

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO
COM QUERCETINA E AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES
ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA**

FELIPE GUZANSKY MILANEZI

VILA VELHA
ABRIL / 2017

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO
COM QUERCETINA E AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES
ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

FELIPE GUZANSKY MILANEZI

VILA VELHA
ABRIL / 2017

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

M637s

Milanezi, Felipe Guzansky.

Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro com quercetina e avaliação de suas atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica / Felipe Guzansky Milanezi – 2017.

52 f.: il.

Orientador: Rodrigo Scherer.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2017.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Flavonoides. 3. Ouro.
I. Scherer, Rodrigo. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

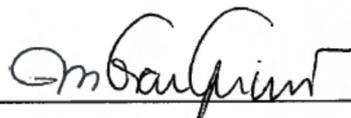
FELIPE GUZANSKY MILANEZI

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO
COM QUERCETINA E AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES
ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA**

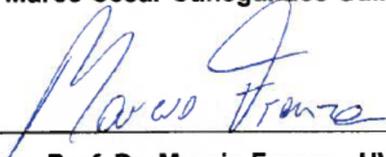
Dissertação apresentada à Universidade
Vila Velha, como pré-requisito do
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas, para a obtenção do grau
de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 27 de Abril de 2017

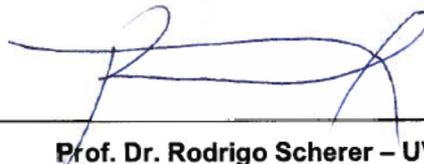
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães - UFES



Prof. Dr. Marcio Fronza - UVV



Prof. Dr. Rodrigo Scherer - UVV

Orientador

Tudo posso naquele que me fortalece.

Filipenses 4:13

AGRADECIMENTOS

1. Ao Senhor Jesus em primeiro lugar, 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, e não me deixar desistir.
2. À minha família, pela base sólida que são e pelo porto seguro, por terem estado sempre comigo, tanto nos momentos de alegrias, quanto nos de desespero, me apoiando e me dando forças para continuar.
3. À Universidade Vila Velha, ao meu orientador Dr. Rodrigo Scherer, e aos professores Dr. Marco César Cunegundes Guimarães, Dr. Márcio Fronza e Dr^a. Denise Coutinho Endringer que me orientaram na realização deste trabalho.
4. Aos alunos de mestrado e doutorado da UVV e UFES pelo apoio e auxílio na realização de algumas etapas do estudo e em especial ao Jairo que foi meu tutor no mundo da nanotecnologia.
5. À Clarisse, Leandra e a Professora Maricele pelo apoio nos ensaios antimicrobianos.
6. Ao IFES, pelas análises de potencial zeta, ao LabPetro pelas análises de IRFT e ao LABIOM pelas análises de UV-Visível.
7. Aos colegas do mestrado e doutorado da UFES e da UVV que tão companheiros foram durante o cumprimento dos créditos de disciplinas. A todos os colegas do LUCCAR e ao professor Dr. Breno, pelo aprendizado, apoio técnico, companheirismo, diversão, convivência, aniversários e comemorações durante todo o tempo do mestrado. Criamos grandes vínculos entre UFES e UVV que vão muito além de uma simples amizade de laboratório.
8. Ao CNPq e a CAPES pela oportunidade da bolsa de estudos durante o curso.

SUMÁRIO

Lista de figuras	VIII
Lista de tabelas	IX
Lista de símbolos e abreviaturas.....	X
Resumo.....	XII
Abstract.....	XIV
1. Introdução.....	15
2. Métodos.....	16
3. Resultados.....	21
4. Discussão	27
5. Conclusão	31
6. Referências.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espectroscopia de absorção no UV- Visível.....	22
Figura 2. Espectroscopia no infravermelho.....	23
Figura 3. Ultraestrutura das nanopartículas de ouro e das nanopartículas de ouro com quercetina em microscopia eletrônica de transmissão.....	24
Figura 4. Ensaio pelo método MTT.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tamanho médio das nanopartículas e valores do Potencial Zeta (PZ) em mV	25
Tabela 2. Atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e óxido nítrico das amostras de quercetina e nanopartículas de ouro com quercetina.....	25
Tabela 3. Determinação da concentração inibitória mínima das amostras para os microrganismos testados.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS

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

AuNPsQct: Nanopartículas de ouro com quercetina

ANOVA: Análise de Variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AuNPs: Nanopartículas de Ouro

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CTT: cloreto de trifeniltetrazolium

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

força g: Força gravitacional

g: Grama

HAuCl₄: Ácido cloroáurico

IR-FT: Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier

IR50: Índice de redução de 50%

kV: Quilovolt

L: Litro

LSPR: Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

mg: Miligrama

min: Minutos

mL: Mililitros

mM: Milimolar

MTT: (3-(4,5-dimetil-2tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromide)

nm: Nanômetros

NPS: Nitroprussiato de sódio

μL : Microlitro

μM : Micromolar

PZ: Potencial Zeta

Qct: Quercetina

RPSL: Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada

rpm: Rotações por minuto

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UVV: Universidade de Vila Velha

UV-Vis: UV-Visível

$^{\circ}\text{C}$: graus celsius

RESUMO

MILANEZI, FELIPE, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, Abril de 2017. **Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro com quercetina e avaliação de suas atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica.** Orientador: Rodrigo Scherer

O objetivo desse trabalho foi sintetizar nanopartículas de ouro com quercetina, bem como realizar sua caracterização e avaliar suas atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica. As nanopartículas de ouro com quercetina (AuNPsQct) foram caracterizadas através de espectro no UV-Visível (UV-Vis), espectro no infravermelho (IRFT), análise de sua ultraestrutura em microscopia eletrônica de transmissão (MET) e análise de estabilidade coloidal através do método do Potencial Zeta (PZ). As atividades biológicas foram avaliadas tanto para a quercetina quanto para as AuNPsQct, sendo a atividade antioxidante realizada pelos métodos de sequestro dos radicais livres DPPH, ABTS e óxido nítrico, a atividade antibacteriana foi testada contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*, e a atividade antifúngica foi testada contra *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus* e a atividade citotóxica foi realizada com células de fibroblastos L929 através do método do MTT. Foram sintetizadas AuNPsQct confirmadas por espectro UV-Vis que mostrou absorção na região de plasmon de superfície localizada que é característica das AuNPs e o espectro de IRFT mostrou a integridade da molécula da quercetina com as AuNPs. Essas apresentaram tamanhos inferiores à 100 nm e estabilidade eletrostática confirmada através do método do Potencial Zeta. As amostras de quercetina e das AuNPsQct apresentaram forte atividade antioxidante nos métodos DPPH, ABTS e óxido nítrico, mostrando que a atividade antioxidante da quercetina foi preservada. As nanopartículas de quercetina apresentaram fraca atividade antibacteriana, porém, apresentaram forte atividade contra *Aspergillus fumigatus* (0,2 mg/mL). Na avaliação da citotoxicidade foi verificado que nanopartículas de quercetina não apresentaram citotoxicidade em células de fibroblastos, ao contrário disso, ocorreu uma indução da proliferação celular.

Palavras chaves: nanotecnologia; nanopartículas de ouro; quercetina; flavonoides.

ABSTRACT

MILANEZI, FELIPE, M.Sc, University of Vila Velha – ES, April de 2017.

Synthesis and characterization of gold nanoparticles with quercetin and evaluation of their antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities.

Advisor: Rodrigo Scherer

The objective of this work was to synthesize gold nanoparticles with quercetin, as well as to carry out its characterization and evaluate its antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities. The gold nanoparticles with quercetin (AuNPsQct) were characterized by UV/VIS spectra, infrared spectrum (IRFT), analysis of ultrastructure in transmission electron microscopy (TEM) and analysis of colloidal stability through Zeta Potential (PZ) method. The antibacterial activity was tested against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*, and the antifungal activity was evaluated for both quercetin and AuNPsQct against *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. The antioxidant activity was performed by DPPH, ABTS and nitric oxide free radical scavenging methods. The cytotoxic activity was performed with L929 fibroblast cells by the MTT method. AuNPsQct were synthesized confirmed by UV-VIS spectrum which showed absorption in the localized surface region of plasmon which is characteristic of AuNPs and the IRFT spectrum showed the integrity of the quercetin molecule with the AuNPs. These presented sizes smaller than 100 nm and electrostatic stability confirmed by the Zeta Potential method. The quercetin and AuNPsQct samples showed strong antioxidant activity in the DPPH, ABTS and nitric oxide methods, the latter being interesting showing that the antioxidant capacity was preserved. The results showed poor antibacterial activity and strong activity for *Aspergillus fumigatus* (0.2 mg/mL). The AuNPsQct did not present cytotoxicity for the fibroblast cells, by the way, there was an induction of cell proliferation.

Keywords: nanotechnology; Nanoparticles of gold; Quercetin; Flavonoids.

Introdução

Os flavonoides são uma classe de compostos fenólicos presentes nos produtos naturais que diferem entre si pela sua estrutura química e características particulares. Dentre eles, a quercetina (3,5,7,3'-4'- pentahidroxi flavona), um flavonol, é um dos principais presente na dieta humana, e possui diversos efeitos farmacológicos, tais como atividade antioxidante^{11,12,13}, anti-inflamatórias^{13,14,15,16,17}, anti-proliferativas e anti-angiogênica^{18,19,20}, e apresenta efeito hepatoprotetor²¹. Apesar dessas vantagens, a quercetina apresenta baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade, sendo caracterizada como hidrofóbica o que limita o seu uso clínico^{13,22,23,24}.

A nanociência pode ser definida como uma área da ciência dedicada ao estudo e a manipulação dos materiais na escala atômica e molecular, que conduzem à produção de estruturas na escala nanométrica, em geral até 100 nm. As nanopartículas apresentam algumas aplicações inovadoras, como conjugação de anticorpos¹, veículo para fármacos^{2,3,4,5}, proteção contra raios UV⁶, purificação de água⁷, e para fins de diagnóstico, como agente antimicrobiano^{6,8,9} e em métodos de imunoenensaio¹⁰.

Dentre os nanomateriais existentes, as nanopartículas de ouro (AuNPs) atraem a atenção, pois o ouro é um material inerte, resistente à oxidação, o que faz com que seu uso seja interessante em tecnologias e dispositivos em nanoescala⁷. Além disso, as AuNPs são bem elucidadas quanto à redução e funcionalização com produtos sintéticos e naturais.

Por outro lado, as propriedades farmacológicas da quercetina devem ser preservadas no processo de capeamento. Dessa forma, a nanotecnologia pode ser um método promissor para criar novas formulações com o intuito de auxiliar

na capacidade da atuação biológica da quercetina e potencializar a atividade dessas moléculas no qual o objetivo do presente trabalho foi caracterizar nanopartículas de ouro capeadas com quercetina (AuNPsQct), e avaliar suas atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica.

Métodos

Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro com quercetina

As nanopartículas de ouro (AuNPs) foram sintetizadas por redução química de sais, de modo a obter ouro coloidal. Para isso, foram utilizadas solução aquosa de citrato de sódio e solução aquosa de ouro (ácido tetracloroáurico - HAuCl_4 Sigma-Aldrich)²⁵, e em seguida as nanopartículas sintetizadas foram capeadas com soluções etanólicas de quercetina. Todas as vidrarias e materiais foram previamente lavados três vezes em solução de água régia (1:3 de ácido clorídrico e ácido nítrico) e posteriormente lavados cinco vezes com água destilada e secas à temperatura ambiente. Para a síntese foram utilizados 15 mL da solução de HAuCl_4 (0,1 g/L, pH 5) mantidos sob agitação a 600 rpm a 90°C. Em seguida foi adicionado 1 mL da solução aquosa de citrato de sódio (10 g/L) com agitação por 10 minutos, e após esse tempo o aparecimento de coloração avermelha confirmou a formação das AuNPs. Após essa etapa, foram adicionadas as soluções etanólicas de quercetina com agitação de mais 5 minutos. Esse procedimento foi realizado para cada concentração testada (0,17 mg/mL; 0,85 mg/mL; 1,7 mg/mL e 8,5 mg/mL).

Caracterização no UV-Visível

Foram feitas leituras de absorvância das amostras de nanopartículas utilizando Espectrofotômetro Evolution® 300 Thermo Scientific. A leitura foi realizada em 250 até 700 nm, com velocidade de varredura de 600 nm/min. O resultado foi

expresso por meio de gráficos de absorvância por comprimento de onda (nm) obtidos pelo software OriginPro 8.5 (Versão Trial).

Caracterização no FTIR

A análise de infravermelho foi realizada no modo ATR em FTIR/FTNIR Spectrum 400 PerkinElmer, utilizando o brometo de potássio (KBr) para desidratação após a centrifugação do material em 8.608 g por 10 min. Todas as bandas foram analisadas nas faixas de absorção de 650 a 4000 cm^{-1} pelo software Origin Pro 8.5 (Versão Trial).

Caracterização em microscópio eletrônico de transmissão (MET)

As AuNPsQct foram examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão (JEM-1400, JEOL, USA inc.), com filamento de hexaboreto de lantânio (LaB_6) operado a 120 kV. Cerca de 5 μL das amostras foram gotejadas sobre as grades de cobre de 400 mesh, contendo um filme suporte de resina Formvar (Polivinyl Formal Resin) e secas a temperatura ambiente. As imagens por MET foram obtidas para verificar a distribuição de tamanho e forma das AuNPsQct sintetizadas.

Avaliação da estabilidade das AuNPs através do método do Potencial Zeta

Cerca de 2 mL das amostras foram analisadas em um analisador de partículas Microtrac Zetatrac e os valores foram referentes à média das leituras e expressos em mV.

Liofilização das nanopartículas

As nanopartículas foram congeladas a -80°C (Ultra freezer CL580, Cold Lab) e liofilizadas em um liofilizador Enterprise I Terroni, por 24 h ou até a formação de um pó completamente desidratado de coloração avermelhada.

Atividade antioxidante pelo método DPPH

A atividade antioxidante da quercetina e das AuNPsQct foi determinada através do método do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)²⁶ no qual foram utilizadas 20 μL de uma solução etanólica de quercetina e de AuNPsQct na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 280 μL de uma solução etanólica de DPPH 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Todos os testes foram realizados em triplicata. As microplacas foram mantidas no escuro, em temperatura ambiente por 90 min, e após esse período, a absorbância foi medida a 517 nm. A atividade de eliminação dos radicais foi calculada conforme a equação: $I\% = [(Abs_0 - Abs_1) / Abs_0] \times 100$, onde a absorbância Abs_0 é a do branco e Abs_1 é a absorbância do teste. O IR50 (quantidade suficiente para 50% de redução) foi calculado através da equação da reta obtida da curva de calibração. A ação antioxidante também foi expressa pelo Índice de Atividade Antioxidante (IAA) que é calculado pela equação 2: $IAA = \text{massa de DPPH } (\mu\text{g}/\text{mL}) / \text{IR50 } (\mu\text{g}/\text{mL})$.

Atividade antioxidante pelo método ABTS

A atividade antioxidante da quercetina e das AuNPsQct foi determinada através do método do sequestro do radical livre $\text{ABTS}^{\cdot+}$ ^{27,24}. O radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ foi formado pela mistura de 7 mM de ABTS (em etanol 50%) e 2,45 mM de persulfato de potássio, essa solução estoque ficou armazenada em refrigeração no mínimo 16 h. A partir da solução estoque de $\text{ABTS}^{\cdot+}$ foram preparadas diariamente soluções com absorbância de 1,00 ($\pm 0,01$) a 734 nm pela diluição com etanol 50%. Em microplacas de 96 poços foram adicionados 270 μL do radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$

e 30 µL de cada concentração dos compostos testes nas mesmas concentrações do método anterior. Após 6 minutos de reação no escuro, foi realizada a leitura em 734 nm. A atividade de eliminação de radicais foi calculada conforme a equação: $I\% = [(Abs0 - Abs1) / Abs0] \times 100$, onde a absorbância Abs0 é a do branco e Abs1 é a absorbância do teste. Os resultados foram expressos em IR50, que foi calculado através da equação da reta obtida da curva de calibração.

Atividade antioxidante pelo sequestro do radical óxido nítrico por medição de nitrito com NPS

Para a avaliação do sequestro do radical óxido nítrico utilizou-se nitroprussiato de sódio (NPS) 2,5 mM com diferentes concentrações das amostras (20 a 0,2 µg/mL) e incubada à temperatura ambiente durante 10 minutos. Determinou-se a quantidade de nitrito através da reação de Griess²⁸, no qual foi utilizado 150 µL do reagente de Griess (volumes iguais de sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5% e solução de N- (1-naftil) etilenodiamina a 0,1%. A absorbância foi medida a 540 nm contra uma curva de calibração com padrões de nitrito de sódio.

Atividade antimicrobiana

Para avaliação da atividade antibacteriana, foram utilizadas espécies de *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Bacillus cereus* (ATCC 14579) obtidas da lista de cepas de referência do INCQS-FIOCRUZ. As cepas foram repicadas em placa de cultura com ágar Mueller Hinton e incubadas a 35°C por 24 h. A concentração final de células foi ajustada com caldo Mueller Hinton em

espectrofotômetro a 625 nm, com densidade ótica de 0,08 a 0,1, para obter uma concentração final no poço de 5×10^5 UFC/mL.

A atividade antibacteriana dos compostos foi realizada através do método de microdiluição em caldo em placas de 96 poços onde foram adicionados 150 µL do caldo Mueller Hinton com inóculo e 150 µL das amostras solubilizadas em caldo Mueller Hinton (quercetina, AuNPsQct e AuNPs) nas concentrações de 2 mg/mL a 0,016 mg/mL. Em todas as placas foram inseridos controle positivo e controle negativo, e todas as análises foram realizadas em triplicata. As placas foram incubadas a temperatura de 36°C por 24 h, e após esse período foi adicionado 50 µL do indicador cloreto de trifeniltetrazolium (CTT) a 0,5% em solução aquosa. Após seis horas de incubação a CIM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível das células conferido pelo CTT (cora células vivas).

Para análise da atividade antifúngica foram utilizados três isolados clínicos de *Aspergillus fumigatus* [Af 293 (PyrG +), WT Af 35 e CEA 17 (PyrG+)] e três isolados de *Aspergillus flavus* [CCDCA 1043, CCDCA 10391 e CCDCA 1049] isolados de grãos de café colhidos no Espírito Santo. Os espécimes foram doados pela Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto e Universidade Federal de Lavras (UFLA) respectivamente. Também foram utilizadas as cepas de referência de *Aspergillus fumigatus* INCQS 40014 (ATCC 16913) e *Aspergillus flavus* INCQS 40182 (ATCC 204304) doadas da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária-CMRVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ. A determinação do perfil de susceptibilidade a quercetina, AuNPsQct e AuNPs, foi determinada através do perfil de susceptibilidade dos isolados aos compostos²⁹. Os fungos isolados foram

cultivados em ágar dextrose batata por 7 dias a 36 °C para induzir a formação de esporos, após esse período foram recolhidos com solução salina estéril (1 mL) a 0,85% e Tween 20 (0,01 mL). Essa solução foi transferida para um tubo de ensaio estéril e após possíveis fragmentos dos fungos decantados, o líquido suspenso foi recolhido e homogeneizado em vórtex por 15 segundos. Em seguida, uma solução de concentração que variou de $0,4 \times 10^4$ UFC/mL a 5×10^4 UFC/mL de esporos foi preparada através de método espectrofotométrico a 530 nm com densidade ótica entre 0,09 a 0,13. Após esta etapa a solução contendo os esporos foi diluída 1:50 em meio RPMI-1640. Para o ensaio de susceptibilidade foi utilizado meio RPMI-1640 (com glutamina, sem bicarbonato de sódio, com vermelho fenol e indicador de pH), tamponado com MOPS [3- (N-morfolino) propanossulfônico], em concentração de 0,165 mol/L em pH $7,0 \pm 0,1$ a 25 °C. O ensaio foi realizado em microplacas, e em seguida essas foram incubadas a temperatura de 36 °C e o resultado analisado após 48 h. O resultado foi dado através da identificação da concentração inibitória mínima (CIM), que foi identificada visualmente com o auxílio de um espelho de leitura.

Atividade citotóxica pelo método do MTT

Para avaliar a atividade citotóxica da quercetina, AuNPsQct e AuNPs, foi usada o método colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromide)³⁰, no qual foram adicionados 150 µL da cultura de células de fibroblastos da linhagem L929 em que foram incubadas por 24 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após 24 h foram adicionados 50 µL de concentrações crescentes (0,2 µg/mL a 25 µg/mL) das amostras de AuNPsQct, quercetina e AuNPs, diluídas em DMEM 3,7 + SFB 10%, e as placas foram incubadas por 24 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após este período, o conteúdo do poço

foi removido, e então foram adicionados 100 μ L de MTT (5 mg/mL) e incubados por duas horas. Após esse período, a solução de MTT foi removida e foram adicionados 100 μ L de DMSO para dissolução dos cristais de formazana. O etoposido (antitumoral) na concentração de 50 μ M foi usado como controle positivo e a leitura da absorbância em 595 nm. A viabilidade celular foi determinada por comparação dos valores de absorbância obtidos para as células tratadas e não tratadas, e o resultado foi expresso em porcentagem como IC50.

Análise Estatística dos Dados

As análises estatísticas foram expressas como médias \pm desvio padrão. A análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey foi utilizada para determinar se houve diferença entre as médias ($p < 0,05$) e para isso foi utilizado o programa Biostat 5.0.

Resultados

Caracterização por espectros no UV-Visível

Nos espectros de UV-Visível observa-se que a absorção de cada espectro está relacionada com a concentração das AuNPsQct sintetizadas e também pode ser visualizada a ocorrência de um deslocamento batocrômico quando comparado com a quercetina, no qual não ocorre absorção no visível e também observa-se um deslocamento hiperacrômico (0.17mg/mL), quando a absorção se dá na faixa entre 500 a 600 nm, o que caracteriza a formação com maior número das AuNPsQct, comparado com as AuNPs, conforme visualizado na Figura 1.

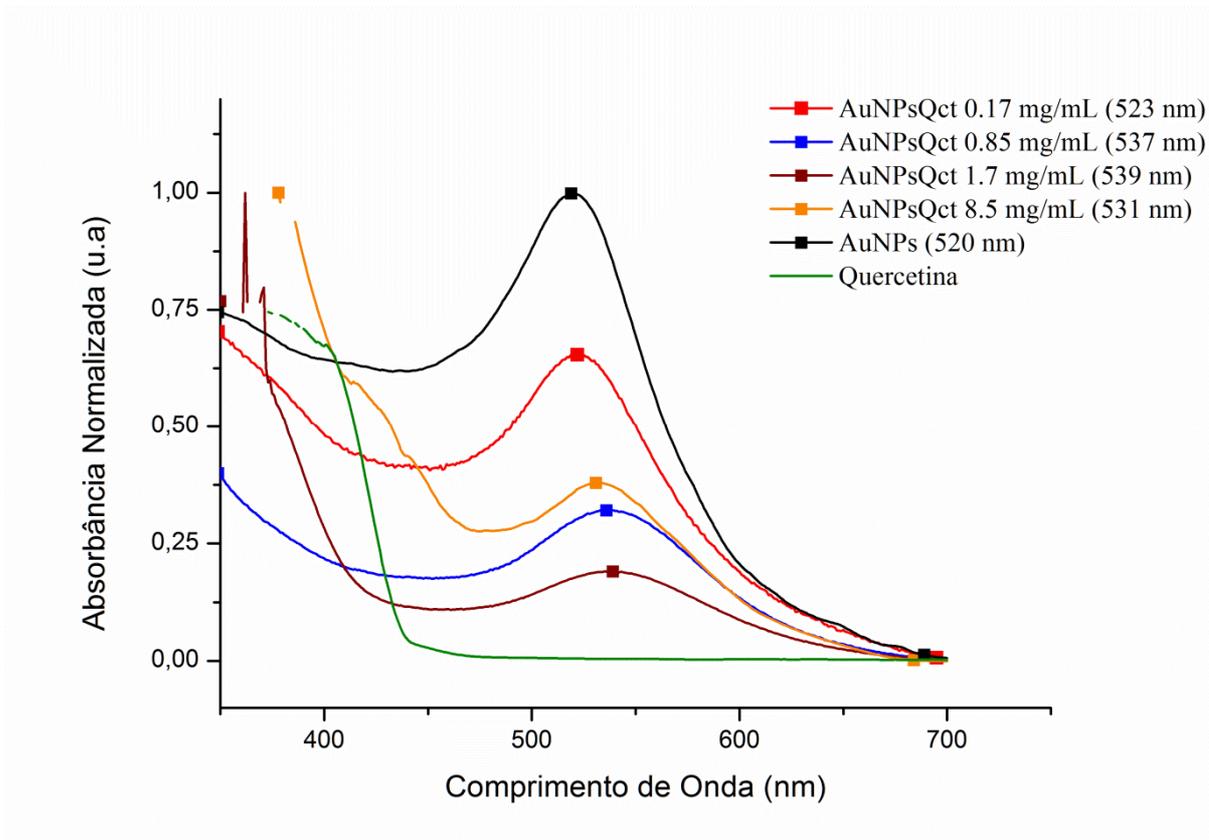


Figura 1. Espectro de absorção no UV-Visível. AuNPsQct: nanopartículas de ouro com quercetina.

Caracterização por espectros no IRFT

As possíveis interações entre as AuNPsQct e a quercetina foram verificadas através de análises de IRFT, que pode ser visualizado na Figura 2. A análise comparativa entre os espectros na região do infravermelho indicou a presença da absorção em 3248 cm^{-1} possivelmente relacionado com estiramento O-H. Já a banda de 1670 cm^{-1} está relacionada com o grupamento C=O. As bandas na região de 1500 cm^{-1} podem ser referentes ao grupamento C=C, indicando a presença do grupamento aromático da quercetina, confirmado pelas bandas de absorção na região entre $650\text{ a }1000\text{ cm}^{-1}$ que está relacionado possivelmente

com deformação angular C=C-H de compostos aromáticos. Isso caracteriza a presença da quercetina íntegra durante a funcionalização com as AuNPs.

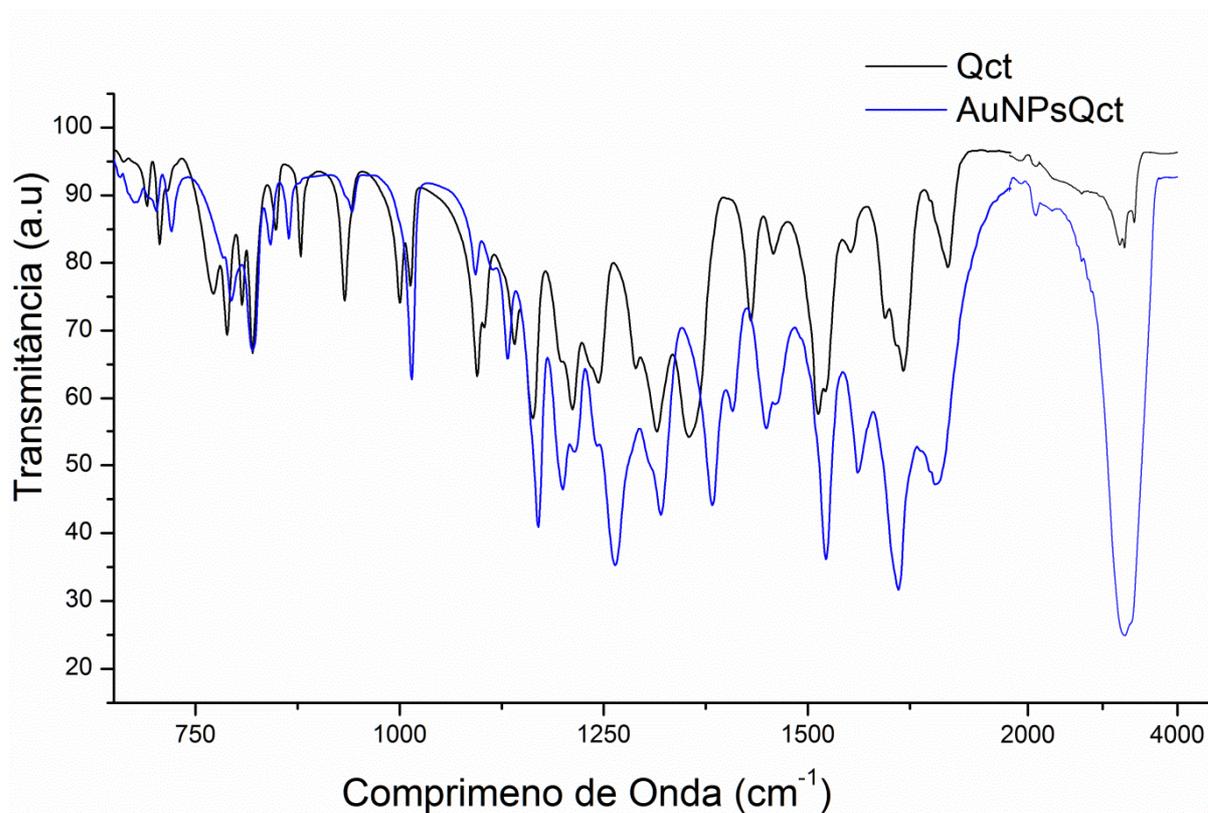


Figura 2. Caracterização por espectros no FTIR. Qct: quercetina; AuNPsQct: nanopartículas de ouro com quercetina (0.17mg/mL).

Caracterização em microscopia eletrônica de transmissão e análise de estabilidade eletrostática através do método do Potencial Zeta

Na microscopia eletrônica de transmissão, as imagens revelaram AuNPsQct estruturalmente quasisféricas e de tamanhos menores que 100 nm, que pode ser visualizado na Figura 3.

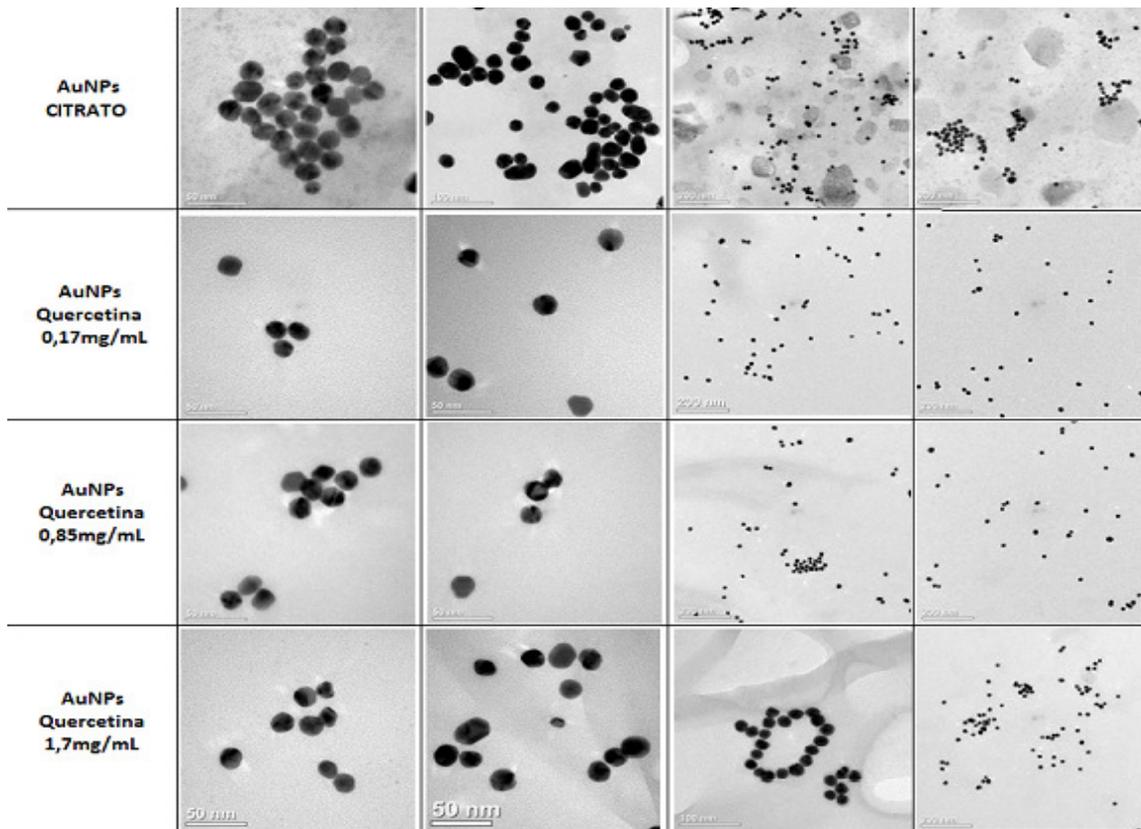


Figura 3. Imagem da ultraestrutura das nanopartículas de ouro e das nanopartículas de ouro com quercetina em microscopia eletrônica de transmissão.

As análises de estabilidade coloidal através do método do Potencial Zeta (PZ) mostraram que as nanopartículas apresentaram estabilidade conforme visualizado na Figura 4, onde as AuNPsQct apresentaram carga negativa em relação às AuNPs.

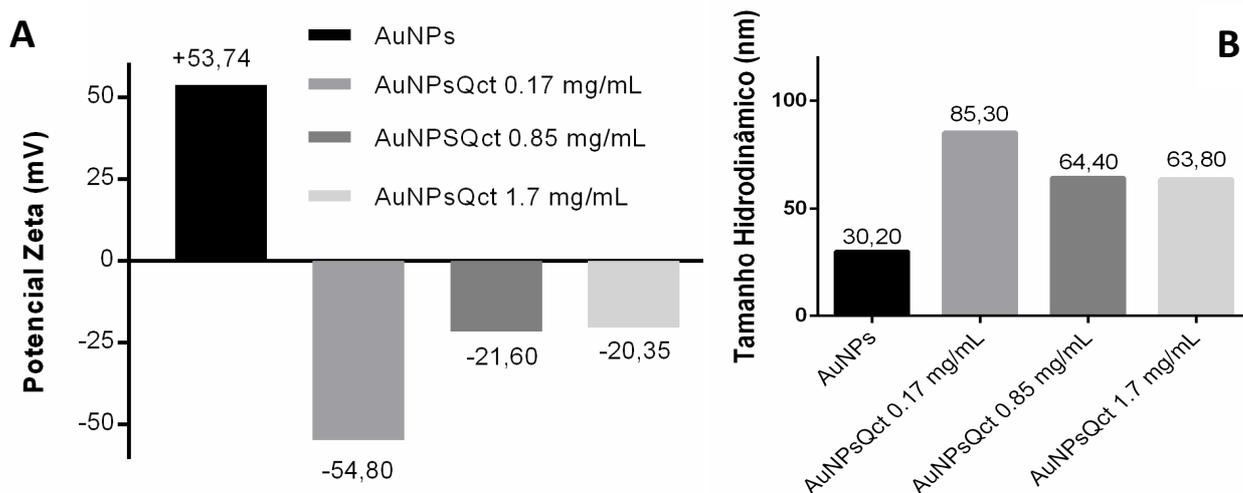


Figura 4. **A** - Valores do Potencial Zeta (PZ) e **B** - Tamanho médio das AuNPs

Avaliação da atividade antioxidante

A partir dos ensaios de DPPH, ABTS e sequestro de óxido nítrico foi observado que a quercetina e as AuNPsQct apresentaram atividade antioxidante em todos os métodos testados (Tabela 1). O IR50 da quercetina mostrou-se menor nos ensaios de DPPH e ABTS, porém no ensaio de sequestro do óxido nítrico mostrou-se o inverso, ou seja, o IR50 das AuNPsQct foi significativamente menor ($p < 0,05$), demonstrando que a atividade antioxidante foi preservada.

Tabela 1. Atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e óxido nítrico das amostras de quercetina e nanopartículas de ouro com quercetina.

Amostras	DPPH IR ₅₀ (µg/mL)	ABTS IR ₅₀ (µg/mL)	Óxido Nítrico IR ₅₀ (µg/mL)
Quercetina	2,04 ± 0,04 a	3,05 ± 0,27 b	0,57 ± 0,06 a
AuNPsQct	2,75 ± 0,12 b	5,55 ± 0,71 a	0,48 ± 0,02 b

Letras diferentes na mesma coluna correspondem a diferença significativa ($p < 0,01$). AuNPsQct: nanopartículas de ouro com quercetina.

Avaliação da atividade antimicrobiana

As AuNPsQct e a quercetina inibiram o crescimento do *A. fumigatus* e do *S. aureus*, que pode ser visualizado na Tabela 2.

Tabela 2. Determinação da concentração inibitória mínima das amostras para as bactérias testadas.

	Quercetina (mg/mL)	AuNPsQct (mg/mL)	AuNPs (mg/mL)
<i>Bactérias</i>			
<i>S. aureus</i>	2,0	2,0	-
<i>B. cereus</i>		-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-
<i>Fungos</i>			
<i>A. fumigatus</i> WT35	0,2	0,5	-
<i>A. fumigatus</i> AF293	0,1	0,2	-
<i>A. fumigatus</i> CEA17	0,2	0,5	-
<i>A. flavus</i>	-	-	-

AuNPsQct: nanopartículas de ouro com quercetina, AuNPs: nanopartículas de ouro sem quercetina, -: sem inibição.

Essa atividade deve-se à estrutura das bactérias Gram-negativas possuírem estruturas de múltiplas camadas bastante complexas como: uma camada de peptidoglicano e outros três componentes que envolvem a parede celular (lipoproteína, membrana externa e lipopolissacarídeo), o que pode ter dificultado a ação das AuNPsQct nessas espécies bacterianas³¹.

Já o *B. cereus* apesar de ser Gram-positivo, apresenta característica de ser endoesporulado, um possível mecanismo de resistência bacteriana, que pode levar a dificuldade de ação das AuNPsQct sobre essa espécie bacteriana^{32,33,34}. Na avaliação da atividade antifúngica observou-se que, as AuNPsQct e a quercetina inibiram o crescimento de todas as espécies de *A. fumigatus* estudadas com concentração inibitória mínima que variou de 0,1 a 0,5 mg/mL. Dessa forma, pode-se concluir que as AuNPsQct tiveram um bom potencial antifúngico.

Avaliação da atividade citotóxica

As AuNPsQct e a quercetina não apresentaram citotoxicidade para as células de fibroblastos L929, ao contrário, houve a estimulação de uma proliferação celular quando AuNPsQct foram utilizadas, o que pode ser visualizado na Figura 5. Foi obtido um aumento da viabilidade celular entre as concentrações de (0,78 a 12,5 µg/mL) para as AuNPsQct, porém não houve diferença significativa entre essas concentrações. Por outro lado, todas as concentrações de AuNPsQct mostraram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos de AuNPs e quercetina.

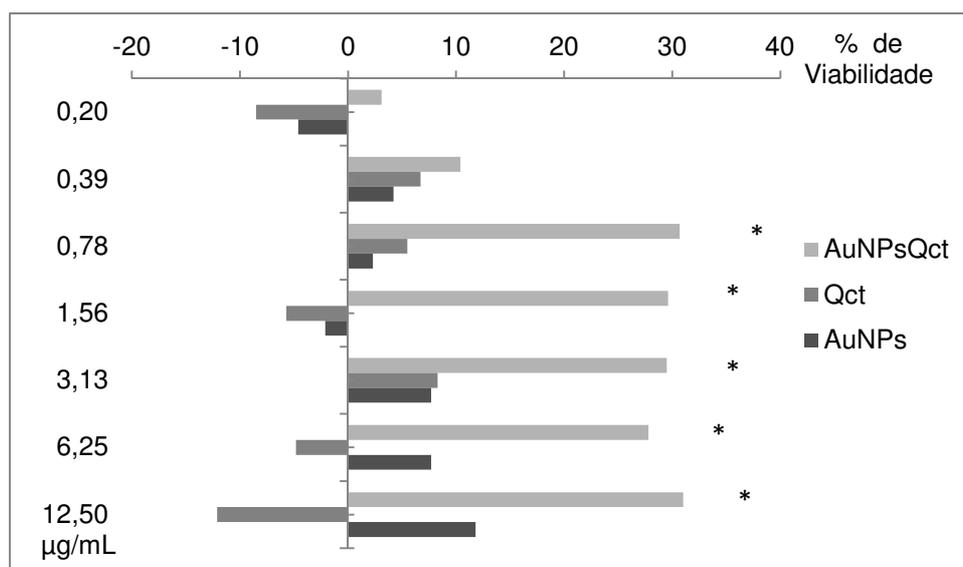


Figura 5. Avaliação da viabilidade celular pelo método colorimétrico MTT. * Diferença significativa ($p < 0,05$).

Discussão

O espectro de varredura UV-Visível mostrou que as AuNPsQct apresentaram bandas de absorção entre 500 e 600 nm que podem ser atribuídas à ressonância de plasmon de superfície localizada (LSPR)^{37,38}. Esta é uma propriedade óptica de metais nobres, tais como o ouro, que se manifesta na região do visível (400 – 700 nm) do espectro eletromagnético^{37,38}. As propriedades ópticas das nanopartículas têm íntima relação com seu tamanho, pois os metais apresentam propriedades dirigidas por suas bandas de energia, no entanto, em escala nanométrica, este comportamento varia, de modo que o caminho livre médio dos elétrons excede o raio da partícula, podendo 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 criando uma força de compensação dando origem a um comprimento de onda ressonante único, a banda plasmônica de superfície^{37,38}. Essa propriedade para as nanopartículas de ouro se dá por volta de 520 nm, podendo variar na faixa de 500 a 600 nm conforme seu tamanho e grau de agregação³⁸. Visualmente, a mudança de cor da amostra para tons que variam de vermelho à violeta confirma a formação das AuNPs³⁹, e ocorre devido à excitação de vibrações de plasmons de superfície, uma propriedade que é característica⁴¹. Já a solução precursora, (HAuCl₄) não apresenta banda característica LSPR, podendo-se concluir que essa propriedade é observada apenas quando há a formação de AuNPs.

Quanto à forma e variação de tamanho, as AuNPsQct apresentaram-se com morfologia esférica e com tamanhos hidrodinâmicos médios inferiores a 100 nm. Para que não haja discrepância entre as AuNPs sintetizadas é necessário que todos os núcleos sejam formados ao mesmo tempo, pois uma vez formados sob as mesmas condições, as AuNPs apresentam tamanhos muito próximo e crescem de maneira uniforme.

Os espectros no infravermelho registraram características semelhantes, ainda que em menor intensidade da molécula de quercetina presente após a síntese das AuNPs, que se deu através de interações eletrostáticas irreversíveis, o que mostra que a integridade da molécula foi preservada.

Existem diversos tipos de radicais livres e distintos alvos de oxidação. Por esse motivo é importante utilizar mais de um método na avaliação, e dessa forma, representar a atividade antioxidante com melhor precisão. Desse modo, os métodos DPPH, o ABTS e o sequestro de óxido nítrico, juntos, podem oferecer um resultado mais abrangente, no que se refere à avaliação do potencial antioxidante. Nos resultados foi observado que, apesar da diferença significativa entre quercetina e AuNPsQct, ambos apresentaram forte atividade antioxidante, garantindo dessa forma que as AuNPsQct preservam essa propriedade reconhecida da quercetina. Além disso, no método de sequestro do radical do óxido nítrico, as AuNPsQct apresentaram maior atividade antioxidante em relação a quercetina pura, fato notável para a utilização futura do material sintetizado. Apesar disso, uma possível pequena redução da atividade antioxidante poderia ser esperada, visto que os radicais hidroxilas que conferem atividade antioxidante para a quercetina são os mesmos responsáveis pela redução e estabilização do ouro.

No que tange à estabilidade das AuNPs, sua relação é diretamente proporcional ao Potencial Zeta (PZ), que 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. Foi observado que as AuNPsQct apresentaram PZ negativo, e as AuNPs apresentaram PZ positivo, essa mudança de carga elétrica confirma a estabilidade coloidal através do método do Potencial Zeta. O valor do PZ indicou que as moléculas de nivelamento presentes na superfície de AuNPsQct são compostos principalmente de grupos carregados negativamente e também responsável pela estabilidade das AuNPsQct, já que a quercetina é um agente redutor forte, que pode auxiliar na estabilização das AuNPs. O grupo carboxilato presente na superfície externa das AuNPs também pode atuar como um agente tensoativo para fixar à superfície das mesmas e estabiliza-la através de estabilização eletrostática, propriedade fundamental, principalmente para aplicação em estudos farmacológicos e biomédicos⁴².

As AuNPsQct foram capazes de inibir o crescimento de *A. fumigatus* testados, com uma concentração inibitória mínima satisfatória. Além disso, mostraram atividade bacteriana contra as cepas de *S. aureus*. Como os valores do Potencial Zeta foram negativos, e o *S. aureus* possui carga positiva, devido à composição de sua parede celular, rica em ácidos teicóicos, que pode ter favorecido a interação entre as nanopartículas e o microrganismo^{42, 43}. A atividade antibacteriana das AuNPsQct e a quercetina foram similares. Apesar disso, uma vantagem no uso das AuNPsQct é a possível penetração nas membranas celulares, aumentando o efeito antibacteriano e o direcionamento da droga,

favorecendo sua atividade biológica^{42,43}. Um possível mecanismo está relacionado à capacidade das AuNPs gerarem furos nas paredes das células bacterianas³¹, e AuNPs menores são capazes de penetrar no interior das bactérias com maior facilidade^{42,43}.

O mecanismo de ação das AuNPsQct para *A. fumigatus* é similar à teoria da ação bacteriana. Isso possivelmente ocorreu devido a um mecanismo de ação das AuNPsQct que possivelmente geram um desarranjo na parede fúngica, levando a desintegração da mesma, resultando em perda de organelas fundamentais para a estrutura da parede fúngica e conseqüentemente à morte celular.^{35,36}, o que é interessante visto que o *A. fumigatus* é um dos maiores causadores de aspergilose (hipersensibilidade alérgica até aspergilomas que são formas pulmonares e cerebrais de patologias fúngicas), já que os mesmos são encontrados abundantemente no ar (80-90%) geralmente inofensivo, porém em pacientes com sistema imunológico debilitado pode ser um grande causador de doenças infecciosas podendo levar à morte. Além disso, esses fungos produzem toxinas conhecidas como micotoxinas, tais como aflatoxina, que podem causar câncer hepático e infecções com alto risco de morte para pacientes leucêmicos e transplantados, sendo também um grande alergênico para pacientes asmáticos.^{35,36}

Quanto à atividade das AuNPsQct para as células L929, uma ação celular deve-se possivelmente ao tamanho das AuNPs que foram inferiores a 100 nm, o que possivelmente facilitou a ação nas células de fibroblastos devido ao maior grau de interação com a membrana celular. Isso significa um avanço quanto à utilização das AuNPsQct para tratamentos celulares em que moléculas maiores não apresentem capacidade de interação com a membrana celular. Além disso,

as AuNPsQct sintetizadas podem auxiliar no tratamento ou como agente quimiopreventivo de câncer em células e tecidos. Porém, estudos in vivo necessitam ser realizados para completa elucidação do potencial biológico das AuNPsQct sintetizadas⁴⁴.

Conclusão

As AuNPsQct sintetizadas mostraram-se promissoras, preservando as propriedades biológicas da quercetina após a síntese. Sua ultraestrutura se mostrou com forma quasisférica e com tamanho médio inferior a 100 nm, e estabilidade coloidal confirmada pelo Potencial Zeta. A atividade antioxidante foi preservada mostrando um IAA maior que 2, caracterizando uma atividade antioxidante muito forte, potencial antifúngico contra *A. fumigatus* com uma concentração inibitória mínima entre 0,1 a 0,5mg/mL, e nenhuma citotoxicidade em células de fibroblastos L929.

Agradecimentos

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo) pelo apoio durante o curso, ao LABIOM (Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares da Universidade Federal do Espírito Santo) pelas análises de UV-Visível, ao LabPetro (Núcleo de Competência em Química do Petróleo da Universidade Federal do Espírito Santo) pelas análises de IRFT e ao LUCCAR (Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins) pela parceria durante a realização desse trabalho.

Referências

1. Jazayeri H, Amani H, Pourfatollah A, Pazoki-Toroudi H, Sedighimoghaddam B. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. *Sensing and Bio-Sensing Res* 2016;**9**:17-22.
2. Kumar CG, Poornachandra Y, Mamidyala S. Green synthesis of bacterial gold nanoparticles conjugated to resveratrol as delivery vehicles. *J Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2014;**125**:511-17
3. Amirthalingam E, Rodrigues M, Casal-Dujat L, Calpena AC, Amabilino DB, Ramos-López D, et al. Macrocyclic imidazolium-based amphiphiles for the synthesis of gold nanoparticles and delivery of anionic drugs. *J Colloid and Interface Sci* 2015;**437**:132-39
4. Chowdhury S, Yusof F, Salim W, Sulaiman N, Faruck M. An overview of drug delivery vehicles for cancer treatment: Nanocarriers and nanoparticles including photovoltaic nanoparticles. *J Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2016;**164**: 151-59
5. Fernandes AR, Jesus J, Martins P, Figueiredo S, Rosa D, Martins L, et al. Multifunctional gold-nanoparticles: A nanovectorization tool for the targeted delivery of novel chemotherapeutic agentes. *J Controlled Release* 2017;**245**:52-61
6. Ganesan RM, Prabu HG. Synthesis of gold nanoparticles using herbal *Acorus calamus* rhizome extract and coating on cotton fabric for antibacterial and UV blocking applications. *Arab J Chem* 2015, in press.
7. Bindhu MR, Umadevi M. Antibacterial activities of green synthesized gold nanoparticles. *Materials Letters* 2014;**120**:122–25

8. Giteru SG, Coorey R, Bertolatti D, Watkin E, Stuart J, Fang Z. Physicochemical and antimicrobial properties of citral and quercetin incorporated karifin-based bioactive films. *Food Chemistry* 2015;**268**:341-47.
9. Praddepa, Udaya Bhat K, Vidya SM. Nisin gold nanoparticles assemble as potente antimicrobial agente against *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Drug Delivery Science and Technology* 2017;**37**:20-7.
10. Caderquist B, Liu B, Grima MR, Dalack PJ, Mahorn JT. Laser-fabricated gold nanoparticles for lateral flow immunoassays. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2017;**149**:351-57.
11. Lee E, Bhimanagouda S; Kil Y. Antioxidants of 15 onions with white, yellow, and red colors and their relationship with pungency, anthocyanin, and quercetin. *LWT Food Science and Technology* 2015;**63**:108-14.
12. Yufang W, Xiaoyong W. Binding, stability, and antioxidant activity of quercetin with soy protein isolate particles. *Food Chemistry* 2015;**188**:24-9.
13. Hatahet T, Morille M, Shamseddin A, Aubert-Pouessel A, Devoisselle JN, Bêgu S. Dermal quercetin lipid nanocapsules: Influence of the formulation on antioxidant activity and cellular protection against hydrogen peroxide. *International J of Pharmaceutics* 2017;**518**:167-76.
14. Jie-Qiong M, Zhang L, Wan X, Chan L, SI L. Quercetin protects mouse liver against CCl₄-induced inflammation by the TLR2/4 and MAPK/NF-κB pathway. *International Immunopharmacology* 2015;**28**:531-39.
15. Weiyong Z, Wenwen L, Bei Y, Lei W, Jianhua Y, Ting Z, et al. Quercetin protects against perfluorooctanoic acid-induced liver injury by attenuating oxidative stress and inflammatory response in mice. *International Immunopharmacology* 2015;**28**:129-35.

16. Wang W, Sun C, Mao L, Ma P, Liu F, Yang J, et al. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends in Food Science & Technology* 2016;**56**:21-38.
17. Lin X, Lin CH, Zhao T, Zuo D, Ye Z, Liu L, et al. Quercetin protects against heat stroke-induced myocardial injury in male rats: Antioxidative and antiinflammatory mechanisms. *Chemico-Biological Interactions* 2017;**265**:47-54.
18. Gacche R, Meshram R, Shegokar H, Gond D, Kamble S, Dhabadge V, et al. Flavonoids as scaffold for development of novel anti-angiogenic agents: An experimental and computational enquiry. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2015;**577**:35-48.
19. Granato M, Rizello C, Montani MSG, Cuomo L, Vitillo M, Santarelli R, et al. *J of Nutritional Biochemistry* 2017;**41**:124-36.
20. Júnior RFA, Araújo AA, Pessoa BJ, Neto FPF, Silva GR, Oliveira AL C.S, et al. Anti-inflammatory, analgesic and anti-tumor properties of gold nanoparticles. *Pharmacological Reports* 2017;**69**:119-29.
21. Miltonprabu S, Tomczyk M, Zniak K, Rastrelli L, Daglia M, Nabavi SF, et al. Hepatoprotective effect of quercetin: From chemistry to medicine. *Food and Chemical Toxicology* 2016; in press.
22. Khor CM, Ng WK, Kanaujia P, Chan KP, Dong Y. Hot-melt extrusion microencapsulation of quercetin for taste-masking. *J of Microencapsulation* 2017;**1**: 29-37.
23. De Souza, K.C.B., Bassani, V.L., Schapoval, E.E.S. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. *Phytomedicine* 2007;**14**: 102–108.

24. Guss, KL, Pavanni, S, Prati B, Dazzi L, Oliveira, JP, Nogueira, BV, et al. Ultrasound-assisted extraction of *Achyrocline satureioides* prevents contrast-induced nephropathy in mice. *Ultrasonics Sonochemistry* 2017; **37**: 368-374.
25. Oliveira J, Prado A, Milaneze B, Keijok W, Lenz D, Ribeiro J, et al. Gold nanoparticles synthesis to application as nano biosensors. *BMC Proceedings* 2014;**8**:249.
26. Scherer R, Godoy H. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem* 2009;**112**:654-58.
27. Re R, Pellegrini N, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999;**26**:9-10.
28. Maia R, Moura C, Bispo V, Santos J, Santana R, Matos H. Avaliação do sequestro do óxido nítrico pelo extrato metanólico da alga *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe 2010;**20(4)**:489-93.
29. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M38-A2 2008.
30. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J of Immunological Methods* 1983;**65**:55-63.
31. Guo, Y., Wang, Y., Liu, S., Yu, J., Wang, H., Wang, Y, et al. Label-free and highly sensitive electrochemical detection of *E. coli* based on rolling circle amplifications coupled peroxidase-mimicking DNAzyme amplification. *Biosens.Bioelectron* 2016; **75**: 315-319.

32. Li, F., Zuo, S., Yu, P., Zhou, B., Wang, L., Liu, C, et al. Distribution and expression of the enterotoxin genes of *Bacillus cereus* in food products from Jiangxi Province, China. *Food Control* 2016; **67**:155-162.
33. Forghani, F., Langaee, T., Eskandari, M., Seo, K., Chung, M., Oh, D. Rapid detection of viable *Bacillus cereus* emetic and enterotoxic strains in food by coupling propidiummonoazide and multiplex PCR (PMA-mPCR). *Food. Cont* 2015; **55**: 151-157.
34. Abbas, A. A., Planchon, S., Jobin, M., Schmitt, P. Absence of oxygen affects the capacity to sporulate and the spore properties of *Bacillus cereus*. *Food.Microbiol* 2014,**42**:122-131.
35. Zainab, A.A., Tariq, A., Fahad, A. International Journal of Pediatrics and Adolescent Medicine 2016, **3**:128-13141.
36. Lu, Y., Meixia, Su., Qiang, L. Radiology of Infectious Diseases. Myelodysplastic syndrome with aspergillus fumigatus infection: A case report and literature review 2016; **xx**: 1-3.
37. Petryayeva, E.; Krull, U. Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing-A review. *Analytica Chimica Acta* 2011a; **706**:8-24.
38. Petryayeva, E.; Krull, U. Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing-A review. *Analytica Chimica Acta* 2011b; **706**:8–24.
39. Shameli K, Bin AM, Jaffar AEA, Ibrahim NA, Shabanzadeh P, Rustaiyan A, et al. Green biosynthesis of silver nanoparticles using *callicarpa maingayi* stem bark extraction. *Molecules* 2012;**17**:8506–17.

40. Song JY, Jang HK, Kim BS. Biological synthesis of gold nanoparticles using *Magnolia kobus* and *Diopyros kaki* leaf extracts. *Process Biochemistry* 2009;**44**:1133-38.
41. Ayaz Ahmed KB, Subramanian S, Sivasubramanian A, Veerapan G, Veerapan A. Preparation of gold nanoparticles using *Salicornia brachiata* plant extract and evaluation of catalytic and antibacterial activity. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2014;**130**:54–58.
42. Lee KD, Nagajyothi PC, Sreekanth TVM, Park S. Eco-friendly synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) using *Inonotus obliquus* and their antibacterial, antioxidant and cytotoxic activities. *J of Industrial and Engineering Chemistry* 2015;**26**:67–72.
43. Suganya U, Govindaraju K, Kumar VG, Dhas TS, Karthick V, Singaravelu G, et al. Blue green alga mediated synthesis of gold nanoparticles and its antibacterial efficacy against Gram positive organisms. *Materials Science and Engineering* 2015; **47**:351–56.
44. Tomoaia G, Horovitz O, Mocanu A, Nita A, Avram A, Racz CP, et al. Effects of doxorubicin mediated by gold nanoparticles and resveratrol in two human cervical tumor cell lines. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2015; **135**:726-

