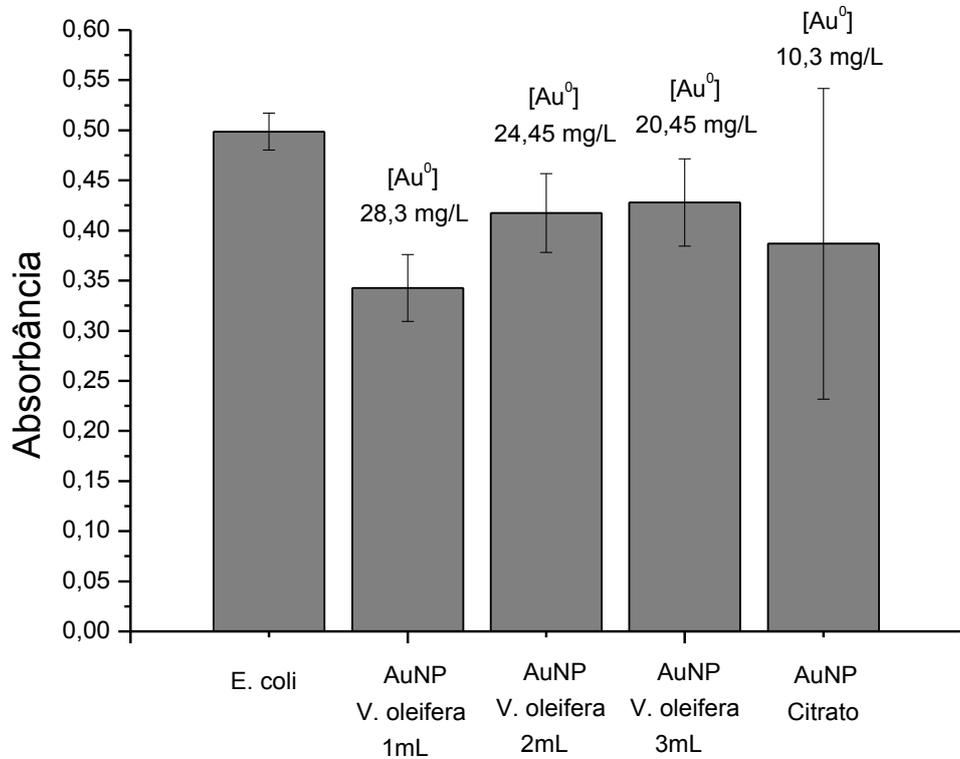


Figura 31. Crescimento de *E. coli*. Absorbância referente a taxa de crescimento do microrganismo; [***E. coli***]: Crescimento máximo; [**AuNP *Virola* 1mL**]: Crescimento de *E. coli* frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com 1 mL da solução de resina de *Virola oleifera*; [**AuNP *Virola* 2mL**]: Crescimento de *E. coli* frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com 2 mL da solução de resina de *Virola oleifera*; [**AuNP *Virola* 1mL**]: Crescimento de *E. coli* frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com 2 mL da solução de resina de *Virola oleifera*; [**AuNP citrato**]: Crescimento de *E. coli* frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com citrato de sódio.

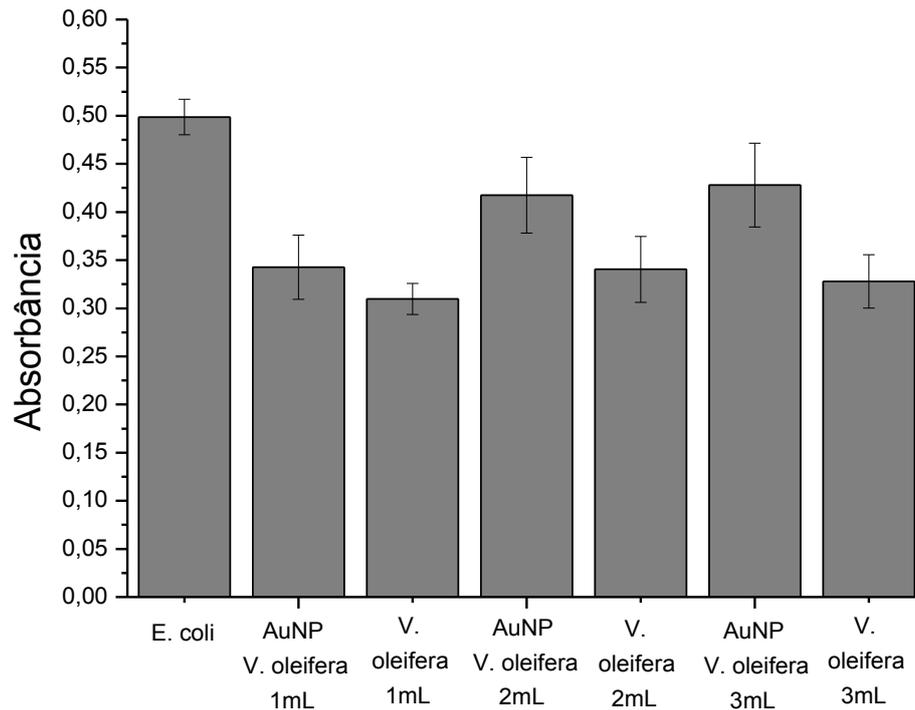


Figura 32. Crescimento de *E. coli*. Absorbância referente a taxa de crescimento do microrganismo; **[*E. coli*]**: Crescimento máximo; **[AuNP *Virola* 1mL]**: Crescimento de *E. coli* frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com 1 mL da solução de resina de *Virola oleifera*; **[*V. oleifera* 1mL]**: Crescimento de *E. coli* frente solução de resina de *Virola oleifera* (1mL resina + 10mL de água ultrapura); ; **[AuNP *Virola* 2mL]**: Crescimento de *E. coli* frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com 2 mL da solução de resina de *Virola oleifera*; **[*V. oleifera* 2mL]**: Crescimento de *E. coli* frente solução de resina de *Virola oleifera* (2mL resina + 10mL de água ultrapura); ; **[AuNP *Virola* 3mL]**: Crescimento de *E. coli* frente a nanopartículas de ouro sintetizadas com 3 mL da solução de resina de *Virola oleifera*; **[*V. oleifera* 3mL]**: Crescimento de *E. coli* frente solução de resina de *Virola oleifera* (3mL resina + 10mL de água ultrapura).

5.6.4 Análise ultraestrutural

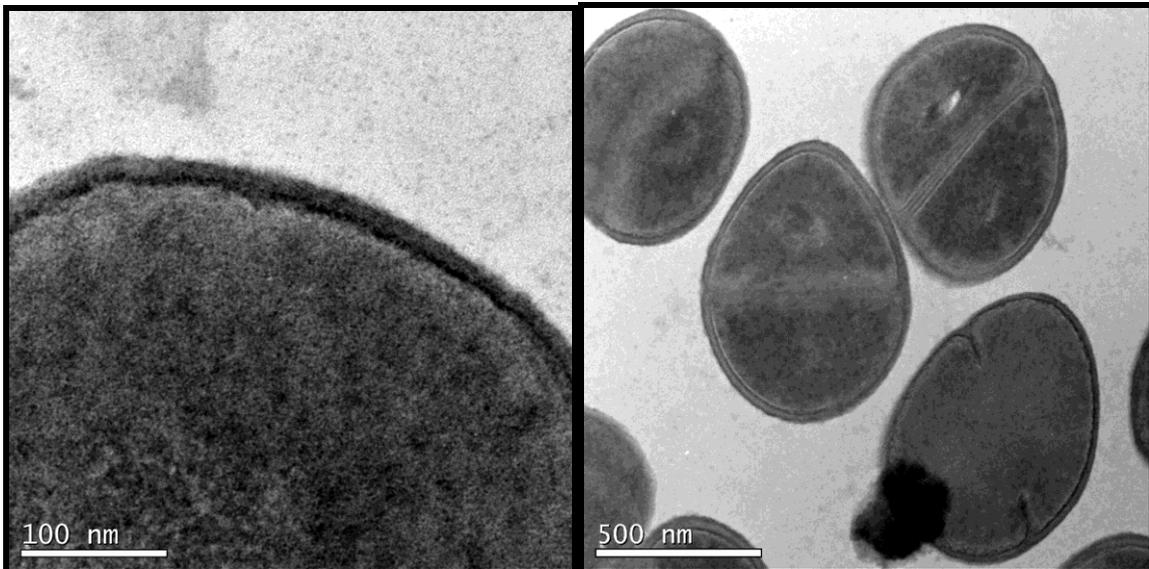


Figura 33. Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão de *S. aureus* após processamento e utilização de contraste.

Com o objetivo de avaliar possíveis danos estruturais, foram feitas imagens de MET *S. aureus*, após tratamento com AuNP *Virola* por 24 horas. Para fins comparativos, uma amostra contendo apenas *S. aureus* foi processada (Figura 33). Foi observado que a membrana se encontrava intacta, sem qualquer tipo de alteração. Já após o tratamento com AuNP's algumas alterações estruturais foram observadas. A Figura 34 mostra que as AuNP's *Virola* foram capazes de gerar danos na membrana da bactéria, e em alguns casos fazer com que houvesse perda de conteúdo da mesma.

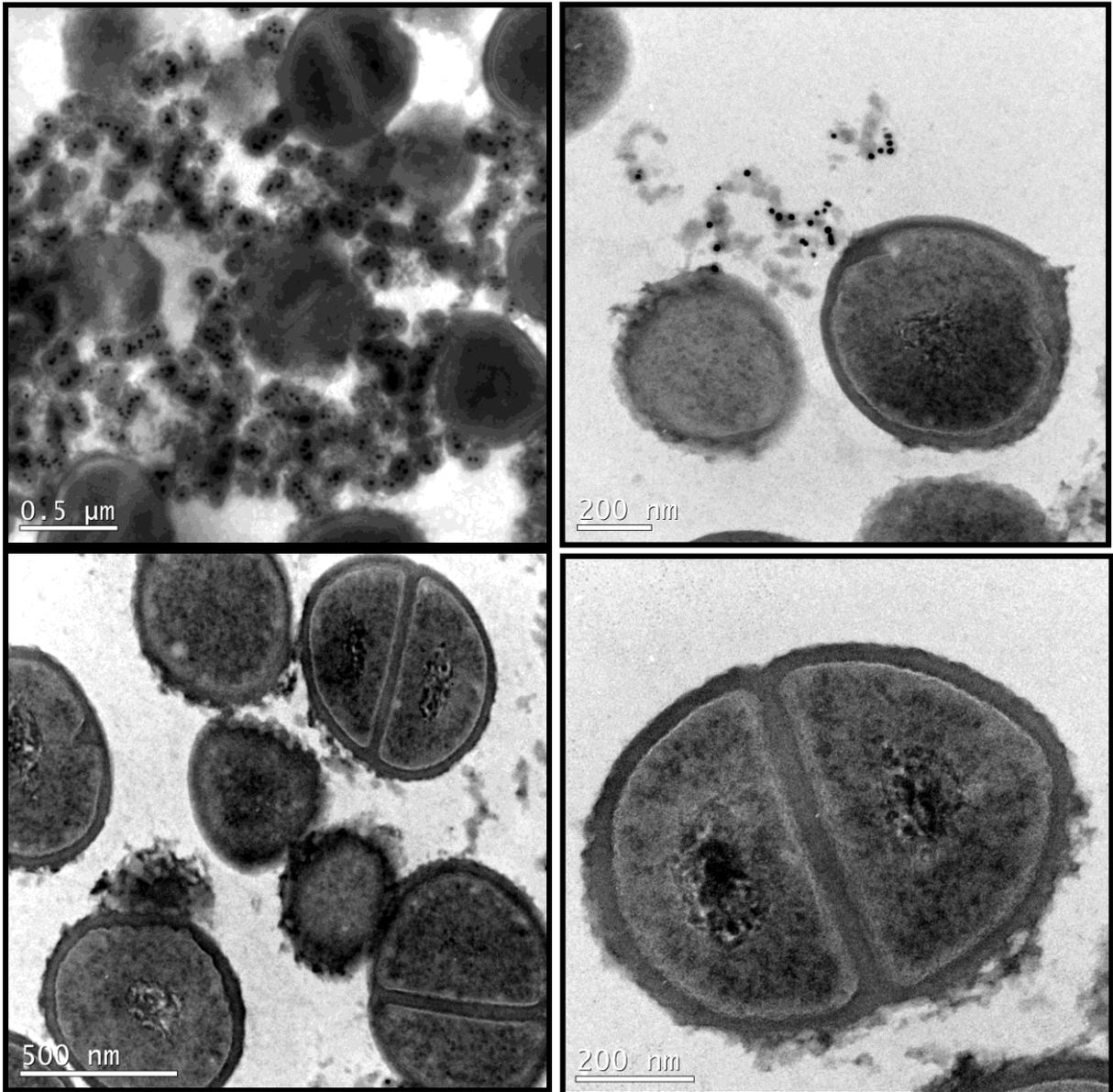


Figura 34. Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão de AuNP *Virola* com *S. aureus*.

6 DISCUSSÕES

O desenvolvimento de metodologias de síntese de AuNP's utilizando extratos naturais é de extrema relevância, principalmente no que tange sobre questões ambientais (GANESAN; PRABU, 2015). Se compararmos o material vegetal com o citrato de sódio (um agente redutor tradicionalmente utilizado) observamos que a resina de *Virola oleifera* foi capaz de levar a formação das AuNP's de forma satisfatória. O planejamento fatorial é uma ferramenta extremamente útil, e confirmou que a resina de *Virola oleifera* é um ótimo agente redutor, e uma

excelente alternativa para os reagentes tradicionalmente utilizados, como por exemplo, o citrato de sódio.

Neste estudo, o potencial efeito redutor da resina de *Virola oleifera* foi avaliado. Em todas as concentrações testadas a solução de *V. oleifera* foi capaz de reduzir o sal metálico. A atividade redutora dos materiais vegetais já vem sendo utilizada em diversos estudos que envolvem a síntese de nanopartículas metálicas (BAGHIZADEH et al., 2015; CAUERHFF; CASTRO, 2013; IRAVANI, 2011; ISAAC; SAKTHIVEL; MURTHY, 2013). Quanto às condições de síntese, a análise estatística mostrou que apenas a concentração do agente redutor foi significativa para o processo, ou seja, a reação se completou em um tempo igual ou inferior a 10 minutos, e por isso tempos maiores não modificaram as características das nanopartículas (Figura 12). Já com relação à concentração do agente redutor, foram observadas alterações no padrão do espectro com as alterações de volume de resina adicionadas. As Figura 12 e Figura 14 mostram que quanto maior a concentração de agente redutor adicionada, maior a intensidade do pico de absorbância. O espectro de varredura mostrou ainda que as nanopartículas de ouro sintetizadas pela rota verde tiveram pico de absorção entre 520 e 540nm. Tais bandas podem ser atribuídas à LSPR de AuNPs (AYAZ AHMED et al., 2014; ISAAC; SAKTHIVEL; MURTHY, 2013; KASTHURI; VEERAPANDIAN; RAJENDIRAN, 2009; LEE et al., 2015; PANIGRAHI et al., 2004). Uma vez que as propriedades eletrônicas e ópticas das nanopartículas são determinados por seu tamanho e forma (ASWATHY AROMAL; PHILIP, 2012; HENGLEIN, 1989), a posição do pico SPR está diretamente relacionada a tais características (BINDHU et al., 2014). A solução precursora contendo íons de ouro não apresentou banda característica SPR. Assim, pode concluir-se que a banda de SPR observada é devido apenas à formação de AuNPs (KASTHURI; VEERAPANDIAN; RAJENDIRAN, 2009).

Quando comparamos a síntese verde com a rota tradicional, observamos que ambas as reações ocorreram em intervalos de tempo semelhantes, no entanto o material vegetal não necessita de energia térmica. Sem aquecimento o citrato de sódio necessita de um tempo extremamente maior para completar a reação, além de dar origem a nanopartículas de maior tamanho e com formação de aglomerados. Com a resina de *Virola oleifera* a cor da solução mudou para roxo dentro de cerca

de 2 minutos, sem necessidade de aquecimento, tempo curto se comparado a outras metodologias que utilizam materiais vegetais, que chegam a levar horas e até dias (BINDHU; UMADEVI, 2014; DU; XIAN; FENG, 2011). A mudança de cor para tons que variam de vermelho a roxo confirma a formação do colóide de nanopartículas de ouro (AYAZ AHMED et al., 2014; DUBEY; LAHTINEN; SILLANPÄÄ, 2010), e ocorre devido à excitação de vibrações de plasmons de superfície em nanopartículas de ouro, uma propriedade característica (LINK; EL-SAYED, 1999; SHAMELI et al., 2012; SONG; JANG; KIM, 2009).

Quanto à forma e variação de tamanho, as nanopartículas sintetizadas com citrato de sódio foram mais homogêneas, e a grande maioria era esférica. Dentre as sínteses com *Virola oleifera* ocorreu maior variação de tamanho e forma. Com 2mL de agente redutor as AuNP's se mostraram com menor variação de tamanho, no entanto, em todas as condições foram observadas a formação de nanotriângulos e nanobastões, normalmente encontradas em síntese verde. Outros trabalhos envolvendo síntese verde também mostraram tal situação (BINDHU; UMADEVI, 2014; LOKINA et al., 2014; LEE et al., 2015) Utilizando extrato aquoso de *Inonotus obliquus* para a síntese de nanopartículas de ouro, obteve nanopartículas esféricas, triangulares, hexagonais e na forma de bastão, com diâmetro médio de 23nm. A formação de nanotriângulos pode estar envolvida com uma redução rápida e síntese em temperatura ambiente (HUANG et al., 2007; PHILIP, 2009). A temperatura desempenha um papel importante na formação das nanopartículas, e por isso na síntese com citrato de sódio tais formas não foram observadas (PHILIP, 2009). Para a obtenção de nanopartículas com distribuição de tamanho uniforme, é necessário que todos os núcleos sejam formados ao mesmo tempo. Uma vez formados sob as mesmas condições, os núcleos apresentam tamanhos muito próximo e crescem de maneira uniforme (GUIMARÃES DE CASTRO, 2009). Dentre os experimentos 1, 4 e 7 não foi observado grande variação de tamanho, onde a maior parte das nanopartículas tinham 10-25nm. Fato este que pode ser justificado pela pequena variação no padrão de absorbância. As maiores AuNP's foram encontradas com 3mL, o que justifica a localização do pico de absorbância, tendendo a regiões menos energéticas do espectro. Assim, a partir dos resultados pode-se inferir que a quantidade de extrato desempenha um papel crítico na determinação da distribuição do tamanho das nanopartículas de ouro.

As análises de EDS comprovaram a formação das AuNP's. Picos de em 2,2 keV são característicos de ouro metálico, enquanto outros de menor intensidade são referentes ao ouro em outros estados de oxidação (BINDHU et al., 2014). Sinais mais fracos de outros elementos são comuns, e podem ter sido originados das biomoléculas ligadas à superfície das nanopartículas, provenientes do agente redutor (LEE et al., 2015).

Quanto à intensidade do pico de absorvância, esta está relacionada à concentração das nanopartículas (HAISS et al., 2007). As nanopartículas obtidas com o extrato vegetal mostram picos mais intensos que as obtidas com citrato. Ao cruzarmos com as informações do ICP-MS, tal informação é confirmada, visto que a concentração de ouro metálico no colóide obtido com resina de *Virola oleifera* chega a ser o dobro do observado quando o ouro é reduzido com citrato de sódio.

A partir dos ensaios de DPPH e ABTS foi observado que a *Virola oleifera* tem forte atividade antioxidante, em especial contra os radicais DPPH, bem próximos do observado para o padrão Trolox®. Tal característica também está relacionada à capacidade de reduzir o ouro. Apesar de não existir uma relação linear, o mecanismo de redução do ouro pode se dar pela presença de substâncias com potencial antioxidante, comuns em extratos vegetais (ISAAC; SAKTHIVEL; MURTHY, 2013), fato este comprovado durante a síntese, que ocorreu de modo eficiente, com poucos minutos, sem a necessidade de aquecimento, como no caso da utilização do citrato de sódio, e outros materiais vegetais (AYAZ AHMED et al., 2014).

Os ensaios de atividade antioxidante mostraram ainda que apesar de em menor intensidade, as nanopartículas obtidas pela síntese verde também mostraram potencial antioxidante. A redução da atividade antioxidante é esperada, já que os compostos que conferem tal característica ao material vegetal são os mesmos responsáveis pela redução e estabilização do ouro. Existem diversos tipos de radicais e distintos alvos de oxidação. Por esse motivo é difícil selecionar apenas um método que seja capaz de representar a atividade antioxidante, com precisão, de um composto ou material vegetal (CHOI et al., 2002). Desse modo o DPPH e ABTS, juntos podem oferecer um resultado mais abrangente, no que se refere a AA%, o

que é fundamental na avaliação do potencial antioxidante, e funcionalização das nanopartículas.

Além de participarem da redução do ouro, a resina também atuou na funcionalização e estabilização das nanopartículas. Fato este evidenciado mais uma vez pelas análises de infravermelho. Espectros do infravermelho foram registrados para o extrato puro e para as AuNP's contendo o material vegetal. Eles mostram que existe uma similaridade no perfil do espectro de caracterização, indicando que a possibilidade de os compostos presentes no extrato do vegetal estarem funcionalizando a partícula metálica através de interações eletrostáticas irreversíveis. As bandas determinadas pelo infravermelho confirmam as moléculas encontradas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) como quercetina, pirogalol, epicatequina, eriodictiol, ácido ferúlico e ácido gálico (Dados ainda não publicados).

No que tange à estabilidade do colóide, sua relação é diretamente proporcional ao potencial zeta (PZ). O PZ reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (DUBEY; LAHTINEN; SILLANPÄÄ, 2010; LIAO; WU; LIAO, 2009). Foi observado que as nanopartículas de ouro sintetizadas utilizando a resina de *Virola oleifera* se possuem PZ negativo, e com valor absoluto maior, ou seja, apresentando maior estabilidade, se comparadas às sintetizadas com citrato de sódio. O valor do PZ indicou que as moléculas de nivelamento presentes na superfície de AuNP's são compostos principalmente de grupos carregados negativamente e também responsável pela estabilidade moderada das nanopartículas. Tal fato pode ser devido a presença de polifenóis, flavonóides e proteínas que são responsáveis pela estabilização das AuNP's. (AYAZ AHMED et al., 2014). Os flavonóides presentes no extrato de folha são agentes redutores fortes, que podem ser responsáveis pela redução de ácido cloroáurico. O grupo carboxilato presente em proteínas pode atuar como um agente tensoativo para fixar à superfície de AuNP e estabiliza-la através de estabilização eletrostática. Desse modo, verifica-se que *Virola oleifera* tem a capacidade de executar funções duplas de redução e estabilização da AuNP (MUTHUVEL et al., 2014). A

estabilidade de AuNPs é fundamental, principalmente para aplicação em estudos farmacológicos e biomédicos (UMA SUGANYA et al., 2015)

Os testes de interação rápida mostraram que as nanopartículas estudadas tem a tendência de se aproximarem da membrana das bactérias. Apesar de todas terem apresentado esse comportamento, o resultado do ensaio bacteriano foi distinto. As nanopartículas de ouro sintetizadas com citrato de sódio não foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus* e de *E. coli*. Já as nanopartículas de ouro sintetizadas utilizando resina de *Virola oleifera* como agente redutor mostraram grande atividade bacteriana contra as cepas de *S. aureus*, ou seja, contra o microrganismo Gram positivo, e nenhuma atividade contra *E. coli* (Figura 29 e Figura 31). Tal fato já foi observado em outros trabalhos. Lee et al. 2015 estudou a atividade antibacteriana de nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato aquoso de *Inonotus obliquus*, e observou maior atividade antibacteriana contra *S. aureus*, se comparado a *E. coli*. Bindhu et al., 2014, utilizando *Hibiscus cannabinus*, sintetizou nanopartículas de ouro com grande potencial antimicrobiano frente a *S. aureus*. As diferentes respostas das AuNP's frente às bactérias Gram positivas e Gram negativas possivelmente se dá devido a sua estrutura celular, fisiologia, metabolismo e a sua interação com as AuNP's carregadas (BINDHU; UMADEVI, 2014; BINDHU et al., 2014)

Conforme houve aumento na concentração de resina aumentou a atividade antimicrobiana. No entanto, se observarmos os valores do potencial zeta, quanto menor o valor, ou seja, menos negativo era a partícula, maior foi a atividade antibacteriana. Como os valores foram negativos, e *S. aureus* possui carga negativa, devido a composição de sua parede, rica em ácidos teicóicos, um menor valor favorece a interação entre as nanopartículas e o microrganismo (BINDHU et al., 2014).

Uma Suganya et al., 2015 observou que a atividade bacteriana das nanopartículas de ouro sintetizadas por uma rota verde, aumentou consideravelmente com o aumento da concentração das AuNP's, fato este não observado no presente estudo. Conforme a concentração de ouro reduzido era maior, menor foi a atividade antibacteriana (Tabela 7). O fato de a síntese com 1mL de *V. oleifera* (maior

concentração de ouro metálico) não ter inibido o crescimento de *S. aureus* como as demais pode ter ocorrido ou pela menor concentração do agente redutor, que foi consumido durante a redução do ouro ou devido ao valor mais alto de potencial zeta, negativo, que pode ter impedido que as partículas tenham se aproximado da bactéria, que também é negativa (CHWALIBOG et al., 2010).

A Figura 30 compara a atividade antibacteriana das nanopartículas com a do agente redutor, na mesma concentração, e mostra que a atividade antibacteriana é a mesma, ou seja, mesmo após reduzir o ouro, a resina de *Virola oleifera* funcionalizou de modo efetivo a partícula, que continua com alto poder antibacteriano. Uma vez que a atividade bactericida foi diretamente proporcional à concentração do agente redutor, está pode ser atribuída ao material vegetal. Uma vantagem no uso das nanopartículas é que podem penetrar as membranas celulares, aumentando o efeito bactericida e o direcionamento da droga, aumentando assim sua atividade biológica e química (BINDHU; UMADEVI, 2014). Um possível mecanismo está relacionado a capacidade de as AuNPs gerarem furos nas paredes das células bacterianas (LEE et al., 2015; RAI; PRABHUNE; PERRY, 2010). AuNP's menores são capazes de penetrar no interior das bactérias com maior facilidade (BINDHU; UMADEVI, 2014). Fato este observado nas imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão, onde é evidente que AuNPs causaram danos nas células por distorcer a parede celular bacteriana dando origem a buracos e a deformações da membrana celular, perturbando assim as funções bacterianas como a respiração, e permeabilidade, fato este já observado em outros estudos com AuNP's (LEE et al., 2015; RAI; PRABHUNE; PERRY, 2010; UMA SUGANYA et al., 2015; ZAWRAH; EL-MOEZ, 2011).

Embora, com malha grossa como peptidoglicano da parede celular nas bactérias Gram-positivas, as imagens do MET mostram uma acentuada destruição da membrana celular bacteriana, quando tratados com AuNPs, fato este já observado em outros estudos (UMA SUGANYA et al., 2015). As AuNPs podem inicialmente ficar ancorada na parede celular bacteriana, interagindo assim com a camada de peptidoglicano causando a quebra de ligações e entrando no interior da célula fazendo perfurações no exterior (PARASHAR et al., 2011; UMA SUGANYA et al., 2015). Pode também ser possível que as nanopartículas de ouro ligar-se ao DNA de

bactérias e inibem o desenrolamento e transcrição de DNA, portanto, promover a morte das bactérias (RAI; PRABHUNE; PERRY, 2010).

Devido ao seu tamanho e grande área de superfície, as AuNP's de produzir efeitos eletrônicos e estes efeitos podem aumentar a força de ligação das nanopartículas com as bactérias. Assim, as nanopartículas de ouro se ligam facilmente à membrana da célula e também têm a capacidade de penetrar no interior das bactérias, facilitando assim o contato com resina vegetal. Especulamos que os seguintes mecanismos podem ser responsáveis pela atividade antibacteriana das AuNP's. Sua ação está relacionada à concentração de resina utilizada, pois a ação inibitória não depende só do tamanho e da área de superfície, mas também do agente de proteção que estabiliza e funcionaliza a AuNP's, como já observado (MUTHUVEL et al., 2014).

7 CONCLUSÕES

- A resina de *Virola oleifera* na concentração de 1g/L, em todas as 3 variações de volume foi capaz de:
 - Reduzir o sal metálico em todas as condições avaliadas;
 - Dar origem a nanopartículas com diferentes formas (esferas, triângulos e bastões), diferente do citrato de sódio, que formou apenas esferas;
 - Reduzir uma maior concentração de ouro em comparação ao citrato de sódio;
- As nanopartículas mostraram potencial antioxidante, principalmente contra os radicais DPPH⁺ e potencial antimicrobiano contra a cepa de *S. aureus* 1117.

Com base nos resultados podemos concluir que a resina de *Virola oleifera* é uma excelente alternativa para a síntese de nanopartículas de ouro, e que além de reduzir o ouro ainda foi capaz de estabilizar e funcionalizar as NP's.

8 REFERÊNCIAS

ABREU, S. L. **Caracterização e dispersão em meio aquoso da α -Alumina com tamanho de partícula submicrométrico e nanométrico** ". [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO, 2011.

AHMAD, T. et al. Biosynthesis, structural characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 107, p. 227–234, 2013.

ALBERNAZ, V. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico**. [s.l.] UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, 2014.

ALBUQUERQUE, M. L. S. et al. Infrared absorption spectra of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil. **Vibrational Spectroscopy**, v. 33, n. 1-2, p. 127–131, 2003.

ARIAS, J. L. et al. Study of the stability of Kollidon® SR suspensions for pharmaceutical applications. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 338, n. 1-3, p. 107–113, 2009.

ASWATHY AROMAL, S.; PHILIP, D. Green synthesis of gold nanoparticles using *Trigonella foenum-graecum* and its size-dependent catalytic activity. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 97, p. 1–5, 2012.

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

BADWAIK, V. D. et al. Single-step biofriendly synthesis of surface modifiable, near-spherical gold nanoparticles for applications in biological detection and catalysis. **Langmuir**, v. 27, n. 9, p. 5549–5554, 2011.

BAGHIZADEH, A. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Calendula officinalis* in liquid phase. **Journal of Molecular Liquids**, v. 207, p. 159–163, 2015.

BESWICK, O. et al. Iron oxide nanoparticles supported on activated carbon fibers catalyze chemoselective reduction of nitroarenes under mild conditions. **Catalysis Today**, v. 249, p. 45–51, 2015.

BINDHU, M. R. et al. Antibacterial activities of *Hibiscus cannabinus* stem-assisted silver and gold nanoparticles. **Materials Letters**, v. 131, p. 194–197, 2014.

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

BOGUNIA-KUBIK, K.; SUGISAKA, M. From molecular biology to nanotechnology and nanomedicine. **BioSystems**, v. 65, n. 2-3, p. 123–138, 2002.

BONIFÁCIO, L. D. S. **Processos de agregação e fusão de nanopartículas de ouro: Uma abordagem química**. [s.l.] UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2006.

BRASIL. Resolução-RDC n. 20, de 5 de maio de 2011. **DOU n. 87 de 9 de maio de 2011.**, v. 10, p. 39–41, 2011.

BRUNELLE, M. T. Colloidal fouling of reverse osmosis membranes. **Desalination**, v. 32, p. 127–135, 1980.

BURYGIN, G. L. et al. On the enhanced antibacterial activity of antibiotics mixed with gold nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, v. 4, n. 8, p. 794–801, 2009.

CABEEN, M. T.; JACOBS-WAGNER, C. Bacterial cell shape. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 8, p. 601–610, 2005.

CAUERHFF, A.; CASTRO, G. R. Bionanoparticles, a green nanochemistry approach. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, p. 1–10, 2013.

CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical microbiology reviews**, v. 10, n. 4, p. 781–791, 1997.

CHOI, C. W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, n. 6, p. 1161–1168, 2002.

CHWALIBOG, A. et al. Visualization of interaction between inorganic nanoparticles and bacteria or fungi. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, n. 1, p. 1085–1094, 2010.

COHEN, M. L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. **Science (New York, N.Y.)**, v. 257, n. 5073, p. 1050–1055, 1992.

COLLIS, C. M.; HALL, R. M. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 1, p. 155–162, 1995.

COSTA, M. N. F. DOS S. et al. Characterization of Pentaclethra macroloba oil. **J Therm Anal Calorim**, v. 115, p. 2269–2275, 2014.

CUI, Y. et al. The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on Escherichia coli. **Biomaterials**, v. 33, n. 7, p. 2327–2333, 2012.

CUNICO, M. W. M. et al. Factorial Desing: a Valuable Statistic Tool To Define Experimental Parameters Applied in Scientific Research. **Visão Acadêmica**, v. 9, n. 1, p. 23–32, 2008.

DANIEL, M. C.; ASTRUC, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications Toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 1, p. 293–346, 2004.

DAS, R. K.; BRAR, S. K. Plant mediated green synthesis: modified approaches. **Nanoscale**, v. 5, p. 10155–10162, 2013.

DAS, S.; SRIVASTAVA, V. C. Copper succinate nanoparticles synthesis by electrochemical method: Effect of pH on structural, thermal and textural properties. **Materials Letters**, v. 150, p. 130–134, 2015.

DEGUELDRE, C.; FAVARGER, P. Y.; WOLD, S. Gold colloid analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry in a single particle mode. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, n. 2, p. 263–268, 2006.

DEURENBERG, R. H. et al. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 3, p. 222–235, 2007.

DU, J. et al. A Colorimetric Logic Gate Based on Free Gold Nanoparticles and Coordination Strategy between Melamine and Mercury Ions. **Chemical Communications**, p. 4196–4198, 2012.

DU, L.; XIAN, L.; FENG, J. X. Rapid extra-/intracellular biosynthesis of gold nanoparticles by the fungus *Penicillium* sp. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 3, p. 921–930, 2011.

DUBEY, S. P.; LAHTINEN, M.; SILLANPÄÄ, M. Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 7, p. 1065–1071, 2010.

FLORES-MIRELES, A. L. et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 269–284, 2015.

FRANKLIN D. LOWY, M. D. *Staphylococcus aureus* Infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 520–532, 1998.

GANESAN, R. M.; PRABU, H. G. Synthesis of gold nanoparticles using herbal *Acorus calamus* rhizome extract and coating on cotton fabric for antibacterial and UV blocking applications. **Arabian Journal of Chemistry**, 2015.

GEETHALAKSHMI, R.; SARADA, D. V. L. Characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles synthesized using saponin isolated from *Trianthema decandra* L. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 107–115, 2013.

GOOTZ, T. D. Discovery and development of new antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 13–31, 1990.

GÜLÇİN, I.; BERASHVILI, D.; GEPIREMEN, A. Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis* decne. **Journal of ethnopharmacology**, v. 101, n. 1-3, p. 287–93, 3 out. 2005.

HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G. In appreciation of Theodor Escherich. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 902–902, 2007.

HAISS, W. et al. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV - Vis Spectra. v. 79, n. 11, p. 4215–4221, 2007.

HANG, J. et al. Electrostatic and electrosteric stabilization of aqueous suspensions of barite nanoparticles. **Powder Technology**, v. 192, n. 2, p. 166–170, 2009.

HENGLEIN, A. Small-particle research: physicochemical properties of extremely small colloidal metal and semiconductor particles. **Chemical Reviews**, v. 89, n. 8, p. 1861–1873, 1989.

HUANG, J. et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. **Nanotechnology**, v. 18, n. 10, p. 105104, 2007.

IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 2638, 2011.

ISAAC, R. S. R.; SAKTHIVEL, G.; MURTHY, C. Green Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles Using *Averrhoa bilimbi* Fruit Extract. v. 2013, 2013.

JAMALI, H. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. **Food Control**, v. 54, p. 383–388, 2015.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, 2004.

KARAMAN, R. M. P. AND M. E. **Applied Colloid and Surface Chemistry**. Nova York: [s.n.].

KARTHISHWARAN, K. et al. Phytochemical Investigation of Methanolic Extract of Leaves of *Pergularia daemia*. **Journal of Biological Sciences**, v. 10, p. 242–246, 2010.

KASTHURI, J.; VEERAPANDIAN, S.; RAJENDIRAN, N. Biological synthesis of silver and gold nanoparticles using apiin as reducing agent. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 68, n. 1, p. 55–60, 2009.

KAVIYA, S.; SANTHANALAKSHMI, J.; VISWANATHAN, B. Green synthesis of silver nanoparticles using *Polyalthia longifolia* leaf extract along with D-sorbitol: Study of antibacterial activity. **Journal of Nanotechnology**, v. 2011, 2011.

KHARISSOVA, O. V. et al. The greener synthesis of nanoparticles. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 240–248, 2013.

LABORDA, F. et al. Critical considerations for the determination of nanoparticle number concentrations, size and number size distributions by single particle ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 28, p. 1220–1232, 2013.

LEE, K. D. et al. Eco-friendly synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) using *Inonotus obliquus* and their antibacterial, antioxidant and cytotoxic activities. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 26, p. 67–72, 2015.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* Infections. In: ACADEMIC PRESS (Ed.). . **Bacterial Vaccines**. René Germa ed.Orlando: [s.n.]. p. 187 – 229.

LI, L. et al. Synthesis of reduced graphene oxide-iron nanoparticles with superior enzyme-mimetic activity for biosensing application. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 639, p. 470–477, 2015.

LIAO, D. L.; WU, G. S.; LIAO, B. Q. Zeta potential of shape-controlled TiO₂ nanoparticles with surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 348, n. 1-3, p. 270–275, 2009.

LINK, S.; EL-SAYED, M. A. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 21, p. 4212, 1999.

LIU, Q. et al. Evaluation of antioxidant activity of chrysanthemum extracts and tea beverages by gold nanoparticles-based assay. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 92, p. 348–352, 2012.

LOKINA, S. et al. Spectroscopic investigations, antimicrobial, and cytotoxic activity of green synthesized gold nanoparticles. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 129, p. 484–90, 2014.

LOO, C. et al. Nanoshell-enabled photonics-based imaging and therapy of cancer. **Technology in cancer research & treatment**, v. 3, n. 1, p. 33–40, 2004.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670–673, 2004.

LOURENCO, C. et al. Steric stabilization of nanoparticles: Size and surface properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 138, n. 1, p. 1–12, 1996.

LOWY, F. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 9, p. 1265–1273, 2003.

LU, K.; KESSLER, C. Colloidal dispersion and rheology study of nanoparticles. **Journal of Materials Science**, v. 41, n. 17, p. 5613–5618, 2006.

MANNING, S. D. **Escherichia coli Infections**. 2^a. ed. [s.l.] Chelsea House, 2010.

MARANGONI, V. S. **ESTUDO E DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPÓSITOS CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE OURO CONJUGADAS COM BIOMOLÉCULAS: SÍNTESE E APLICAÇÕES EM NANOMEDICINA.** [s.l.] UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2012.

MILANEZE, B. et al. The green synthesis of gold nanoparticle using extract of *Virola oleifera*. **BMC Proceedings**, v. 8, n. Suppl 4, p. P29, 2014.

MISHRA, A. et al. Biocatalytic and antimicrobial activities of gold nanoparticles synthesized by *Trichoderma* sp. **Bioresource Technology**, v. 166, p. 235–242, 2014.

MITTAL, A. K.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 346–356, 2013.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A C.; MURRAY, J. C. Nanomedicine: current status and future prospects. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 19, n. 3, p. 311–330, 2005.

MONTAZERI, E. A. et al. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from burn patients by multiplex PCR. **Burns**, v. 41, n. 3, p. 590–594, 2015.

MORILLO, D.; PÉREZ, G.; VALIENTE, M. Efficient arsenic(V) and arsenic(III) removal from acidic solutions with Novel Forager Sponge-loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 453, p. 132–141, 2015.

MORTON N. SWARTZ, M. D. Use of Antimicrobial Agents and Drug Resistance. **N Engl J Med**, v. 337, p. 491–496, 1997.

MP, J. “Celbenin”-resistant staphylococci. **BMJ**, v. 1, p. 124–125, 1961.

MULVANEY, P. Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles. **Langmuir**, v. 12, n. 3, p. 788–800, 1996.

MUTHUVEL, A. et al. Biosynthesis of gold nanoparticles using *Solanum nigrum* leaf extract and screening their free radical scavenging and antibacterial properties. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 325–332, 2014.

NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 169, n. 2, p. 59–79, 2011a.

NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 169, n. 2, p. 59–79, 2011b.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition.** [s.l: s.n.], v. 23

NEMA, V. et al. Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, n. 1, p. 29–35, 2007.

NETO, B. DE B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** 2^a. ed. São Paulo: [s.n.].

OLIPHANT, C. M.; EROSCHENKO, K. Antibiotic Resistance, Part 2: Gram-negative Pathogens. **The Journal for Nurse Practitioners**, v. 11, n. 1, p. 79–86, 2015.

PAL, R. et al. Characterization of citrate capped gold nanoparticle-quercetin complex: Experimental and quantum chemical approach. **Journal of Molecular Structure**, v. 1046, p. 153–163, 2013.

PANIGRAHI, S. et al. General method of synthesis for metal nanoparticles. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 6, n. 4, p. 411–414, 2004.

PARASHAR, U. K. et al. Study of mechanism of enhanced antibacterial activity by green synthesis of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 22, n. 41, p. 415104, 2011.

PEREIRA, M. K. **Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado e Espalhamento Raman em Soluções Coloidais de Ouro.** [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2009.

PETRYAYEVA, E.; KRULL, U. J. Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing-A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 706, n. 1, p. 8–24, 2011a.

PETRYAYEVA, E.; KRULL, U. J. Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing-A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 706, n. 1, p. 8–24, 2011b.

PHILIP, D. Biosynthesis of Au, Ag and Au-Ag nanoparticles using edible mushroom extract. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 73, n. 2, p. 374–381, 2009.

PISSUWAN, D. et al. **Functionalised gold nanoparticles for controlling pathogenic bacteria.** [s.l.] Elsevier Ltd, 2010.

PRADO, A. R. et al. Comparison between the synthesis of gold nanoparticles with sodium citrate and sodium tetraborate. **BMC Proceedings**, v. 8, n. Suppl 4, p. P252, 2014.

RAI, A.; PRABHUNE, A.; PERRY, C. C. Antibiotic mediated synthesis of gold nanoparticles with potent antimicrobial activity and their application in antimicrobial coatings. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 32, p. 6789, 2010.

RANGEL, R. N. **Colóides: um estudo introdutório**. São Paulo: [s.n.].

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231–1237, 1999.

ROEGES, N. P. G. A Guide to the Complete Interpretation of Infrared Spectra of Organic Structures. v. 118, p. 3543, 1994.

ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado Antioxidant activity of cerrado fruits. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n. 1, p. 53–60, 2007.

RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre. **Comunicado Técnico on line**, v. 127, p. 0–3, 2007.

SADEGHI, B.; MOHAMMADZADEH, M.; BABAKHANI, B. Green synthesis of gold nanoparticles using Stevia rebaudiana leaf extracts: Characterization and their stability. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 148, p. 101–106, 2015a.

SADEGHI, B.; MOHAMMADZADEH, M.; BABAKHANI, B. Green synthesis of gold nanoparticles using Stevia rebaudiana leaf extracts: Characterization and their stability. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 148, p. 101–106, 2015b.

SALAM, H. A. et al. Plants: Green Route for Nanoparticle Synthesis. **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 5, p. 85–90, 2012.

SALTON MRJ AND KIM KS. Structure. In: IN: BARON S, E. (Ed.). . **Medical Microbiology**. 4th. ed. [s.l.] University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. p. 8477.

SALUNKE, G. R. et al. Rapid efficient synthesis and characterization of silver, gold, and bimetallic nanoparticles from the medicinal plant *Plumbago zeylanica* and their application in biofilm control. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 2635–2653, 2014.

SATHYANARAYANAN, M. B. et al. The effect of gold and iron-oxide nanoparticles on biofilm-forming pathogens. **ISRN microbiology**, v. 2013, p. 272086, 2013.

SCHITO, G. C. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 12 Suppl 1, p. 3–8, 2006.

SCOTT, A. B.; SMITH, W. A.; THOMPSON, M. A. Alkali Halides Colored By Colloidal Metal. **J. Phys. Chem**, v. 57, n. 8, p. 757–761, 1953.

SHAMELI, K. et al. Green biosynthesis of silver nanoparticles using callicarpa maingayi stem bark extraction. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 8506–8517, 2012.

SHON, Y. S.; CHOO, H. Organic reactions of monolayer-protected metal nanoparticles. **Comptes Rendus Chimie**, v. 6, n. 8-10, p. 1009–1018, 2003.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 5, p. a000414, 2010.

SO, A. D. et al. Towards new business models for R&D for novel antibiotics. **Drug Resistance Updates**, v. 14, n. 2, p. 88–94, 2011.

SONG, J. Y.; JANG, H. K.; KIM, B. S. Biological synthesis of gold nanoparticles using Magnolia kobus and Diopyros kaki leaf extracts. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 1133–1138, 2009.

SOUSA, C. M. D. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plants medicinais. **Química NOva**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

STUART, B. H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. [s.l: s.n.]. v. 8

STUART, B. H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. [s.l: s.n.]. v. 8

SWEENEY, N. J. et al. The Escherichia coli K-12 gntP gene allows E. coli F-18 to occupy a distinct nutritional niche in the streptomycin-treated mouse large intestine. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 9, p. 3497–3503, 1996.

TAVARES, S.; PEREIRA, J. Physical and chemical characteristics of the mucilage of lyophilized yam. **Ciênc. agrotec**, v. 35, p. 973–979, 2011.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2010.

TOMASZ, A. Multiple-Antibiotic-Resistant Pathogenic Bacteria. A report on the Rockefeller University Workshop. **The New England Journal of Medicine**, v. 330, p. 1247–1251, 1992.

TURKEVICH, J. Colloidal Gold . Part I. v. 18, n. 1, p. 86–91, 1985.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of Colloidal Gold. **Discuss. Faraday Soc.**, v. 11, n. c, p. 55–75, 1951.

UMA SUGANYA, K. S. et al. Blue green alga mediated synthesis of gold nanoparticles and its antibacterial efficacy against Gram positive organisms. **Materials Science and Engineering: C**, v. 47, p. 351–356, 2015.

VILLANUEVA-IBÁÑEZ, M. et al. Aqueous corn husk extract – mediated green synthesis of AgCl and Ag nanoparticles. **Materials Letters**, v. 152, p. 166–169, 2015.

VOLLMER, W.; BLANOT, D.; DE PEDRO, M. A. Peptidoglycan structure and architecture. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, p. 149–167, 2008.

WANG, G.; SUN, W. Optical limiting of Gold nanoparticle aggregates induced by electrolytes. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 42, p. 20901–20905, 2006.

WANG, H.-B. et al. A label-free and ultrasensitive fluorescent sensor for dopamine detection based on double-stranded DNA templated copper nanoparticles. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 220, p. 146–153, 2015.

WHO. ANTIMICROBIAL RESISTANCE Global Report on Surveillance 2014. **World Health Organization**, 2014.

WOODFORD, N. Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 11 Suppl 3, p. 2–21, 2005.

YANG, M. et al. Synthesis of copper oxide nanoparticles and their sensing property to hydrogen cyanide under varied humidity conditions. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 213, p. 59–64, 2015.

ZAWRAH, M. F.; EL-MOEZ, S. I. A. Antimicrobial Activities of Gold Nanoparticles against Major Foodborne Pathogens. **Life Science Journal**, v. 8, n. 4, p. 37–44, 2011.

ZHAO, Y. et al. Small-Molecule Capped Gold Nanoparticles as Potent Antibacterial Agents that Target Gram-negative Bacteria. **J. Am. Chem. Soc.**, n. 24, p. 1–17, 2010.

ZHAROV, V. P. et al. Self-assembling nanoclusters in living systems: application for integrated photothermal nanodiagnostics and nanotherapy. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 1, n. 4, p. 326–345, 2005.