



RENORBIO

Rede Nordeste de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

ALYNE RODRIGUES DE ARAÚJO

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA FRAÇÃO AQUOSA DO EXTRATO
ETANÓLICO DE *Terminalia fagifolia* Mart. E IDENTIFICAÇÃO DO SEU
CONSTITUINTE MAJORITÁRIO**

TERESINA - PI

2019

ALYNE RODRIGUES DE ARAÚJO

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA FRAÇÃO AQUOSA DO EXTRATO
ETANÓLICO DE *Terminalia fagifolia* Mart. E IDENTIFICAÇÃO DO SEU
CONSTITUINTE MAJORITÁRIO**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia RENORBIO – Ponto Focal UFPI, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite

Coorientador: Prof. Dr. Peter J. Eaton

TERESINA - PI

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

A663p Araújo, Alyne Rodrigues de.
Potencial biotecnológico da fração aquosa do extrato etanólico de *Terminalia fagifolia* Mart. e identificação do seu constituinte majoritário / Alyne Rodrigues de Araújo. – 2019.
127 f. : il.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.

“Orientador: Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite”.

“Coorientador: Prof. Dr. Peter J. Eaton”.

1. *Terminalia* sp. 2. Antifúngico. 3. Anti-Inflamatório.
4. Antioxidante. 5. Nanopartículas de Prata. I. Título.



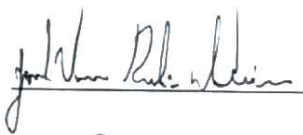


CDD 615.882

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: Alyne Rodrigues de Araújo

TÍTULO DO PROJETO: “POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA FRAÇÃO AQUOSA DO EXTRATO ETANÓLICO DE Terminalia fagifolia Mart. E IDENTIFICAÇÃO DO SEU CONSTITUINTE MAJORITÁRIO.”

PROFESSOR ORIENTADOR: José Roberto de Souza de Almeida Leite

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite - UFPI (Presidente)	<u>SATISFATORIO</u>	
Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo - UFPI (Examinador)	<u>SATISFATORIO</u>	
Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros - UFPI (Examinador)	<u>SATISFATORIO</u>	
Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho – UFPI (Examinador)	<u>SATISFATORIO</u>	
Profa. Dra. Alexandra Patrícia Rego Plácido do Nascimento - UNIPORTO (Examinadora)	<u>SATISFATORIO</u>	

DATA DA AVALIAÇÃO: 14 de Março de 2019.

HORÁRIO: 10h

LOCAL: Auditório do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-Tronco - Nupcelt/CCA-UFPI.

A Deus, Aos meus pais, Lúcia e João Manoel, Ao meu irmão, Alan e Ao meu marido, Victor Leonardo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela providência, coragem e inspiração.

A Nossa Senhora Aparecida, ao meu Anjo da guarda e todos os Santos e Anjos do céu que intercederam por mim ao longo dessa jornada.

A Universidade Federal do Piauí, especialmente ao *Campus* Ministro Reis Velloso, na pessoa do Professor Dr. Alexandro Marinho, Diretor do *Campus*.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, na pessoa da Professora Dr^a Carla Eiras, Coordenadora.

Ao meu orientador, Professor Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite, pela condução da minha carreira científica, amizade e companheirismo, muito obrigada!

Ao meu coorientador, Professor Dr. Peter Eaton, pelos ensinamentos em microscopia e amizade.

Ao Professor Dr. Paulo Humberto Moreira Nunes, pelo carinho e prontidão ao me fornecer os derivados de *T. fagifolia*.

A minha família, em especial meus pais, João Manoel de Araújo e Lúcia Maria Rodrigues de Araújo, pelas oportunidades, além do amor verdadeiro e dedicação a mim dispensados e ao meu irmão, Alan Rodrigues de Araújo, pelo companheirismo e torcida incondicional.

Ao meu marido, Victor Leonardo de Moraes Nobre, por toda dedicação, paciência, companheirismo, amor e pelo café com biscoito durante a escrita da tese.

A família do meu marido, em especial meus sogros, Márcio Antônio Monteiro Nobre e Zelinda Maria do Nascimento Carvalho de Moraes Nobre, e Elda Maria do Nascimento Carvalho de Moraes, pela força, carinho, dedicação e torcida de sempre.

Ao meu cunhado, Márcio Leonardo de Moraes Nobre, pela amizade e pelos conhecimentos acerca do mundo microbiano compartilhados.

Aos integrantes do Trio Ternura, Bruno da Silva Gomes e Everton Lopes, por todo carinho e amizade, além do apoio emocional.

A Ana Carolina Machado Leódido, pela amizade e por todo companheirismo na labuta diária.

Ao Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia – Biotec, especialmente àqueles que contribuíram diretamente com esta pesquisa.

Ao Professor Dr. Joilson Ramos de Jesus, pela amizade sincera, por estar sempre ao meu lado e pela ajuda científica.

A Professora Dr^a Durcilene Alves da Silva, pela amizade, companheirismo e contribuição científica.

A Professora Dr^a Leiz Maria Costa Veras, pela amizade e apoio científico.

A Jéssica Pires, Márcia Luana Gomes Perfeito, Maria Adelaide Guimarães, Taiane Oliveira, Antônia Carla, Flaviane França, Késsia Costa, Thaís Danielle pela amizade e pelos momentos compartilhados.

Às Patrícias do Laboratório, Ayslan Batista Barros, Bruno Iles, Fábio Oliveira, Gisele Araújo, Jéssica Teles e Raí Emanuel, pela amizade, companheirismo, conversas científicas, não-científicas, desafios de canto, problematizações, enfim, por estarem sempre ao meu lado.

Ao Manoel Brito e Airton, por toda dedicação, consideração e carinho.

A Higinalice e Luiz Felipe, pelos momentos de alegria diários.

A Hianny e Soraya, pela força e carinho.

Aos amigos de Doutorado, Eryka Andrades, Manoel Dias e Wilson, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos Elanno e Marianne, pelo companheirismo e amizade.

Ao Hygor Fernandes e Mário Sérgio Branco, pela cumplicidade, carinho e amizade.

Ao Jhones Dias e Kerolayne Melo, pelo empenho e amizade.

Aos colaboradores brasileiros e seus respectivos grupos de pesquisa ou Universidade: GEAMICOL, LAFIDG, LIMAV, NPPM, NUPMIA, IFSP, UNESP, UNB.

Aos colaboradores estrangeiros e seus respectivos grupos de pesquisa ou Universidade: REQUIMTE, i3S, Laboratório de RMN (Universidade de Aalborg).

Aos amigos que fiz durante a vida e que, mesmo anonimamente, torceram por mim.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz,
e os seus planos serão bem-sucedidos. ”

Provérbios 16

*“La vie n'est facile pour aucun de nous.
Mais quoi, il faut avoir de la
persévérance, et surtout de la confiance
en soi. Il faut croire que l'on est doué
pour quelque chose, et que, cette chose,
il faut l'atteindre coûte que coûte”*

“A vida não é fácil para nenhum de nós.
Mas, e daí? Precisamos ter perseverança
e acima de tudo confiança em nós
mesmos. Devemos acreditar que somos
bons em alguma coisa, e que, essa coisa,
deve ser alcançada a qualquer custo. ”

Marie Curie

ARAÚJO, A.R. **Potencial biotecnológico da fração aquosa do extrato etanólico de *Terminalia fagifolia* Mart. e identificação do seu constituinte majoritário.** 2019, 127f. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal UFPI. Orientador: Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite.

RESUMO

A espécie *Terminalia fagifolia* Mart., presente no cerrado brasileiro, se destaca pelo seu uso etnofarmacológico. Em estudos anteriores, a fração aquosa do extrato etanólico de *T. fagifolia* apresentou resultados promissores no tocante à atividade antibacteriana, antibiofilme, citotóxica, antiulcerogênica e vasorrelaxante, sendo a fração do extrato etanólico mais ativa dentre aquelas testadas. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi averiguar o potencial biotecnológico da fração aquosa do extrato etanólico de *T. fagifolia* Mart., bem como isolar e identificar seu constituinte majoritário. A fração aquosa foi avaliada quanto ao seu potencial antifúngico contra leveduras e fungos filamentosos, de acordo com os documentos M27-A3 e M38-A2 da CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2008), com posterior análise das alterações morfológicas em *Candida albicans* por microscopia de força atômica. O potencial anti-inflamatório da fração aquosa foi verificado por meio dos modelos de edema de pata e peritonite induzidos por carragenina em camundongos, além do modelo de neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeo em células microgлияis. A atividade antioxidante da fração aquosa foi caracterizada por ensaios *in vitro*, tais como sequestro dos radicais DPPH, ABTS, além da capacidade de redução do ferro (FRAP) e de absorção do radical oxigênio (ORAC). A toxicidade da fração aquosa foi testada em eritrócitos humanos e em larvas de *Galleria mellonella*. Para identificação do constituinte majoritário, o estudo fitoquímico da fração aquosa foi realizado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear. As características do mecanismo de ativação da molécula foram estudadas usando simulações computacionais de química quântica. O extrato etanólico e a fração aquosa de *T. fagifolia* foram utilizados para síntese verde de nanopartículas de prata (AgNPs), que foram caracterizadas por espectroscopia do ultra-violeta ao visível, infra-vermelho com transformada de Fourier, análise de rastreamento de nanopartículas, microscopia eletrônica de transmissão acoplada a espectroscopia por dispersão de energia e voltametria cíclica. Uma vez caracterizadas, as AgNPs foram testadas quanto a sua atividade antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP e ORAC), com determinação de fenólicos e flavonoides totais, além da sua atividade antibacteriana e antifúngica. O teste de hemólise foi realizado para verificar a atividade hemolítica das AgNPs. Após a realização dos testes, a fração aquosa demonstrou excelente potencial antifúngico, principalmente contra leveduras sensíveis e resistentes do gênero *Candida* sp.. Em relação aos modelos murinos utilizados, a fração aquosa diminuiu significativamente ($p < 0.05$) o edema de pata na terceira hora, com percentual de inibição do processo inflamatório semelhante ao da Indometacina, além disso, reduziu significativamente ($p < 0.05$) os níveis de malondialdeído no modelo de peritonite. Em micrógлияs, o pré-tratamento com a fração aquosa foi capaz de inibir significativamente a produção de fator nuclear kappa B após indução com lipopolissacarídeo. Quanto aos ensaios de toxicidade, a fração aquosa não demonstrou toxicidade contra as larvas

de *G. mellonella* e não diminuiu a viabilidade dos eritrócitos, nas concentrações $\leq 500 \mu\text{g/mL}$. A partir das análises fitoquímicas, identificou-se um derivado do ácido elágico, eschweilenol C, como o constituinte majoritário da fração aquosa. Os estudos teóricos mostraram semelhança estrutural entre a molécula isolada e a indometacina, além de um excelente potencial antioxidante. Com o extrato etanólico e a fração aquosa foi possível sintetizar nanopartículas de prata esféricas e poligonais, respectivamente e as AgNPs sintetizadas apresentaram atividade antimicrobiana e potencial antioxidante. Os resultados obtidos nessa investigação indicam que a fração aquosa do extrato etanólico tem potencial para aplicação na área biomédica, com baixa toxicidade. Com a fração aquosa rica em metabólitos secundários foi possível reduzir e estabilizar a prata, resultando em nanopartículas de prata bioativas.

Palavras-chave: *Terminalia* sp.; antifúngico; anti-inflamatório; antioxidante; nanopartículas de prata; ácido elágico.

ARAÚJO, A.R. **Biotechnological potential of the aqueous fraction of the ethanolic extract of *Terminalia fagifolia* Mart. and identification of its major constituent.** 2019, 127s. Thesis, PhD Program in Biotechnology, RENORBIO, Focal Point UFPI. Doctoral supervisor: Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite.

ABSTRACT

The species *Terminalia fagifolia* Mart., present in the Brazilian cerrado, stands out for its ethnopharmacological use. In previous studies, the aqueous fraction of the ethanolic extract of *T. fagifolia* showed promising results regarding the antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities, being the fraction of the ethanolic extract more active among those tested. Thus, the objective of this study was to investigate the biotechnological potential of the aqueous fraction of the ethanolic extract of *T. fagifolia* Mart., as well as to isolate and identify its major compound. The aqueous fraction was evaluated for its antifungal potential against yeasts and filamentous fungi, according to the documents M27-A3 and M38-A2 of CLSI (2008), with subsequent analysis of the morphological alterations in *Candida albicans* by atomic force microscopy. The anti-inflammatory potential of the aqueous fraction was verified by carrageenan-induced paw edema and peritonitis models in mice, in addition to the model of LPS-induced neuroinflammation in microglial cells. The antioxidant activity of the aqueous fraction was characterized by *in vitro* assays, such as sequestration of DPPH, ABTS radicals, in besides iron reduction capacity (FRAP) and ORAC value. Toxicity of the aqueous fraction was tested on human erythrocytes and *Galleria mellonella* larvae. For the identification of the major constituent, the phytochemical study of the aqueous fraction was performed using HPLC, LC-MS and NMR. Further insights on the activation mechanism were studied using quantum chemistry computer simulations. The ethanolic extract and the aqueous fraction of *T. fagifolia* were used for green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs), which were characterized by UV-vis spectroscopy, FTIR, NTA, TEM/EDS and cyclic voltammetry. Once characterized, the AgNPs were tested for their antioxidant activity (DPPH, ABTS, FRAP and ORAC), with determination of phenolics and total flavonoids, in addition to their antibacterial and antifungal activity. The haemolysis test was performed to verify the hemolytical activity of AgNPs. After the tests, the aqueous fraction showed excellent antifungal potential, especially against sensitive and resistant yeasts of the genus *Candida* sp.. In relation to the murine models used, the aqueous fraction significantly ($p < 0.05$) decreased the paw edema in the third hour, with percentage of inhibition of the inflammatory process similar to Indomethacin, in addition, significantly ($p < 0.05$) reduced the levels of malondialdehyde in the peritonitis model. In microglia, pre-treatment with the aqueous fraction was able to significantly inhibit the production of NF- κ B after induction with LPS. As for the toxicity tests, the aqueous fraction showed no toxicity against *G. mellonella* larvae and did not decrease the viability of erythrocytes at the concentrations $\leq 500 \mu\text{g/mL}$. From the phytochemical analyzes, eschweilenol C, an ellagic acid derivative, was identified as the major constituent of the aqueous fraction. The theoretical studies showed structural similarity between isolated molecule and indomethacin, besides an excellent antioxidant potential. With the ethanolic extract and the aqueous fraction it was possible to synthesize spherical and polygonal silver nanoparticles, respectively, and the synthesized AgNPs presented antimicrobial activity and antioxidant potential. The results

obtained in this investigation indicate that the aqueous fraction of ethanolic extract has potential for application in the biomedical area, with low toxicity. With the aqueous fraction rich in secondary metabolites it was possible to reduce and stabilize silver, resulting in bioactive silver nanoparticles.

Keywords: *Terminalia* sp.; antifungal; anti-inflammatory; antioxidant; silver nanoparticles; ellagic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** *Terminalia fagifolia* Mart. (Combretaceae). 31
- Figura 2.** Detalhes da folha e da flor de *Terminalia fagifolia* Mart. 32
(Combretaceae).
- Figura 3.** Esquema da obtenção da fração aquosa a partir da casca do caule de *T. fagifolia* (NUNES et al., 2014). 39
- Figura 4.** Esquema ilustrativo do experimento realizado para determinação da 41
atividade antifúngica.
- Figura 5.** Imagens 3D de microscopia de força atômica (MFA) de células de 59
Candida albicans.
- Figura 6.** Imagens topográficas de microscopia de força atômica (MFA) de células 60
de *Candida albicans*.
- Figura 7.** Avaliação da atividade da fração aquosa (62,5 a 2000 µg/mL) contra 61
biofilme formado (24 h) de *Candida albicans*.
- Figura 8.** Visualização do biofilme de *Candida albicans* SC5314 por microscopia 62
de fluorescência.
- Figura 9.** Redução do edema de pata induzido por carragenina em camundongos 64
pré-tratados com fração aquosa - FAq (0,6, 1,2 ou 2,5 mg/kg).
- Figura 10.** Percentual de inibição da inflamação pela fração aquosa - FAq (0,6, 1,2 65
ou 2,5 mg/kg).
- Figura 11.** Concentração de MDA peritoneal depois do tratamento com a fração 66
aquosa - FAq (1,2 mg/kg).
- Figura 12.** Níveis celulares do inibidor da via do NF-kB em células microgliais, 67
tratadas ou não-tratadas com a fração aquosa - FAq.
- Figura 13.** Avaliação da viabilidade de eritrócitos tratados com a fração aquosa – 69
Faq.
- Figura 14.** Curva de sobrevivência de *Galleria mellonella* tratada com PBS or 70
fração aquosa (5,0; 2,5 or 1,2 mg/kg) após sete dias de observação.
- Figura 15.** Cromatograma do Extrato Etanólico (EEt) de *T. fagifolia* no $\lambda=254$ nm, 72
mostrando o tempo de retenção dos picos majoritários.
- Figura 16.** Cromatograma da Fração Aquosa (FAq) do EEt de *T. fagifolia* no 72
 $\lambda=254$ nm, mostrando o tempo de retenção dos picos majoritários.

Figura 17.	Cromatogramas sobrepostos da Fração Aquosa (vermelho) e do EEt (verde) de <i>T. fagifolia</i> no $\lambda=254\text{nm}$.	73
Figura 18.	Cromatograma da Mangiferina no $\lambda=254\text{nm}$, mostrando o tempo de retenção do pico majoritário.	74
Figura 19.	Biossíntese de compostos fenólicos, flavonoides e xantonas, a partir do Ácido Chiquímico.	74
Figura 20.	Espectro de massas do constituinte majoritário com $T_R = 26,46$ min da FAq de <i>T. fagifolia</i> , obtido após Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (CL-EM).	75
Figura 21.	Estrutura química da Mangiferina.	75
Figura 22.	Espectro de massas da Mangiferina, obtido após Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (CL-EM).	76
Figura 23.	Estrutura química do eschweilenol C.	76
Figura 24.	Representação molecular (3D) do Eschweilenol C e da Indometacina e IFCA para reações em direção a nucleófilos (f+), eletrófilos (f-) e radicais livres (f0).	79
Figura 25.	Características acerca do caráter doador/receptor de elétrons do Eschweilenol C.	79
Figura 26.	Local de maciez em relação à reatividade com radicais para eschweilenol C.	80
Figura 27.	Figura esquemática da síntese verde das AgNPs (A) e espectros de UV-vis das soluções de AgNPs (B).	82
Figura 28.	Gráficos de distribuição de tamanho das AgNPs a partir de análises por NTA.	84
Figura 29.	Espectros de FTIR dos extratos, frações e AgNPs sintetizadas.	85
Figura 30.	Mecanismo sugerido de síntese e estabilização de AgNPs com extratos e frações de <i>T. fagifolia</i> .	86
Figura 31.	Morfologia das AgNPs por microscopia eletrônica de transmissão - MET.	87
Figura 32.	Análise por EDS da nanopartícula de prata sintetizada com a fração aquosa de <i>T. fagifolia</i> (AgNPFAq).	88
Figura 33.	Histogramas de dispersão das AgNPs a partir de imagens de MET.	88
Figura 34.	Voltametria de pulso diferencial para AgNPs, extratos e frações.	91

Figura 35.	Conteúdo de fenólicos totais das AgNPs, extratos e frações de <i>T. fagifolia</i> .	92
Figura 36.	Possíveis mecanismos para a atividade antibacteriana de nanopartículas de prata.	96
Figura 37.	Imagens de MFA de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	97
Figura 38.	Percentual de hemólise induzida por AgNPs em diferentes concentrações.	100

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1	Métodos para síntese de nanopartículas metálicas de acordo com AHMED et al., 2016.	36
Tabela 2	Estirpes fúngicas utilizadas para determinação da concentração inibitória mínima.	40
Tabela 3	Concentração inibitória mínima - CIM da fração aquosa (FAq) contra leveduras e fungos filamentosos.	57
Tabela 4	Níveis de malondialdeído - MDA (nmol/mL) nos diferentes grupos estudados (média \pm EPM).	66
Tabela 5	Ensaio para determinação da capacidade antioxidante da fração aquosa - Faq.	68
Tabela 6	Dados da espectroscopia de RMN.	77
Tabela 7	Denominação utilizada para as nanopartículas sintetizadas	81
Tabela 8	Tamanho médio das nanopartículas de prata (AgNPs), índice de polidispersão (PDI), potencial Zeta e concentração das AgNPs.	83
Tabela 9	Atividade antioxidante das AgNPs, extratos e frações determinados pelos ensaios de ABTS, DPPH e FRAP.	89
Tabela 10	Valores de Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) em $\mu\text{g/mL}$ das AgNPs, AgNO_3 , extratos, frações e antibacterianos padrão (Controle positivo) contra as bactérias testadas.	93
Tabela 11	Valores de Concentrações Inibitórias Mínimas (MICs) de AgNPs, AgNO_3 , extratos, frações e Itraconazol contra fungos testados em $\mu\text{g/mL}$.	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
AgNPEEt	Nanopartículas de prata sintetizadas com extrato etanólico
AgNPEHa	Nanopartículas de prata sintetizadas com extrato hidroalcoólico
AgNPFAq	Nanopartículas de prata sintetizadas com fração aquosa
AgNPFHa	Nanopartículas de prata sintetizadas com fração hidroalcoólica
AgNPs	Nanopartículas de prata
ATCC	American Type Culture Collection
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DLS	Espalhamento Dinâmico da Luz (Dynamic Light Scattering)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FTIR	Infra-vermelho com Transformada de Fourier
g	grama
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> (orbital molecular ocupado de mais alta energia)
IFCA	Índices de Fukui Condensados sobre os Átomos
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> (orbital molecular desocupado de mais baixa energia)
M	Molar
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
mg	Miligrama
mL	mililitro
MRSA	Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus
NTA	Análise de rastreamento de nanopartículas
PBP	Protein Binding Penicilin
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TFA	Trifluoroacetic acid
TPC	Conteúdo de fenólicos totais
TTC	Cloreto de Trifeniltetrazólio
UFC	Unidades formadoras de colônias
UV-vis	Ultra-violeta visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	27
3.1 Plantas medicinais.....	28
3.2 Família Combretaceae.....	29
3.3 <i>Terminalia fagifolia</i> Mart.....	31
3.4 Atividade antifúngica de extratos de plantas.....	32
3.5 Atividade anti-inflamatória e antioxidante de extratos de plantas.....	34
3.6 Nanotecnologia.....	34
3.7 Síntese verde de nanopartículas de prata.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 Coleção do material vegetal, preparação dos extratos e partição das frações do extrato etanólico.....	39
4.2 Ensaio para avaliação da atividade antifúngica da FAq.....	39
4.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	39
4.2.2 Análise do efeito antifúngico da fração aquosa por Microscopia de Força Atômica – MFA.....	42
4.2.3 Estudo da atividade contra o biofilme de <i>Candida albicans</i>.....	42
4.3 Avaliação in vivo do potencial anti-inflamatório da fração aquosa – FAq.....	40
4.3.1 Animais.....	43

4.3.2 Edema de pata induzido por carragenina.....	43
4.3.3 Peritonite induzida por carragenina.....	43
4.3.4 Análise estatística.....	44
4.4 Avaliação da inibição de NF-kB em modelo de neuroinflamação em micróglia.....	44
4.5 Averiguação do potencial antioxidante da fração aquosa – FAq.....	45
4.5.1 Atividade antioxidante pelo ensaio de ABTS.....	45
4.5.2 Sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazilo)	45
4.5.3 Ensaio para determinação da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)	45
4.5.4 Ensaio para mensurar o poder antioxidante de redução do Ferro (FRAP)	46
4.6 Avaliação da toxicidade da FAq.....	46
4.6.1 Teste de viabilidade de eritrócitos humanos.....	46
4.6.2 Avaliação de toxicidade no modelo de <i>Galleria mellonella</i>	46
4.7 Estudo fitoquímico da fração aquosa – FAq.....	47
4.7.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	47
4.7.2 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM)	47
4.7.3 Ressonância magnética nuclear (RMN)	47
4.8 Análise de Química Quântica Computacional da molécula isolada e identificada.....	48
4.9 Síntese e caracterização de nanopartículas de prata (AgNPs) com a fração aquosa – FAq.....	50
4.10 Testes para determinação da capacidade antioxidante das AgNPs.....	51
4.11 Análise Eletroquímica das AgNPs.....	51
4.12 Estimativa do conteúdo de fenólicos totais (CFT)	51

de <i>T. fagifolia</i>	52
4.14 Estudo do efeito das AgNPs sobre a morfologia das bactérias por Microscopia de Força Atômica (MFA)	52
4.15 Avaliação da Atividade Antifúngica das AgNPs, extratos e frações de <i>T. fagifolia</i>	53
4.16 Estudo da atividade hemolítica das AgNPs.....	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÃO	102
7 PERSPECTIVAS	104
REFERÊNCIAS	106

ANEXOS

ANEXO A – ARTIGOS PUBLICADOS

1 INTRODUÇÃO

Existem evidências que as plantas medicinais são usadas desde o tempo pré-histórico para o tratamento das mais diversas enfermidades, fazendo parte das interações humanas com o ambiente (ADOVASIO; FRY, 1976; HALBERSTEIN, 2005; SASIDHARAN et al., 2011). O trabalho taxonômico realizado pelo naturalista sueco *Carl von Linné* (1707-1778), no século XVIII, classificou milhares de espécies botânicas, permitindo a padronização na documentação relacionada ao histórico do uso das plantas medicinais (PETROVSKA, 2012; AJLAN, 2016). O conhecimento etnobotânico é transmitido através de gerações e o estudo farmacológico e fitoquímico de extratos de plantas levaram à caracterização de muitas moléculas bioativas (MANDAL et al., 2013).

Os principais metabólitos secundários que promovem uma ação fisiológica no organismo humano são taninos, alcaloides, terpenoides, esteroides, flavonoides e fenóis. (TIWARI et al., 2011). Atualmente, os recursos vegetais disponíveis ainda representam uma importante alternativa terapêutica, tendo em vista que muitas espécies produzem componentes químicos que atuam como analgésicos, antimicrobianos, anti-inflamatórios, antidiarreicos, digestivos auxiliares, antioxidantes e reguladores de fertilidade (NUNES et al., 2014; ARAÚJO et al., 2015; JAIN; CHOUDHARY; JAIN, 2015; TERÇAS et al., 2017). Geralmente, as drogas à base de plantas são facilmente disponíveis, relativamente seguras, menos dispendiosas, eficientes e raramente apresentam efeitos colaterais (YADAV; AGRAWALA, 2011).

Plantas nativas, como membros da família Combretaceae, são muito utilizados pela população para fins medicinais. Essa família compreende 20 gêneros e cerca de 600 espécies de plantas ricas em metabólitos secundários, distribuídas, principalmente, entre os trópicos. O gênero *Terminalia* sp., se destaca por possuir cerca de 200 espécies amplamente utilizadas na medicina popular, que possuem uma gama de metabólitos secundários com comprovada atividade biológica. Dentre elas, a espécie *Terminalia fagifolia* Mart., presente no cerrado brasileiro, chama atenção pelo seu uso etnofarmacológico para o tratamento de doenças crônicas e infecciosas (EXEL; STACE, 1966; ALMEIDA et al., 1998; MASOKO; PICARD; ELOFF, 2005; AYRES et al., 2009; VENKATALAKSHMI; VADIVEL; BRINDHA, 2016).

As doenças infecciosas se mantêm prevalentes, consistindo em um problema de saúde mundialmente reconhecido, principalmente, devido à capacidade que os micro-organismos (bactérias e fungos) têm de desenvolver mecanismos de resistência aos fármacos disponíveis. Esse fato tem aumentado o número de mortes e internações, principalmente, se associadas a outras comorbidades (OLAR et al., 2010; MOHANTY et al., 2012). A Organização Mundial da Saúde (OMS) alerta que novos mecanismos de resistência microbianos estão surgindo e se

disseminando globalmente, fato que diminui a obtenção de sucesso no tratamento de doenças infecciosas comuns, resultando em doenças prolongadas, deficiência e morte (WHO, 2018).

Tanto as doenças infecciosas como outros estímulos nocivos (substâncias químicas perigosas ou insultos físicos) podem desencadear processos inflamatórios no corpo (MEDZHITOV, 2008; ROCK et al., 2010). Tais processos associados a outras doenças reduzem significativamente a qualidade de vida das pessoas em todo o mundo (ORCHARD et al., 2017; BACCI et al., 2018). Vale ressaltar que a inflamação aguda é uma resposta curta, caracterizada pela reação do sistema imunológico aos estímulos mencionados anteriormente, culminando com infiltração celular, cicatrização e reparo tecidual. No entanto, o processo inflamatório pode ser prolongado e tornar-se crônico, promovendo dano tecidual que pode levar à perda da função (NATHAN; DING, 2010; SELDERS et al., 2017). Apesar do efeito terapêutico, os anti-inflamatórios disponíveis para o tratamento dessas doenças causam efeitos colaterais indesejáveis que poderiam ser minimizados pelo uso de produtos naturais com potencial anti-inflamatório (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011).

Além do exposto anteriormente, extratos e frações ricos em compostos fenólicos têm, notavelmente, potencial para atividade antioxidante (ERKAN, 2012). Tais compostos contribuem para combater o excesso de radicais livres no organismo e, conseqüentemente, prevenir ou minimizar os danos peculiares do tecido inflamado, além de reprimir o aparecimento ou progressão de doenças crônicas e degenerativas (DAVALLI et al., 2016). A prevalência das doenças degenerativas também tem aumentado nos últimos anos, diminuindo consideravelmente a qualidade de vida das pessoas, principalmente dos idosos (BOEING et al., 2012; SVRAKA et al., 2017). Entre as doenças degenerativas, algumas que afetam o sistema nervoso central podem ser desencadeadas por processos inflamatórios com ativação crônica de células microgлияis, como as doenças de Alzheimer e Parkinson e esclerose múltipla (GLASS et al., 2010; SOLLEIRO-VILLAVICENCIO; RIVAS-ARANCIBIA, 2018).

Dessa forma, as populações tradicionais usam plantas ricas em metabólitos secundários para o tratamento de uma grande variedade de doenças, e o estudo desses derivados naturais pode propiciar tanto a confirmação do efeito terapêutico esperado, em função do uso empírico pela população, como a descoberta de novas drogas (VALLI et al., 2012). O isolamento dos constituintes presentes nos derivados de *T. fagifolia* é importante para a padronização dos efeitos farmacológicos observados, além de ser uma possível fonte de identificação de novas moléculas. No entanto, os extratos e frações dessa espécie, ricos em metabólitos secundários,

também podem ser bastante úteis para aplicações biotecnológicas relacionadas à área da saúde, particularmente no campo da nanotecnologia (PARSONS; PERALTA-VIDEA; GARDEA-TORRESDEY, 2007; GRIFFIN et al., 2018).

Materiais em escala nanométrica tem propriedades exclusivas que podem ser aplicadas em diversas áreas da Biotecnologia, inclusive na área médica para tratar e/ou curar doenças com elevada morbimortalidade. A nanotecnologia é um campo da ciência que tem crescido cada vez mais, devido à versatilidade e às propriedades únicas que os nanomateriais possuem (AMIN; HWANG; PARK, 2011). As nanopartículas de prata, que são bem conhecidas e utilizadas principalmente em função das suas propriedades antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes, são atualmente os nanomateriais mais utilizados nos produtos disponibilizados para consumo. Nesse sentido, a síntese verde de nanopartículas busca manter essas propriedades de maneira simples, eficiente, barata, ecológica e com grandes possibilidades de produção em escala industrial (TOLAYMAT et al., 2010; ZHANG et al., 2016).

Há alguns anos, os derivados de plantas, principalmente extratos e frações ricos em moléculas bioativas, são reconhecidos pela sua capacidade de reduzir íons metálicos (GOVINDARAJU et al., 2010; PARK et al., 2011; SATHISHKUMAR et al., 2017). Sabendo-se das possibilidades de aplicação dos extratos vegetais e, da necessidade de novas alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças que elevam a morbimortalidade da população, este estudo buscou a avaliação do potencial biotecnológico da fração aquosa do extrato etanólico de *T. fagifolia* Mart. e identificação do seu constituinte majoritário.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar o potencial biotecnológico da fração aquosa do extrato etanólico de *Terminalia fagifolia* Mart. e identificar o seu constituinte majoritário.

2.2 Objetivos Específicos:

- ✓ Averiguar a atividade antifúngica *in vitro* da fração aquosa frente a leveduras e fungos filamentosos e o potencial antibiofilme contra biofilme de *Candida albicans*;
- ✓ Investigar a capacidade antioxidante da fração aquosa *in vitro*;
- ✓ Estudar o potencial anti-inflamatório da fração aquosa em modelos murinos de edema de pata e peritonite induzidos por carragenina;
- ✓ Testar o potencial anti-inflamatório em modelo de neuroinflamação em micróglia induzida por lipopolissacarídeo (LPS);
- ✓ Determinar a toxicidade da fração aquosa em larvas de *Galleria mellonella* e em eritrócitos humanos;
- ✓ Isolar e identificar o constituinte majoritário da fração aquosa;
- ✓ Caracterizar a molécula identificada por meio de estudos *in silico*;
- ✓ Sintetizar e caracterizar nanopartículas de prata com a fração aquosa e com outros derivados da *Terminalia fagifolia*;
- ✓ Verificar a capacidade antioxidante das nanopartículas de prata sintetizadas;
- ✓ Testar a atividade antibacteriana e antifúngica das nanopartículas sintetizadas;
- ✓ Estudar a atividade hemolítica das nanopartículas de prata em eritrócitos humanos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Plantas medicinais

A medicina tradicional é baseada no conhecimento empírico, passado de geração em geração e adquirido a partir da observação da natureza, principalmente a observação do comportamento animal. A partir dos fatos observados, a exploração dos recursos naturais para fins medicinais acontece gradualmente, principalmente por difusão cultural (HALBERSTEIN, 2005; AJLAN, 2016; TSABANG et al, 2016). As plantas medicinais ainda são muito utilizadas para tratamento e cura de diversas enfermidades, cerca de 80% da população residente nos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para os cuidados primários de saúde, pois esta é considerada segura e acessível (SASIDHARAN et al., 2011; BHATIA et al., 2014).

A etnomedicina e a farmacologia tradicional estão ganhando cada vez mais reconhecimento na medicina moderna devido à busca por novas alternativas terapêuticas. Além disso, o estudo para comprovação científica das propriedades medicinais de produtos naturais, permitiu o isolamento e identificação de moléculas diversificadas que possuem uma vasta gama de atividades biológicas e, até hoje, têm sido utilizadas para o desenvolvimento de novos fármacos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), plantas medicinais seriam a melhor fonte para obtenção de drogas (FYHRQUIST et al., 2002; AWAAD; AL-JABER, 2010; YADAV; AGRAWALA, 2011; HASSAN, 2013).

A extração com solventes apropriados e procedimentos padronizados permite a separação de porções biologicamente ativas do material vegetal, que se constituem de misturas relativamente complexas de metabólitos com afinidade química pelo solvente utilizado, após difusão do mesmo no material sólido da planta (geralmente moído ou triturado). Os produtos podem se apresentar na forma líquida, semi-sólida ou pó (após remoção do solvente) e a população, geralmente, usa na forma de preparações conhecidas como decocções, infusões, tinturas, dentre outros (HANDA et al., 2008; TIWARI et al., 2011).

As ervas medicinais podem promover muitas atividades biológicas benéficas ao homem, tais como atividade anticâncer, antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antidiarreica, analgésica e cicatrizante. Entretanto, experimentos e ensaios clínicos necessitam ser realizados para comprovação do uso tradicional da planta, bem como a sua segurança a longo prazo (SASIDHARAN et al., 2011). Alguns exemplos clássicos de substâncias derivadas de plantas que tiveram seu efeito comprovado cientificamente e são bastante utilizadas na clínica médica, são: ácido acetilsalicílico, morfina, codeína, digoxina, quinina, reserpina, taxol, doxorubicina,

vimblastina, vincristina, dentre outras (BONADONNA et al., 2004; HALBERSTEIN, 2005; FALK et al., 2017).

Alguns países, como a Alemanha, apostam na fitoterapia racional como opção de tratamento, esta se baseia na aplicação de preparações cuja eficiência depende da dose aplicada e dos componentes ativos identificados, após comprovação de sua eficiência por experimentos e testes clínicos. Tratam-se de preparações padronizadas de produtos vegetais que seguem os pré-requisitos de boas práticas de fabricação exigidos pelas agências reguladoras (PETROVSKA, 2012). A escolha pelo tratamento com fitoterápicos é crescente nos últimos anos, por serem considerados mais seguros e em função da crença de que esse tipo de tratamento promova uma vida mais natural e saudável (O'HARA et al., 1998; KAZEMIPOOR et al., 2012; EKOR, 2014).

No Brasil, apesar da enorme biodiversidade disponível, ainda existem poucos fitoterápicos no mercado, a exemplo do Acheflan®, primeiro fitomedicamento comercializado no país, à base de óleo essencial de *Varronia curassavica* (*Cordia verbenacea*), rico em α -humuleno e trans-cariofileno. Sua produção e comercialização foi efetivada após confirmação da atividade anti-inflamatória dos constituintes do óleo por Fernandes et al. (2007) (BOLZANI et al., 2012). Em 2009, O Ministério da Saúde, por meio do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, elaborou um documento que consiste em uma Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS - RENISUS, na qual constam 70 espécies com potencial terapêutico, além da erva baleeira (*V. curassavica*) (BRASIL, 2009).

Entretanto, algumas plantas nativas do Brasil e ricas em metabólitos secundários ainda não estão citadas nessa lista, como as plantas pertencentes à família Combretaceae.

3.2 Família Combretaceae

A família Combretaceae pertence à ordem Myrtales e compreende 20 gêneros com cerca de 600 espécies catalogadas em áreas tropicais e subtropicais, dentre eles 5 gêneros são recorrentes no Brasil e os gêneros *Combretum* sp. e *Terminalia* sp. são os que mais se destacam. As plantas dessa família, geralmente, crescem em lugares bem drenados, ao longo de córregos, rios e vales (TAN et al., 2002; VENKATALAKSHMI; VADIVEL; BRINDHA, 2016; MORGAN et al., 2018). É uma família de ervas, arbustos e árvores ricas em taninos, flavonoides, terpenoides e estilbenoides (ELOFF; KATERERE; MCGAW, 2008; LIMA et al., 2012).

Os membros da família Combretaceae são muito utilizados para fins medicinais em vários continentes no mundo, principalmente o caule e as raízes (ELOFF; KATERERE; MCGAW, 2008). Isto inclui o tratamento de distúrbios e dores abdominais, dores nas costas, tosse, resfriado, conjuntivite, diarreia e disenteria, dismenorreia, otite, febre, cefaleia, ancilostomíase, infertilidade em mulheres, hanseníase, pneumonia, peçonhas de escorpião ou cobra, sífilis, úlcera gástrica, doenças venéreas, cardiopatias, cálculos biliares, hemorragias nasais e astenia (FYHRQUIST et al., 2002; MASOKO; PICARD; ELOFF, 2005; FYHRQUIST, 2007).

O gênero *Terminalia*, pertencente à família Combretaceae, compreende cerca de 200 espécies distribuídas em regiões tropicais, que variam de arbustos a grandes árvores e são amplamente utilizadas na medicina popular. O nome do gênero vem do latim *Terminus*, devido a disposição das folhas que aparecem nas porções terminais dos brotos. As plantas desse gênero são ricas em diversos metabólitos secundários, tais como triterpenos pentacíclicos e seus derivados glicosilados, flavonoides, taninos e outros compostos aromáticos (GARCEZ et al., 2003a; GARCEZ et al., 2003b; GARCEZ et al., 2006; AYRES et al., 2009; COCK, 2015; FAHMY; AL-SAYED; SINGAB, 2015; VENKATALAKSHMI; VADIVEL; BRINDHA, 2016).

Pesquisas relatam que as plantas desse gênero possuem atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, hipoglicêmica, anti-mutagênica, antioxidante, antiulcerogênica, anti-nociceptiva, anti-proliferativa e cicatrizante, entre outras atividades farmacológicas (KAUR et al., 2002; GUPTA, 2012; CHANDA et al., 2013; DÉSIÉ et al., 2014; NUNES et al., 2014; RATHINAMOORTHY; THILANGAVATHI, 2014; ARAÚJO et al., 2015). Muitas espécies do gênero *Terminalia* apresentam potente atividade antibacteriana, como a *T. chebula*, e algumas espécies se mostraram efetivas para inibir o crescimento fúngico, principalmente de leveduras (*T. prunioides*, *T. brachystemma*, *T. sericea*, *T. gazensis*, *T. mollis* and *T. sambesiaca*). Substâncias isoladas de plantas do gênero também mostram atividades biológicas promissoras, como a casuarinina, isolada de *T. arjuna*, que foi capaz de inibir a replicação viral de Herpes vírus (MALEKZADEH et al., 2001; CHENG; LIN; LIN, 2002; MASOKO; PICARD; ELOFF, 2005).

Reddy et al. (2009) ao testarem o ácido chebulágico, derivado de *Terminalia chebula*, comprovaram a atividade citotóxica dessa substância sobre linhagens de células cancerosas por indução de apoptose. Chen e Li (2006) testaram punicalagina, o tanino mais abundante nas folhas de *Terminalia catappa* quanto à sua atividade citotóxica e observaram redução na

viabilidade celular. Apesar da vasta literatura sobre plantas desse gênero, existem poucos estudos acerca da espécie *T. fagifolia* que é o foco deste trabalho.

3.3 *Terminalia fagifolia* Mart.

Terminalia fagifolia Mart. (Combretaceae) (**Fig. 1**) é uma planta nativa, de grande porte (cerca de 14 m), encontrada no cerrado brasileiro, inclusive no meio-norte do Brasil, conhecida popularmente como capitão, capitão-do-mato, capitão-do-cerrado, capitão-do-campo, mirindiba, pau-de-bicho e cascudo. Trata-se de uma árvore melífera e ornamental, utilizada tanto para fins artesanais (frutos) como na marcenaria e construção civil (madeira). Na medicina popular, as cascas do caule são usadas no combate de aftas, tumores e distúrbios gastrointestinais (ALMEIDA et al., 1998; SOARES-NETO et al., 2014).

Figura 1. *Terminalia fagifolia* Mart. (Combretaceae).



(Foto: Valdelânia Gomes)

O estudo dos caracteres morfológicos das folhas de *T. fagifolia* demonstra um formato elíptico ($3,0-4,3 \times 9,0-1,5$ cm) com ápice agudo ou arredondado e pecíolo de 1 a 2 mm de comprimento. As flores são amareladas e tomentosas ($3,5-4,0 \times 3,0-3,5$ mm) e os frutos são

alados (SOARES-NETO et al., 2014). Os detalhes das folhas e da flor podem ser observados na **Figura 2**.

Figura 2. Detalhes da folha e da flor de *Terminalia fagifolia* Mart. (Combretaceae).



(Foto: João de Deus Medeiros)

Estudos realizados com *T. fagifolia* mostraram que o extrato das cascas e das folhas é rico em (+)-catechin, flavonoides, 1,3-diarilpropanos, triterpenos pentacíclicos glicosilados e não glicosilados, ácido gálico e sitosterol, corroborando com a composição de outras plantas do mesmo gênero. Estes compostos podem apresentar diversas atividades farmacológicas de importância para a saúde humana e animal (AYRES et al., 2009; GARCEZ et al., 2006).

Garcez et al. (2006) demonstraram efeito anti-proliferativo de substâncias isoladas do extrato etanólico de *T. fagifolia*, Nunes et al. (2014) comprovaram o efeito antiulcerogênico, gastroprotetor, bem como o potencial antioxidante de extratos e frações derivados da casca do caule de *T. fagifolia*. A atividade antibacteriana foi demonstrada por Araújo et al. (2015), concomitantemente ao relato do potencial antibiofilme e citotóxico do extrato etanólico e frações de *T. fagifolia*; enquanto o efeito vasorrelaxante, dependente de canais de K^+ , foi elucidado por Carvalho et al. (2019). Nos três últimos estudos citados acima, a fração aquosa do extrato etanólico de *T. fagifolia* apresentou bons resultados para os testes realizados, sendo a mais ativa dentre as frações utilizadas. Apesar disso, o seu potencial antifúngico e anti-inflamatório, bem como seu potencial para síntese de nanopartículas de prata ainda não foi demonstrado.

3.4 Atividade antifúngica de extratos de plantas

Comumente, as plantas medicinais produzem moléculas que funcionam como agentes protetores contra micro-organismos ou fitopatógenos. Estas moléculas podem ser extraídas e

testadas contra fungos patogênicos no intuito de suprir a necessidade por alternativas para o tratamento de plantas, animais e seres humanos, com reduzidos efeitos colaterais e menores riscos ao meio ambiente (SHUPIN; ELOFF, 2017; NAZZARO et al., 2017). O uso de fármacos imunossupressores, bem como o aumento na sobrevivência de pacientes com enfermidades que comprometem o sistema imunológico, permitiram uma maior disseminação e acometimento da população por infecções causadas por fungos oportunistas. O aumento na prevalência dessas infecções ocorre em todo o mundo, tanto em países subdesenvolvidos, como em países desenvolvidos (FISHMAN, 2013; BADIEE; HASHEMIZADEH, 2014).

Os principais antifúngicos disponíveis no mercado são derivados azólicos, alilaminas, equinocandinas, além da griseofulvina e flucitosina, tendo como principais alvos a membrana plasmática e a parede celular das células fúngicas (MAZU et al., 2016; SCORZONI et al., 2017). O uso indiscriminado desses antifúngicos propicia o desenvolvimento de resistência pelos micro-organismos e os efeitos colaterais associados ao seu uso, são limitantes durante a implementação desses fármacos como opção terapêutica (NIGAM, 2015). Neste contexto, as plantas ricas em metabólitos secundários (alcaloides, taninos, flavonoides, e compostos fenólicos) representam alternativas oportunas, por possuírem moléculas que podem atingir as células fúngicas com mecanismos de ação diferenciados, podendo atuar isoladamente ou em sinergismo com os fármacos atualmente usados na prática clínica (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012; MURTAZA; MUKHTAR; SARFRAZ, 2015).

Masoko, Picard e Eloff (2005) testaram a atividade antifúngica de extratos de seis espécies de *Terminalia* (*T. prunioides*, *T. brachystemma*, *T. sericea*, *T. gazensis*, *T. mollis* e *T. sambesiaca*) contra fungos leveduriformes e fungos filamentosos (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporum canis* e *Sporothrix schenckii*), demonstrando o potencial antifúngico de plantas desse gênero. Os estudos de Fyhrquist et al. (2015) também mostram o potencial antifúngico de extratos derivados desse gênero (*T. sambesiaca*, *T. sericea* e *T. kaiserana*) contra *Candida glabrata* e *C. neoformans*.

Dentre outros sinais e sintomas, as infecções fúngicas são acompanhadas pela resposta imune do organismo acometido, com surgimento de processos inflamatórios associados, tais como ativação de fatores de transcrição e secreção de mediadores inflamatórios. Nesse caso, vale salientar que extratos ricos em compostos fenólicos e flavonoides também podem ser anti-inflamatórios, atuando tanto no combate à infecção como na atenuação da resposta imune (CALIXTO; OTUKI; SANTOS, 2003; RICHARDSON; MOYES, 2015; TUNG MUNNITHUM et al., 2018).

3.5 Atividade anti-inflamatória e antioxidante de extratos de plantas

Inúmeros estímulos podem desencadear inflamação no corpo humano, apresentando os sinais característicos do processo inflamatório: dor, rubor, inchaço, calor e perda de função. A depender do tempo de duração ela pode ser classificada como aguda ou crônica. A inflamação aguda pode ser caracterizada como uma resposta do sistema imune inato que cursa com edema (extravasamento de fluido), aumento do fluxo sanguíneo, migração de neutrófilos e estresse oxidativo. Mediante uma falha na resposta inicial ou persistência do estímulo, a inflamação pode se tornar crônica levando ao dano tecidual (MEDZHITOV, 2008; VEGA et al., 2018).

O tratamento das doenças inflamatórias é extensivamente realizado com anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) e traz ao paciente efeitos adversos associados. Dentre eles, desconforto e erosão gástrica, além de reações de hipersensibilidade e desordens renais (MEEK; VAN DE LAAR; VONKEMAN, 2010; YAP; GOH, 2015). Assim, o uso de produtos naturais para o tratamento de doenças inflamatórias tem sido encorajado, tendo em vista o potencial anti-inflamatório de algumas classes de metabólitos secundários (terpenos, flavonoides, etc.), com reduzida toxicidade (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011; KHEDIR et al., 2016).

Muitas vezes, a atividade anti-inflamatória de produtos naturais está associada à sua capacidade de combater radicais livres gerados durante o processo inflamatório ou prevenir o estresse oxidativo, que pode ocorrer após um desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante do organismo e a geração de radicais livres a partir do metabolismo endógeno (SILVA et al., 2013; KHEDIR et al., 2016). Jami et al. (2014) reportaram a atividade anti-inflamatória de *Terminalia chebula* em modelos animais experimentais. Essa espécie também possui potencial antioxidante estudado, além de outras plantas do mesmo gênero, tais como *T. arjuna*, *T. bellerica* e *T. fagifolia*, algumas por sequestro de radicais DPPH, ABTS⁺, outras por redução do ferro (FRAP) e capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) (AYRES et al., 2009; NUNES et al., 2014; FAHMY; AL-SAYED; SINGAB, 2015).

A propriedade antioxidante de produtos naturais pode estar associada à atuação dessas moléculas como agentes redutores (FARIAS et al., 2013; LEE et al., 2017). Essa capacidade pode ser explorada para síntese de nanopartículas metálicas visando utilização na área biomédica (GRIFFIN et al., 2018).

3.6 Nanotecnologia

O termo nanotecnologia se refere à produção, caracterização e aplicação de sistemas em escala nanométrica, ou seja, 10^{-9} m e essa ideia foi introduzida pela primeira vez em 1959, por

Richard Feynman (DREXLER, 1981; FANFAIR; DESAI; KELTY, 2007). A pesquisa e desenvolvimento em nanotecnologia têm atraído a atenção da comunidade científica, pelas propriedades únicas que os sistemas nanoestruturados apresentam e pelo potencial de aplicação nos mais variados setores, inclusive na área biomédica, especialmente pela similaridade de tamanho entre as nanopartículas e as biomoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos (AHMED et al., 2016; DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006; INGALE; CHAUDHARI, 2013).

O tamanho, a forma e a morfologia de superfície das nanopartículas desempenham um papel fundamental no controle das propriedades físicas, químicas, ópticas, eletrônicas e biológicas desses nanomateriais (EDISON; SETHURAMAN, 2012). Quanto menor a partícula, maior é a sua relação área/volume e maior sua reatividade química e, provavelmente, sua atividade biológica (DURÁN et al., 2010). As nanopartículas metálicas são consideradas nanopartículas promissoras, entre elas, as nanopartículas de prata (AgNPs) despertam interesse por suas propriedades, tais como estabilidade química, boa condutividade, atividade catalítica e um grande potencial para atividades biológicas, como atividade antibacteriana, antifúngica, antioxidante e anti-inflamatória. Além disso, as AgNPs têm sido relatadas para o uso no diagnóstico e tratamento de câncer (AHMED et al., 2016). Alguns produtos à base de nanopartículas de prata têm sido aprovados e liberados por vários órgãos reguladores, tais como o FDA (*“Food and Drug Administration”*) e EPA (*“Environmental Protection Agency”*) nos Estados Unidos e SIAA (*“Society of International Sustaining Growth for Antimicrobial Articles”*) no Japão (VEERAPUTHIRAN, 2013).

A prevalência de patógenos resistentes aos antimicrobianos disponíveis é um importante problema de saúde pública e motiva a contínua busca por novos antimicrobianos, tais como nanopartículas de prata que se mostram efetivas contra bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas) e fungos, além de outros tipos de patógenos (DURÁN et al., 2007). Vários mecanismos de ação estão envolvidos no efeito microbicida das nanopartículas de prata, sendo que o processo de síntese pode influenciar diretamente no efeito observado. Dentro do processo de síntese, parâmetros como pH, temperatura, rotação e tempo irão influenciar na nanopartícula sintetizada e no efeito observado (DURÁN et al., 2010; AZIZ; JASSIM, 2018; KOBASHIGAWA et al., 2018), portanto, independente da abordagem escolhida para a síntese, esses pormenores devem ser bem estabelecidos.

Existem duas abordagens geralmente utilizadas para síntese de nanopartículas de prata, *“Top-down”* (de cima para baixo) e *“Bottom-up”* (de baixo para cima) (**Tabela 1**). A técnica

Top-down consiste na desconstrução de material em partículas finas, geralmente por técnicas litográficas ou por moagem de alta energia, pulverização catódica, ablação térmica ou a laser, até a obtenção do produto final nanoestruturado, enquanto a *Bottom-up* segue o caminho oposto, no qual ocorrem interações entre átomos e/ou moléculas individuais para a formação de novos núcleos nanoestruturados, sendo que nesta última, métodos químicos e biológicos podem ser usados para síntese de AgNPs (DEEPAK et al., 2011; AHMED et al., 2016).

Tabela 1. Métodos para síntese de nanopartículas metálicas de acordo com AHMED et al., 2016.

Top-down	Bottom-up
Cauterização química	Processo sol-gel
Ablação a laser/térmica	Deposição de vapor
Moagem	Pirólise
Pulverização catódica	Condensação atômica ou molecular
Processos explosivos	Redução química
	Síntese verde (extratos de plantas, micro-organismos)

Fonte: Autoria própria

Diferentes métodos sintéticos (síntese química) têm sido empregados para obtenção de nanopartículas de prata, os quais podem ser muito caros e danosos ao meio ambiente, dessa forma torna-se necessário um processo de síntese mais seguro, com maior viabilidade industrial e mais ecológico (SHARMA; KANCHI; BISSETY, 2015). A síntese verde, é um método ambientalmente benigno e eficaz, por isso foi a abordagem escolhida nesse estudo para a síntese de nanopartículas de prata.

3.7 Síntese verde de nanopartículas de prata

A síntese verde de nanopartículas de prata, denominação comum dada às rotas de síntese que utilizam produtos relativamente atóxicos, biodegradáveis para reduzir e estabilizar a prata, é uma abordagem promissora, que consiste na geração de produtos com impacto ambiental reduzido, associado a ganhos econômicos e sociais. Ao contrário da maioria dos métodos químicos, que incluem a utilização de solventes tóxicos, a geração de resíduos nocivos para a saúde e o meio ambiente, além de resultar em um alto consumo de energia, demandado em rotas geralmente complexas e com múltiplos passos (DHUPER; PANDA; NAYAK, 2012).

Para o processo de síntese verde, pode ser utilizado um organismo biológico ou parte dele. Dentre os recursos biológicos disponíveis estão produtos vegetais e animais, algas, fungos,

bactérias, dentre outros. No caso dos extratos vegetais, biomoléculas e metabólitos secundários atuam como agentes redutores, resultando na formação das AgNPs. Geralmente, esses compostos também atuam estabilizando as nanopartículas (QUELEMES et al., 2013; KULKARNI; MUDDAPUR, 2014; ARAGÃO et al., 2016).

A utilização de extratos de plantas traz outras vantagens, pois trata-se de um processo de maior acessibilidade à matéria prima, com menos risco biológico, menos dispendioso, onde não há necessidade de manutenção de culturas. Além disso, a utilização de plantas endêmicas da região pode fortalecer a cadeia produtiva local (KALISHWARALAL et al., 2010). Geralmente, a síntese verde de nanopartículas com extratos vegetais é um processo de um único passo, que inicialmente, envolve a coleta do material vegetal e preparação do extrato. Em seguida, o extrato é colocado em contato com a solução de AgNO_3 para que ocorra a redução de íons Ag^+ a Ag^0 , a qual pode ser monitorada por espectroscopia na região do ultravioleta ao visível (UV-vis). Acredita-se que durante o processo de nanoestruturação, a quantidade de extrato vegetal no meio reacional pode determinar a forma e o tamanho das nanopartículas sintetizadas (DUBEY et al., 2010; TILLOTSON; THERIAULT, 2013; AHMED et al., 2016).

Os níveis relativamente elevados de metabólitos secundários, tais como esteroides, carboidratos, flavonoides e compostos fenólicos, atuam como agentes redutores e podem recobrir as nanopartículas, proporcionando estabilidade e potencial para atividades biológicas (SUNA et al., 2014). Algumas plantas da família Combretaceae são ricas em metabólitos secundários e demonstram potencial para síntese de nanopartículas (EDISON; SETHURAMAN, 2012), inclusive plantas do gênero *Terminalia* (KUMAR et al., 2012; EDISON; LEE; SETHURAMAN, 2016). Neste contexto, os extratos e frações derivados da espécie *T. fagifolia* foram considerados bons candidatos para síntese verde de nanopartículas de prata.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleção do material vegetal, preparação dos extratos e partição das frações do extrato etanólico

As cascas do caule de *T. fagifolia* foram coletadas na cidade de Timon, Estado do Maranhão, Brasil. A espécie foi identificada e a exsicata depositada no Herbário Graziela Barroso, da Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI, Brasil, com número 21691. O material vegetal foi seco à sombra a, aproximadamente, 40 °C, moído e o pó extraído com 99,6% de etanol à temperatura ambiente. Após a filtração, o solvente foi eliminado sob vácuo a 50 °C e o concentrado foi liofilizado para obtenção do extrato etanólico seco de *T. fagifolia* (EEt), que foi armazenado sob refrigeração até uma posterior utilização. Para obtenção da fração aquosa (FAq), o extrato foi dissolvido numa solução de metanol/água destilada (1:2 v/v) e extraído com acetato de etila. Em seguida, a fase acetato de etila foi concentrada e dissolvida numa solução de metanol/água destilada (9:1 v/v). A fase aquosa obtida foi concentrada por eliminação do solvente (NUNES et al., 2014) e o pó obtido (FAq) foi utilizado nos experimentos a seguir (**Fig. 3**).

Figura 3. Esquema da obtenção da fração aquosa a partir da casca do caule de *T. fagifolia* (NUNES et al., 2014).



Fonte: Autoria própria

4.2 Ensaio para avaliação da atividade antifúngica da FAq

4.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A fração aquosa - FAq foi testada contra leveduras do gênero *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* conforme recomendado pelo documento M27-A3 e contra fungos filamentosos *Fonsecaea pedrosoi* e *Tricophyton interdigitale* (**Tabela 2**) de acordo com o documento M38-A2, ambos do *Clinical Laboratory Standard Institute* - CLSI (2008).

Tabela 2. Estirpes fúngicas utilizadas para determinação da concentração inibitória mínima.

Espécie fúngica	Tipo de fungo
<i>Candida albicans</i> SC 5314	Levedura
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	Levedura
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22901	Levedura
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	Levedura
<i>Candida albicans</i> ATCC 96901	Levedura
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Levedura
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	Levedura
<i>Cryptococcus neoformans</i> H99	Levedura
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> ATCC 46428	Dermatófito (filamentoso)
<i>Tricophyton interdigitale</i> 73826	Dermatófito (filamentoso)

Fonte: Autoria própria

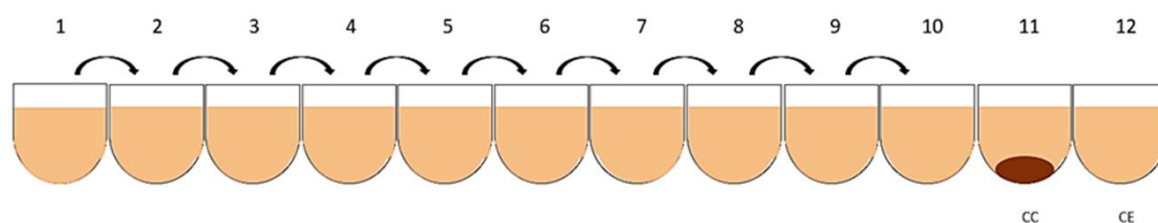
As leveduras foram previamente cultivadas em ágar Sabouraud (Difco™) e mantidas a 30 °C por 24 h (*Candida* spp.) ou 48 h (*Cryptococcus neoformans*), em condições aeróbicas. A partir do cultivo anterior, uma colônia foi isolada, cultivada em caldo Sabouraud (37 °C, 24 h, sob agitação de 200 rpm), após esse tempo as células leveduriformes foram coletadas, lavadas 3 vezes com PBS e então ajustadas para 1×10^3 e 1×10^4 células/mL para *Candida* spp e *C. neoformans*, respectivamente, em câmara de Neubauer. Os micro-organismos foram expostos a diluições seriadas da fração aquosa (FAq) em concentrações que variaram de 2.000 a 0,06 µg/mL em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com tampão MOPs (3-[N-morfolino]propano-ácido sulfônico, Sigma-Aldrich), usando fluconazol (16 a 0,25 µg/mL) como controle positivo para *Candida* spp e Anfotericina B (32 a 0,5 µg/mL) para *C. neoformans*.

Para o teste com os fungos filamentosos, os isolados fúngicos foram inoculados em ágar Batata Dextrose e mantidos a 35 °C, em estufa. A suspensão de esporos de cada cultura foi

preparada em solução salina a 0,85% (v/v) e ajustada em espectrofotômetro até atingir densidade celular padronizada a 530 nm com transmissão de 68-70% para *Fonsecaea pedrosoi* e 80-82% para *Tricophyton interdigitale*. A partir dessa solução, o inóculo fúngico foi preparado de maneira que a concentração fosse igual a $0,4 \times 10^4$ - 5×10^4 UFC/mL para *F. pedrosoi* e 1×10^3 - 3×10^3 UFC/mL para *T. interdigitale*. O meio de cultura utilizado foi o mesmo citado anteriormente, RPMI-1640 com MOPs, e como controle positivo utilizou-se o antifúngico padrão itraconazol diluído em DMSO e caldo RPMI-MOPS para obter uma faixa de concentração de 16 a $0,0313 \mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2008).

Os resultados foram visualizados em tempos diferentes de acordo com o micro-organismo: *Candida* spp. – 24 h, *C. neoformans* – 48 h, *T. interdigitale* – 5 dias, *F. pedrosoi* – 7 dias. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da fração aquosa contra as leveduras foi observado após adição de AlamarBlue™ (Sigma-Aldrich) por 2 h para *Candida* spp. e 24 h para *Cryptococcus*. O corante de viabilidade utilizado (AlamarBlue™) possui coloração azulada e mediante o crescimento celular, a cor vira de azul para rosa e a fluorescência pode ser lida, sendo diretamente proporcional ao crescimento microbiano (RAMBERSAD, 2012). O resultado para fungos filamentosos foi observado visualmente em comparação com o crescimento do controle livre de drogas (meio inoculado). O ensaio foi realizado utilizando placas estéreis de 96 poços com uma base em forma de “U” (*U shape*), onde o controle de esterilidade também foi realizado, com meio estéril (**Fig. 4**). A CIM foi definida como a menor concentração da substância que inibe substancialmente o crescimento do micro-organismo (CLSI, 2008). Todos os testes foram realizados em triplicata.

Figura 4. Esquema ilustrativo do experimento realizado para determinação da atividade antifúngica.



Legenda: CC: controle de crescimento/CE: controle de esterilidade.

Fonte: Autoria própria.

4.2.2 Análise do efeito antifúngico da fração aquosa por Microscopia de Força Atômica - MFA

Para as análises de MFA, a concentração inibitória mínima (CIM) da fração aquosa - FAq (com concentrações variando de 1.000 a 1,9 µg/mL) contra *Candida albicans* ATCC 10231 (1×10^3 células/mL) foi determinada como descrito anteriormente, com algumas modificações. Após 24 horas de tratamento, 30 µL de amostras de levedura tratadas ou não-tratadas foram depositados em uma superfície de vidro previamente limpa e seca, com subsequente incubação das amostras a 35 ± 2 °C por 30 min. Em seguida, as amostras foram lavadas 2 vezes com Tween 20 (0,05%) e secas como explicado acima. O efeito da FAq nas leveduras foi observado em microscópio TT-AFM (AFM Workshop, EUA) em modo contato intermitente (“*vibrating*” ou “*tapping mode*”) utilizando sondas de silício (TAP300-G-10, TED PELLA, INC.) com uma frequência de ressonância de aproximadamente 250 kHz. As imagens foram analisadas usando o software Gwyddion 2.47.

4.2.3 Estudo da atividade contra o biofilme de *Candida albicans*

Inicialmente, alíquotas de 100 µL de 1×10^6 células/mL de *Candida albicans* SC 5314, cultivadas previamente de acordo com o item 4.2.1, foram adicionadas em microplacas de 96 poços e incubadas a 37 °C por 24 h em meio RPMI-1640 com MOPs como descrito por Repp (2007), com modificações. Após o período de incubação, os poços foram lavados três vezes com PBS para remoção de células não aderidas e, em seguida, aquelas que permaneceram aderidas à placa foram tratadas com a FAq em concentrações que variaram de 2.000 a 62,5 µg/mL. Após a adição da FAq, as placas foram incubadas a 37 °C durante mais 24 h. Para avaliação do resultado, os poços foram lavados novamente com PBS e o biofilme foi quantificado utilizando o reagente de viabilidade AlamarBlue™ (Sigma-Aldrich) durante 2 h a 37 °C. Após esse tempo, o resultado foi observado em leitor de microplacas (SpectraMax®) após determinação da fluorescência com excitação de 530 nm e emissão de 585 nm. O resultado também foi observado por microscopia de fluorescência (microscópio óptico invertido, Axio observer Z1 - Carl Zeiss microscopy, EUA), após adição de 0,01% de floxina B, que marcará as células mortas do biofilme.

4.3 Avaliação *in vivo* do potencial anti-inflamatório da fração aquosa – FAq

4.3.1 Animais

Os camundongos Swiss saudáveis (machos e fêmeas; 25-35 g), utilizados no estudo, foram obtidos no biotério central da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Brasil. Previamente à realização dos testes, os animais foram mantidos à temperatura ambiente (25 °C), com ciclos claro/escuro de 12 horas e acesso a água e alimento *ad libitum*. O anti-inflamatório indometacina (Sigma-Aldrich) e o veículo (Tween 80 a 1% em solução salina a 0,9%) foram utilizados como controles nos experimentos. Os tratamentos e protocolos experimentais foram conduzidos de acordo com a aprovação do Comitê Institucional de Ética em Pesquisa Animal da UFPI (protocolo nº 068/14).

4.3.2 Edema de pata induzido por carragenina

Os camundongos foram divididos em grupos de acordo com os tratamentos, com a fração aquosa - FAq nas doses de 0,6, 1,2 ou 2,5 mg/kg, via oral (v.o.) ou com a indometacina (10 mg/kg, v.o.). O pré-tratamento foi realizado e após 30 min, 50 µL do agente flogístico, carragenina (500 µg/pata), foram administrados na pata traseira direita. Os animais do grupo controle (não-tratados) receberam apenas o veículo (v.o.). O volume da pata foi medido em pletismômetro (Insight®, Brasil) no tempo zero (volume basal) e 1, 2, 3 e 4 horas após a administração de carragenina. Os dados foram expressos como a diferença do volume inicial (V_0) e final (V_f), em mililitros (mL), como média \pm EPM (WINTER et al., 1962).

4.3.3 Peritonite induzida por carragenina

A melhor dose, determinada no experimento descrito anteriormente (edema de pata), foi utilizada neste ensaio. Camundongos Swiss foram pré-tratados por via oral com a fração aquosa - FAq (1,2 mg/kg), indometacina (10 mg/kg) ou veículo. Após 1 hora, os animais receberam injeções com carragenina (500 µg/250 µL por cavidade, i.p.) ou solução salina (i.p.) como controle. Após 4 horas, os camundongos foram eutanasiados e a cavidade peritoneal foi lavada com 1,5 mL de tampão fosfato salina (PBS) heparinizado e as amostras foram coletadas para a análise dos níveis de malondialdeído (MDA) de acordo com Mihara e Uchiyama (1978). Os resultados foram expressos como nanomoles por mililitro de exsudato peritoneal (nmol/mL).

4.3.4 Análise estatística

No edema de pata induzido por carragenina e no ensaio de peritonite, os resultados foram expressos como média \pm EPM e a diferença estatística entre os tratamentos foi avaliada com ANOVA two way ou ANOVA one-way seguida de pós-teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism® 6.01 e a significância estatística foi admitida com $p < 0,05$.

4.4 Avaliação da inibição de NF-kB em modelo de neuroinflamação em micróglia

A linhagem de células microgliciais humanas CHME3 foi obtida a partir de culturas primárias de células microgliciais embrionárias humanas, por transfecção com um plasmídeo mutante do vírus símio (SV40) que codifica o antígeno T (JANABI et al., 1995), no laboratório de células gliais do i3S em Porto, Portugal. As micróglia CHME3 foram cultivadas em DMEM GlutaMAX™-I, com 100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina suplementada com 10% de soro fetal bovino, como descrito anteriormente (SOCODATO et al., 2018). As células foram mantidas a 37 °C, 95% de ar e 5% de CO₂ em incubadora umidificada. As culturas foram realizadas em placas de cultura de células (35 mm, Ibidi polymer coverslip), apropriadas para protocolos de microscopia *in vivo*. Para os ensaios, as micróglia foram transientemente transfectadas com o biossensor do inibidor da via do NF-kB (SHCHERBAKOVA et al., 2016) usando Jetprime (Polyplus), de acordo com as indicações do fabricante. Os experimentos foram realizados em um microscópio DMI6000B totalmente motorizado (Leica Microsystems) equipado com um filtro infra-vermelho.

As células microgliciais foram gravadas por 10 minutos em solução salina normal ou solução salina com FAq (para obtenção da linha de base) e, então, as imagens foram registradas na presença ou ausência de LPS (1 μ g/mL) por 30 minutos (período de estimulação). As imagens foram exportadas e processadas no software FIJI. Usando FIJI, os valores correspondentes à intensidade média do biossensor utilizado (da via do inibidor de NF-kB) foram recuperados (SOCODATO et al., 2015; PORTUGAL et al., 2017; SOCODATO et al., 2017). Em seguida, o efeito mínimo do inibidor da via do NF-kB na presença de LPS foi utilizado para avaliação estatística, que foi realizada por meio do teste ANOVA one-way seguido do teste para múltiplas comparações de Sidak, com auxílio do programa GraphPad Prism® 6.0, onde $p < 0,05$ foi adotado para dados estatisticamente significativos. Para os testes em células microgliciais, a fração aquosa - FAq foi utilizada na concentração de 125 μ g/mL.

4.5 Averiguação do potencial antioxidante da fração aquosa – FAq

4.5.1 Atividade antioxidante pelo ensaio de ABTS

O estudo da atividade antioxidante das amostras foi analisado por meio do ensaio colorimétrico de sequestro de radicais $ABTS^+$ (2, 2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) proposto por Gião et al. (2007). De acordo com esta técnica, a produção direta do cromóforo $ABTS^+$ foi conseguida pela reação entre 7 mM de ABTS (Sigma-Aldrich) e 2,45 mM de persulfato de potássio (Merk, Damstadt, Alemanha). A solução de $ABTS^+$ foi misturada com as amostras e após o tempo de incubação, a absorbância foi registrada a 734 nm e comparada com o ácido ascórbico padrão (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Usando a curva de calibração, previamente preparada com ácido ascórbico como padrão, o resultado final foi expresso como concentração equivalente de ácido ascórbico (EAA).

4.5.2 Sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazilo)

O ensaio de DPPH foi realizado de acordo com o método aplicado por Barroso et al. (2016), com algumas modificações. Para tanto, alíquotas de 25 μ L das amostras (AgNPs, extratos e frações) foram misturadas com 200 μ L de solução etanólica de DPPH e a mistura, após agitação, foi deixada em repouso durante 30 min ao abrigo da luz. A curva de calibração foi preparada com soluções de Trolox e a absorbância foi medida em 517 nm. A curva padrão foi linear entre 25 e 800 mM de Trolox. Os resultados são expressos em μ g equivalente de Trolox (ET).

4.5.3 Ensaio para determinação da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)

O método para determinação da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) avalia a capacidade sequestradora de uma molécula antioxidante frente à formação de uma radical peroxila. O ensaio para mensuração de ORAC foi realizado de acordo com Huang et al. (2002) em microplacas com fluoresceína. A análise foi realizada em microplacas 96 poços, para tanto um volume de 25 μ L da amostra foi misturado com 150 μ L de fluoresceína (55,5 nM) e incubado por 15 minutos a 37 °C na microplaca, antes da adição de 25 μ L da solução 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH, 155 mM). A fluorescência foi observada por 50 minutos ($\lambda_{excit.} = 485$ nm; $\lambda_{emis.} = 520$ nm). As soluções Trolox foram preparadas para a curva de calibração (8, 16, 24, 32 e 40 M). Todas as soluções foram diluídas em tampão fosfato (75 mM, pH 7,4). Os resultados foram expressos em mmol equivalente de Trolox por g da amostra.

4.5.4 Ensaio para mensurar o poder antioxidante de redução do Ferro (FRAP)

O reagente FRAP (tampão acetato de sódio, solução TPTZ (Sal de 2,4,6-Tri-(2-Piridil)-1,3,5-Triazina 1:3 com Ácido p-Toluenosulfônico) e solução de cloreto férrico), preparado recentemente foi misturado com 20 µL de amostras ou padrão, em seguida as amostras foram incubadas a 37 °C. Ao final do período de incubação, as leituras da absorbância foram feitas imediatamente a 593 nm (BENZIE; STRAIN, 1999). A quantificação foi realizada utilizando a curva de calibração construída com o ácido ascórbico como padrão. A atividade antioxidante foi expressa como µg equivalente de ácido ascórbico por mL. Todo o experimento foi realizado a 37 °C.

4.6 Avaliação da toxicidade da FAq

4.6.1 Teste de viabilidade de eritrócitos humanos

O ensaio para observar o percentual de viabilidade de eritrócitos humanos (O⁺) após a exposição a diferentes concentrações da FAq (7,8 a 1.000 µg/mL) foi realizado de acordo com Marani et al. (2016). Resumidamente, o sangue foi coletado por venopunção em tubo com anticoagulante (EDTA K2, BD Vacutainer[®]) e os eritrócitos foram separados do plasma por centrifugação (3.600 rpm/15 min). Em seguida, os eritrócitos foram lavados três vezes com solução salina (0,85 % *p/v*) e a suspensão de eritrócitos em solução salina (2%) que foi utilizada para o ensaio foi preparada. Os eritrócitos foram incubados com a FAq por 30 min a 37 °C, após esse período de incubação, o sobrenadante foi coletado e a absorbância lida a 492 nm em leitor de microplacas. O resultado foi expresso como média ± desvio-padrão. Solução salina (0,85% *p/v*) e Triton-X 0,1% (*v/v*) foram utilizados como controles.

4.6.2 Avaliação de toxicidade no modelo de *Galleria mellonella*

As larvas de *Galleria mellonella* do sexto instar foram selecionadas aleatoriamente (250-300 mg) e usadas para testes de toxicidade, conforme descrito por Ignasiak e Maxwell, (2007). As larvas são mantidas no laboratório do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília em uma incubadora a 30 °C. Para cada tratamento, 16 larvas foram usadas e 10 µL de diferentes doses de FAq (5, 2,5 e 1,25 mg/kg) diluídas em PBS ou apenas PBS (controle) foram injetados. As larvas foram incubadas a 37 °C e monitoradas por sete dias, contando-se o número de larvas mortas diariamente. O ensaio foi realizado duas vezes e os resultados foram avaliados no software Graphpad Prism 6.0.

4.7 Estudo fitoquímico da fração aquosa – FAq

4.7.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para análise do perfil cromatográfico do Extrato Etanólico (EEt), da Fração Aquosa (FAq) e da Mangiferina (Sigma-Aldrich®), foi utilizado um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE, Shimadzu, Tokio - Japão) híbrido, composto por sistema binário de bombas LC-6AD, um *degasser* DGU-20A₅, forno CTO-20A, um detector UV-vis SPD-20A, injetor automático SIL-10AF e um controlador CBM-20A. As condições usadas para a obtenção dos cromatogramas foram: coluna analítica C18 Phenomenex-Luna (250 x 2 mm e 4µm), comprimento de onda (λ) de 254 nm, fluxo de 0,3 mL/min e injeção manual de 20 µL. As amostras foram diluídas em etanol e água (8:2) e as soluções foram eluídas utilizando Ácido fórmico 0,1% (Bomba A) e Acetonitrila com TFA 0,1% (Bomba B) segundo o gradiente: A (0%) a B (100%) por 40 min e A (100%) a B (0%) por 5 min, de acordo com o método utilizado por Nunes et al. (2014), com adaptações. O software utilizado foi o LCsolution Release 1.24 SP1.

4.7.2 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM)

A análise do peso molecular dos constituintes majoritários da FAq de *T. fagifolia* foi feita utilizando-se CL-EM (Cromatografia Líquida Ultrarrápida Acoplada ao Espectrômetro de Massas), equipamento da Shimadzu (Tokio, Japão) composto por sistema de degaseificação DGU-20A₃, sistema binário de bombas LC-20AD, injetor automático SIL-20AHT e um controlador CBM-20A. A amostra foi eluída utilizando 50% de Ácido Fórmico a 2% e 50% de Acetonitrila, com fluxo de 0,05 mL/min.

Para a espectrometria de massas, a fonte de ionização utilizada foi eletrospray (ESI) com analisador duplo quadrupolo e sistema de armadilha de íons (ION TRAP), Bruker (Bremen, Alemanha). As condições de trabalho foram: temperatura do gás (N₂): 200°C; fluxo do gás: 10 L/min; pressão do nebulizador: 12 psi; voltagem no capilar: 2000 V; voltagem da fonte: -200 V e gás de colisão: He. O Software de controle utilizado foi o HyStar e a Mangiferina adquirida da Sigma-Aldrich® foi o padrão utilizado na análise.

4.7.3 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os experimentos de RMN foram realizados em parceria com o prof. Dr. Reinhard Wimmer na Universidade de Aalborg, Dinamarca. Os dados de RMN foram registrados num

espectrômetro RMN Bruker AVIII-600 MHz, equipado com uma sonda de tripla ressonância, arrefecida criogenicamente. Para tanto, a amostra foi dissolvida em 525 μL de DMSO- d_6 (99,8% D, contendo 0,03% v/v TMS, Sigma-Aldrich). Todos os espectros de RMN foram registados a 308,1 K. O TopSpin 3.5pl6 foi usado para registrar e processar dados.

4.8 Análise de Química Quântica Computacional da molécula isolada e identificada

Estas análises foram realizadas em parceria com o prof. Dr. Filipe Dalmatti Lima do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo. O constituinte majoritário da FAq, Indometacina, H_2O_2 , OH^\bullet e HOO^\bullet foram projetadas usando o programa Avogadro (HANWELL et al., 2012) e pré-otimizadas usando mecanismo molecular *Generic Amber Force Field* (GAFF) (WANG et al., 2004) e o método PM6 (*Parametric Method 6*) semi-empírico do programa MOPAC (STEWART, 2013), apropriados para moléculas orgânicas.

As estruturas moleculares foram totalmente otimizadas, empregando Teoria do funcional da densidade (DFT, do inglês *Density Functional Theory*) (KOHN; SHAM, 1965), com auxílio do software Gaussian 09 (FRISCH et al., 2004). As otimizações geométricas e o cálculo da estrutura eletrônica foram realizados utilizando o conjunto de funções de correlação e de troca B3LYP (LEE; YANG; PARR, 1988) e 6-31G (d, p). Utilizou-se o *Polarizable Continuum Model* (PCM) (TOMASI; MENUCCI; CAMMI, 2005) para simular a presença do solvente (água).

As energias dos orbitais moleculares de fronteira, tanto os ocupados de mais alta energia como os desocupados de mais baixa energia (HOMO e LUMO, respectivamente), foram estimadas para todos os sistemas visando o entendimento da reatividade química das moléculas estudadas, usando os potenciais de ionização (IP) e afinidades eletrônicas (EA), de acordo com as seguintes equações:

$$E_{\text{HOMO}} = -\text{IP} = E(\text{M}) - E(\text{M}^+), \quad (1)$$

$$E_{\text{LUMO}} = -\text{EA} = E(\text{M}^-) - E(\text{M}), \quad (2)$$

Onde $E(\text{M}^+)$, $E(\text{M}^-)$ e $E(\text{M})$ representam as energias totais das espécies catiônica, aniônica e neutra da molécula M tomadas como uma transição vertical, seguindo o princípio de Franck-Condon que versa sobre as transições eletrônicas que ocorrem com os núcleos estacionários (KABOUCHI et al., 2017).

A técnica de Índices de Fukui Condensados sobre os Átomos (IFCAs) (YANG; MORTIER, 1986) foi empregada para classificar a reatividade das moléculas. Tais índices

descrevem as mudanças nas populações eletrônicas locais ao desenhar/insere elétrons, permitindo identificar locais moleculares propensos a interagir com os agentes nucleofílicos (f⁺), eletrofílicos (f⁻) e radicais (f⁰). Estes descritores têm sido utilizados em estudos prévios de polímeros e moléculas (BRONZE-UHLE et al., 2011; BATAGIN-NETO et al., 2013; CESARINO et al., 2016; MARTINS et al., 2018). Para evitar valores negativos de IFCA, o modelo de carga de Hirshfeld foi usado para obter as populações eletrônicas (HIRSHFELD, 1977; PROFT et al., 2002; SAHA; ROY; AYERS, 2009). A abordagem restrita *open shell* de Kohn-Sham foi empregada para evitar a contaminação do *spin* (CUNDARI, 2001).

Para tornar a análise IFCA mais quantitativa, em particular no que se refere às reações radicais, foram calculados índices de maciez local para cada composto. O parâmetro de maciez local (s_k^0) carrega informações sobre a reatividade local no k-ésimo átomo (f_k^0) e a maciez global (S) da molécula. Neste contexto, com base no princípio dos ácidos e bases duros e macios (HSAB, do inglês *hard and soft acids and bases*), é possível estimar quais átomos das moléculas têm maior probabilidade de reagir (LEWARS, 2010). A equação (3) ilustra como os parâmetros s_k^0 são estimados:

$$s_k^0 = f_k^0 \cdot S, \quad (3)$$

Onde $S = 1/(IP-EA)$. De acordo com o princípio da HSAB, as interações eletrofílicas/nucleofílicas e radicais/radicais são favorecidas entre átomos com maciez semelhante. Neste sentido, comparando os valores s_k^0 é possível identificar reações que são propensas a ocorrer. Finalmente, para entender melhor a propriedade antioxidante da molécula isolada e da indometacina (fármaco padrão), os índices de aceitação de elétrons (R_a) e de doação de elétrons (R_d) propostos por Martínez et al. (2008) foram avaliados:

$$R_a = \frac{\omega_M^+}{\omega_{Fluorine}^+} \quad (4)$$

$$R_d = \frac{\omega_M^-}{\omega_{Sodium}^-} \quad (5)$$

Onde ω_M^- e ω_M^+ representam os poderes de eletroaceitação e eletrodoação obtidos dos valores de IP e EA, que descrevem com que facilidade o sistema M doa ou aceita cargas eletrônicas, respectivamente, dadas por (VÁZQUEZ et al., 2007):

$$\omega^- = \frac{(3IP+EA)^2}{16(IP-EA)^2} \quad (6)$$

$$\omega^+ = \frac{(IP+3EA)^2}{16(IP-EA)^2} \quad (7)$$

ω^+ Fluorine e ω^- Sodium estão associados a átomos de flúor e sódio e foram obtidos a partir de seus valores experimentais de IP e EA (MARTÍNEZ et al., 2008). Em geral, valores mais altos de Ra e valores mais baixos de Rd indicam que M é mais efetivo que os modelos de átomos de sódio e flúor, seguindo o mapa doador-receptor (DAM). Os índices associados a outros antioxidantes comuns também foram avaliados seguindo a mesma abordagem teórica.

Após identificação e caracterização *in silico* do constituinte majoritário da fração aquosa, esta foi utilizada para síntese de nanopartículas metálicas, no intuito de ampliar seu potencial antimicrobiano, tendo em vista as propriedades já reconhecidas da prata. Sabendo-se da riqueza de metabólitos secundários nos outros extratos e frações derivados da casca do caule de *T. fagifolia*, extraídos de acordo com Nunes et al. (2014), o potencial para sintetizar e estabilizar nanopartículas de prata desses extratos e frações foi estudado e o resultado utilizado para comparação com a fração aquosa.

4.9 Síntese e caracterização de nanopartículas de prata (AgNPs) com extratos e frações de *T. fagifolia*

As nanopartículas de prata (AgNPs) foram sintetizadas misturando-se o precursor AgNO₃ (1mM) da Sigma-Aldrich Corporation diluído em água destilada e as soluções dos extratos (Extrato etanólico – EEt e Extrato hidroalcoólico – EHa) e frações do EEt da casca do caule de *T. fagifolia* (Fração aquosa – FAq e Fração hidroalcoólica – FHa) a 0,2% (p/v) recém-preparadas, na proporção de 1:1 (v/v). As soluções obtidas foram agitadas durante 72 h à temperatura ambiente. A concentração final foi igual a 500 µMAg (54 µgAg/mL) e 0,1% (1000 µg/mL) de extratos ou frações.

As AgNPs foram caracterizadas usando espectroscopia na região do Ultravioleta ao visível (UV-1800, Shimadzu, Japão) na faixa de 300-600 nm. Os grupos funcionais foram estudados utilizando a espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR-Shimadzu IRAffinity-1S, Japão) na faixa espectral de 4000 a 400 cm⁻¹ em modo ATR. O potencial Zeta (mV) e o tamanho médio (nm) foram medidos usando o analisador Malvern Zeta Sizer por meio do método de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS). As análises de rastreamento de nanopartículas (“*Nanoparticle Tracking Analysis*” – NTA) foram realizadas num equipamento Malvern NanoSight NS300, utilizando um módulo LASER de 542 nm e o *software* NTA 3.2 para observar a concentração de partículas em cada solução de AgNPs e o tamanho médio das AgNPS.

A Microscopia Eletrônica de Transmissão, acoplada a espectroscopia por Dispersão de Energia (MET/EDS) foi realizada para estudar a morfologia de superfície das AgNPs, composição química, bem como o tamanho médio das AgNPs.

4.10 Testes para determinação da capacidade antioxidante das AgNPs

A atividade antioxidante das AgNPs e respectivos extratos/frações precursores foi estudada pela capacidade de sequestrar radicais (ABTS^{•+}, DPPH), além da capacidade de redução do ferro (FRAP), conforme descrito anteriormente para a fração aquosa. As leituras ópticas dos resultados foram realizadas em leitor de microplacas de modo múltiplo (BioTek Instruments, EUA).

4.11 Análise Eletroquímica das AgNPs

Para avaliar o perfil de oxirredução das AgNPs e extratos/frações precursores, realizou-se o ensaio de voltametria de pulso diferencial. Por meio deste ensaio também foi possível confirmar a presença da prata no estado reduzido (Ag⁰, nanoestruturado). Os experimentos de voltametria de pulso diferencial foram realizados utilizando um Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT128N (EcoChemie, Utrecht, Holanda), juntamente com o software NOVA 1.6.

Para tanto, foi adotada uma configuração de três eletrodos usando um eletrodo de carbono impresso (SPCE), com o eletrodo de trabalho de carbono (4 mm), um eletrodo de carbono auxiliar e um eletrodo de referência de prata. Para as análises, a solução tampão padrão (HCl 0,1 M, pH 4,3) que continha ácido gálico (1 mg/mL) ou quercetina (1 mg/mL) foi utilizada como modelo do sistema analista. Para a determinação voltamétrica, adicionou-se uma alíquota de 5 µL de amostra e 45 µL de tampão à superfície do eletrodo de trabalho, um potencial constante de -0,2 V foi aplicado por 180 s para a pré-concentração de íons na superfície do eletrodo de trabalho. Então, o potencial foi varrido de -0,2 V a +0,1 V usando voltametria de pulso diferencial para retirar os íons de volta à solução. Todos os experimentos eletroquímicos foram realizados à temperatura ambiente (25 °C).

4.12 Estimação do conteúdo de fenólicos totais (TPC)

O TPC das AgNPs, extratos e frações foi determinado usando o reagente de Folin-Ciocalteu. Resumidamente, 25 µL das amostras foram misturadas com 75 µL de água destilada e subsequentemente com 100 µL de solução de Na₂CO₃ (75 g/L). Logo após a agitação da mistura de reação (30 s), as soluções foram colocadas ao abrigo da luz durante 90 min e a

absorbância foi registrada a 765 nm. A análise foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG).

4.13 Avaliação da Atividade Antibacteriana das AgNPs, extratos e frações de *T. fagifolia*

A atividade antibacteriana foi realizada com linhagens de bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (“*Methicillin Resistant*” - MRSA), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; e linhagens Gram-negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium ATCC 14028. Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), os micro-organismos foram cultivados em ágar Mueller-Hinton a 35 ± 2 °C por 24 horas, em condições aeróbicas. Em seguida, foi preparada uma suspensão bacteriana em salina estéril (0,85% *p/v*) com uma densidade óptica (625 nm) equivalente a 0,5 da escala de McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL), esta solução foi utilizada para confecção do inóculo bacteriano final (5×10^5 UFC/mL).

O ensaio antibacteriano foi realizado de acordo com Quelemes et al. (2013). Dessa forma, o experimento foi realizado em microplacas de 96 poços, onde as bactérias foram expostas a diluição seriada de razão dois das AgNPs e AgNO₃ variando de 27 a 0,84 µgAg/mL, além dos extratos e frações de *T. fagifolia* (500 a 0,97 µg/mL) em caldo Mueller-Hinton (Difco™). Os antibióticos padrão, efetivos contra as bactérias usadas, também foram utilizados como controle positivo (32 a 0,25 µg/mL). O controle de esterilidade do teste foi realizado com o meio de cultura estéril e o controle do crescimento bacteriano foi feito com caldo inoculado. A CIM foi definida como a menor concentração do agente testado que foi capaz de restringir o crescimento bacteriano visível no meio de cultura. Toda a manipulação bacteriana realizada nos procedimentos descritos anteriormente foi realizada seguindo condições assépticas em cabine de segurança nível 2, além disso, os testes foram realizados em triplicata.

4.14 Estudo do efeito das AgNPs sobre a morfologia das bactérias por Microscopia de Força Atômica (MFA)

A análise morfológica da bactéria *E. coli* ATCC 25922, após o tratamento com a nanopartícula que apresentou melhor potencial inibitório, foi realizada utilizando um microscópio de força atômica TT-AFM (AFM Workshop, EUA) em modo contato intermitente (“*tapping mode*”) com 512×512 pixels (6 µm x 6 µm). Antes da análise por MFA, o experimento antibacteriano foi realizado para determinar a CIM da AgNP contra *E. coli* conforme descrito anteriormente. No experimento, as concentrações da AgNP variaram de 27

a 0,84 µgAg/mL contra 5×10^5 UFC/mL de *E. coli*. Após o período de incubação (35 ± 2 °C/24 h), 20 µL do meio de cultura contendo bactérias não tratadas ou bactérias submetidas a concentrações sub-inibitória (1/2CIM) e inibitória (CIM) foram depositadas sobre uma superfície de vidro limpa, seguida por secagem à temperatura ambiente durante 20 min. As amostras foram suavemente lavadas duas vezes com 1 mL de água deionizada e secas novamente nas mesmas condições. As imagens foram feitas usando cantilevers ACT-20 (AppNano - EUA) com uma frequência de ressonância de aproximadamente 359 kHz e as imagens representativas foram analisadas usando o software Gwyddion 2.47.

4.15 Avaliação da Atividade Antifúngica das AgNPs, extratos e frações de *T. fagifolia*

O teste de susceptibilidade antifúngica foi conduzido de acordo com o método de microdiluição em caldo proposto nos protocolos M38-A2 e M27-A3 da CLSI (CLSI, 2008), semelhante ao descrito para a fração aquosa. Os isolados fúngicos foram inoculados em ágar Batata Dextrose e mantidos a 35 °C, em estufa. A suspensão de esporos de cada cultura foi preparada em solução salina a 0,85% (v/v) e ajustada em espectrofotômetro até atingir densidade celular a 530 nm com transmissão de 68-70% para *Fonsecaea pedrosoi*, 80-82% para *Tricophyton interdigitale* e 90% para *Candida krusei*. O inóculo foi diluído numa proporção de 1:50 em caldo RPMI 1640 tamponado com MOPS. O medicamento padrão, itraconazol foi usado como controle positivo (16 a 0,0313 µg/mL). As AgNPs foram testadas contra uma levedura: *C. krusei* ATCC 6258 ($5,0 \times 10^2$ - $2,5 \times 10^3$ UFC/mL); e duas estirpes de fungos filamentosos: *T. interdigitale* ATCC 73826 (1×10^3 - 3×10^3 UFC/mL) e *F. pedrosoi* ATCC 46428 ($0,4 \times 10^4$ - 5×10^4 UFC/mL). Os micro-organismos foram expostos à diluição em série das AgNPs com concentrações variando de 27 a 0,05 µgAg/mL, AgNO₃ (0,05 a 27 µg/mL) e extratos e frações de *T. fagifolia* (500 a 0,97 µg/mL).

4.16 Estudo da atividade hemolítica das AgNPs

O ensaio de atividade hemolítica foi realizado em eritrócitos humanos (O⁺), coletados em tubos contendo EDTA (1,8 mg/mL), por medição espectrofotométrica da liberação de hemoglobina após exposição a várias concentrações das AgNPs *in vitro*. Os eritrócitos foram lavados três vezes por centrifugação a 3600 rpm/10 min e ressuspensos com solução salina estéril (0,85% v/v), conforme descrito anteriormente para a fração aquosa (MARANI et al., 2016). A suspensão de glóbulos vermelhos (GVs) (2%) foi misturada com a solução de AgNP e AgNO₃ nas concentrações de 27 a 0,84 µgAg/mL, as misturas foram incubadas durante 30 min a 35 ± 2 °C e após centrifugação a 10.000 xg por 1 min o sobrenadante foi separado e o

valor da absorbância (A) foi mensurado a 492 nm em leitor de placas (Bioeasy). Triton-X (0,1% v/v) e solução salina foram utilizados como controles de hemólise positivo e negativo, respectivamente. A porcentagem de hemólise (%) foi calculada a partir da equação: $[(A_{AgNP} - A_{salina}) / (A_{triton} - A_{salina})] \times 100$.

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey usando GraphPad Prism® versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA / EUA). A significância estatística foi aceita quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os processos de extração e fracionamento foram realizados conforme descrito na seção anterior e a fração aquosa (FAq) derivada do extrato etanólico de *Terminalia fagifolia* foi obtida com sucesso. Após o processo de liofilização, o pó foi utilizado para o estudo do potencial antifúngico, anti-inflamatório e para uma maior investigação do seu potencial antioxidante, além da síntese verde de nanopartículas de prata. A atividade antifúngica foi avaliada contra leveduras e fungos filamentosos, onde o resultado encontrado mostrou que todas as linhagens de *Candida* spp. e de dermatófitos (*Fonsecaea pedrosoi* e *Tricophyton interdigitale*) foram susceptíveis (**Tabela 3**). Os fungos filamentosos, dentre eles os causadores de dermatofitoses, comumente presentes em países tropicais, muitas vezes necessitam de um tratamento longo, com associação de medicamentos para obtenção da cura (SUGANTHI, 2017), assim, produtos naturais capazes de inibir o crescimento desses micro-organismos podem representar importantes alternativas terapêuticas.

Neste estudo, a fração aquosa (FAq) demonstrou um excelente potencial antifúngico contra leveduras do gênero *Candida* (tanto estirpes de *Candida albicans* como espécies de *Candida* não-*albicans*), com CIMs variando de 0,48 – 1.000 µg/mL. Entre as linhagens sensíveis, a FAq foi mais ativa contra *Candida parapsilosis* ATCC 22901 (CIM = 0,48 µg/mL). No entanto, a fração aquosa foi bastante ativa contra a estirpe de *Candida albicans* ATCC 96901, resistente ao fluconazol (CIM = 100 µg/mL), com CIM igual a 0,48 µg/mL. O mesmo resultado não foi demonstrado para o *Cryptococcus neoformans* que não apresentou sensibilidade à fração aquosa nas concentrações utilizadas (≤ 2000 µg/mL), de acordo com a **Tabela 3**. Apesar de ser um fungo leveduriforme, *C. neoformans* possui fatores de virulência, tais como a presença de cápsula e a melanização que pode torná-lo menos susceptível às substâncias testadas (GROSSMAN; CASADEVALL, 2017). Apesar disso, nos estudos de Bognan et al. (2013) *C. neoformans* foi susceptível aos extratos da casca do caule de *Terminalia mantaly*, entretanto a metodologia utilizada pelos autores foi diferente.

O resultado encontrado para *Candida* spp. corrobora com os achados de Machado-Gonçalves et al. (2018) que demonstraram atividade do extrato de *Terminalia cattapa* contra *C. albicans*, no entanto, vale ressaltar que a concentração inibitória do extrato de *T. cattapa* foi igual a 6.250 µg/mL, ou seja, bem superior àquelas utilizadas neste estudo. Por outro lado, Aneja, Sharma e Joshi (2012) relataram que *Terminalia arjuna* não foi ativa contra *C. albicans*, bem como *Terminalia ivorensis* que foi mais ativa contra *Aspergillus fumigatus* (fungo filamentosos) do que contra *C. albicans* (SITAPHA et al., 2013). Apesar de pertencerem ao mesmo gênero, as espécies de *Terminalia* citadas têm potencial antifúngico variável, provavelmente devido à diferença entre a composição dos extratos, tendo em vista que a

produção de metabólitos secundários pelas plantas depende de múltiplos fatores (clima, localização, tipo de solo, etc.) (DONG et al., 2011; GUERRIERO et al., 2018).

Tabela 3. Concentração inibitória mínima - CIM da fração aquosa (FAq) contra leveduras e fungos filamentosos.

Micro-organismos	CIM FAq (µg/mL)	CIM Itraconazol (µg/mL)	CIM Fluconazol (µg/mL)	CIM Anfotericina B (µg/mL)
<i>Candida albicans</i> SC 5314	30	-	0,25	-
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	125	-	1,0	-
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22901	0.4	-	2,0	-
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	1000	-	4,0	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 96901	0.4	-	100	-
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	3,9	0,12	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> H99	> 2000	> 2000	-	2,0
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> ATCC 46428	15,6	0,5	-	-
<i>Tricophyton interdigitale</i> 73826	3,9	0,12	-	-

-Não testado

Fonte: Autoria própria

Leveduras pertencentes ao gênero *Candida* são os agentes etiológicos da candidíase, doença que ampliou sua prevalência, principalmente pelo aumento da sobrevida de pacientes

imunocomprometidos. Tal infecção pode afetar a mucosa oral e os órgãos sexuais, além da corrente sanguínea, principalmente em infecções nosocomiais (DE-LA-TORRE et al., 2018; EL-HOUSSAINI et al., 2019). Além disso, *C. albicans* é a principal causadora de infecções nosocomiais na corrente sanguínea, com alta taxa de mortalidade (MORAN; COLEMAN; SULLIVAN, 2012; DELALOYE; CALANDRA, 2014). A literatura mostra que a atividade anti-*Candida* de produtos naturais que possuem ácidos fenólicos em sua composição, assim como a fração aquosa, deve-se, provavelmente, à precipitação de proteínas e à capacidade quelante e antioxidante desses compostos que culminam com modificações importantes no metabolismo dos micro-organismos (OKUDA, 2008; TERÇAS et al., 2017).

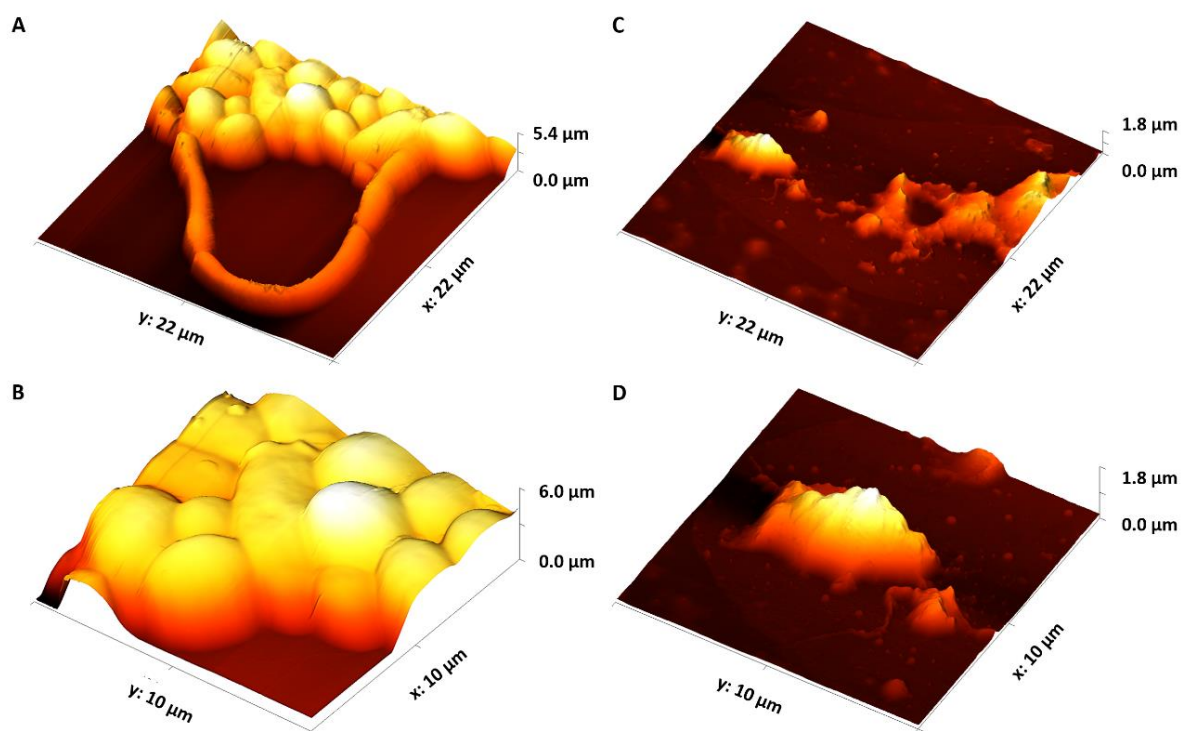
A existência de estirpes de *Candida* resistentes aos medicamentos comumente usados, bem como os efeitos colaterais causados por essas drogas, torna o tratamento da candidíase complicado (NASROLLAHI et al., 2015). Surpreendentemente, a linhagem de *C. albicans* resistente ao fluconazol (antifúngico padrão) foi mais susceptível à FAq do que as outras linhagens da mesma espécie. Dentre os mecanismos de resistência ao Fluconazol, o envolvimento de genes da biossíntese do ergosterol é o mais comum e pode ser desenvolvido a partir da exposição excessiva à droga, já no caso da *C. krusei*, que também foi susceptível à FAq, a resistência ao fluconazol é intrínseca (BERKOW; LOCKHART, 2017).

Hong-Zhuo et al. (2019) mostraram compostos naturais que eram capazes de inibir o crescimento de *Candida albicans* sensível e resistente aos azóis e que alguns deles inibiam melhor o crescimento das leveduras resistentes, corroborando com o resultado encontrado neste estudo. Nesse sentido, Sardi et al. (2011) reportaram o uso de produtos naturais como alternativa para o tratamento de infecções fúngicas, inclusive infecções orais. Vale lembrar que a população faz uso de *T. fagifolia* para o tratamento de aftas e que essas lesões são causadas, frequentemente, por *Candida* sp. (NUNES et al., 2014).

Para o estudo do efeito da FAq sobre a morfologia fúngica, a estirpe de *Candida albicans* ATCC 10231, utilizada para microscopia, foi susceptível à fração aquosa com CIM igual a 15,6 µg/mL. As imagens de microscopia de força atômica (MFA) das leveduras expostas à FAq (na concentração sub-CIM, 7,8 µg/mL) e das leveduras não-tratadas (controle) são mostradas na **Figura 5**. Por meio da microscopia foi possível observar uma diminuição na densidade das células fúngicas com o tratamento, bem como mudanças drásticas na morfologia celular (**Fig. 5 C/D**), com redução da altura (Z). As leveduras controle apresentaram uma forma característica, com superfície lisa, presença de hifas ou pseudo-hifas e brotamento característico

(Fig. 5 A/B). Esse comportamento das leveduras não tratadas (morfologia e presença de pseudo-hifas) demonstra a viabilidade dessas leveduras no teste quando não há tratamento com a FAq, comprovando que a inibição do crescimento, realmente, se dá por ação da fração testada.

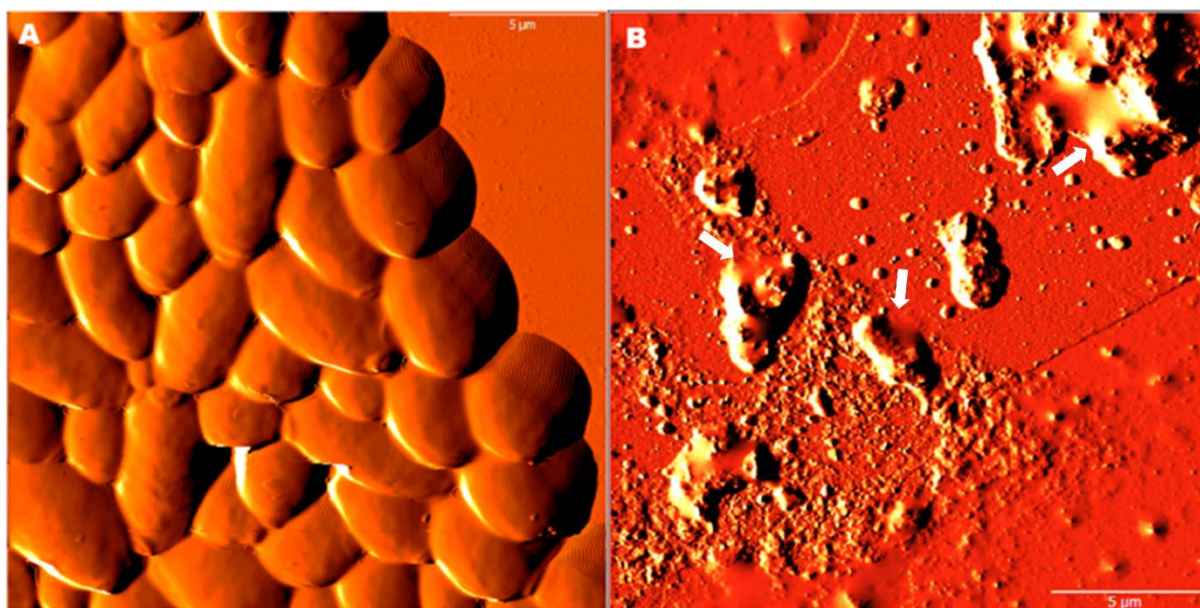
Figura 5. Imagens 3D de microscopia de força atômica (MFA) de células de *Candida albicans*.



Legenda: Células de *Candida albicans* não tratadas (A) ou tratadas com a fração aquosa de *T. fagifolia* (C). As imagens B e D mostram detalhes das células antes e depois do tratamento, respectivamente.

A **Figura 6** evidencia o efeito da FAq (**Fig. 6 B**) em 2D e em outro campo analisado, onde também pode-se observar alterações na conformação estrutural das leveduras tratadas, corroborando com a imagem anterior. Ainda na **Figura 6B** observa-se uma possível ruptura da levedura com extravasamento do conteúdo citoplasmático (setas brancas), aquelas células em que não se observa o possível extravasamento, nota-se maior rugosidade na superfície em relação ao controle. Dessa forma, as imagens de MFA revelaram alterações morfológicas causadas pela fração aquosa em células de *C. albicans* com diminuição do volume celular, alteração na superfície celular e provável ruptura, conforme demonstrado por Tyagi e Malik (2010) e Gonçalves et al. (2017).

Figura 6. Imagens topográficas de microscopia de força atômica (MFA) de células de *Candida albicans*.



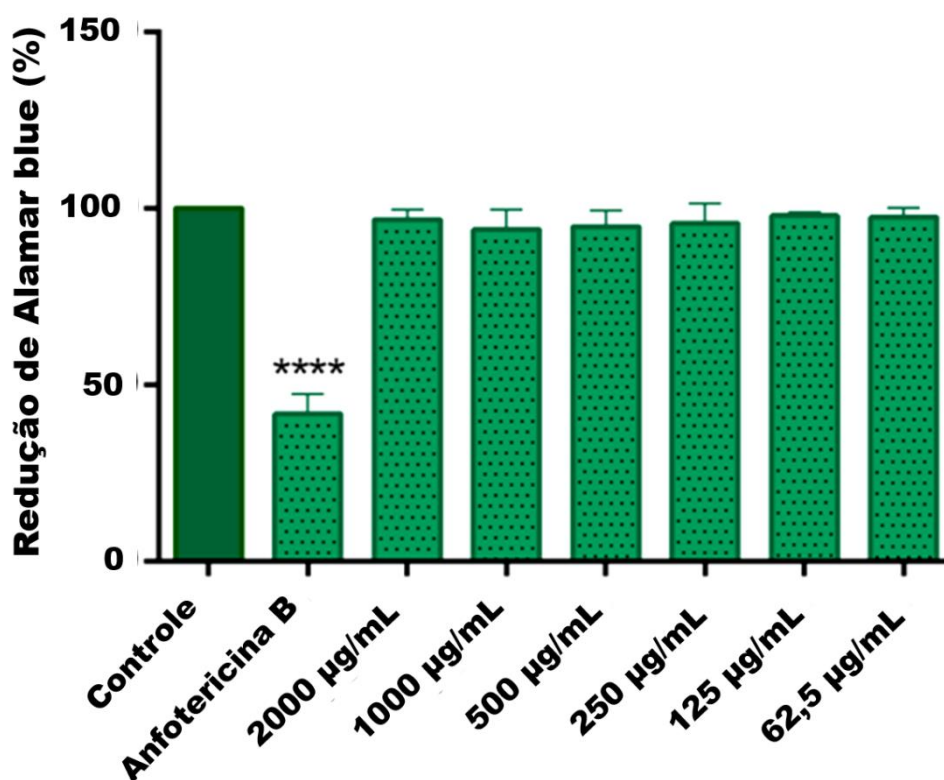
Legenda: Células de *Candida albicans* não tratadas (A) ou tratadas com a fração aquosa de *T. fagifolia* (B).

A microscopia de força atômica (MFA) tem algumas vantagens em relação às outras microscopias para o estudo do efeito de substâncias em superfícies biológicas como a facilidade de preparação da amostra (que não necessita de muitos tratamentos prévios) e, principalmente, a alta resolução, que permite a observação de danos nas membranas de micro-organismos. Como desvantagem pode-se citar o tempo para geração da imagem, principalmente, em alta resolução (MÜLLER; DUFRÊNE, 2011; HEINISCH et al., 2012).

As alterações observadas (Fig. 5 C/D e 6 B) corroboram com os mecanismos previamente propostos para extratos ou frações ricas em ácidos fenólicos, que envolvem uma alteração no metabolismo da levedura, impedindo seu crescimento ou levando ao extravasamento do conteúdo celular pela desestabilização da membrana. Essa desestabilização da membrana poderia ocorrer pela inibição da síntese do ergosterol, que é o mecanismo de ação descrito para vários antifúngicos utilizados na prática clínica, como o fluconazol (LI et al., 2015). No entanto, não se pode afirmar que esse seja o único mecanismo envolvido, já que estirpes resistentes a fluconazol mostraram sensibilidade à FAq, além disso, a literatura demonstra que produtos naturais podem agir por vários mecanismos ao mesmo tempo, dentre eles, maior acumulação intracelular das substâncias naturais em detrimento do fármaco padrão utilizado (HONG-ZHUO et al., 2019).

Ainda que o efeito sobre células planctônicas de *C. albicans* seja promissor, a fração aquosa não apresentou atividade contra o biofilme formado (24 h) dessa mesma linhagem. Os dados obtidos mostram que não houve diminuição na fluorescência emitida pelas células do biofilme coradas com Alamar blue™, após tratamento com FAq em concentrações variando de 62,5 – 2.000 µg/mL, indicando ausência de efeito na taxa metabólica dos fungos no biofilme, tendo em vista que a fluorescência emitida pelo corante é proporcional ao metabolismo destes micro-organismos (Fig. 7).

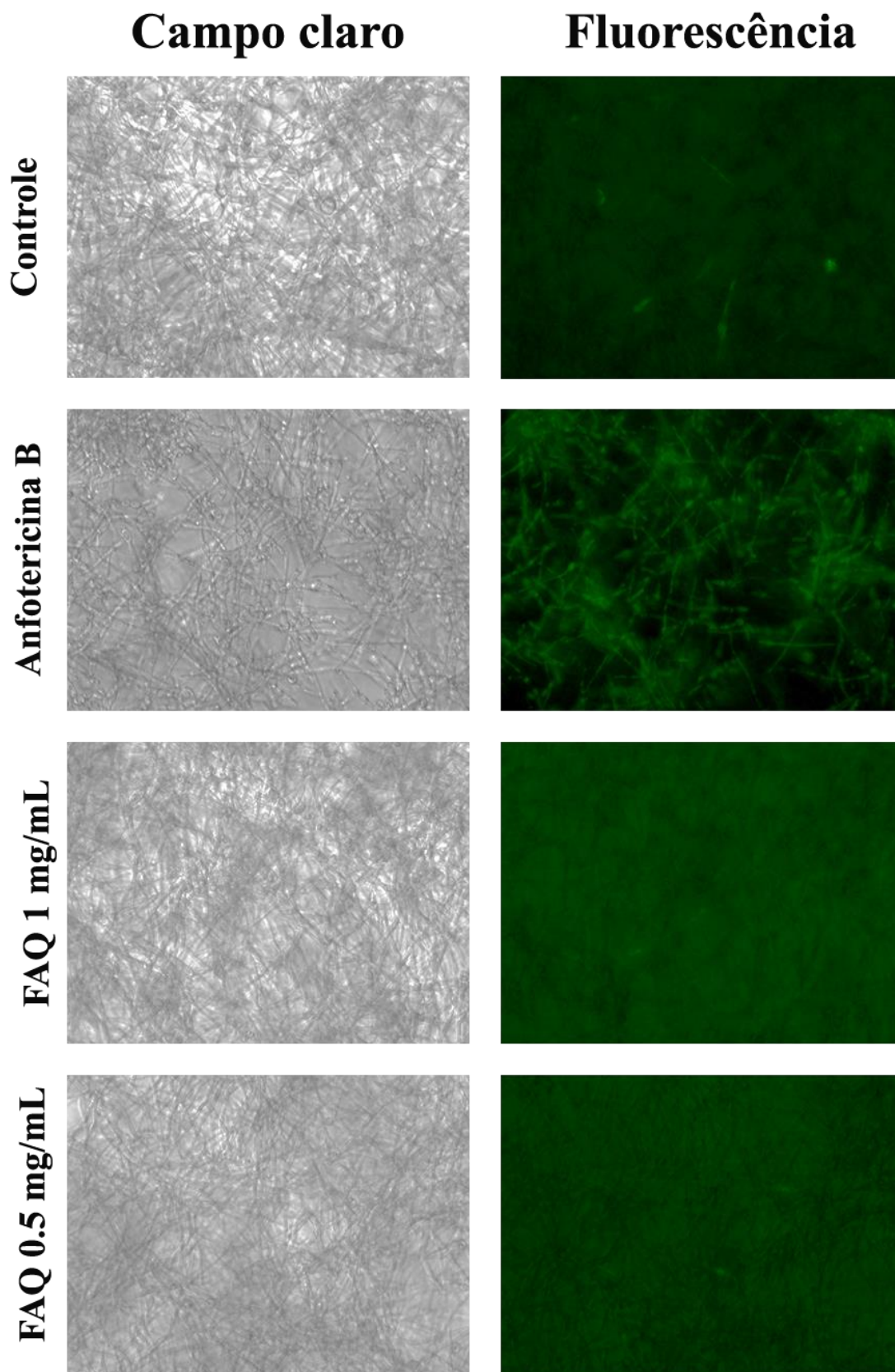
Figura 7. Avaliação da atividade da fração aquosa (62,5 a 2000 µg/mL) contra biofilme formado (24 h) de *Candida albicans*.



Legenda: Controle: Biofilme de 24 h sem tratamento/****p<0,05 para atividade inibitória significativa em relação ao controle.

A microscopia de fluorescência confirma a ausência de inibição do biofilme formado pela fração aquosa (FAq) nas concentrações de 1.000 e 500 µg/mL, onde o fluoróforo marcaria as células mortas, já o controle positivo utilizado, Anfotericina B, apresenta células fúngicas marcadas, indicando a ação inibitória desse fármaco contra o biofilme formado (24 h), conforme observado na **Figura 8**.

Figura 8. Visualização do biofilme de *Candida albicans* SC5314 por microscopia de fluorescência.



Legenda: As células mortas aparecem marcadas em verde após tratamento com Anfotericina B.

No entanto, levando-se em consideração a relevância da formação do biofilme em infecções persistentes e recorrentes (principalmente vaginites), testes para estudo da formação inicial do biofilme, devem ser realizados. Esses testes buscariam avaliar a influência da FAq nos processos iniciais de formação do agregado fúngico, ou seja, na adesão das leveduras à superfície, bem como nos mecanismos intrínsecos necessários para a formação do biofilme, como a produção de prostaglandina E, que é imprescindível para o estabelecimento do biofilme, caracterizando-se como um importante fator de virulência (MATOS et al., 2016).

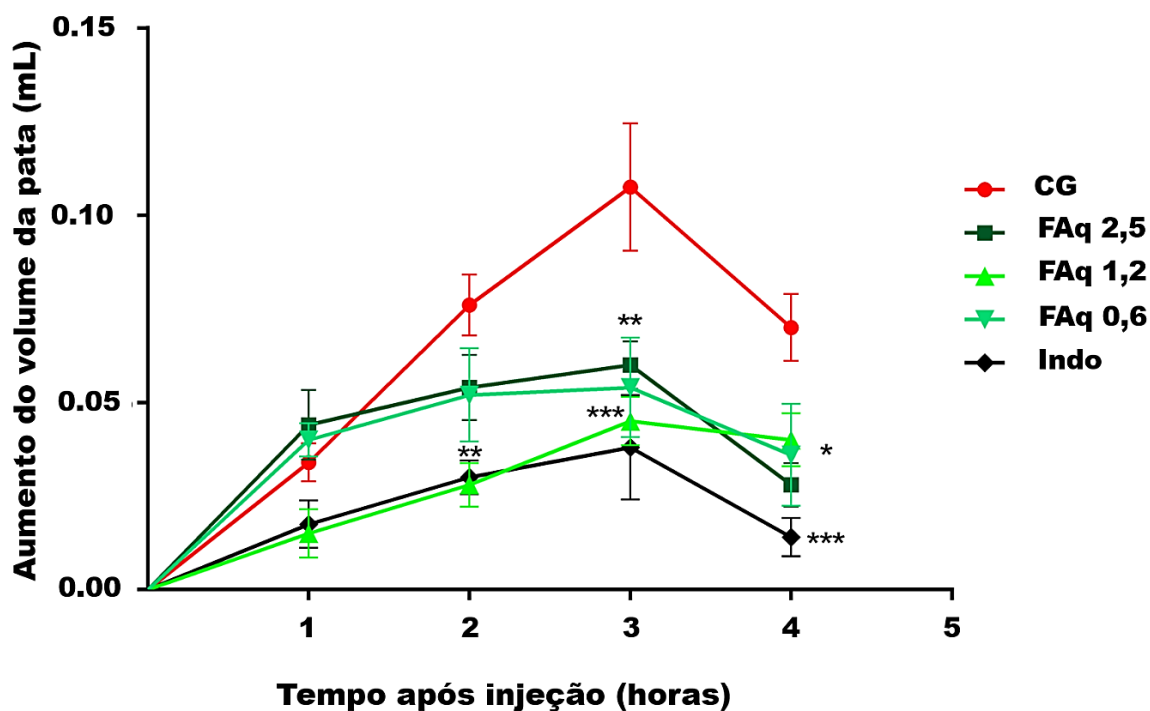
O resultado deste estudo contrasta com os achados de Machado-Gonçalves et al. (2018) que demonstraram a atividade antibiofilme do extrato de *Terminalia catappa* (vale ressaltar que o teste foi realizado em concentrações superiores às concentrações utilizadas aqui). Embora as duas espécies de plantas (*T. fagifolia* e *T. catappa*) sejam ricas em compostos fenólicos que podem contribuir para o efeito antibiofilme, a diversidade e quantidade desses compostos em cada extrato pode explicar a presença ou ausência do efeito inibitório contra o biofilme de *Candida*.

Infecções fúngicas, bacterianas, injúrias e toxinas são estímulos que podem desencadear processos inflamatórios no organismo (GALLO et al., 2017). Para estudar o potencial anti-inflamatório da fração aquosa (FAq), optou-se pelo modelo de edema de pata induzido por carragenina e as doses (0,6, 1,2 e 2,5 mg/kg) foram selecionadas após estudos prévios (dados não publicados) no laboratório. É importante lembrar que essa fração (FAq, 2000 mg/kg) é classificada como segura (nível 5 de segurança), pois não causa toxicidade em camundongos machos e fêmeas (Nunes et al., 2014). A inflamação induzida por carragenina na pata de camundongos é caracterizada por um evento bifásico baseado na ação de mediadores inflamatórios e na geração de radicais livres, como espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (MOILANEN et al., 2012). Os resultados do estudo do potencial anti-inflamatório da fração aquosa são mostrados na **Figura 9**.

Os dados mostrados indicam que a carragenina provoca um aumento no volume da pata com o tempo, atingindo o pico máximo na terceira hora ($0,107 \pm 0,03$ mL), conforme o esperado. A partir da segunda hora, a fração aquosa já apresenta redução significativa do edema de pata na dose de 1,2 mg/kg ($0,028 \pm 0,01$ mL) em relação ao veículo ($0,076 \pm 0,01$, $p < 0,01$). Na terceira hora, todas as doses foram capazes de prevenir o aumento do volume da pata induzido pelo agente flogístico (nas doses de 0,6 e 2,5 mg/kg, $p < 0,01$ e na dose de 1,2 mg/kg,

$p < 0,001$). Também na **Figura 9** é possível observar que a dose de 1,2 mg/kg segue o mesmo comportamento da indometacina (10 mg/kg) até a 3ª hora.

Figura 9. Redução do edema de pata induzido por carragenina em camundongos pré-tratados com fração aquosa - FAq (0,6, 1,2 ou 2,5 mg/kg).



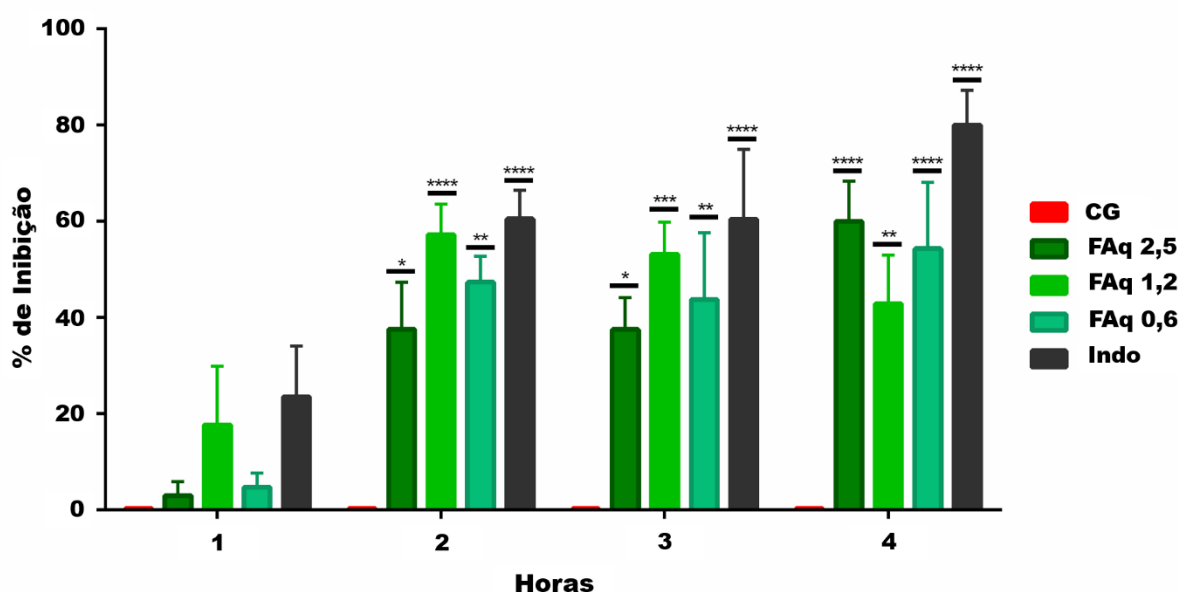
Legenda: Os resultados dos grupos tratados com a FAq (linhas verdes) foram comparados aos grupos veículo (linha vermelha) e indometacina - Indo (linha preta). Cada linha representa a média \pm EPM. O eixo y representa a diferença do volume final e basal, enquanto o eixo x representa os períodos de tempo em horas. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs grupo veículo (ANOVA two-way seguida pelo pós-teste de Tukey).

Os resultados apresentados anteriormente corroboram com os achados de Jami et al. (2014) que demonstraram o potencial anti-inflamatório do extrato de frutos de *Terminalia chebula* em edema de pata induzido por carragenina. Assim como Talwar et al. (2011) que relataram a atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de *Terminalia paniculata*, com efeito na segunda e terceira hora, tal qual os resultados desta pesquisa. Os autores ainda sugerem que o efeito anti-inflamatório pode se dar por inibição na inflamação mediada pelas prostaglandinas derivadas do ácido araquidônico, via ativação das isoenzimas cicloxigenases (COX), assim como o fármaco padrão utilizado, indometacina, um anti-inflamatório não esteroideal – AINE (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

Os animais tratados com a FAq apresentaram percentual de inibição da inflamação semelhante à droga padrão (indometacina) até a terceira hora, na dose de 1,2 mg/kg (**Fig. 9**), momento em que o pico de inflamação ocorre e o efeito pode ser melhor observado (KHEDIR

et al., 2016). Cabe salientar que a partir da segunda hora, todas as doses testadas mostraram inibição significativa do processo inflamatório induzido pela carragenina ($p < 0,05$). A literatura mostra que o extrato de *Terminalia bellerica* apresentou potencial anti-inflamatório em modelo de edema de pata induzido por carragenina, com percentual de inibição da inflamação semelhante aos resultados desse estudo na terceira hora (CHAUHAN et al., 2018).

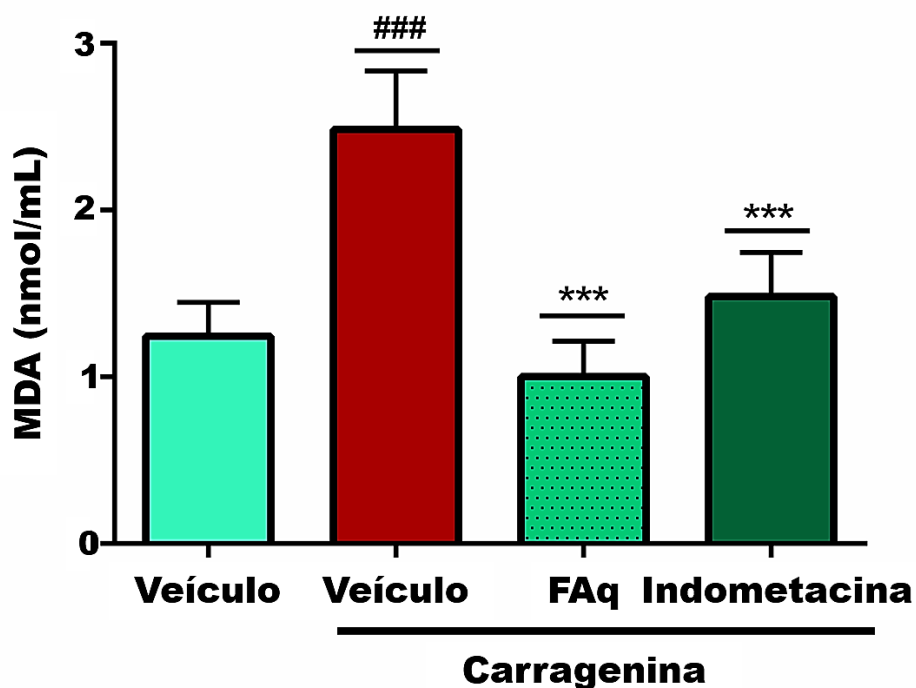
Figura 10. Percentual de inibição da inflamação pela fração aquosa - FAq (0,6, 1,2 ou 2,5 mg/kg).



Legenda: Inibição da inflamação pela fração aquosa (FAq) em diferentes doses ou Indometacina (Indo), em comparação com os grupos veículo (CG) por hora (1-4 h). As barras representam as médias±EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ and **** $p < 0,0001$ vs grupo veículo (ANOVA two-way seguido pelo pós-teste de Tukey).

A carragenina também foi utilizada para induzir peritonite com subsequente quantificação do malondialdeído (MDA), que reflete a peroxidação lipídica derivada do estresse oxidativo (KHEDIR et al., 2016), tendo em vista que os lipídeos de membrana são o primeiro alvo das espécies reativas de oxigênio geradas. De acordo com os resultados, a fração aquosa (1,2 mg/kg) promoveu uma diminuição significativa ($p < 0,001$) nas concentrações de MDA (Fig. 11), indicando um efeito protetor contra a geração de radicais livres que pode culminar na redução da inflamação (SILVA et al., 2013). O resultado observado corrobora com o resultado apresentado pelo extrato hidroalcoólico de *T. chebula* que também foi capaz de reduzir os níveis de MDA em ratos, após indução de peritonite por carragenina (melhor dose, onde os níveis assemelham-se aos níveis basais, de 250 mg/kg), os autores afirmam que o resultado de inibição de MDA somado ao resultado de diminuição do edema de pata provocado por carragenina, aumentam a probabilidade de interferência na síntese das prostaglandinas pelo extrato, o mesmo pode ser inferido para este estudo (BAG et al., 2013).

Figura 11. Concentração de MDA peritoneal depois do tratamento com a fração aquosa - FAq (1,2 mg/kg).



Legenda: Pré-tratamento com a fração aquosa (FAq, 1,2 mg/kg), indometacina (10 mg/kg) ou veículo. Carragenina (500 µg/cavidade) foi injetada 30 minutos depois dos tratamentos. Valores são expressos com média±EPM. *** p<0,001 vs grupo veículo com carragenina i.p., e ### p<0,001 vs grupo veículo com carragenina (ANOVA one-way seguido pelo pós-teste de Tukey).

Conforme abordado anteriormente, o grupo FAq (1,2 mg/kg) manteve a concentração de MDA (1,00 ± 0,09 nmol/mL) semelhante ao grupo veículo sem carragenina (1,24 ± 0,1 nmol/mL), ou seja, manteve os níveis basais de MDA. Comparando-se o grupo FAq ao grupo veículo com carragenina, que apresentou um aumento significativo (p <0,001) nos níveis de MDA (2,48 ± 0,14 nmol/mL), percebe-se que há diferença significativa entre eles. Nesse teste, o resultado para o grupo tratado com a FAq foi semelhante ao grupo tratado com indometacina. A concentração média de MDA é vista na **Tabela 4**.

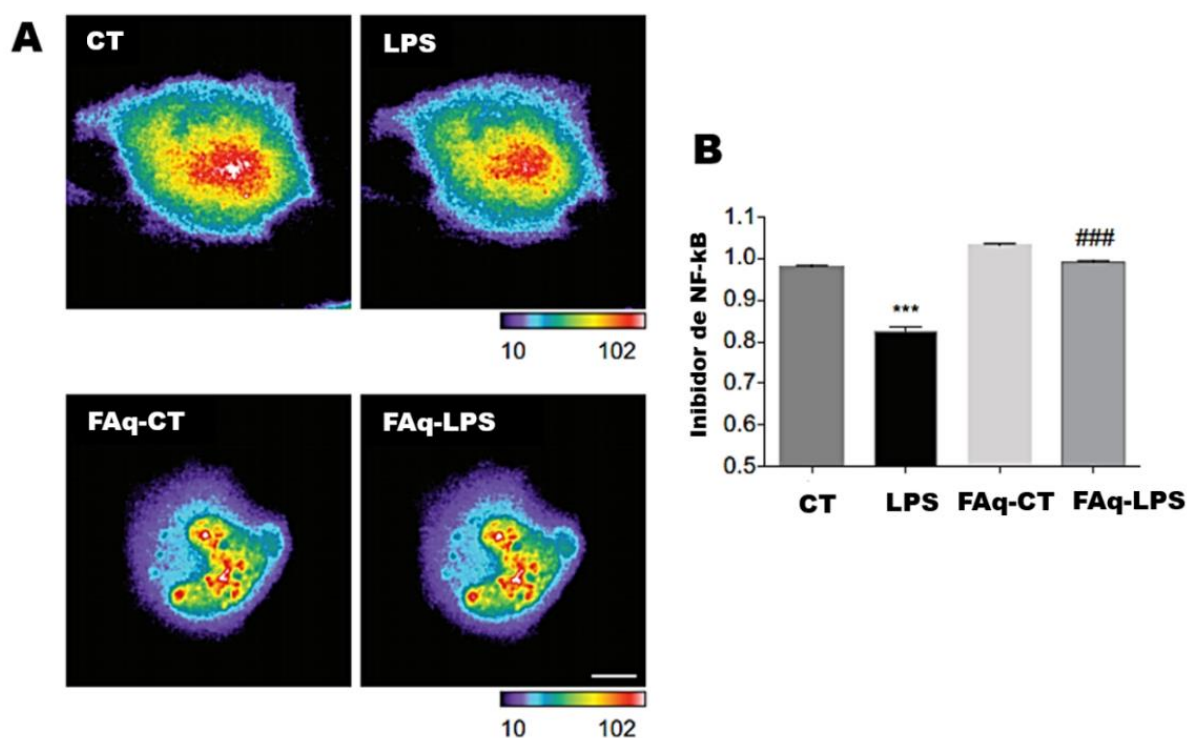
Tabela 4. Níveis de malondialdeído - MDA (nmol/mL) nos diferentes grupos estudados (média ± EPM).

Grupos	Veículo	Veículo	FAq (1,2 mg/kg)	Indometacina (10 mg/kg)
	Carragenina (500 µg/cavidade)			
Níveis de MDA	1.24 ± 0.10	2.48 ± 0.14	1.00 ± 0.09	1.48 ± 0.13

Fonte: Autoria própria

Outro teste realizado para investigação do potencial anti-inflamatório da fração aquosa (FAq) foi a indução de neuroinflamação por lipopolissacarídeo (LPS). Neste teste, as células microgliciais são induzidas a um processo inflamatório e são pré-incubadas ou não com FAq, em seguida as células vivas são monitoradas por microscopia. Os resultados mostraram que a fração aquosa (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi capaz de inibir a produção de fator nuclear kappa B (NF- κB) pelas células microgliciais (**Fig. 12**). Em relação ao do grupo LPS, observa-se uma redução nos níveis de inibidor da via do NF- κB em comparação ao controle (CT), o que indica um aumento na atividade do NF- κB . Enquanto nas células tratadas com FAq, observa-se atenuação significativa ($p < 0,001$) do efeito prévio, ou seja, o pré-tratamento com FAq (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) permitiu a manutenção da inibição da atividade de NF- κB nos níveis basais, após a indução com LPS. Este resultado indica um bloqueio do efeito do LPS na ativação do NF- κB , que pode estar associado a um efeito anti-inflamatório promovido pela FAq (**Fig. 12 B**).

Figura 12. Níveis celulares do inibidor da via do NF- κB em células microgliciais, tratadas ou não-tratadas com a fração aquosa - FAq.



Legenda: (A) Culturas de células microgliciais expressando biosensor do inibidor da via do NF- κB . (B) Quantificação do efeito do inibidor da via do NF- κB na presença ou ausência de LPS em células microgliciais. *** $p < 0,001$ vs controle (CT) e ### $p < 0,001$ vs grupo LPS.

O ensaio de neuroinflamação em células microgliciais, enfocando a inibição do NF- κB , é um modelo adequado para o estudo do potencial anti-inflamatório de compostos bioativos, uma vez que a produção celular de muitos marcadores pró-inflamatórios está envolvida com a

ativação desse fator de transcrição (NF-kB) (KHASNAVIS et al., 2012; SHIH et al., 2015). Dessa forma, o resultado demonstrado nesse estudo pode indicar um efeito neuroprotetor da FAq derivada de *T. fagifolia*, considerando que a indução de NF-kB leva a um aumento na produção de mediadores inflamatórios e consequente agravamento de doenças neurodegenerativas (KALTSCHMIDT; KALTSCHMIDT, 2009). Em estudos similares, Rahimi et al. (2018) demonstraram o efeito neuroprotetor do extrato hidroetanólico de *Terminalia chebula* após inflamação induzida por LPS em células de micróglias, corroborando com os achados desta pesquisa.

A ativação de NF-kB também está relacionada com o agravamento do estresse oxidativo e este, por sua vez, também pode modular a ativação da via do NF-kB, de maneira que compostos com atividade antioxidante tem capacidade para reparar danos causados pelas espécies reativas de oxigênio e modular a sinalização celular (MORGAN; LIU, 2011; LINGAPPAN, 2018). Nunes et al. (2014) mostraram que a fração aquosa do extrato etanólico tem capacidade para sequestrar radicais DPPH e ABTS, assim como neste estudo (**Tabela 5**). Além desses testes antioxidantes, realizou-se também ensaios para verificação da redução do ferro (FRAP) e para determinação da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC). A fração aquosa mostrou boa capacidade antioxidante em todas as metodologias *in vitro* utilizadas (de acordo com a **Tabela 5**), fato que pode ser atribuído à presença de compostos fenólicos e flavonoides na FAq (Nunes et al., 2014). Estes resultados também estão de acordo com o potencial antioxidante demonstrado por Ayres et al. (2009) para o extrato das folhas de *T. fagifolia* e para o extrato rico em polifenóis de *T. chebula* (SAHA; VERMA, 2016).

Tabela 5. Ensaio para determinação da capacidade antioxidante da fração aquosa – FAq.

Testes	FAq
ABTS ^{•+} (µgEAA/mL)	83±1
DPPH (µgET/mL)	240±2
FRAP (µgEAA/mL)	873±15
ORAC (mmolET/gExt)	9.8±0.9

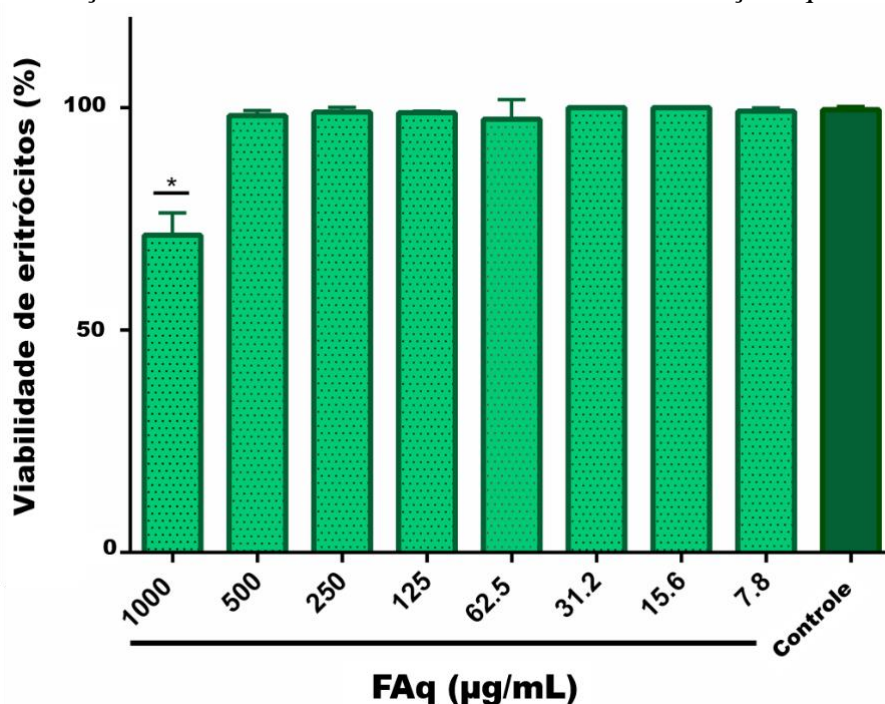
Fonte: A autoria própria

Os resultados antioxidantes de FRAP e ORAC para a fração aquosa de *T. fagifolia* são inéditos e relevantes para consolidação dos dados publicados até o momento. Dentre os testes realizados, o ensaio de ORAC tem uma melhor correlação com resultados *in vivo*, sendo

amplamente aceito para medir a capacidade antioxidante total de amostras biológicas e alimentares, por estar relacionado à medição de um radical biologicamente relevante. Além disso, os dois testes citados apresentam boa correlação entre si (THAIPONG et al., 2006; SAÉNZ et al., 2009). Estes resultados corroboram com o efeito demonstrado no ensaio de peritonite (*in vivo*), onde foi demonstrado um possível efeito antioxidante da fração, relacionado à diminuição dos níveis de malondialdeído (MDA), após a administração do agente flogístico (carragenina).

Após os estudos para verificação do potencial antifúngico, anti-inflamatório e antioxidante da fração aquosa, foram realizados protocolos para analisar a toxicidade desta fração. A hemocompatibilidade da fração aquosa - FAq foi avaliada utilizando eritrócitos humanos. Neste teste, concentrações ≤ 500 $\mu\text{g/mL}$ não causaram nenhum dano aos glóbulos vermelhos (Fig. 13), similar à solução salina (0,85%), controle positivo e ao resultado encontrado por Bag et al. (2013) para o extrato hidroalcoólico de *T. chebula* (50 – 500 $\mu\text{g/mL}$). Estes autores afirmam que a hemocompatibilidade também pode ser associada à atividade anti-inflamatória *in vitro* de produtos naturais, tendo em vista a semelhança das membranas dos eritrócitos com membranas lisossomais. A ausência de dano pode evitar a liberação de enzimas relacionadas ao processo inflamatório agudo e crônico (KOTA; SHARMA; TAHASHILDAR, 2018).

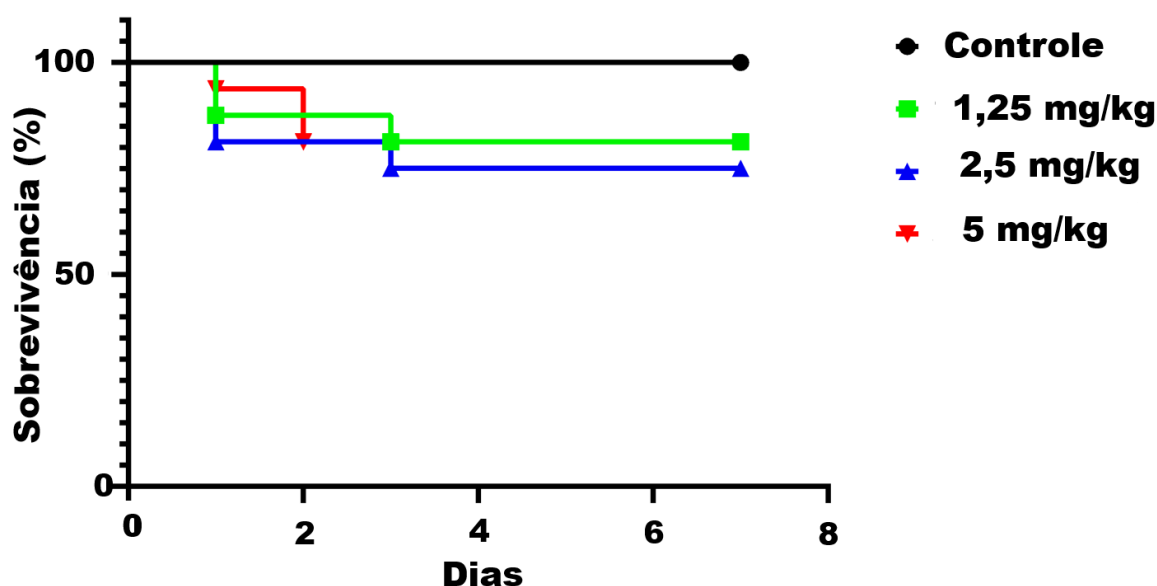
Figura 13. Avaliação da viabilidade de eritrócitos tratados com a fração aquosa – FAq.



Legenda: Controle: Solução salina a 0,85%.

Além do estudo *in vitro* com eritrócitos, larvas de *Galleria mellonella* foram tratadas com a FAq em diferentes doses (1,25; 2,5 e 5,0 mg/kg) ou PBS e observadas por sete dias, para avaliação da toxicidade em um modelo *in vivo*. Após esse tempo, a curva de sobrevivência foi construída (Fig. 14). A FAq administrada em doses de até 5 mg/kg não reduziu significativamente a sobrevivência das larvas em comparação ao controle (larvas tratadas com PBS). Todas as larvas do grupo controle (com PBS) sobreviveram (100%), enquanto as doses de 1,25, 2,5 e 5,0 mg/kg apresentaram 81,25%, 75% e 81,25% de sobrevivência, respectivamente.

Figura 14. Curva de sobrevivência de *Galleria mellonella* tratada com PBS ou fração aquosa (5,0; 2,5 ou 1,2 mg/kg) após sete dias de observação.



Legenda: Controle: PBS (linha preta), fração aquosa (linhas coloridas).

Em modelos *in vitro* (viabilidade de eritrócitos) e *in vivo* (toxicidade em *Galleria mellonella*), a fração aquosa - FAq apresentou baixa toxicidade. A viabilidade dos eritrócitos na presença de novos compostos deve ser testada, levando-se em conta a possibilidade de esses compostos caírem na corrente sanguínea e causarem danos às células vermelhas. O dano, geralmente, ocorre na membrana dos eritrócitos, provocando sua disrupção com liberação do conteúdo de hemoglobina. Esse dano na membrana pode ser causado pela geração de radicais livres (SINGH; RAJINI, 2008), portanto a baixa toxicidade da FAq neste modelo pode ser explicada pelo seu potencial antioxidante demonstrado anteriormente e devido à rica composição em flavonoides e compostos fenólicos (NUNES et al., 2014). Neste contexto,

Hebbani, Reddy e Nallanchakravarthula (2014) mostraram o efeito anti-hemolítico do extrato aquoso de *Terminalia arjuna*, que foi atribuído ao seu potencial antioxidante.

A avaliação da toxicidade *in vivo* em larvas de *Galleria mellonella* é um modelo alternativo rápido e econômico em comparação com modelos de mamíferos, além disso a viabilidade da larva pode ser observada facilmente por ausência de movimento e melanização devido à toxicidade (DESBOIS; COOTE, 2012). Este modelo é frequentemente utilizado para avaliar produtos direcionados para aplicação como antimicrobiano, considerando que a larva possui semelhanças com o sistema imune inato de mamíferos (GLAVIS-BLOOM et al., 2012; SCORZONI et al., 2013; GU et al., 2018; PARTHUISOT et al., 2018).

Além disso, Altincicek e cols. (2008) identificaram uma metaloproteinase em *G. mellonella* com papel na imunidade inata, que pode ser induzida por LPS e tem alta similaridade com metaloproteinases humanas que estão envolvidas na resposta a feridas e processos inflamatórios. Assim, o resultado encontrado neste estudo em larvas *G. mellonella* pode ser utilizado como um indicador para o uso seguro da fração aquosa de *T. fagifolia* no tratamento de doenças humanas, a baixa toxicidade encontrada aqui está de acordo com os achados de Nunes et al. al. (2014). Os autores afirmam que esta fração se enquadra no nível 5 de segurança, de acordo com “*United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals*”.

Em virtude do quão promissora a fração aquosa – FAq se mostrou, é de grande interesse a elucidação do seu constituinte majoritário. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica versátil e amplamente utilizada para o isolamento de produtos naturais, devido ao seu adequado poder de resolução para processamento das amostras, tanto em escala analítica quanto preparativa (CANNELL, 1998; SASIDHARAN et al., 2011). Pela metodologia utilizada, voltada para identificação de flavonoides e compostos fenólicos, é possível observar o perfil fitoquímico do extrato etanólico - EEt, bem como da fração aquosa - FAq. A partir dos cromatogramas mostrados nas **Figuras 15 e 16** podemos observar os picos e seus respectivos tempos de retenção (T_R) que correspondem aos constituintes presentes no EEt e na FAq, de acordo com a interação deles com a coluna (fase estacionária) e os solventes (fase móvel) utilizados.

O cromatograma do EEt (**Fig. 15**) mostra os picos majoritários com os seguintes Tempos de retenção: $T_R = 22,48$ min e $T_R = 24,47$ min, todos com intensidade acima de 900

mAU. Para a FAq a análise cromatográfica revelou dois picos majoritários com T_R iguais a 23,12 e 26,46 minutos, ambos com intensidade maior que 500 mAU (**Fig. 16**).

Figura 15. Cromatograma do Extrato Etanólico (EEt) de *T. fagifolia* no $\lambda=254$ nm, mostrando o tempo de retenção dos picos majoritários.

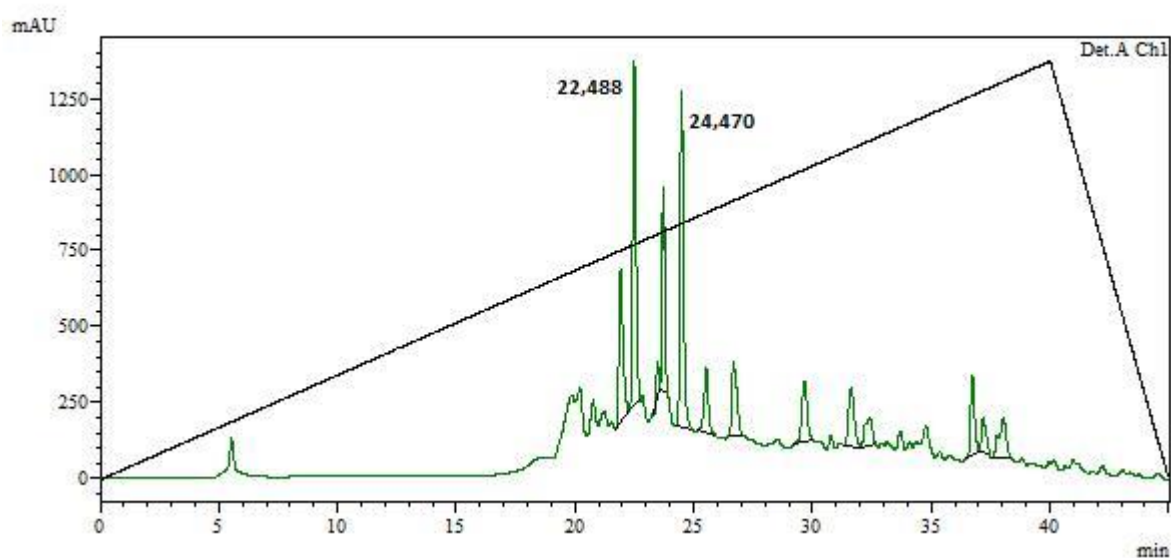
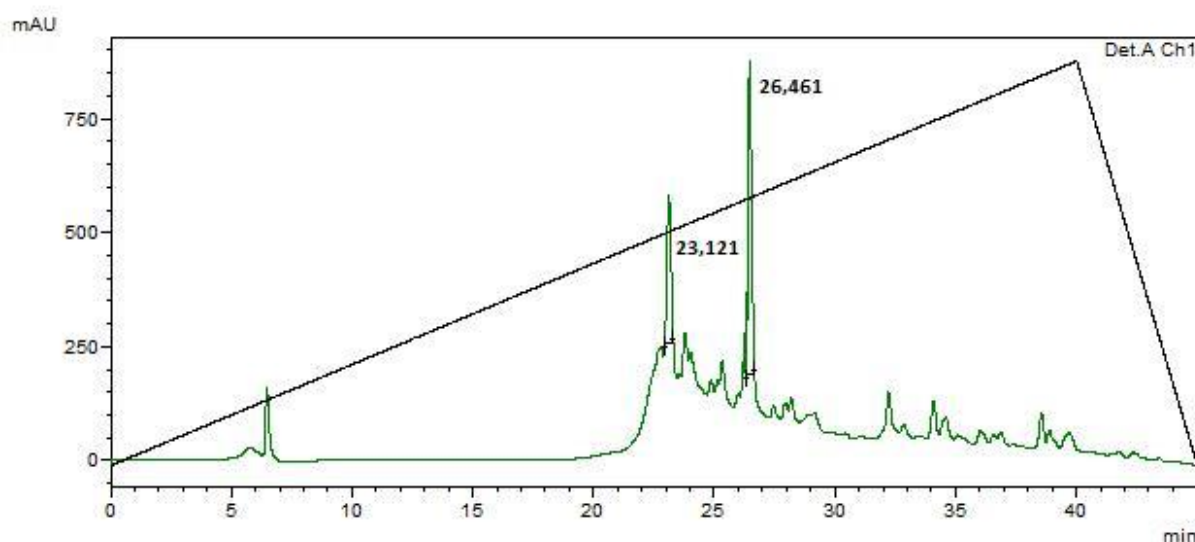


Figura 16. Cromatograma da Fração Aquosa (FAq) do EEt de *T. fagifolia* no $\lambda=254$ nm, mostrando o tempo de retenção dos picos majoritários.

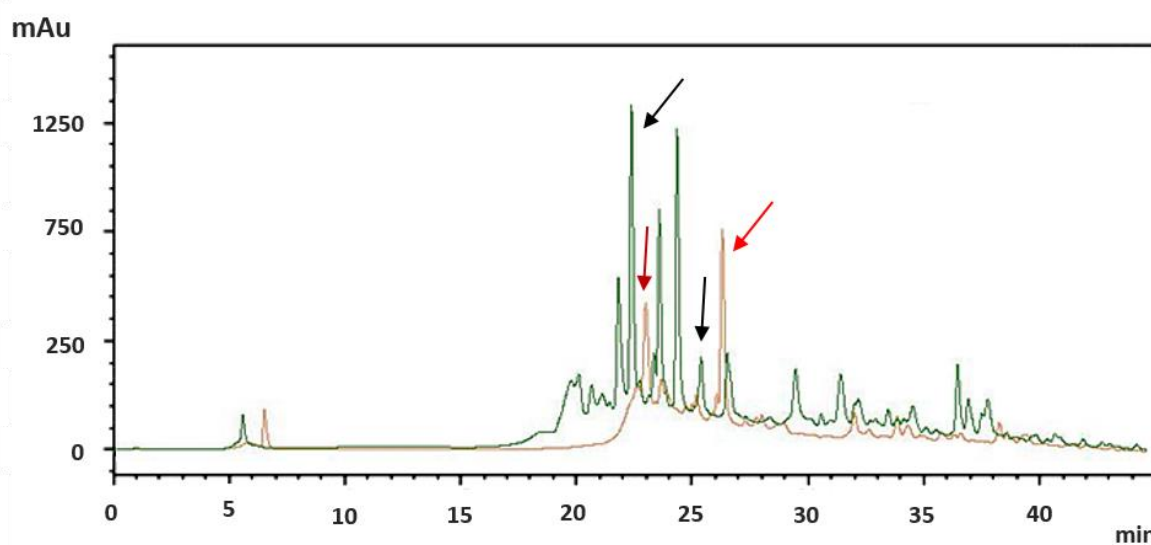


A partir da **Figura 16**, observa-se que a fração aquosa possui dois picos que se destacam dentre os outros, ao contrário do extrato etanólico que possui, pelo menos, quatro picos com absorvância acima de 500 mAu. Portanto, o fracionamento mostrou-se efetivo à medida que

permitiu a predominância de dois constituintes em detrimento daqueles observados no extrato (Fig. 15).

A Figura 17 apresenta os cromatogramas da fração aquosa e do extrato etanólico sobrepostos. Por meio dela, podemos observar que os principais constituintes da fração aquosa estão presentes no extrato etanólico. Considerando-se um leve atraso no cromatograma da FAq (evidenciado pelo atraso no pico do solvente de $T_R \sim 6$ min no cromatograma do EEt e $T_R \sim 7$ min no cromatograma de FAq), supõe-se que o pico com $T_R=23,12$ da FAq seja o mesmo constituinte majoritário do Extrato etanólico com $T_R=22,48$ e que o constituinte majoritário da FAq ($T_R=26,46$ min) seja o mesmo constituinte presente no EEt com $T_R \sim 25$ min, no entanto esta substância encontra-se mais concentrada na fração aquosa do que no seu extrato de origem.

Figura 17. Cromatogramas sobrepostos da Fração Aquosa (vermelho) e do EEt (verde) de *T. fagifolia* no $\lambda=254$ nm.

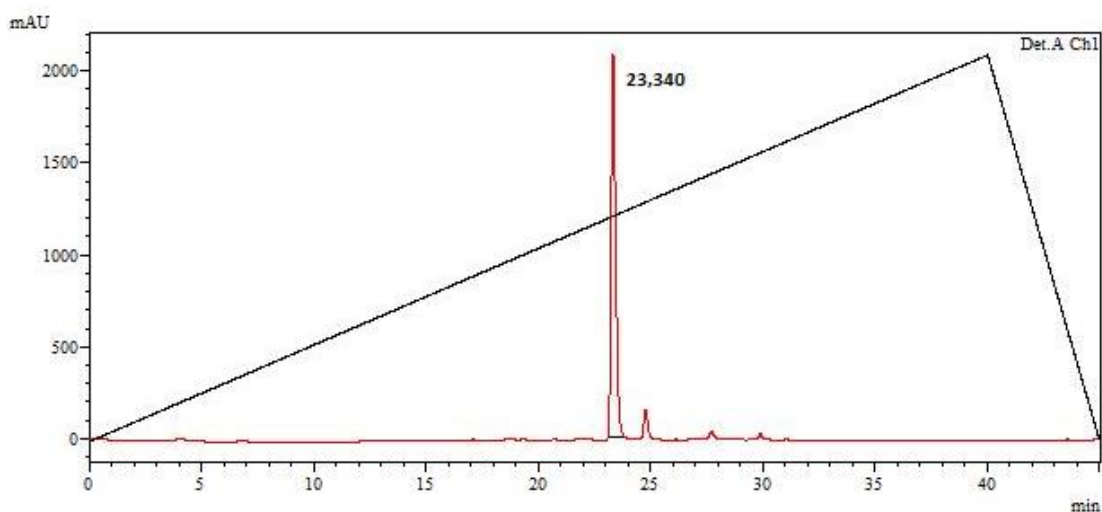


Legenda: As setas pretas representam os constituintes do EEt que podem ser os constituintes majoritários da FAq (setas vermelhas).

Para validação do método utilizado, optou-se por usar a Mangiferina (Sigma-Aldrich), substância que se encontra presente na casca do caule de *Mangifera indica* L., popularmente conhecida como mangueira (LUO et al, 2012). O padrão de xantona utilizado apresentou um pico majoritário no $T_R = 23,34$ min. A Figura 18 mostra que o pico da Mangiferina possui um tempo de retenção semelhante a alguns picos encontrados nos cromatogramas anteriores, sugerindo que essas moléculas têm polaridade semelhante à Mangiferina. Além disso, esse resultado demonstra que o método utilizado foi adequado para essa classe de metabólitos

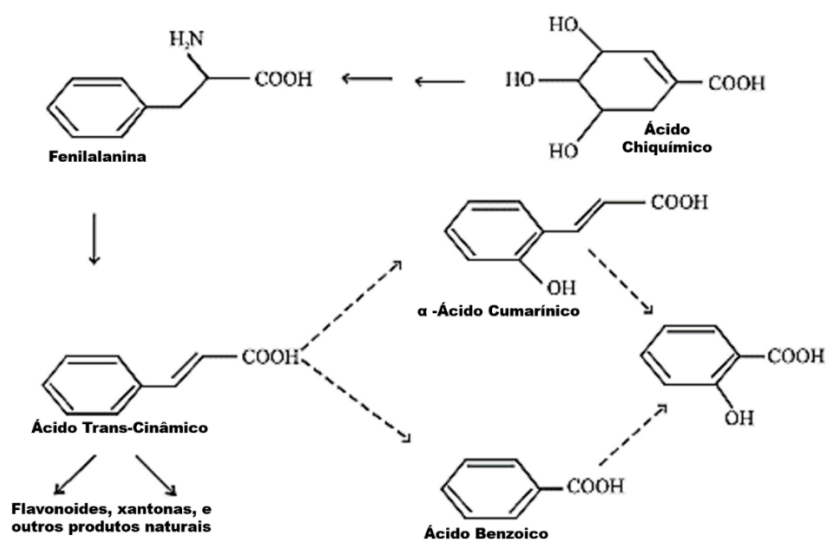
secundários, ainda que a mangiferina não esteja presente na fração aquosa que é o foco deste estudo.

Figura 18. Cromatograma da Mangiferina no $\lambda=254\text{nm}$, mostrando o tempo de retenção do pico majoritário.



Após a obtenção dos cromatogramas e separação eficaz das moléculas, o constituinte majoritário da fração aquosa foi coletado e seco. Após secagem do mesmo, percebeu-se que se tratava de um composto solúvel em DMSO, em etanol e água ou metanol e água. Essas características são compatíveis com aquelas citadas para compostos fenólicos, que são metabólitos secundários polifenólicos, derivados do ácido chiquímico (**Fig. 19**).

Figura 19. Biossíntese de compostos fenólicos, flavonoides e ácidos benzoicos, a partir do Ácido Chiquímico.

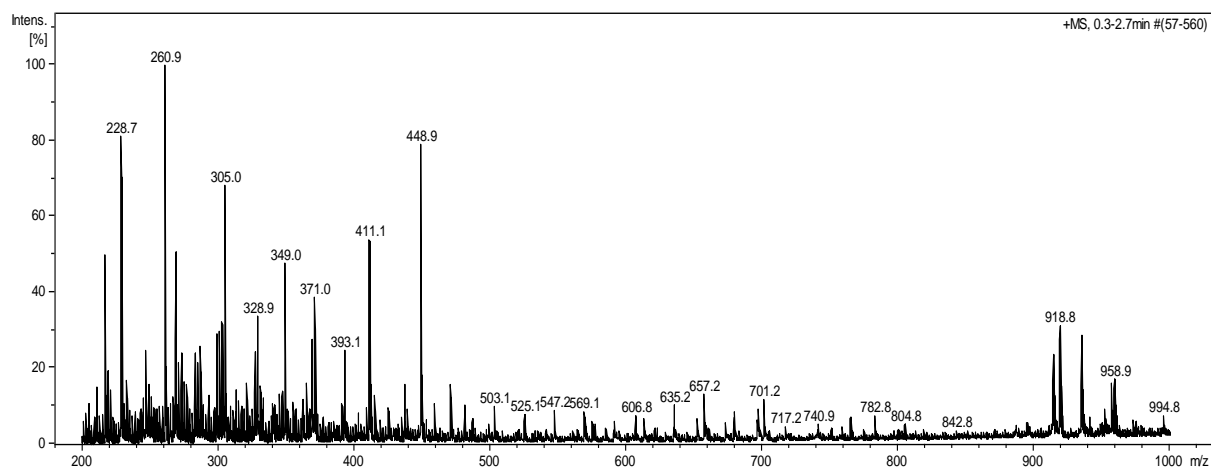


Adaptado de Ansari & Misra (2007).

De posse da molécula isolada, buscou-se analisar, por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (CL-EM), o peso molecular da amostra e da Mangiferina, usada como padrão para validação da metodologia empregada. A CL-EM também é uma técnica rotineiramente usada para a análise de constituintes de extratos de plantas. Esta técnica fornece informações importantes para a elucidação estrutural dos compostos quando o padrão não está disponível, ou quando a molécula é desconhecida (SASIDHARAN et al., 2011; YE et al., 2007).

O espectro após a ionização positiva da substância majoritária da FAq de *T. fagifolia*, com $T_R = 26,46$ minutos (Pico 2), mostra um íon parental $448.9 m/z$, conforme pode ser observado na **Figura 20**.

Figura 20. Espectro de massas do constituinte majoritário com $T_R = 26,46$ min da FAq de *T. fagifolia*, obtido após Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (CL-EM).



Conforme pode ser observado na figura acima, o espectro m/z do isolado é diferente do pico encontrado para Mangiferina (**Fig. 21**), que corrobora com a literatura ($422.9 m/z$) (**Fig. 22**).

Figura 21. Estrutura química da Mangiferina.

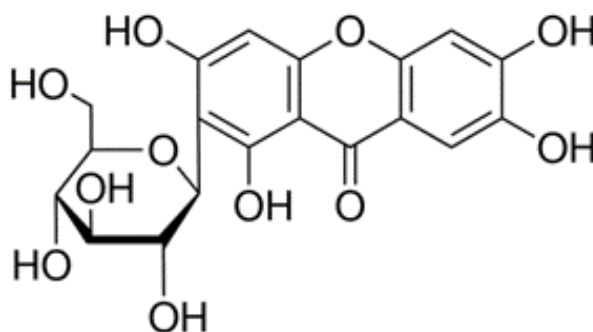
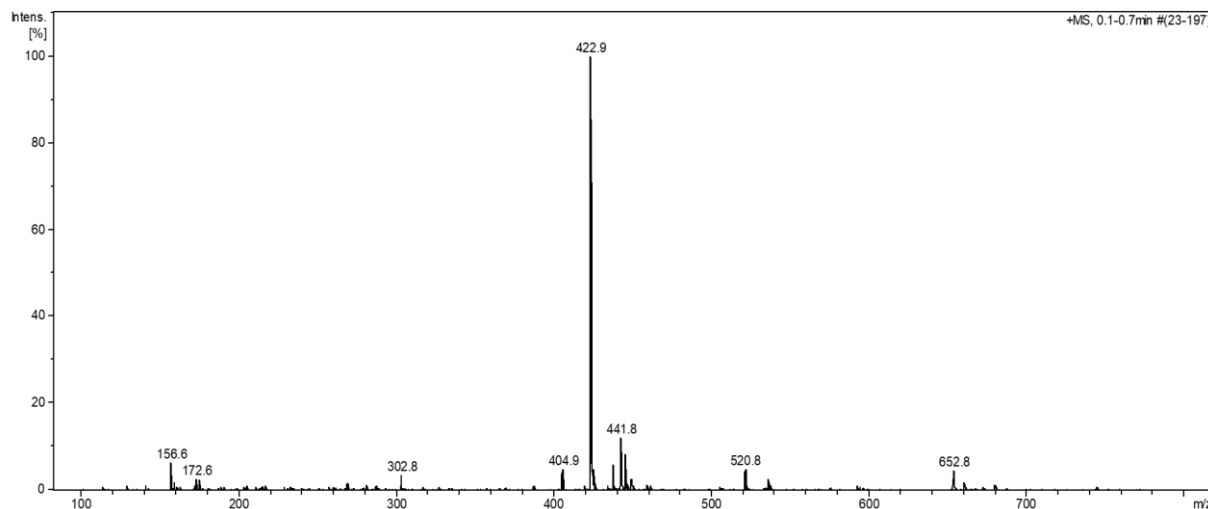
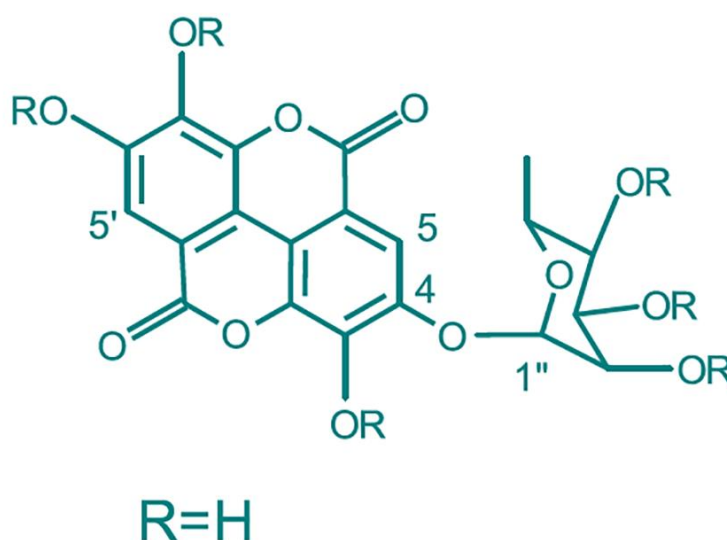


Figura 22. Espectro de massas da Mangiferina, obtido após Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (CL-EM).



Para completa elucidação da estrutura do constituinte da fração aquosa, buscou-se analisar, por RMN, a substância coletada. Após a obtenção dos dados de RMN (**Tabela 6**) o constituinte isolado foi identificado como um composto fenólico, derivado do ácido elágico, eschweilenol C (**Fig. 23**). De posse desse resultado, pode-se observar que há similaridade estrutural entre a molécula identificada a partir da FAq e a mangiferina utilizada como padrão, o que pode explicar a proximidade dos tempos de retenção observados por cromatografia. Apesar de pertencerem a classes diferentes as duas moléculas são derivadas da via do ácido Chiquímico (**fig. 19**).

Figura 23. Estrutura química do eschweilenol C.



Os principais dados encontrados pela análise de ^1H RMN foram dois singletos (δ 7,75 e 7,49) na região aromática, juntamente com um sinal de dubleto metílico (δ 1,14), enquanto o espectro de ^{13}C apresentou 20 sinais de carbono com duas unidades de 7-carbono, indicando o esqueleto do ácido elágico de acordo com Yang et al. (1998). Além disso, os deslocamentos químicos de ^{13}C do resíduo de açúcar, δ 100,1, 69,7, 70,0, 71,6, 69,8 e 17,7 (C-1" para C-6") foram observados e se assemelharam aos sinais correspondentes de uma ramnose glicosídica 1-substituída, conform pode ser visto na **Tabela 6**.

Tabela 6. Dados da espectroscopia de RMN.

Posição	δ ^1H	Mult	δ ^{13}C	^{13}C fragmento	HMBC
1			114.45	C	
2			136.30	C	
3			141.15	C	
4			146.30	C	
5	7.75	s	111.55	CH	141.15 (3), 146.31(4), 114.45 (1), 111.71(1'), 107.41(6), 136.30(2), 158.99(7)
6			107.41	C	
7			158.99	C	
1'			111.71	C	
2'			136.66	C	
3'			139.72	C	
4'			148.68	C	
5'	7.49	s	110.19	CH	136.66(2'), 139.72(3'), 114.45(1), 111.71(1'), 148.68(4'), 107.94(6'), 158.84(7)
6'			107.94	C	
7'			158.84	C	
1''	5.46	"s"	100.12	CH	146.31(4), 69.80(5''), 69.76(2'')
2''	4.00	"d"	69.76	CH	71.67(4''),
3''	3.85	dd	70.03	CH	71.67(4''), 69.76(2'')
4''	3.33	dd	71.67	CH	69.80(5''), 69.76(2''), 17.72(6'')
5''	3.57	ddq	69.80	CH	70.03(3''), 17.72(6'')
6''	1.14	d	17.72	CH ₃	71.67(4''), 69.80(5'')

Fonte: Autoria própria.

Após a análise de RMN, o material recuperado foi novamente analisado por espectrometria de massas e apresentou um íon 449 m/z semelhante ao resultado demonstrado anteriormente. Após a fragmentação desse íon, o espectro MS^2 apresentou um íon 303 m/z , característico do Eschweilenol C após perder a ramnose ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$) que possui 146 Da, exatamente a diferença entre os dois íons. Portanto, corrobora com os dados de RMN que apontam para um ácido elágico deoxihexosídeo (eschweilenol C).

Neves et al. (2018) afirmam que a ramnose é a única desoxihexose descrita na literatura como um agente glicosilante do ácido elágico, corroborando com nossos achados. Os dados de RMN foram comparados com os da literatura, onde os deslocamentos químicos e as correlações de HMBC confirmaram a identidade da molécula (YANG et al., 1998; LI et al., 1999; ASAMI et al., 2003). O eschweilenol C (ácido 4-O- (α -ramnopiranosil) elágico) não é um derivado do ácido elágico muito comum em plantas do gênero *Terminalia* e foi relatado apenas por Yamauchi et al (2016) no extrato metanólico da casca de *Terminalia brownii* (no Sudão) e por Kim et al. (2018) no extrato metanólico da fruta de *Terminalia chebula*, coletada na Coreia do Sul.

Em termos de atividade biológica descrita, esta biomolécula possui fraca atividade contra o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, potencial citotóxico contra células tumorais (P388, K562, B16, HeLa e KB) e é um inibidor enzimático da protease do HIV-1, glicosiltransferase bacteriana e acetilcolinesterase (YANG et al., 1998; ASAMI et al. al., 2003; KUSPRADINI et al., 2007; KIM et al., 2018). Neste contexto, Teodoro et al. (2015) reportaram a atividade do extrato de *Buchenavia tomentosa* contra leveduras do gênero *Candida*. Esta espécie pertence ao gênero Combretaceae, assim como a *T. fagifolia*, e também possui em sua composição o derivado do ácido elágico, eschweilenol C. Semelhante ao resultado reportado anteriormente neste estudo.

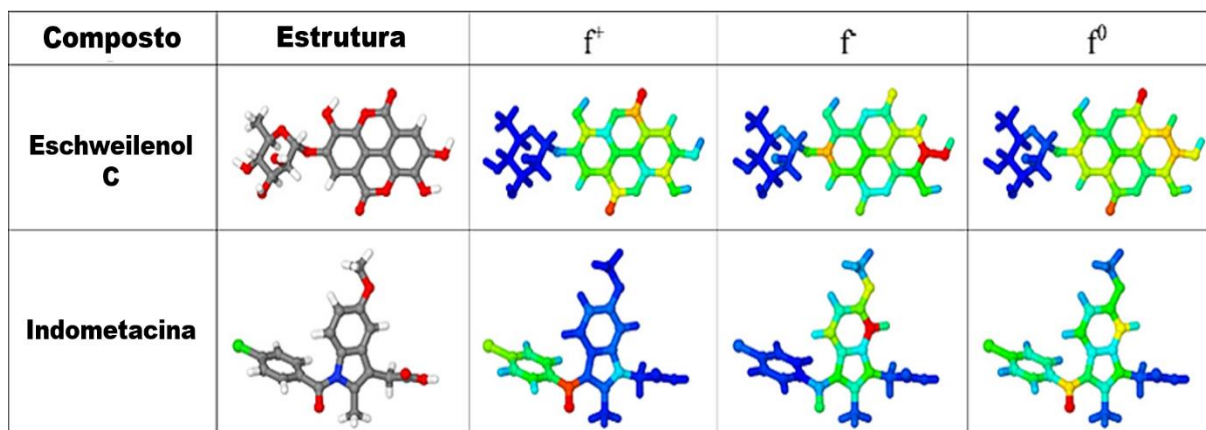
Realizou-se, então, o estudo teórico do eschweilenol C em comparação com a indometacina (droga padrão de anti-inflamatório), para verificar a similaridade entre elas. Para aprimorar o conhecimento acerca desse bioativo, abordagens teóricas para verificação do potencial antioxidante desta molécula também foram realizadas.

A **Figura 24** apresenta os Índices de Fukui Condensados sobre os Átomos (IFCAs) estimados para as moléculas eschweilenol C e indometacina, onde a reatividade é classificada de azul (mais baixa) a vermelha (mais alta), seguindo uma escala de cores RGB. Em geral, as reatividades moleculares de ambos os compostos são bastante semelhantes: i) maior reatividade em relação aos nucleófilos (f^+) e radicais livres (f^0) nos átomos de oxigênio mais externos; ii) maior reatividade para eletrófilos (f^-) nas regiões internas dos anéis ressonantes.

Do ponto de vista geométrico, é possível inferir que os efeitos de impedimento estérico são reduzidos no eschweilenol C em relação ao composto comercial, o que poderia supor uma melhora na atividade biológica dessa molécula, no entanto, estudos experimentais com a

molécula precisam ser desenvolvidos para explorar o seu potencial biológico e confirmar essa suposição.

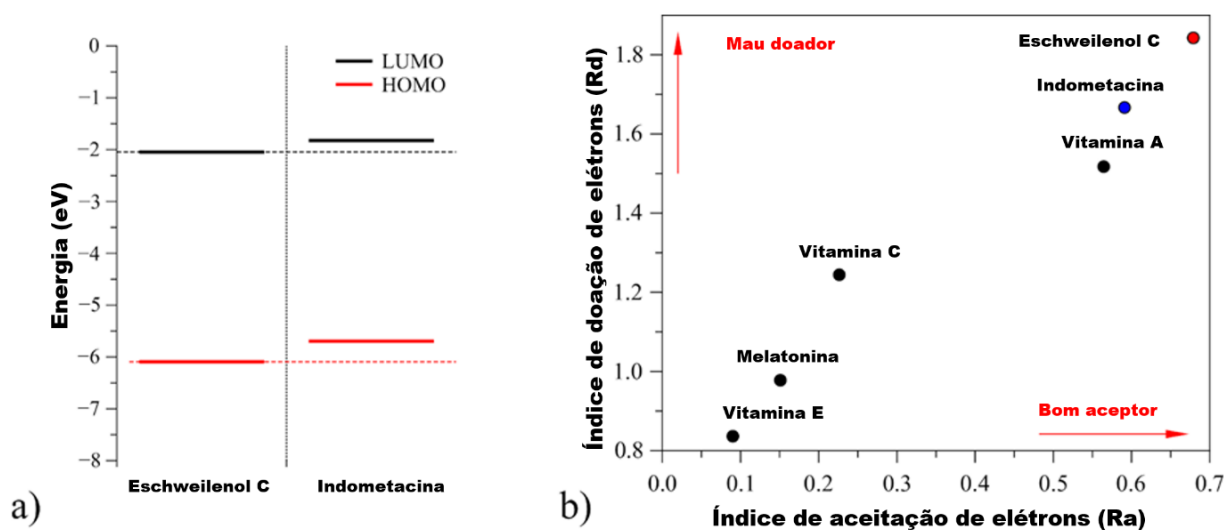
Figura 24. Representação molecular (3D) do Eschweilenol C e da Indometacina e IFCAs para reações em direção a nucleófilos (f^+), eletrófilos (f^-) e radicais livres (f^0).



Legenda: Esquema de cores: cinza (Carbono), vermelho (Oxigênio) e branco (Hidrogênio). De vermelho a verde: locais de maior reatividade e azul: locais de menor reatividade.

A semelhança eletrônica entre os compostos foi confirmada considerando a posição relativa dos orbitais de fronteira (análise de HOMO - onde a molécula tem maior capacidade de doar elétrons e LUMO - onde a molécula tem menos resistência para aceitar elétrons) (**Fi. 25 a/b**). Na **Figura 25 b** é possível observar que o comportamento do eschweilenol C é similar ao da indometacina e da vitamina A, funcionando melhor como acceptor de elétrons do que como doador.

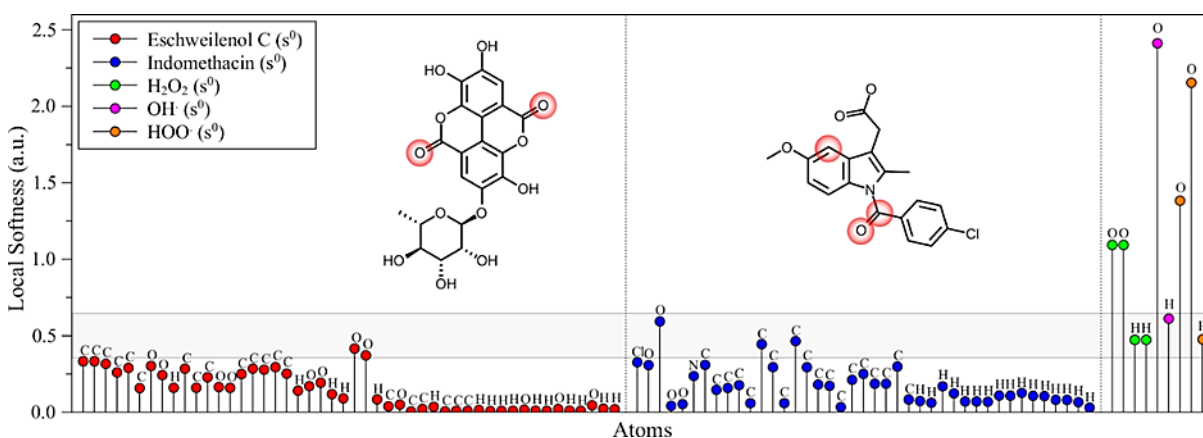
Figura 25. Características acerca do caráter doador/receptor de elétrons do Eschweilenol C.



Legenda: a) Alinhamento dos níveis de HOMO e LUMO espécies químicas Eschweilenol C e Indometacina. b) Razão de doação/aceitação de elétrons comparada a valores da literatura.

O local de maciez química, observado entre eles e com relação às espécies H_2O_2 , OH^\bullet e HOO^\bullet (Fig. 26), sugere que eschweilenol C e indometacina têm mecanismos de desativação antiradical semelhantes, no que diz respeito à atividade antioxidante e o sequestro de radicais livres.

Figura 26. Local de maciez em relação à reatividade com radicais para eschweilenol C.



Legenda: eschweilenol C (esquerda) e indometacina (direita). As últimas colunas mostram a atividade dos radicais H_2O_2 , OH^\bullet e HOO^\bullet para comparação.

Em resumo, os cálculos de Teoria do funcional de densidade (DFT) sugerem que o composto majoritário da FAq (eschweilenol C) apresenta mecanismos anti-radicais livres semelhantes aos do composto comercial, indometacina, conforme mencionado antes. No entanto, espera-se uma melhora nas atividades biológicas principalmente devido à ausência de efeitos de impedimento em eschweilenol C. Como pode ser observado, estes resultados teóricos dão suporte à atividade anti-inflamatória da FAq, dada a similaridade estrutural e química do seu constituinte majoritário com a indometacina, corroborando com o comportamento semelhante nos estudos *in vivo*. O mesmo pode ser inferido para a atividade antioxidante da FAq, tendo em vista que este constituinte é bastante presente na fração estudada.

Além do eschweilenol C (constituinte majoritário) identificado neste estudo, Nunes et al. (2014) relataram a provável presença de epicatequina, como sendo o segundo composto mais abundante na fração aquosa (FAq) do extrato etanólico de *T. fagifolia*. A epicatequina também é uma molécula antioxidante e já possui diversas propriedades biológicas relatadas (BERNATOVA, 2018; SHAY et al., 2015).

Sabendo-se da riqueza da FAq em moléculas bioativas, buscou-se realizar a síntese verde de nanopartículas de prata (AgNPs). Para efeito de comparação, e aproveitamento do potencial químico, outros extratos e frações de *T. fagifolia* também foram utilizados.

Todos os extratos e frações utilizados foram capazes de reduzir a prata (Ag^0) e formar nanopartículas. As AgNPs sintetizadas foram denominadas conforme a **Tabela 7** e caracterizadas pelos protocolos descritos na seção Material e métodos.

Tabela 7. Denominação utilizada para as nanopartículas sintetizadas.

Extrato ou fração precursora	Sigla utilizada
Extrato etanólico de <i>T. fagifolia</i>	AgNPEEt
Extrato hidroalcoólico de <i>T. fagifolia</i>	AgNPEHa
Fração aquosa do extrato etanólico de <i>T. fagifolia</i>	AgNPFAq
Fração hidroalcoólica do extrato etanólico de <i>T. fagifolia</i>	AgNPFHa

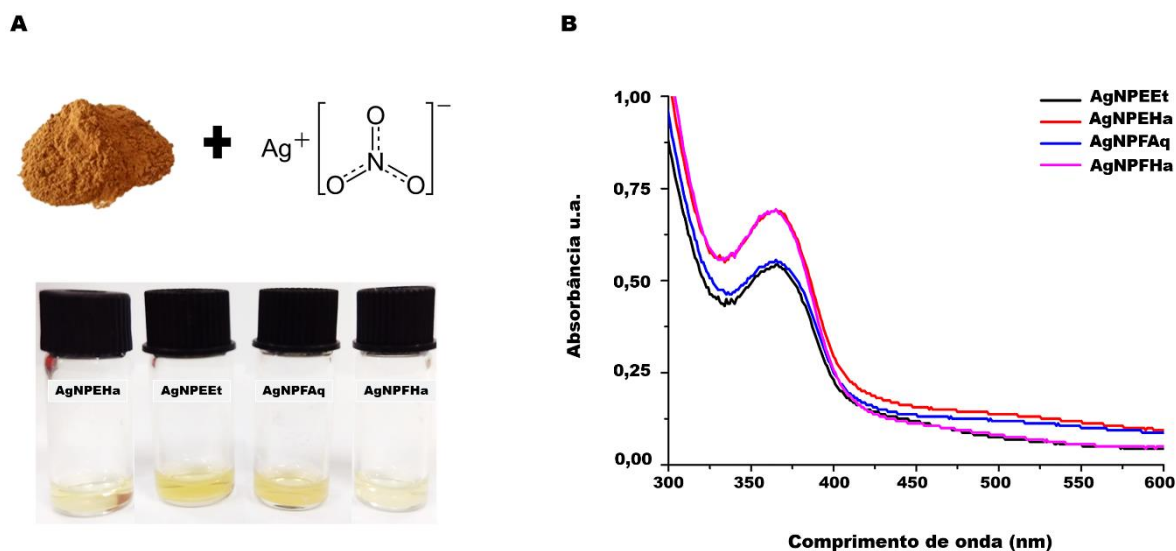
Fonte: Autoria própria.

A formação das AgNPs foi monitorada e confirmada pela alteração de cor na mistura de reação e análise por espectroscopia na região do UV-vis, na qual observa-se a presença de bandas de ressonância plasmônica de superfície na região de 350 e 500 nm (ROY; BARIK, 2010; SALEM et al., 2016). A **Figura 27** mostra uma ilustração esquemática da síntese das AgNPs, bem como a aparência da solução de nanopartículas sintetizada (**Fig. 27 A**). O espectro de UV-vis (**Fig. 27 B**) mostra banda em torno de 365 nm para todas as AgNP formadas, semelhante à encontrada por Rasheed et al. (2018) ao sintetizar nanopartículas de prata com Cefixime e à relatada na literatura para AgNPs sintetizadas com citrato (MULVANEY, 1996).

Kumar et al. (2012), Edison e Sethuraman (2012) e Dwivedi (2013) sintetizaram nanopartículas de prata com extrato *Terminalia chebula* tanto para fins biológicos, como para atividade catalítica e redução de corantes. Ankamwar (2011) e Devadiga, Shetty e Saidutta (2017) realizaram síntese verde de nanopartículas de prata usando folhas de *Terminalia catappa*, enquanto Shah, Patil e Sharma (2014) utilizaram o extrato da raiz de *T. tomentosa*. El-Rafie e Hamed (2014) sintetizaram AgNPs com atividade antioxidante e anti-inflamatória utilizando extrato de várias espécies de *Terminalia* (*T. catappa*, *T. mellueri*, *T. bentazoe* e *T. bellerica*). O extrato de *T. arjuna* também foi utilizado para síntese verde de nanopartículas de prata para

aplicações biológicas (AHMED; IKRAM, 2015), demonstrando o potencial de plantas do gênero *Terminalia* para síntese verde de nanopartículas de prata, assim como nesse estudo.

Figura 27. Figura esquemática da síntese verde das AgNPs (A) e espectros de UV-vis das soluções de AgNPs (B).



Legenda: AgNPEEt – AgNps sintetizadas com extrato etanólico de *T. fagifolia*. AgNPEHa – AgNPs sintetizadas com extrato hidroalcoólico de *T. fagifolia*. AgNPFAq – AgNPs sintetizadas com a fração aquosa do extrato etanólico de *T. fagifolia*. AgNPFHa – AgNPs sintetizadas com a fração hidroalcoólica do extrato etanólico de *T. fagifolia*.

Ao observar o espectro de UV-vis, verifica-se que as bandas se apresentam relativamente largas, o que pode representar um conjunto de nanopartículas polidispersas, como pode ser visto na **Tabela 8**, que mostra o índice de polidispersão (PDI) das AgNPs, determinado pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) (ANURADHA; SUNDAR; RAMANA, 2014). O tamanho hidrodinâmico médio das partículas medido por DLS variou de $66,22 \pm 3,65$ nm a $110,57 \pm 2,17$ nm, valores para AgNPEEt e AgNPFHa, respectivamente. O PDI das nanopartículas variou de $0,41 \pm 0,01$ a $0,57 \pm 0,07$, valores que podem caracterizar amostras polidispersas e que corroboram com a banda larga apresentada pela análise de UV-vis. No entanto, é um resultado comum para nanopartículas de prata polidispersas analisadas por DLS devido a limitações técnicas para este tipo de amostra (EATON et al., 2017). O mesmo comportamento polidisperso pode ser observado para nanopartículas de prata sintetizadas com extrato de *T. arjuna* (AHMED; IKRAM, 2015)

O potencial Zeta foi negativo para todas as nanopartículas e os valores encontrados ficaram entre -27 e -23,5 mV, estes valores podem indicar a estabilidade coloidal do sistema por forte força repulsiva entre as partículas carregadas negativamente e estão de acordo com o

reportado por Edison e Sethuraman (2012) para AgNPs de *T. chebula* (SALOPEK; KRASI; FILIPOVI, 1992).

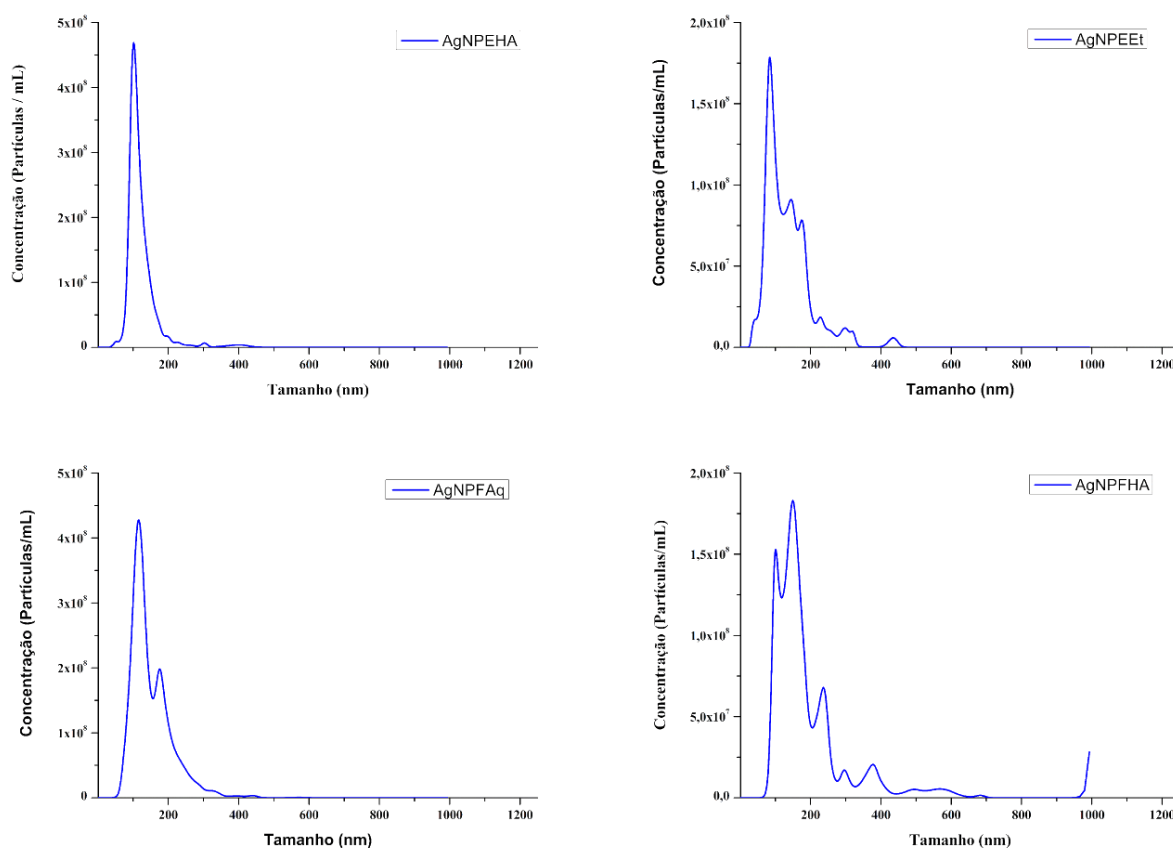
Pela técnica de rastreamento de nanopartículas - NTA também foi possível determinar o tamanho médio de AgNPs que variou de $110,2 \pm 1,8$ nm a $157,7 \pm 5,7$ nm. As técnicas de DLS e NTA têm diferentes mecanismos de medição, fato que pode justificar as pequenas diferenças encontradas no resultado das análises de tamanho, além disso outros estudos também relataram resultados diferentes entre as duas técnicas (MACCUSPIE et al., 2011). A concentração de nanopartículas em solução medida por NTA foi da ordem de 10^8 partículas/mL, assim como o resultado relatado por Mwilu et al. (2013) ao analisarem AgNPs por NTA. Os dados apresentados acima são mostrados na **Tabela 8**.

Tabela 8. Tamanho médio das nanopartículas de prata (AgNPs), índice de polidispersão (PDI), potencial Zeta e concentração das AgNPs.

AgNPs	Tamanho médio (nm) por DLS	Tamanho médio (nm) por NTA	PDI	Potencial Zeta (mV)	Concentração (partículas/mL)
AgNPEHa	$69,77 \pm 1,70$	$112,6 \pm 1,3$	$0,57 \pm 0,07$	-26,0	$14,10 \times 10^9 \pm 3,58 \times 10^8$
AgNPEEt	$66,22 \pm 3,65$	$110,2 \pm 1,8$	$0,51 \pm 0,04$	-27,0	$9,99 \times 10^9 \pm 3,45 \times 10^8$
AgNPFAq	$81,39 \pm 1,57$	$133,5 \pm 47,8$	$0,41 \pm 0,01$	-23,5	$19,10 \times 10^9 \pm 7,42 \times 10^8$
AgNPFHa	$110,57 \pm 2,17$	$157,7 \pm 5,7$	$0,57 \pm 0,07$	-24,6	$9,68 \times 10^9 \pm 7,08 \times 10^8$

Fonte: Autoria própria.

A distribuição das nanopartículas por tamanho pode ser evidenciada nos gráficos abaixo (**Fig. 28**), gerados a partir da análise por NTA. Percebe-se que apesar de apresentar um dos maiores valores de índice de polidispersão ($0,57 \pm 0,07$) por DLS, a AgNPEHa apresentou uma população unimodal na análise por NTA. Essa discrepância entre as técnicas pode ser explicada pela presença de agregados nessa amostra (ver adiante na **Fig. 31 A/B**) que pode limitar a sensibilidade do DLS (EATON et al., 2017). Já a AgNPFHa (nanopartícula de prata sintetizada com a fração hidroalcoólica) apresentou o mesmo PDI e também se mostrou polidispersa na análise por NTA. Pelos gráficos da **Figura 28** confirmam-se os números apresentados na **Tabela 8** para o tamanho mensurado por NTA, ou seja, percebe-se uma predominância de nanopartículas em torno de 100 nm.

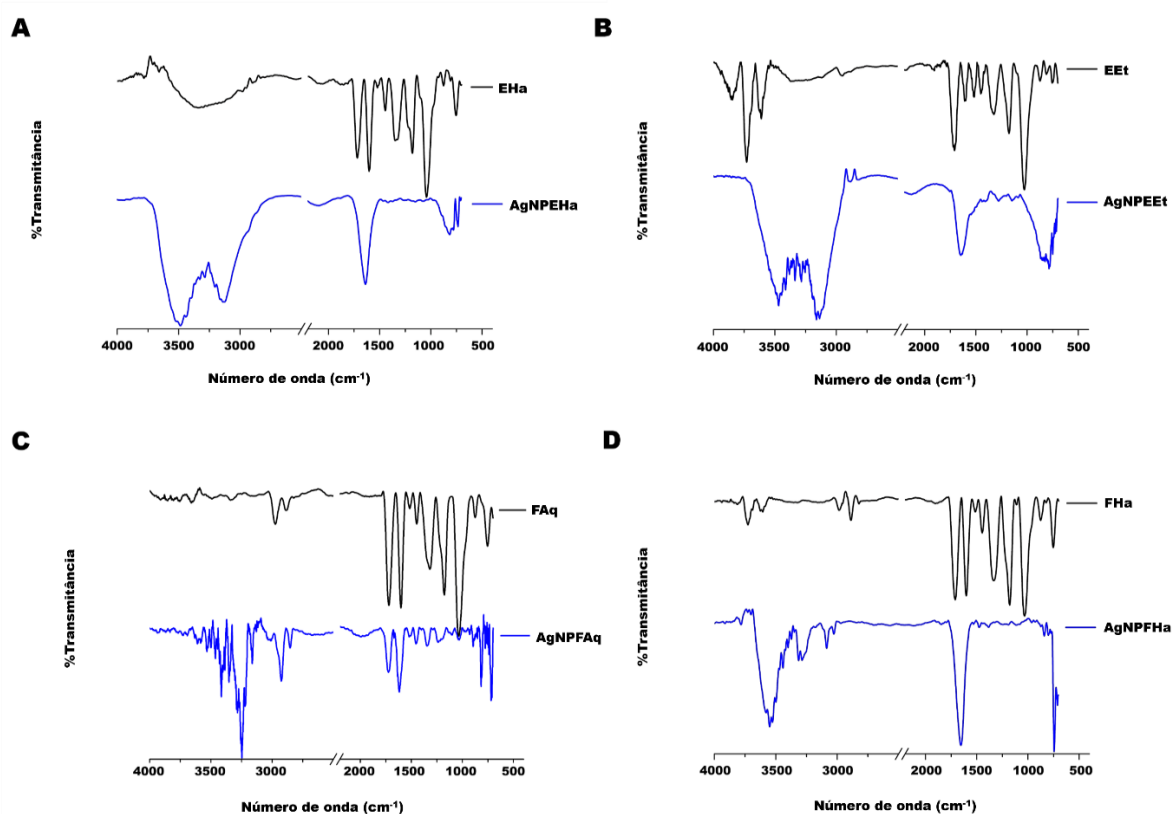
Figura 28. Gráficos de distribuição de tamanho das AgNPs a partir de análises por NTA.

As análises de FTIR foram realizadas para extratos, frações e AgNPs, visando identificar as possíveis moléculas envolvidas na redução dos íons Ag^+ e no recobrimento das AgNPs (**Fig. 29**). Os espectros mostram as bandas características de OH (região de $3.200\text{-}3.600\text{ cm}^{-1}$), além das bandas de compostos fenólicos presentes em derivados de *T. fagifolia*: bandas em 1.600 cm^{-1} atribuídas a $\text{C}=\text{C}$, em $1440\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ devido ao estiramento de CH, em $1.100\text{-}1.040\text{ cm}^{-1}$ atribuídas às vibrações de CO de álcoois.

Ao tempo que nos espectros das AgNPs podemos observar a diminuição das bandas características dos compostos fenólicos citados acima, como a banda na região de 1200 cm^{-1} (CO de ácidos carboxílicos, ésteres e éteres), nos espectros das AgNPs ocorre o aparecimento de uma intensa banda na região de 1636 cm^{-1} , o que corresponde à deformação de NH de aminas primárias e 1380 cm^{-1} que pode ser atribuída a estiramento de NO_3 ou CN de amina aromática (**Fig. 29**), esse resultado é similar aos apresentados nos espectros de FTIR por Edison e Sethuraman (2012) para nanopartículas de prata sintetizadas com *T. chebula*. A análise FTIR confirmou que a redução dos íons Ag^+ para as nanopartículas de prata, provavelmente, deve-se

aos componentes presentes no material vegetal derivado de *T. fagifolia* (ANURADHA; SUNDAR; RAMANA, 2014; SASIREKHA et al., 2018), assim como a análise de FTIR feita por Ahmed e Ikram (2015) para AgNPs de *T. arjuna*.

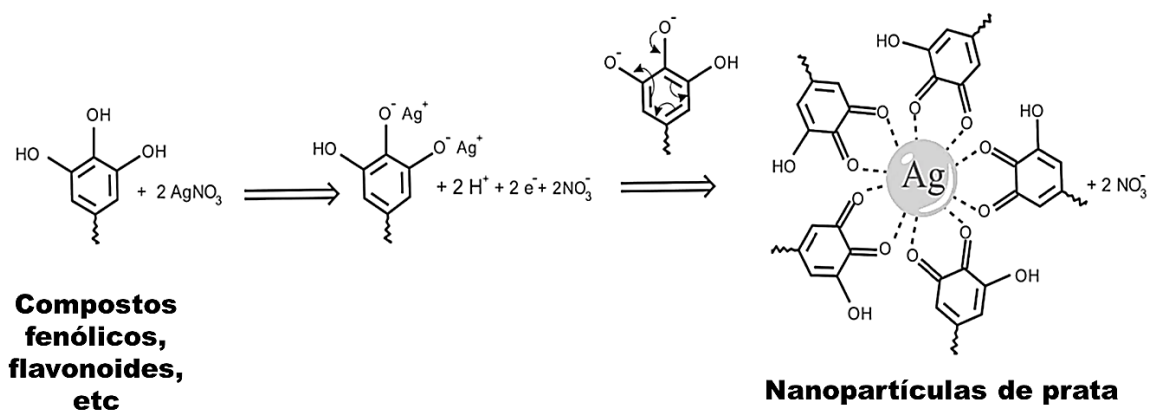
Figura 29. Espectros de FTIR dos extratos, frações e AgNPs sintetizadas.



Legenda: A: espectro do extrato hidroalcoólico – EHa e sua respectiva nanopartícula – AgNPEHa; B: espectro do extrato etanólico – EEt e sua respectiva nanopartícula – AgNPEEt; C: espectro da fração aquosa – FAq e sua respectiva nanopartícula – AgNPFAq; D: espectro da fração hidroalcoólica – FHa e sua respectiva nanopartícula – AgNPFHa.

Conforme mencionado anteriormente, *T. fagifolia* é uma planta rica em metabólitos secundários, tais como: compostos fenólicos, taninos hidrolisáveis, flavonoides, triterpenos glicosilados e outros compostos que podem ser oxidados em aldeídos, ácidos carboxílicos, cetonas ou flavonas, dessa forma, os íons metálicos são reduzidos a nanopartículas e podem desempenhar um papel importante no recobrimento das nanopartículas. Baseado nestas afirmações, um possível mecanismo de síntese foi proposto para as AgNPs sintetizadas e estabilizadas com extratos e frações de *T. fagifolia* (**Fig 30**) (GARCEZ et al., 2006; ANURADHA; SUNDAR; RAMANA, 2014).

Figura 30. Mecanismo sugerido de síntese e estabilização de AgNPs com extratos e frações de *T. fagifolia*.

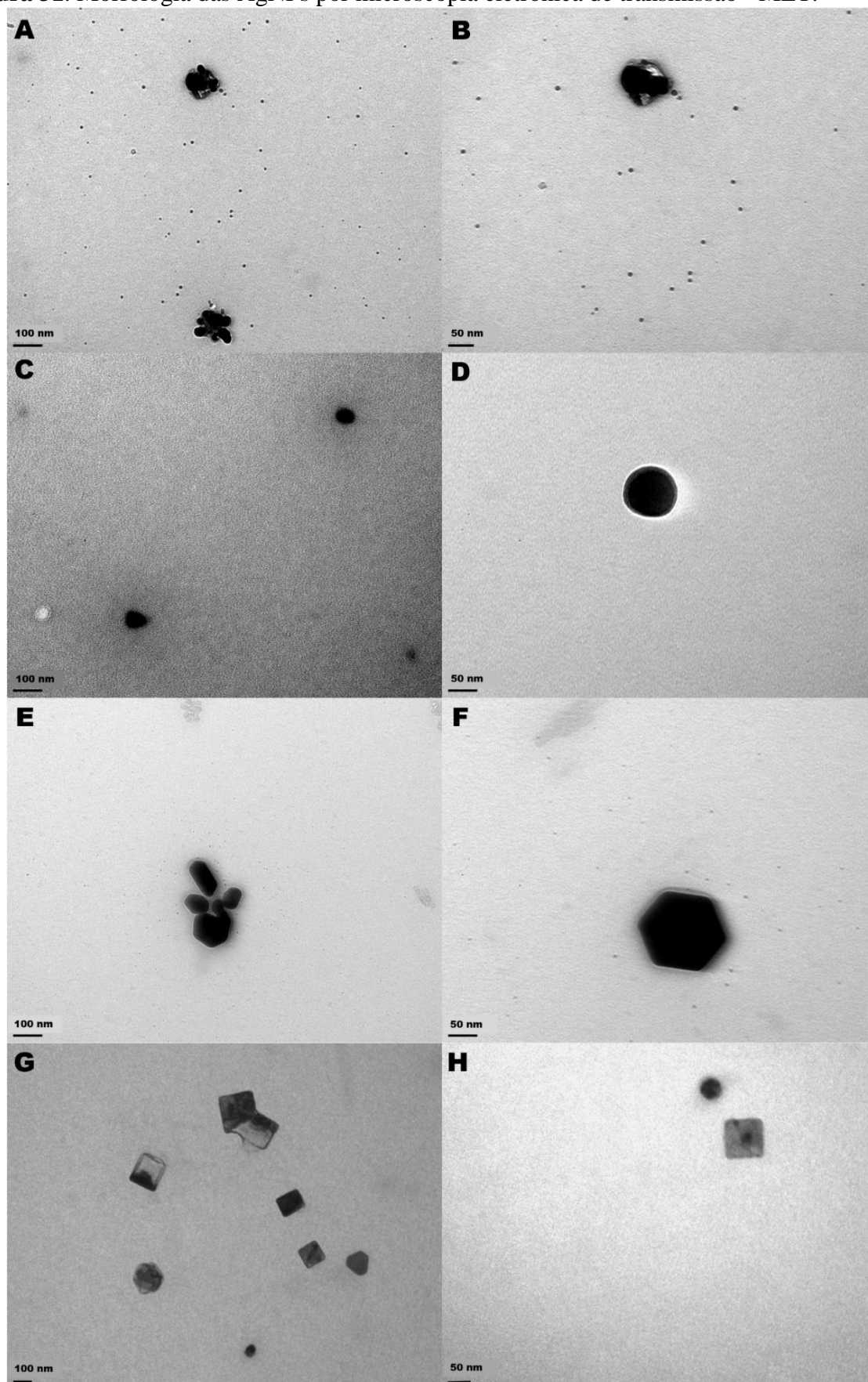


Adaptado de Edison e Sethuraman (2012).

Uma vez que as AgNPs foram sintetizadas, a observação da morfologia dessas nanopartículas é de extrema importância. A **Figura 30** evidencia uma população heterogênea de nanopartículas analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), pode-se observar AgNPs com formato esférico (**Fig. 31 B**), com simetria hexagonal (**Fig. 31 E/F**) ou cubos (**Fig. 31 G/H**), corroborando com o resultado encontrado por Ankamwar (2011) para AgNPs de *T. cattapa*. As diferentes formas das AgNP sintetizadas podem explicar as bandas largas observadas na análise por UV-vis (**Fig. 27**) e o PDI acima de 0,3 mostrado na **Tabela 8**. Outra característica perceptível das AgNPs é que aquelas sintetizadas com as frações (aquosa ou hidroalcoólica) tem um formato mais poligonal em detrimento da predominância de nanopartículas esféricas sintetizadas com os extratos. Como as frações possuem menos variedade de moléculas, esse fato pode ser decorrente de uma maior organização cristalina das moléculas para o processo de estabilização das nanopartículas de prata.

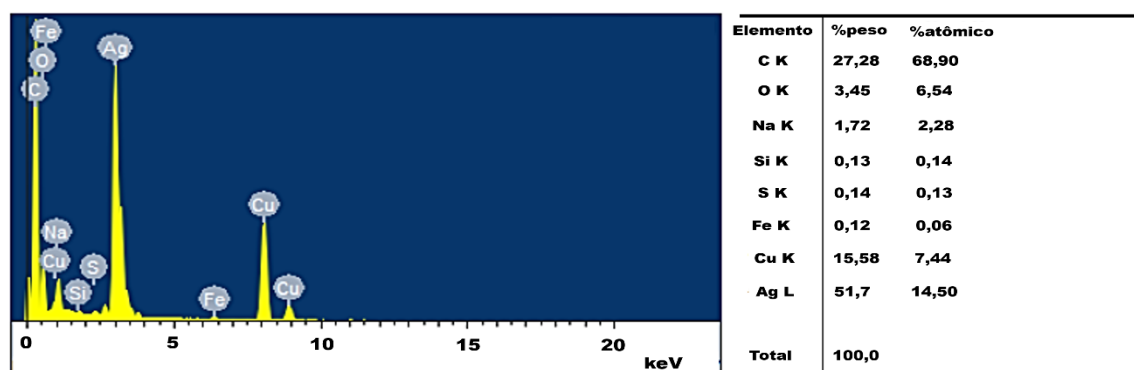
A partir da análise de espectroscopia de dispersão de energia - EDS da AgNPFAq (**Fig. 32**), observa-se um forte sinal dos átomos de prata - Ag e carbono - C com % atômico de 14,5% e 68,9%, respectivamente. A presença de outros elementos, bem como o pico intenso de C, pode ser causada pela existência de moléculas orgânicas derivadas dos extratos e frações de *T. fagifolia* ligados às nanopartículas, já a presença marcante do pico de Ag indica a propriedade cristalina das AgNPs, enquanto que o pico de oxigênio - O alinhado com o pico de Ag, pode indicar que as AgNPs são recobertas pelos metabólitos secundários de *T. fagifolia* pelo átomo de oxigênio, conforme proposto na **Figura 30**. A presença intensa do cobre (Cu) é devido à grade usada para realização da microscopia (EDISON; SETHURAMAN, 2012).

Figura 31. Morfologia das AgNPs por microscopia eletrônica de transmissão - MET.



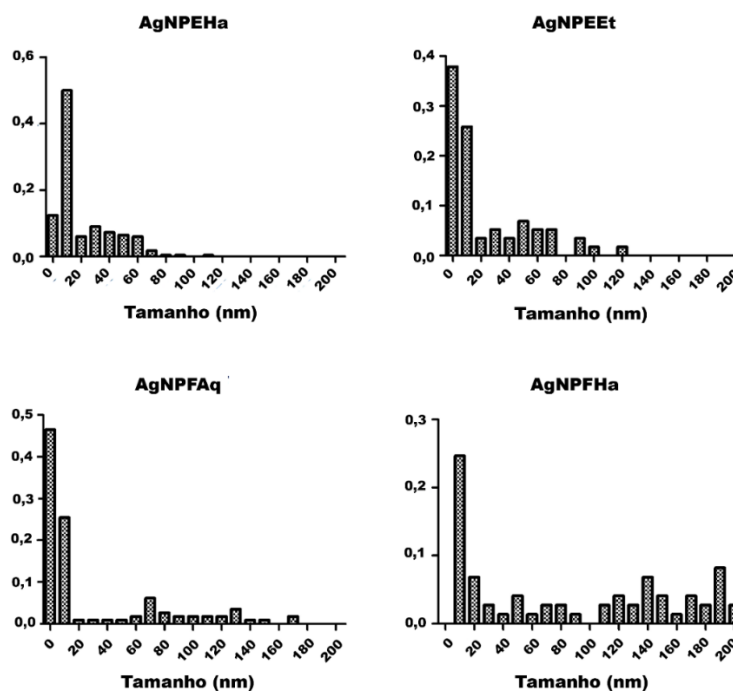
Legenda: A-B) AgNPEHa; C-D) AgNPEEt; E-F) AgNPFAq e G-H) AgNPFHa.

Figura 32. Análise por EDS da nanopartícula de prata sintetizada com a fração aquosa de *T. fagifolia* (AgNPFAq).



O tamanho também foi calculado a partir das imagens obtidas por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET). O tamanho médio das AgNPs aferido por MET variou de $20,5 \pm 20,21$ nm a $113,10 \pm 101,64$ nm, para AgNPEHa e AgNPFHa, respectivamente. A AgNPEEt apresentou tamanho igual a $24,8 \pm 29,47$ nm e a AgNPFAq apresentou tamanho médio de $30,0 \pm 44,60$ nm (**Fig. 33**), semilar ao tamanho encontrado por Edison e Sethuraman (2012) para AgNPs de *T. chebula*, a partir da microscopia eletrônica de transmissão.

Figura 33. Histogramas de dispersão das AgNPs a partir de imagens de MET.



Por esta técnica o tamanho médio das AgNPs foi menor que o encontrado por DLS e NTA, no entanto era um resultado esperado, tendo em vista que as duas técnicas medem o

diâmetro hidrodinâmico e não o tamanho real da partícula. O alto desvio padrão apresentado demonstra a polidispersão das amostras, que pode ser observada nos histogramas gerados após análise por MET e nas imagens da microscopia (**Fig. 31**). O histograma apresentado na **Figura 33** para AgNPFHa corrobora com o gráfico gerado pela análise de NTA (**Fig. 28**), pois esta amostra se apresenta como a mais polidispersa dentre as AgNPs sintetizadas.

Os resultados obtidos para os testes realizados para a detecção do potencial antioxidante das AgNPs são mostrados na **Tabela 9**. As nanopartículas de prata são conhecidas por possuir propriedade antioxidante (EL-RAFIE; HAMED, 2014) que corrobora com o resultado encontrado neste estudo, dessa forma, dentre as nanopartículas, a AgNPFAq foi a que demonstrou a maior atividade antioxidante ($111 \pm 7,3$ μg equivalente de ácido ascórbico/mL) pelo ensaio de ABTS, no entanto apresentou menor sequestro do radical DPPH (210 ± 2 μg equivalente de TROLOX/mL). A maior atividade antioxidante das AgNPs, provavelmente, está relacionada com a forma de adsorção das moléculas antioxidantes do extrato ou fração na superfície da nanopartícula (PATIL; KUMBHAR, 2017).

Tabela 9. Atividade antioxidante das AgNPs, extratos e frações determinados pelos ensaios de ABTS, DPPH e FRAP.

AgNPs/Extratos	ABTS ⁺ ($\mu\text{gEAA/mL}$)	DPPH ($\mu\text{gET/mL}$)	FRAP ($\mu\text{gEAA/mL}$)
AgNPEHa	$59,4 \pm 6,1$	1170 ± 20	$463,02 \pm 41,78$
AgNPEEt	$72 \pm 3,0$	1090 ± 10	$759,50 \pm 23,38$
AgNPFAq	$111 \pm 7,3$	210 ± 2	$412,40 \pm 79,48$
AgNPFHa	$75,2 \pm 1,1$	1120 ± 50	$481,13 \pm 66,87$
EHa	$67,7 \pm 4,1$	1030 ± 10	$442,56 \pm 56,69$
EEt	$61,0 \pm 6,4$	920 ± 10	$606,61 \pm 24,54$
FAq	$82,8 \pm 1,2$	240 ± 2	$873,14 \pm 14,61$
FHa	$131,1 \pm 15,9$	1010 ± 90	$747,11 \pm 109,86$

Fonte: A autoria própria.

O teste de DPPH baseia-se na capacidade de radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazila reagirem com doadores de hidrogênio, incluindo compostos fenólicos (AL-RIMAWI et al., 2017). A AgNPEEt apresentou o melhor resultado no teste de FRAP (759.50 ± 23.38 μg de equivalente de ácido ascórbico/mL), entre os extratos o melhor foi a FAq e FHa com

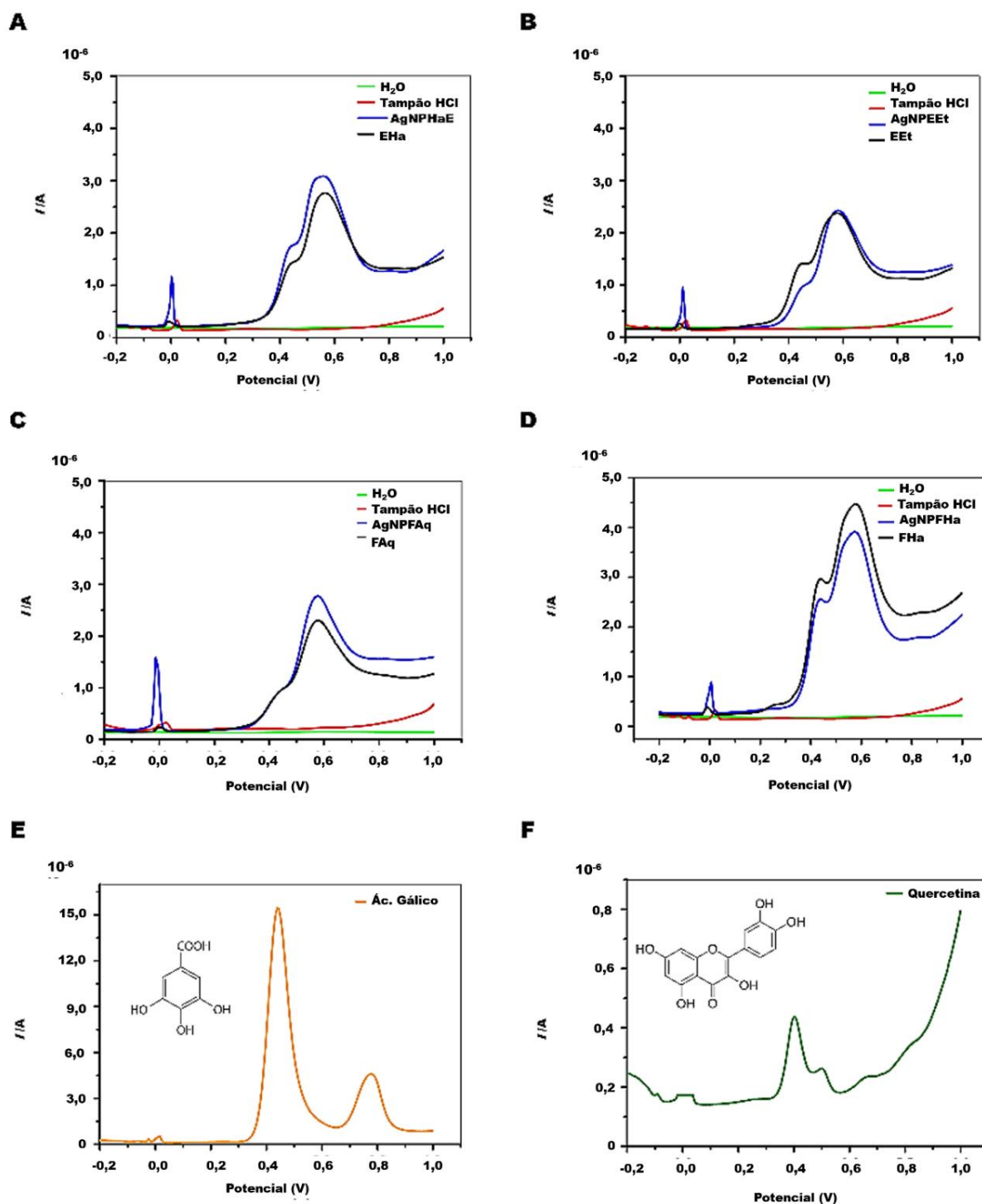
873.14±14.61 e 747,11 ±109,86 µg de equivalente de ácido ascórbico/mL, respectivamente. No entanto, esse valor caiu quase metade após a síntese de AgNPFAq (412,40±79,48 µg equivalente de ácido ascórbico/mL) e AgNPFHa (481,13 ±66,87 µg equivalente de ácido ascórbico/mL). Provavelmente o(s) composto(s) responsável(is) pela capacidade de reduzir o ferro foram consumidos (ainda que parcialmente) durante a síntese das AgNPs. Não é possível realizar a comparação das AgNPs sem extrato ou fração para estabilizá-la, pois, mesmo utilizando um redutor químico, as nanopartículas não se mantêm estáveis.

A literatura relata que as plantas da família Combretaceae, principalmente do gênero *Terminalia*, são ricas em compostos que promovem atividade antioxidante (ELDEEN et al., 2006; MASOKO & ELOFF, 2007; ELOFF; KATERERE; MCGAW, 2008; AYRES et al., 2009; LEE et al., 2017).

Para continuar a investigação acerca do potencial antioxidante das nanopartículas sintetizadas, utilizou-se a eletroquímica para complementar a caracterização das AgNPs. De fato, sendo a prata um composto eletroativo, torna-se razoável usar técnica voltamétrica para analisar as AgNPs como um aspecto importante da pesquisa, apesar das limitações da técnica (MOHAN et al., 2016). Nesse sentido, a voltametria do pulso diferencial (DPV) foi utilizada para observar o comportamento eletroquímico das AgNPs, que pode mostrar o potencial antioxidante, bem como o pico de oxidação da prata, comprovando que estava no seu estado reduzido, característico da sua forma nanoestruturada.

As medidas de voltametria foram realizadas por eletrodo de carbono impresso (SPCE) de -0,2 V para +1 V. Na **Figura 34** observa-se sinal anódico típico em 0,0013 V, 0,0114 V, -0,0137 V e 0,0064 V para a oxidação do AgNPEHa (**Fig. 34/A**), AgNPEEt (**Fig. 34/B**), AgNPFAq (**Fig. 34/C**) e AgNPFHa (**Fig. 34/D**), respectivamente, com uma corrente de pico maior do que a mostrada para extratos ou frações precursoras.

Três picos anódicos são observados a partir dos extratos, frações e AgNPs, mas entre os três picos, os picos anódicos mais visíveis são os das AgNPs, que correspondem a Ag⁺ após a oxidação de Ag⁰ presente nas nanopartículas (MOHAN et al., 2016). Nestes voltamogramas foram observados picos anódicos entre 0,4394 e 0,5754 V que podem ser atribuídos à oxidação de diferentes compostos polifenólicos, incluindo ácido gálico e quercetina, como mostrado na **Figura 34/E** e **Figura 34/F**, respectivamente. Esses constituintes são metabólitos secundários comuns produzidos por diversas espécies de vegetais, inclusive pela *T. fagifolia*, e funcionam como padrão para validação da metodologia, que pode ser correlacionada com os dados obtidos nesse estudo e publicados na literatura para atividade antioxidante de derivados de *T. fagifolia*.

Figura 34. Voltametria de pulso diferencial para AgNPs, extratos e frações.

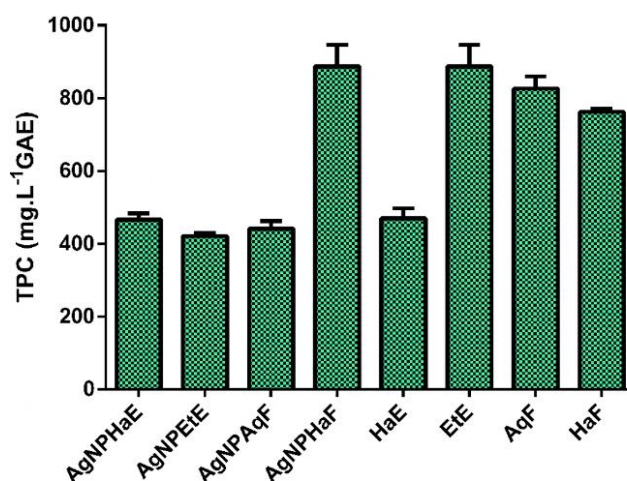
Legenda: AgNPs (A-D/linha preta), extratos de *T. fagifolia* (A e B/linha azul escura), frações de *T. fagifolia* (C e D/linha vermelha), Ácido gálico (E/linha laranja) e Quercetina (F/linha verde) em 0,1 M HCl (linha azul claro) no eletrodo.

Para explicar os resultados dos testes antioxidantes realizados neste estudo, o conteúdo de fenólicos totais (TPC) das AgNPs, extratos e frações, foi analisado (**Fig. 35**). O TPC está

relacionado à capacidade antioxidante mostrada anteriormente, devido estrutura química das moléculas envolvidas e suas propriedades redutoras. Os compostos fenólicos possuem um anel aromático com um ou mais anéis hidroxilas e estão presentes em muitas espécies vegetais. Englobam vários metabólitos secundários, tais como ácidos fenólicos, flavonoides, lignanas, estilbenos, cumarinas e taninos que além de possuir potencial antioxidante, formam intermediários relativamente estáveis em função da ressonância do anel aromático presente nessas substâncias (SOUSA et al, 2007; IGNAT; VOLFF; POPA, 2011; ABDEL-AZIZ et al., 2014).

A partir da **Figura 35** pode-se inferir que o conteúdo de fenólicos totais (TPC) em extratos e frações (EHa = $470 \pm 27,09$, EEt = $887,40 \pm 59,17$, FAq = $826,80 \pm 33,07$ e FHa = $762,50 \pm 7,40$ mg equivalente de ácido gálico/L) diminui após a síntese das AgNPs (AgNPEHa = $465,99 \pm 18,42$, AgNPEEt = $420,92 \pm 9,46$, AgNPFAq = $440,99 \pm 21,91$ e AgNPFHa = $887,37 \pm 59,17$ mg equivalente de ácido gálico/L), exceto para o extrato e a fração hidroalcoólica (EHa e FHa) que permaneceu praticamente o mesmo valor. No geral, esse resultado corrobora com os espectros obtidos nas análises de FT-IR.

Figura 35. Conteúdo de fenólicos totais das AgNPs, extratos e frações de *T. fagifolia*.



Abdel-Azziz et al. (2014) também demonstraram potencial antioxidante das nanopartículas de prata sintetizadas com extrato vegetal e quantificaram o conteúdo de fenólicos totais, que, provavelmente, estão envolvidos no potencial antioxidante demonstrado. A partir dos resultados demonstrados, pode-se observar que as AgNPs possuem boa atividade antioxidante, o que favorece a aplicação desses materiais na área biomédica, tendo em vista que

a capacidade antioxidante pode diminuir o dano oxidativo provocado nas células eucarióticas e assim, as AgNPs possam ser usadas como antimicrobianos, por exemplo (GELAIN et al., 2012; PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2013).

Para avaliar o potencial antibacteriano, as AgNPs foram testadas contra seis estirpes bacterianas, três Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus* MRSA e *Enterococcus faecalis*) e três Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enterica typhimurium*) com relevância clínica devido à alta prevalência em infecções humanas (OMS, 2018). Todas as AgNPs mostraram atividade contra bactérias Gram-positivas sensíveis e resistentes (CIMs variando de 27 a 6,75 µgAg/mL), bem como extratos e frações precursoras, corroborando com o resultado encontrado por Araújo et al. (2015). Para bactérias Gram-negativas, as CIMs variaram de 27 a 3,37 µgAg/mL, os extratos e frações precursoras não apresentaram atividade inibitória frente às linhagens Gram-negativas (**Tabela 10**).

Tabela 10. Valores de Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) em µg/mL das AgNPs, AgNO₃, extratos, frações e antibacterianos padrão (Controle positivo) contra as bactérias testadas.

Linhasgens bacterianas	AgNP EHa	EHA	AgNP EEt	EEt	AgNP FAq	FAq	AgNP FHa	FHa	AgNO ₃	Controle
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	13,5	250	6,75	125	13,5	62,5	27	125	13,5	<0,25 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 (MRSA)	13,5	125	27	125	27	62,5	13,5	125	13,5	<0,5 ^b
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	27	125	6,75	125	27	62,5	27	125	6,75	<4,0 ^b
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	27	-	6,75	-	27	-	13,5	-	6,75	<0,5 ^c
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	13,5	-	3,37	-	27	-	13,5	-	3,37	<0,5 ^c
<i>Salmonella enterica typhimurium</i> ATCC 14028	-	-	3,37	-	-	-	27	-	27	<0,5 ^c

Notas: ^aOxacilina, ^bVancomicina e ^cMeropenem/ - Não apresentou atividade nas concentrações testadas. Fonte: Autoria própria

Bactérias Gram-negativas apresentam um amplo espectro de mecanismos de resistência aos antimicrobianos disponíveis, como produção de enzimas, bombas de efluxo, dentre outros. *Escherichia coli* é um exemplo de bactéria que, atualmente, apresenta resistência aos medicamentos mais utilizados para o tratamento de infecções do trato urinário, que são os antibacterianos da classe das fluoroquinolonas. Em alguns países este tratamento tornou-se ineficaz em mais da metade dos pacientes acometidos, nesse sentido as AgNPs podem se tornar alternativas promissoras (REDGRAVE et al., 2014; RUPPÉ; WOETHER; BARBIER, 2015; WHO, 2018).

Em geral, a AgNPEEt apresentou o melhor resultado antibacteriano, sendo que *P. aeruginosa* e *S. enterica* Typhimurium foram as linhagens mais sensíveis com CIM = 3,37 µgAg/mL, provavelmente as AgNPs interagem melhor com os lipopolissacarídeos das bactérias Gram-negativas do que com os componentes externos das bactérias Gram-positivas (SHRIVASTAVA et al., 2007). A AgNPEEt apresentou o menor tamanho médio dentre as nanopartículas sintetizadas (**Tabela 8**), o que pode ter contribuído para o marcante efeito antibacteriano, tendo em vista que um menor tamanho aumenta a área de superfície e, consequentemente, o contato com os micro-organismos.

Apesar de mostrar boa sensibilidade à AgNPEEt a bactéria Gram-negativa *S. enterica* Typhimurium foi a única estirpe que não apresentou sensibilidade a todas as AgNPs (AgNPEHa e AgNPFAq). A literatura mostra alguns casos de bactérias resistentes à prata, dentre as espécies citadas encontra-se a *S. enterica* Typhimurium, que foi o primeiro caso reportado de resistência à prata mediada pelo gene pMG101. Geralmente, esse tipo de resistência é associado ao habitat da bactéria e normalmente está presente em bactérias ambientais (MC HUGH et al., 1975; DURÁN et al., 2016).

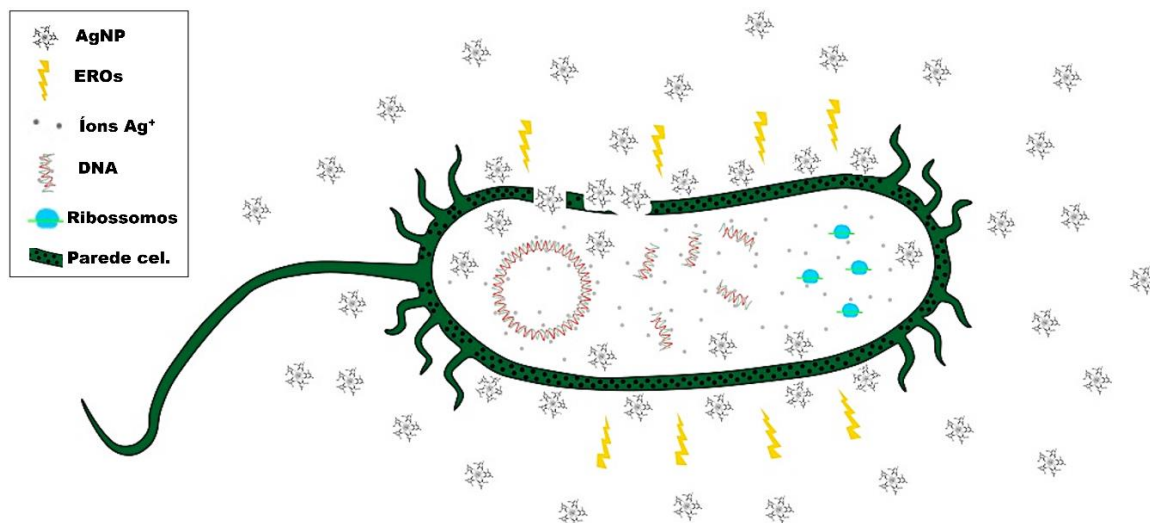
As bactérias do gênero *Staphylococcus* foram susceptíveis às AgNPs testadas, no entanto a *S. aureus* (MRSA) resistente à Meticilina/Oxacilina foi menos sensível para a maioria da nanopartículas. A resistência à Meticilina é um fator adicional importante no estabelecimento das infecções causadas por *S. aureus*, e cada vez se torna mais prevalente. Garza-González e Dowzicky (2013) analisaram o perfil de susceptibilidade de 3.126 estirpes de *S. aureus* isoladas de diversos espécimes clínicos de pacientes hospitalizados em países da América Latina no período de 2004 - 2010, destas 1.467 (46,9%) foram identificadas como resistentes à Meticilina. Durante o estudo, 241 linhagens foram coletadas no Brasil, dentre elas 127 (52,7%) eram resistentes à Meticilina.

A resistência aos β -lactâmicos em MRSA é conferida pela aquisição de um elemento genético móvel conhecido como cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*), prevalente no gênero *Staphylococcus*. O SCC*mec* carrega o gene *mecA* que codifica para a expressão de uma proteína modificada de 78 kDa chamada PBP-2A ou PBP-2' (*Protein Binding Penicilin*), que possui afinidade diminuída pelos β -lactâmicos. Assim, a biossíntese da parede celular nas estirpes MRSA continua, ainda que na presença de níveis considerados inibitórios de antibióticos β -lactâmicos (CHAMBERS; DELEO, 2009; SHORE; COLEMAN, 2013; LAWUNG et al., 2014; PATERSON et al., 2014).

As AgNPs, podem funcionar como alternativas ao aumento da resistência bacteriana por atuarem por vários mecanismos de ação, além do aumento da área de superfície, são eles: ruptura da parede celular, aumento da permeabilidade da membrana, quebra da membrana celular e perturbação da síntese proteica, prolongamento da fase de adaptação ou fase *Lag*, na qual ocorre intensa síntese proteica e se dá a preparação para a fase de crescimento exponencial ou fase *Log*. A liberação de íons Ag^+ promove a interação destes íons com o DNA bacteriano, provocando a fragmentação do DNA por intercalação entre as bases e quebra das ligações de hidrogênio que mantêm a dupla fita de DNA unida (FENG et al., 2000; SONDI; SONDI et al., 2004; AHMED et al., 2016; KATSHURI; KATHIRAVAN; RAJENDIRAN, 2017; JUNG et al., 2017; LI et al., 2017).

O tratamento com AgNPs pode levar à formação de poros na membrana bacteriana, aumentando a permeabilidade aos íons Ag^+ liberados das AgNPs, no entanto, a atividade antibacteriana intrínseca não depende apenas disso. Acredita-se que as AgNPs aumentam a quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) no ambiente celular. Além da atividade antibacteriana evidente, as nanopartículas têm uma grande reatividade, portanto menor tendência para induzir resistência microbiana (HWANG et al., 2008; PARK et al., 2009; MOGHADAM et al., 2012). Os mecanismos citados são mostrados na **Figura 36**.

O AgNO_3 também mostrou atividade antibacteriana contra as bactérias testadas, sendo que em alguns casos a atividade foi melhor do que a atividade das AgNPs, como o resultado encontrados por Li et al. (2017) em seus estudos com nanopartículas de prata.

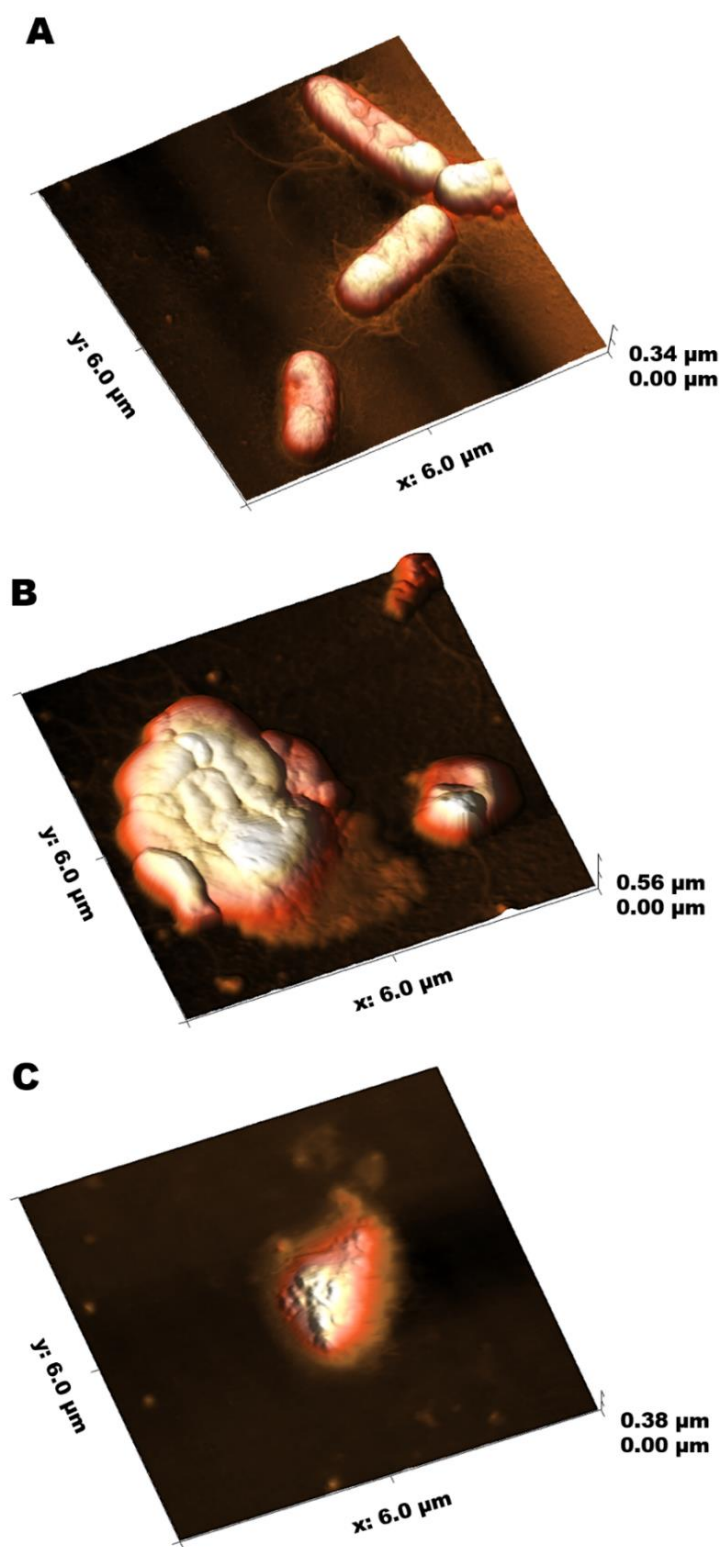
Figura 36. Possíveis mecanismos para a atividade antibacteriana de nanopartículas de prata.

Legenda: As nanopartículas podem causar danos e penetrar na parede celular e na membrana plasmática bacteriana, promover o aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), liberar íons de prata (Ag⁺) que também podem interagir com a parede celular e a membrana plasmática, inibir a replicação por ligação e fragmentação do DNA bacteriano e interromper a síntese protéica. (Modificado de Durán et al. (2016)).

As alterações morfológicas que AgNPEEt promove em *E. coli* ATCC 25922 são mostradas nas imagens realizadas por Microscopia de Força Atômica, na **Figura 37**. A imagem do controle mostrou bactérias características, em forma de bastonete (**Fig. 37 A**), em contraste, após exposição à concentração sub-CIM (1/2 da CIM) de AgNPEEt (3,37 µgAg/mL) durante 24 horas, a imagem revela aumento da rugosidade da superfície celular e diminuição da altura das células, além de endentações na superfície bacteriana. Provavelmente, ocorreu danos na parede celular e na membrana, assim, as células foram deformadas com aparente extravasamento do conteúdo citoplasmático (**Fig. 37 B**).

Após a exposição a 6,75 µgAg/mL de AgNPEEt (concentração igual a CIM) durante 24 h, a morfologia celular mudou de forma irreversível com muitas protuberâncias na superfície. Em resumo, *E. coli* parece estar destruída severamente (**Fig. 37 C**). Estudos revelam que as AgNPs podem desestabilizar a membrana externa, promover o colapso do potencial da membrana plasmática, esgotar os níveis de ATP intracelular e conduzir à formação de poros, culminando na lise celular (LOK et al., 2006; PRIETO; KIAT, 2017).

Figura 37. Imagens de MFA de *Escherichia coli* ATCC 25922.



Legenda: A) *E. coli* não tratada (controle); B) *E. coli* tratada com a concentração sub-CIM (3,37 μgAg/mL) de AgNPEEt e C) *E. coli* tratada com a concentração igual a CIM da AgNPEEt (6,75 μgAg/mL).

Para explorar melhor o potencial antimicrobiano das AgNPs, elas foram testadas contra fungos patogênicos. O aumento da sobrevivência de pacientes imunocomprometidos, discutido anteriormente, permitiu uma maior incidência de infecções fúngicas, dessa forma, também surge a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. Assim como algumas infecções bacterianas são causadas por micro-organismos resistentes aos antibióticos, alguns fungos já não respondem aos medicamentos antifúngicos que são projetados para matá-los. Este fenômeno emergente, conhecido como resistência antifúngica, é um fator preocupante, principalmente nos casos de infecções invasivas causadas por fungos do gênero *Candida*, um dos principais agentes causadores de infecções na corrente sanguínea. Embora a maioria das resistências antifúngicas ocorra em espécies de *Candida* sp., a resistência em outros tipos de fungos, também é uma questão emergente (ARENDRUP, 2014; MAGILL; EDWARDS; BAMBERG, 2014; SANGLARD, 2016).

Após a realização dos testes, as nanopartículas apresentaram boa atividade antifúngica com CIMs variando de 6,75 a 0,10 µgAg/mL (**Tabela 11**). A levedura *C. krusei*, reconhecido pela resistência intrínseca, foi a estirpe mais sensível à ação das AgNPs, porém é importante observar que os fungos filamentosos utilizados neste estudo são difíceis de tratar e vêm se tornando resistentes aos agentes antifúngicos utilizados na prática clínica (BEDOUT; GOMÉZ; RESTREPO, 1997; VANDEPUTTE et al., 2012; TAMURA et al., 2014).

É relatado na literatura que as nanopartículas de prata têm atividade inibitória contra leveduras do gênero *Candida* sp. alterando o potencial da membrana, formando poros, liberando o conteúdo citoplasmático, semelhante ao mecanismo de ação das AgNPs contra bactérias (KIM et al., 2009). Outro importante mecanismo de ação é o aumento das espécies reativas de oxigênio que se convertem dentro da célula fúngica no oxidante forte $\cdot\text{OH}$ (radicais hidroxila) levando à redução do potencial da membrana mitocondrial e à liberação do citocromo c das mitocôndrias resultando em apoptose (HWANG et al., 2012).

Esta é a primeira vez que nanopartículas de prata foram testadas contra *F. pedrosoi*, agente etiológico da cromoblastomicose (KRZYŚCIAK; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014; CASTRO et al., 2017), no entanto, estudos com outro fungo filamentoso revela que as AgNPs podem interferir no processo de reprodução dos fungos e causar mudanças estruturais em hifas (LAMSAL et al., 2011). Rónavári et al. (2018) mostraram em seu estudo que as nanopartículas de prata podiam reduzir o diâmetro da colônia de *Tricophyton* sp. com 30 µgAg/mL, mas não apresentou o mesmo efeito com 10 µg/mL, enquanto que em nosso estudo a CIM das AgNPs para *T. interdigitale* foi muito menor, variando de 1,69 a 0,21 µgAg/mL.

Tabela 11. Valores de Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) de AgNPs, AgNO₃, extratos, frações e Itraconazol contra fungos testados em µg/mL.

Linhagens fúngicas	AgNP EHa	EHA	AgNP EEt	EEt	AgNP FAq	FAq	AgNP FHa	FHa	AgNO₃	Itraconazol
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	0,21	1,9	0,10	1,9	0,21	3,9	0,21	3,9	0,12	0,12
<i>Tricophyton interdigitale</i> ATCC 75826	0,84	7,8	1,69	3,9	1,69	3,9	0,21	7,8	0,84	0,12
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> ATCC 46428	6,75	31,25	6,75	31,25	6,75	15,62	6,75	31,25	27	0,5

Fonte: Autoria própria

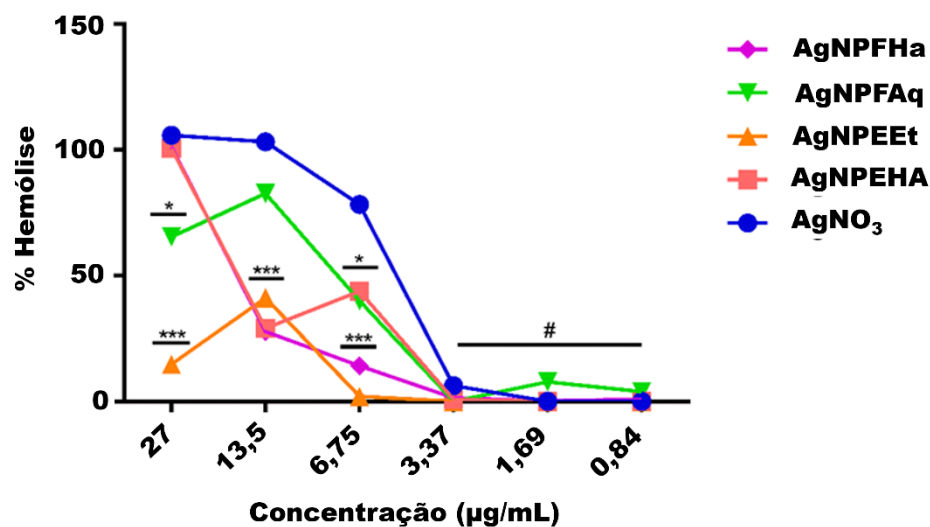
A cromoblastomicose é uma doença fúngica polimórfica definida pela implantação do fungo que leva a uma hiperproliferação do tecido hospedeiro, combinada com a presença de uma fase fúngica patogênica na forma de células muriformes. Esta infecção apresenta-se como uma infecção crônica e granulomatosa da pele e tecido subcutâneo e pode apresentar infecção secundária, responsável pela morbidade dessa doença, juntamente com a incapacidade da parte do corpo afetada ou a transformação das células escamosas em carcinoma (DABOIT et al., 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

Nesse estudo as AgNPs apresentaram um valor de CIM igual a 6,75 µg/mL para *Fonsecaea pedrosoi*, um gênero que é considerado o mais comum no Brasil e tem relacionado as infecções causadas por *Fonsecaea* spp. são mais difíceis de tratar do que outros gêneros. No que diz respeito à cromoblastomicose, que é uma infecção fúngica mais prevalente, a melanina lhes confere um fator de virulência o que os torna mais resistentes do que outros fungos. A terapia é longa e está relacionada a baixas taxas de cura e mesmo a terapia padrão, com itraconazol, para esta micose mostra taxas de cura que variam de 15 a 80% (BONIFAZ; PAREDES-SOLIS; SAUL, 2004; DABOIT et al., 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

Além do potencial biológico, o conhecimento do grau de dano nos glóbulos vermelhos após a exposição a nanopartículas de prata é extremamente necessário, tendo em vista que as AgNPs podem acessar o sistema circulatório por várias rotas (HUANG et al., 2016). No estudo

da atividade hemolítica, os eritrócitos foram expostos a AgNPs (27 a 0,84 $\mu\text{gAg/mL}$) e o resultado pode ser observado na **Figura 38**.

Figura 38. Percentual de hemólise induzida por AgNPs em diferentes concentrações.



Legenda: *** para $p < 0,001$ /* para $p < 0,05$ e # sem significância.

AgNPEEt foi a nanopartícula mais biocompatível entre as AgNPs testadas, apresentou abaixo de 15% de hemólise na maior concentração, seguida de AgNPFAq que apresentou cerca de 65% de hemólise na concentração de 27 $\mu\text{gAg/mL}$, enquanto AgNO₃, AgNPFHa e AgNPEHA promoveram 100% de hemólise nesta mesma concentração. AgNO₃ na concentração de 6,75 $\mu\text{gAg/mL}$ promoveu cerca de 80% de hemólise, ao contrário das AgNPs que apresentaram percentuais $\leq 5\%$, como AgNPEEt e AgNPFAq.

Ruden et al. (2009) obtiveram resultados semelhantes ao comparar a atividade hemolítica de nanopartículas de prata com a do AgNO₃. As substâncias testadas não foram capazes de promover hemólise em concentrações $\leq 3,37$ $\mu\text{gAg/mL}$. É importante enfatizar que AgNPEEt foi ativo contra todas as linhagens de micro-organismos utilizados em concentrações abaixo de 13,5 $\mu\text{gAg/mL}$, portanto, biocompatível nas concentrações efetivas. As outras nanopartículas também mostraram atividade antibacteriana e antifúngica em concentrações não tóxicas.

O efeito hemolítico observado promove a ruptura de eritrócitos e a liberação de seu conteúdo de hemoglobina, alterando a integridade da membrana e as características da superfície. Tais mudanças podem ser induzidas pela liberação de produtos de estresse oxidativo

após a exposição a AgNPs, mas ainda não está claro sobre o mecanismo exato que provoca o dano na membrana dos glóbulos vermelhos (MOCAN, 2013; HUANG et al., 2016).

Após a análise dos resultados obtidos para a síntese verde de nanopartículas de prata, pode-se inferir que o sistema sintetizado tem suas limitações, no entanto foi efetivo para aquilo que foi proposto. Pode-se observar que as nanopartículas não foram muito melhores que os extratos e frações em termos de atividade antibacteriana, mas o fato de ter ampliado o espectro de ação e inibir o crescimento tanto de bactérias Gram-positivas, como de Gram-negativas já traz uma enorme vantagem para aplicação clínica, principalmente quando não se sabe qual micro-organismo está provocando a infecção, além disso também apresenta atividade contra micro-organismos resistentes. Em relação aos fungos estudados, as nanopartículas também foram ativas e podem ser utilizadas em formulações tópicas como adjuvante na terapia de dermatofitoses complicadas.

Além dos aspectos explorados acima, este trabalho traz uma proposta de biomaterial que pode ser otimizado e incorporado em diversas formulações farmacêuticas para aplicação clínica, com algumas vantagens se comparado à prata (Ag^+).

6 CONCLUSÃO

A fração aquosa apresentou potencial antifúngico, principalmente contra leveduras do gênero *Candida* sp., mostrando resultado promissor contra *Candida albicans* resistente a fluconazol.

A fração aquosa também foi capaz de reduzir o edema de pata na terceira hora, com percentual de inibição semelhante à indometacina, assim como a redução dos níveis de MDA, demonstrando potencial anti-inflamatório.

No modelo de células microgлияis, a fração aquosa inibiu o aumento de NF-κB após indução por LPS, indicando um possível efeito protetor contra neuroinflamação.

A fração aquosa apresentou excelente capacidade antioxidante.

O constituinte majoritário da fração aquosa foi identificado como um derivado do ácido elágico, eschweilenol C.

Estudos teóricos do eschweilenol C apontaram similaridades químicas e estruturais com indometacina, além de demonstrar o potencial antioxidante dessa molécula.

Os extratos e as frações da casca do caule de *T. fagifolia* foram efetivos na síntese verde de nanopartículas de prata com atividade antioxidante e alto teor de compostos fenólicos.

As AgNPs apresentaram boa atividade antibacteriana e antifúngica contra as linhagens testadas, vale ressaltar que foi o primeiro relato de atividade de nanopartículas de prata contra *Fonsecaea pedrosoi*, agente etiológico da cromoblastomicose (doença endêmica em algumas regiões do Brasil).

As AgNPs também apresentaram baixa atividade hemolítica, em relação ao AgNO₃, e podem ser alternativas promissoras para aplicações biomédicas.

7 PERSPECTIVAS

- Isolar maiores quantidades das substâncias majoritárias da Fração Aquosa por meio de CLAE.
- Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica do Eschweilenol C e estudar os respectivos mecanismos de ação.
- Testar os constituintes isolados quanto à sua atividade citotóxica e estudar os mecanismos de ação envolvidos.
- Otimizar a síntese verde das AgNPs e realizar o teste de viabilidade celular.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-AZIZ, M. S. et al. Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles biosynthesized using *Chenopodium murale* leaf extract. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 4, p. 356-363, 2014.
- ADOVASIO, J. M.; FRY, G. F. Prehistoric psychotropic drug use in northeastern Mexico and Trans-Pecos Texas. **Economic Botany**. v. 30, p. 94-96, 1976.
- AHMED, S. et al. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. **Journal of Advanced Research**. v. 7, p. 17–28, 2016.
- AHMED, S.; IKRAM, S. Silver nanoparticles: one pot green synthesis using *Terminalia arjuna* extract for biological application. **J Nanomed Nanotechnol**, v. 6, n. 4, p. 309, 2015.
- AJLAN, A. Medicinal plants: a review, **Nat. Prod. Indian J.**, v.12, 2016.
- ALMEIDA, S. P. et al. Cerrado: espécies vegetais úteis. EMBRAPA-CPAC: Planaltina, Distrito Federal, 1998.
- AL-RIMAWI, F. et al. Analysis of phenolic and flavonoids of wild *Ephedra alata* plant extracts by LC/PDA and LC/MS and their antioxidant activity. **African Journal of Traditional, Complementary and alternative medicines**, v. 14, n. 2, p. 130-141, 2017.
- ALTINCICEK, B. et al. Host-derived extracellular nucleic acids enhance innate immune responses, induce coagulation, and prolong survival upon infection in insects. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 4, p. 2705-2712, 2008.
- AMIN, R.; HWANG, S.; PARK, S. H. Nanobiotechnology: An interface between nanotechnology and biotechnology. **Nano**, v. 6, n. 02, p. 101-111, 2011.
- ANEJA, K. R.; SHARMA, C.; JOSHI, R. Antimicrobial activity of *Terminalia arjuna* Wight & Arn.: An ethnomedicinal plant against pathogens causing ear infection. **Braz J Otorhinolaryngol**. v. 78, p. 68-74, 2012.
- ANKAMWAR, B. Biosynthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Terminalia catappa*. **NSNTAIJ**. v. 5, 2011.
- ANSARI, M. S.; MISRA, N. Miraculous Role of Salycilic Acid in Plant and Animal System. **American Journal of Plant Physiology**. v. 2, p. 51-58, 2007.
- ANURADHA, G.; SUNDAR, B. S.; RAMANA, M. V. *Ocimum americanum* L. leaf extract mediated synthesis of silver nanoparticles: A novel approach towards weed utilisation. **Archives of Applied Science Research**, v. 6, n. 3, p. 59, 2014.
- ARAGÃO, A. P. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using the seaweed *Gracilaria birdiae* and their antibacterial activity. **Arabian Journal of Chemistry**. p. 1-7, 2016.
- ARAÚJO, A. R. et al. Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Terminalia fagifolia* Mart. extract and fractions. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v. 14, p. 25-34, 2015.

ARENDRUP, M. C. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. **Clinical microbiology and infection**. v. 20, p. 42-48, 2014.

ASAMI, Y. et al. Isolation and Synthesis of a New Bioactive Ellagic Acid Derivative from *Combretum yunnanensis*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 5, p. 729-731, 2003.

AWAAD, A. S.; AL-JABER, N. A. Antioxidant natural plant. **RPMP Ethnomedicine Source & Mech.**, v.27, p.1-35, 2010.

AYRES, M. C. C. et al. Constituintes Químicos e Atividade Antioxidante de Extratos das Folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. **Química Nova**. v. 32, n. 6, p. 1509-1512, 2009.

AZIZ, W. J.; JASSIM, H. A. Green Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Ag Nanoparticles Using Mint Extract. **American Journal of Nanosciences**, v. 4, n. 2, p. 21-25, 2018.

BACCI, M. R. et al. Quality of life on hemodialysis and inflammation: a descriptive analysis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, n. 6, 2018.

BADIEE, P.; HASHEMIZADEH, Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. **The Indian journal of medical research**, v. 139, n. 2, p. 195, 2014.

BAG, A. et al. Anti-inflammatory, anti-lipid peroxidative, antioxidant and membrane stabilizing activities of hydroalcoholic extract of *Terminalia chebula* fruits. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 12, p. 1515-1520, 2013.

BARROSO, M. F. et al. Total antioxidant capacity of plant infusions: assessment using electrochemical DNA-based biosensor and spectrophotometric methods. **Food Control**, v. 68, p. 153-161, 2016.

BATAGIN-NETO, A. et al. Modelling polymers with side chains: MEH-PPV and P3HT. **Molecular Simulation**. 39, 309-321, 2013.

BEDOUT, C.; GOMEZ, B. L.; RESTREPO, A. In vitro susceptibility testing of *Fonsecaea pedrosoi* to antifungals. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, n. 3, p. 145-148, 1997.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal Biochem**. v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BERKOW, E. L.; LOCKHART, S. R. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. **Infection and drug resistance**, v. 10, p. 237, 2017.

BERNATOVA, I. Biological activities of (-)-epicatechin and (-)-epicatechin-containing foods: Focus on cardiovascular and neuropsychological health. **Biotechnol Adv**. v. 36, n. 3, p. 666-681, 2018.

BHATIA, H. et al. Ethnomedicinal plants used by the villagers of district Udhampur, J&K, India. **Journal of Ethnopharmacology**. v.151, p.1005–1018, 2014.

- BOEING, H. et al. Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. **Eur J Nutr.** v. 51, p. 637–663, 2012.
- BOGNAN, A. J. A. A. et al. Antifungal activity of *Terminalia mantaly* on the in vitro growth of *Cryptococcus neoformans*. **International Journal of Biochemistry Research & Review**, v. 3, n. 1, p. 63, 2013.
- BOLZANI, V. S. et al. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal Chemistry. **Pure Appl. Chem.**, v. 84, p. 1837–1846, 2012.
- BONADONNA, G. et al. Clinical relevance of different sequencing of doxorubicin and cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in operable breast cancer. **Journal of clinical oncology**, v. 22, n. 9, p. 1614-1620, 2004
- BONIFAZ, A.; PAREDES-SOLIS, V.; SAUL, A. Treating chromoblastomycosis with systemic antifungals. **Expert Opin Pharmacol.** v. 5, p. 247-254, 2004.
- BRASIL. **Plantas medicinais de interesse ao SUS – RENISUS**. Ministério da Saúde - Portal da saúde, Brasília, 2009. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/acoes-e-programas/progrma-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-ppnmpf/politica-e-programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos/plantas-medicinais-de-interesse-ao-sus-renisus>. Acesso em: 24 de fevereiro de 2018.
- BRONZE-UHLE, E. S. et al. Poly [1, 1'-bis (ethynyl)-4, 4'-biphenyl (bis-tributylphosphine) Pt (II)] solutions used as low dose ionizing radiation dosimeter. **Applied Physics Letters**, v. 102, n. 24, p. 241917, 2013.
- CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Antiinflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor κ B (NF- κ B). **Planta Medica**. v. 69, n 11, p. 973–983, 2003.
- CANNELL, R. J. P. Natural Products Isolation. **Human Press Inc.** p. 165-208, 1998.
- CARVALHO, E. F. et al. *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. elicits vasorelaxation of rat thoracic aorta through nitric oxide and K⁺ channels dependent mechanism. **Biology open**, v. 8, n. 2, p. bio035238, 2019.
- CASTRO, R. J. A. et al. The Major chromoblastomycosis etiologic agent *Fonsecaea pedrosoi* activates the nlrP3 inflammasome. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1572, 2017.
- CESARINO, I. et al. Electrochemical oxidation of sulfamethazine on a glassy carbon electrode modified with graphene and gold nanoparticles. **Electrochimica Acta**, v. 192, p. 8-14, 2016.
- CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era. **Nature Reviews Microbiology**. v. 7, p. 629-641, 2009
- CHANDA, S.; MENPARA, D.; DESAI, D. Antimicrobial activity of *Terminalia bellerica* leaf and stem collected from two different sites. **Am. J. Phytomed. Clin. Ther.** v. 1, p. 721–733, 2013.

CHAUHAN, P. et al. Evaluation of toxicity studies and anti-inflammatory activity of *Terminalia Bellerica* in carrageenan-induced paw edema in experimental rats. **J Nat Sc Biol Med.** v. 9, p. 169-74, 2018.

CHEN, P-S.; LI, J-H. Chemopreventive effect of punicalagin, a novel tannin component isolated from *Terminalia catappa*, on H-ras-transformed NIH3T3 cells. **Toxicology Letters.** v. 163, p. 44-53, 2006.

CHEN, M. et al., Antimicrobial activity and the mechanism of silver nanoparticle thermosensitive gel. **Int. J. Nanomedicine.** v. 6, p. 2873–2877, 2011.

CHENG, H. Y.; LIN, C. C.; LIN, T. C. Antiherpes simplex virus type 2 activity of casuarinin from the bark of *Terminalia arjuna* Linn. **Antiviral Res.** v. 55, p. 447-455, 2002.

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Test of Yeasts.** Approved standard M27–A3. Wayne, Pa, 2008.

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Test of Filamentous Fungi.** Approved standard M38–A2. Wayne, Pa, 2008.

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically.** Approved standard M07–A10. Wayne, Pa, 2015.

COCK, I. E. The medicinal properties and phytochemistry of plants of the genus *Terminalia* (Combretaceae). **Inflammopharmacology.** v. 23, p. 203-229, 2015.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev. Virtual Quim.** v. 2, p. 47-58, 2010.

CUNDARI, Thomas R. **Computational organometallic chemistry.** CRC Press, 2001.

DAVALLI, P. et al. ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. **Oxid Med Cell Longev.**, 1-18, 2016.

DABOIT, T. C. et al. In vitro susceptibility of chromoblastomycosis agents to five antifungal drugs and to the combination of terbinafine and amphotericin B. **Mycosis.** v. 57, p. 116-120, 2014.

DAYEM, A. A. et al. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. **Int. J. Mol. Sci.** v. 18, p. 1-21, 2017.

DEEPAK, V. et al. Synthesis of gold and silver nanoparticles using purified URAK. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,** v. 86, n. 2, p. 353-358, 2011.

DELALOYE, J.; CALANDRA, T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. **Virulence.** v. 5, n. 1, p. 161–169, 2014.

- DE-LA-TORRE, J. et al. Oral *Candida* colonization in patients with chronic periodontitis. Is there any relationship?. **Rev Iberoam Micol.** v. 35, n. 3, p. 134–139, 2018.
- DESBOIS, A. P.; COOTE, P. J. Utility of greater wax moth larva (*Galleria mellonella*) for evaluating the toxicity and efficacy of new antimicrobial agents. **Adv Appl Microbiol.** v. 78, p. 25–53, 2012.
- DÉSIRÉ, D. P. P. et al. Antidiabetic activity of *Terminalia superba* (Combretaceae) stem bark extract in streptozotocin induced diabetes in rats. **Br. J. Pharm. Res.** v. 4, p. 1300–1310, 2014.
- DEVADIGA, A.; SHETTY, V.; SAIDUTTA, K. M. B. Highly stable silver nanoparticles synthesized using *Terminalia catappa* leaves a antibacterial agent and colorimetric mercury sensor. **Materials Letters.** v. 207, p. 66-71, 2015.
- DONG, J. E. et al. Effects of growing location on the contents of secondary metabolites in the leaves of four selected superior clones of *Eucommia ulmoides*. **Ind. Crop Prod.** 34, 1607–1614, 2011.
- DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotechnology: Introduction, preparation and characterization of nanomaterials and application examples.** 2006.
- DURÁN, N. et al. Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles Produced by Fungal Process on Textile Fabrics and Their Effluent Treatment. **Journal of Biomedical Nanotechnology.** v. 3, p. 203–208, 2007.
- DURÁN, N. et al. Potential Use of Silver Nanoparticles on Pathogenic Bacteria, their Toxicity and Possible Mechanisms of Action. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 21, p. 949-959, 2010.
- DURÁN, N. et al. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.** v. 12, p. 789–799, 2016.
- DREXLER K. E. "Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** v. 78, p. 5275-5278, 1981.
- DHUPER, S.; PANDA, D.; NAYAK, P. L. Green synthesis and characterization of zero valent iron nanoparticles from the leaf extract of *Mangifera indica*. **Nano Trends: J Nanotech App.** v. 13, p.16–22, 2012.
- DUBEY, S. P. et al. Bioprospective of *Sorbus aucuparia* leaf extract in development of silver and gold nanocolloids, **Colloids Surf. B: Biointerfaces.** v. 80, p. 26–33, 2010.
- DWIVEDI, R. Green synthesis of Silver Nanoparticle using *Terminalia chebula* and Assessment of its Antimicrobial Activity. **International Journal of Pure & Applied Bioscience.** v. 1, p. 1-6, 2013.
- EATON, P. et al. A direct comparison of experimental methods to measure dimensions of synthetic nanoparticles. **Ultramicroscopy,** v. 182, p. 179-190, 2017.
- EDISON, T. N. J. I.; LEE, Y. R.; SETHURAMAN, M. G. Green synthesis of silver nanoparticles using *Terminalia cuneata* and its catalytic action in reduction of direct yellow-12

dye. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 161, p. 122-129, 2016.

EDISON, T. J. I.; SETHURAMAN, M. G. Instant green synthesis of silver nanoparticles using *Terminalia chebula* fruit extract and evaluation of their catalytic activity on reduction of methylene blue. **Process Biochemistry**. v. 47, p. 1351–1357, 2012.

EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Frontiers in Pharmacology**. v. 4, p. 1-10, 2014.

ELOFF J. N.; KATERERE D. R.; MCGAW L. J. The biological activity and chemistry of the southern African Combretaceae. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 119, p. 686–699, 2008.

EL-HOUSSAINI, H. H. et al. Correlation between antifungal resistance and virulence factors in *Candida albicans* recovered from vaginal specimens. **Microb Pathogenesis**. v. 128, p. 13-19, 2019.

EL-RAFIE, H. M.; HAMED, M. A.-A. Antioxidant and anti-inflammatory activities of silver nanoparticles biosynthesized from aqueous leaves extracts of four *Terminalia* species. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 5, n. 3, p. 035008, 2014.

ERKAN, N. Antioxidant activity and phenolic compounds of fractions from *Portulaca oleracea* L. **Food Chem.**, v. 133, p. 775–781, 2012

EXELL, A. W.; STACE, C. A. Revision of the Combretaceae. **Boletim da Sociedade Broteriana**. v.40, p. 5–26, 1966.

FAHMY, N. M.; AL-SAYED, E.; SINGAB, A. N. Genus *Terminalia*: A phytochemical and Biological Review. **Medicinal & Aromatic Plants**. v. 4, p. 1-21, 2015.

FALK, E. F. et al. Clinical characteristics of doxorubicin-associated alopecia in 28 dogs. **Veterinary dermatology**, v. 28, n. 2, p. 207-e48, 2017.

FANFAIR D.; DESAI S.; KELTY C. The Early History of Nanotechnology. **Creative Commons**. p. 1-15, 2007.

FARIAS, K. S. et al. Antioxidant properties of species from the Brazilian cerrado by different assays. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 15, n. 4, p. 520-528, 2013.

FERNANDES, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (–)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**. v. 569, p. 228–236, 2007.

FISHMAN, J. A. Opportunistic Infections—Coming to the Limits of Immunosuppression?. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 10, p. a015669, 2013.

FREESTONE, I. et al. The Lycurgus Cup - A Roman nanotechnology. **Gold Bulletin**. v. 40, p. 270-277, ISSN 0017-1557, 2007.

FRISCH, M. J. T. G. W. **Gaussian 03, Revision D.02, Version**. Gaussian, Inc., Wallingford, 2004.

FYHRQUIST, P. Traditional medicinal uses and biological activities of some plant extract of African *Combretum* Loefl., *Terminalia* L. and *Pteleopsis* ENGL. Species (Combretaceae). **Tese de Doutorado**. Universidade de Helsinki, Finlandia. 2007.

FYHRQUIST, P. et al. Antifungal activity of selected species of *Terminalia*, *Pteleopsis* and *Combretum* (Combretaceae) collected in Tanzania. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, n. 4-5, p. 308-317, 2004.

FYHRQUIST, P. et al. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzania. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 79, p. 169–177, 2002.

GALLO, Jiri et al. Inflammation and its resolution and the musculoskeletal system. **Journal of orthopaedic translation**, v. 10, p. 52-67, 2017.

GARCEZ, F. R. et al. Bioactive Flavonoids and Triterpenes from *Terminalia fagifolia* (Combretaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**. vol. 17, n. 7, p. 1223-1228, 2006.

GARCEZ, F. R. et al. Chemical Constituents from *Terminalia glabrescens*. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 14, p. 461-465, 2003.

GARCEZ, F. R. et al. Triterpenoids, lignan and flavans from *Terminalia argentea* (Combretaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 31, p. 229–232, 2003b.

GARZA-GONZÁLEZ, E.; DOWZICKY, M. J. Changes in *Staphylococcus aureus* susceptibility across Latin America between 2004 and 2010. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 17, p. 13-19, 2013.

GELAIN, D. P. et al. Antioxidant Therapies for Neurodegenerative Diseases: Mechanisms, Current Trends, and Perspectives. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. p. 1-2, 2012.

GIÃO, M. S. et al. Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 14, p. 2638-2647, 2007.

GLASS, C. K. et al. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 918-934, 2010.

GLAVIS-BLOOM, J.; MUHAMMED, M.; MYLONAKIS, E. Of model hosts and man: using *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella* as model hosts for infectious disease research. **Recent Advances on Model Hosts**. p. 11-17, 2012.

GLUNDLAPALLI, A. V. et al. Perspectives and concerns regarding antimicrobial agent shortages among infectious disease specialists. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 75, p. 256-259, 2013.

GONÇALVES, S. et al. Psd1 Effects on *Candida albicans* Planktonic Cells and Biofilms. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** v. 7, p. 249, 2017.

GOVINDARAJU, K.; TAMILSELVAN, S. Silver nanoparticles by *Solanum torvum* and their promising antimicrobial activity. **J Biopest.** v. 3, p. 394-399, 2010.

GRIFFIN, S. et al. Natural Nanoparticles: A Particular Matter Inspired by Nature. **Antioxidants.** v. 7, n. 1, 2018.

GROSSMAN, N. T., CASADEVALL, A. Physiological Differences in *Cryptococcus neoformans* Strains In Vitro versus In Vivo and Their Effects on Antifungal Susceptibility. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 61, p. e2108-2116, 2017.

GU, W. et al. In vivo activity of fluconazole/tetracycline combinations in *Galleria mellonella* with resistant *Candida albicans* infection. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 13, p. 74-80, 2018.

GUERRIERO, G. et al. Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists. **Genes.** v. 9, 309, 2018.

GUOA, P. et al. Simultaneous determination of linarin, naringenin and formononetin in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study after oral administration of Bushen Guchi Pill. **Biomed. Chromatogr.** v. 29, p. 246–253, 2015.

GUPTA, P.C. Biological and pharmacological properties of *Terminalia chebula* Retz. (Haritaki) - An overview. **Int. J. Pharm. Sci.** 4, 62–68, 2012.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. **Ann Epidemiol.** v.15, p. 686–699, 2005.

HANDA, S. S. et al. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. **International centre for science and high technology.** p. 21-25, 2008.

HANWELL, Marcus D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, 2012.

HASSAN, B. A. R. Medicinal plants (importance and uses). **Pharm. Anal. Acta.** 2013.

HEBBANI, A. V.; REDDY, V. D.; NALLANCHAKRAVARTHULA, V. In vitro anti-hemolytic activity of *Terminalia arjuna* (Roxb.) Wt. and Arn. bark powder aqueous extract. **Indian J. Adv. Chem. Sci.** v. 3, p. 102-108, 2014.

HEINISCH, J. J. et al. Atomic force microscopy—looking at mechanosensors on the cell surface. **J Cell Sci.** v. 125, n. 18, p. 4189-4195, 2012.

HIRSHFELD, F. L. Bonded-atom fragments for describing molecular charge densities. **Theoretica chimica acta**, v. 44, n. 2, p. 129-138, 1977.

- HONG-ZHUO, S. H. I. et al. Two natural molecules preferentially inhibit azole-resistant *Candida albicans* with MDR1 hyperactivation. **Chinese journal of natural medicines**, v. 17, n. 3, p. 209-217, 2019.
- HUANG, D. et al. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 7, p. 1815-1821, 2002.
- HUANG, H. et al. An evaluation of blood compatibility of silver nanoparticles. **Scientific reports**, v. 6, p. 25518, 2016.
- HWANG, I.-S. et al. Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals. **The FEBS journal**, v. 279, n. 7, p. 1327-1338, 2012.
- IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**. p. 1821- 1835, 2011.
- IGNASIAK, K.; MAXWELL, A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. **BMC Res Notes**. v. 10, p. 428-436, 2017.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer. **Câncer**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>. Acesso em: 06 de Jan. 2018.
- INGALE, A. G.; CHAUDHARI, A. N. Biogenic Synthesis of Nanoparticles and Potential Applications: An Eco-Friendly Approach. **J Nanomed Nanotechol**. v. 4, p. 1-7, 2013.
- JAIN, S.; CHOUDHARY, G. P.; JAIN, D. K. Medicinal plants with potential anti-fertility activity: A review. **International Journal of Green Pharmacy**. v. 9, p. 223-228, 2015.
- JANABI, N. et al. Establishment of human microglial cell lines after transfection of primary cultures of embryonic microglial cells with the SV40 large T antigen. **Neurosci Lett**. v. 195, n. 2, p. 105-108, 1995.
- JAMI, M. S. I. et al. Evaluation of Analgesic and Anti-Inflammatory Activities on ethanolic extract of *Terminalia chebula* fruits in experimental animal models. **A J Plant Sci**. v. 5, p. 63-69, 2014.
- KABOUCHI, B. et al. Theoretical and experimental investigations of structural and electronic properties of 1-Benzyl-3-methyl-quinoxalin-2 (1H)-one molecule. **J. Mater. Environ. Sci**, v. 8, p. 4657-4662, 2017.
- KALISHWARALAL, K. et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei*. **Colloids Surf B: Biointerfaces**. v. 77, p. 257-262, 2010.
- KALTSCHMIDT, B.; KALTSCHMIDT, C. NF-kappaB in the nervous system. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 1, p. a00127, 2009.

KAUR, K. et al. Antimutagenic activities of acetone and methanol fractions of *Terminalia arjuna*. **Food Chem. Toxicol.** v. 40, p. 1745-1482, 2002.

KAZEMIPOOR, M. et al. Safety, efficacy and metabolism of traditional medicinal plants in the management of obesity: a review. **Int J Chem Eng Appl.** v. 3, p. 288-92, 2012.

KHASNAVIS, S. et al. Suppression of nuclear factor- κ B activation and inflammation in microglia by physically modified saline. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 35, p. 29529-29542, 2012.

KHEDIR, B. S. et al. In vivo evaluation of the anti-inflammatory effect of pistacia lentiscus fruit oil and its effects on oxidative stress. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

KIM, K.-J. et al. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. **Biometals**, v. 22, n. 2, p. 235-242, 2009.

KIM, M.-S. et al. Anti-cholinesterase activities of hydrolysable tannins and polyhydroxytriterpenoid derivatives from *Terminalia chebula* Retz. **Fruit Rec Nat Prod**, v. 12, n. 3, p. 284-9, 2018.

KOBASHIGAWA, J. M. et al. Influence of strong bases on the synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using the ligninolytic fungi *Trametes trogii*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2018.

KOKSAL, F.; YASAR, H.; SAMASTI, M. Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. **Microbiological Research**. v. 164, p. 404-410, 2009.

KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. **Physical review**, v. 140, n. 4A, p. A1133, 1965.

KOTA, K.; SHARMA, S.; TAHASHILDAR, J. A scientific validation of In vitro anti-inflammatory activity of *Punica granatum* L. by human red blood cell membrane stabilization. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 6, n. 7, p. 2430, 2018.

KULKARNI, N.; MUDDAPUR, U. Biosynthesis of metal nanoparticles: a review. **J Nanotechnol.** p. 1-8, 2014.

KUMAR, K. M. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Terminalia chebula* extract at room temperature and their antimicrobial studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 91, p. 228-233, 2012.

KUSPRADINI, H. et al. Investigating glucosyltransferase inhibitory activities of polyphenols from kapur (*Dryobalanops* sp.) heartwood extracts. **Journal of Natural Medicines**, v. 61, n. 4, p. 462, 2007.

LAMSAL, K. et al. Application of silver nanoparticles for the control of *Colletotrichum* species in vitro and pepper anthracnose disease in field. **Mycobiology**, v. 39, n. 3, p. 194-199, 2011.

- LAWUNG, G. et al. Revelation of staphylococcal cassette chromosome mec types in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Thailand and Vietnam. **Journal of Microbiological Methods**. v. 107, p. 8-12, 2014.
- LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical review B**, v. 37, n. 2, p. 785, 1988.
- LEE, M. T. et al. Antioxidant capacity of phytochemicals and their potential effects on oxidative status in animals—A review. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 30, n. 3, p. 299, 2017.
- LEWARS, E. G. **Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics**. 2nd ed.. ed. [S.l.]: Springer, 2010.
- LI, X.-C. et al. NMR assignments of ellagic acid derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 37, n. 11, p. 856-859, 1999.
- LI, Y. et al. Synergistic activity of chloroquine with fluconazole against fluconazole-resistant isolates of candida species. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 1365-1369, 2015.
- LIMA, G. R. M. et al. Bioactivities of the genus *Combretum* (Combretaceae): a review. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 9142-9206, 2012.
- LINGAPPAN, K. NF- κ B in oxidative stress. **Current opinion in toxicology**, v. 7, p. 81-86, 2018.
- LOK, C.-N. et al. Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver Nanoparticles. **Journal of Proteome Research**. v. 5, p. 916-924, 2006.
- LUO, F. et al. Quantification and Purification of Mangiferin from Chinese Mango (*Mangifera indica* L.) Cultivars and Its Protective Effect on Human Umbilical Vein Endothelial Cells under H₂O₂-Induced Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 11260-11274, 2012.
- MACCUSPIE, R.I. Colloidal stability of silver nanoparticles in biologically relevant conditions. **J. Nanopart. Res.**, v. 13, p. 2893–2908, 2011.
- MACHADO-GONÇALVES, L. et al. Effects of *Terminalia catappa* Linn. Extract on *Candida albicans* biofilms developed on denture acrylic resin discs. **J Clin Exp Dent**. v. 10, n. 7, e642-647, 2018.
- MAGILL, S. S. et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. **The New England journal of medicine**. v. 370, p. 1198- 2008, 2014.
- MALAIRAJAN, P. et al. Analgesic activity of some Indian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 106, p. 425–428, 2006.

MALEKZADEH, F. et al. Antibacterial activity of black myrobalan (*Terminalia chebula* Retz) against *Helicobacter pylori*. **Int J Antimicrob Agents**. v. 18, p. 85-88, 2001.

MANDAL, S. et al. Analysis of phytochemical profile of *Terminalia arjuna* bark extract with antioxidative and antimicrobial properties. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 3, p. 960-966, 2013.

MANKE, A.; WANG, L.; ROJANASAKUL, Y. Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. **BioMed Research International**. p. 1-15, 2013.

MARANI, M. M. et al. Thaulin-1: The first antimicrobial peptide isolated from the skin of a Patagonian frog *Pleurodema thaul* (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae) with activity against *Escherichia coli*. **Gene**. v. 20, p. 70-80, 2016.

MARTÍNEZ, A. et al. Donator Acceptor Map for Carotenoids, Melatonin and Vitamins. **J. Phys. Chem. A**. v. 112, p. 9037-9042, 2008.

MARTINS, L. M. et al. Improved synthesis of tetraaryl-1, 4-dihydropyrrolo [3, 2-b] pyrroles a promising dye for organic electronic devices: An experimental and theoretical approach. **Dyes and Pigments**, v. 148, p. 81-90, 2018.

MASOKO, P.; PICARD, J.; ELOFF, J. N. Antifungal activities of six South African *Terminalia* species (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 99, p. 301-308, 2005.

MATOS, R. F. et al. Nimesulide inhibits pathogenic fungi: PGE2-dependent mechanisms. **Folia Microbiol**. p. 1-6, 2016.

MAZU, K. T. et al. The mechanistic targets of antifungal agents: an overview. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 16, n. 7, p. 555-578, 2016.

MCHUGH, G. L. et al. *Salmonella typhimurium* resistant to silver nitrate, chloramphenicol, and ampicillin. **Lancet**. v. 1, p. 235-240, 1975.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**. v. 454, p. 428-35, 2008.

MEEK, I. L.; VAN DE LAAR, M. A. F. J.; E VONKEMAN, H. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: an overview of cardiovascular risks. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 7, p. 2146-2162, 2010.

MELO, J. T. et al. Avaliação dos níveis de contaminação microbiológica ambiental das diversas áreas de produção do Laboratório de Fitoterápicos do Programa de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Juiz de Fora. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 2, p. 45-50, 2000.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal Biochem**. v. 86, n. 1, p. 271-278, 1978.

MOCAN, T. Hemolysis as expression of nanoparticles-induced cytotoxicity in red blood cells. **BMBN**, v. 1, n. 1, p. 7-12, 2013.

MOHAN, S. et al. Electrochemical behaviour of silver nanoparticle-MWCNTs hybrid nanostructures synthesized via a simple method. **Int. J. Electrochem. Sci.**, v. 11, p. 745- 753, 2016.

MOHANTY, S. et al. An investigation on the antibacterial, cytotoxic, and antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticles. **Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.** v. 8, p. 916–924, 2012.

MOILANEN, L. J. et al. TRPA1 contributes to the acute inflammatory response and mediates carrageenan-induced paw edema in the mouse. **Sci Rep.** v. 2, p. 380, 2012.

MORAN, G. P.; COLEMAN, D. C.; SULLIVAN, D. J. Candida albicans versus Candida dubliniensis: Why Is C. albicans More Pathogenic?. **International Journal of Microbiology**, 2012.

MORGAN, A. M. A. et al. Pentacyclic triterpenes from the stem bark of *Combretum hartmannianum* Schweinf. **Biochemical Systematics and Ecology.** v. 77, p. 48-50, 2018.

MORGAN, M. J.; LIU, Z.-G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. **Cell research**, v. 21, n. 1, p. 103, 2011.

MÜLLER, D. J.; DUFRÊNE, Y. F. Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface. **Trends Cell Biol.** v.21, p. 461-469, 2011.

MULVANEY, P. Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. **Langmuir**, v. 12, n. 3, p. 788-800, 1996.

MURTAZA, G.; MUKHTAR, M.; SARFRAZ, A. A review: Antifungal potentials of medicinal plants. **Journal of Bioresource Management**, v. 2, n. 2, p. 4, 2015.

MWILU, S. K. et al. Changes in silver nanoparticles exposed to human synthetic stomach fluid: effects of particle size and surface chemistry. **Science of the Total Environment**, v. 447, p. 90-98, 2013.

NASROLLAHI, Z. et al. Fluconazole resistance Candida albicans in females with recurrent Vaginitis and Pir1 overexpression. **Jundishapur journal of microbiology**, v. 8, n. 9, 2015

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 871-882, 2010.

NAZZARO, F. et al. Essential oils and antifungal activity. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 4, p. 86, 2017.

NEL, A.; XIA, T.; MADLER, L.; LI, N. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. **Science.** v. 311, p. 622-627, 2006.

NIGAM, P. K. Antifungal drugs and resistance: Current concepts. **Our Dermatology Online**, v. 6, n. 2, p. 212, 2015.

- NUNES, P. H. M. et al. Gastric Antiulcerogenic and Hypokinetic Activities of *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. (Combretaceae). **Biomed Res Int.** p. 1–15, 2014.
- ORCHARD, T. S. et al. Diet Quality, Inflammation, and Quality of Life in Breast Cancer Survivors: A Cross-Sectional Analysis of Pilot Study Data. **J Acad Nutr Diet.** v. 118, n. 4, p. 578-588, 2017.
- O'HARA, M. et al. A Review of 12 Commonly Used. **Arch Fam Med.** v. 7, p. 523-536, 1998.
- OLAR, R. et al. Prospects for new antimicrobials based on N,N-dimethylbiguanide complexes as effective agents on both planktonic and adhered microbial strains. **European Journal of Medicinal Chemistry.** v. 45, p. 2868-2875, 2010.
- PARK, H. J. et al. Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. **Water Research.** v. 43, p. 1027 – 1032, 2009.
- PARK, Y. et al. Polysaccharides and phytochemicals: a natural reservoir for the green synthesis of gold and silver nanoparticles. **IET Nanobiotechnol.** v.5, p. 69-78, 2011.
- PARSONS, J. G.; PERALTA-VIDEA, J. R.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Use of plants in biotechnology: synthesis of metal nanoparticles by inactivated plant tissues, plant extracts, and living plants. **Developments in environmental science,** v. 5, p. 463-485, 2007.
- PARTHUISOT, N.; ROUQUETTE, J.; FERDY, J.-B. A high-throughput technique to quantify pathogens' virulence on the insect model *Galleria mellonella*. **Journal of microbiological methods,** v. 152, p. 69-72, 2018.
- PATERSON, G. K.; HARRISON, E. M.; HOLMES, M. A. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trend in Microbiology.** v. 22, p. 42-47, 2014.
- PATIL, S. P.; KUMBHAR, S. T. Antioxidant, antibacterial and cytotoxic potential of silver nanoparticles synthesized using terpenes rich extract of *Lantana camara* L. leaves. **Biochemistry and biophysics reports,** v. 10, p. 76, 2017.
- PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews.** v. 6, p. 1-6, 2012.
- PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. **Int J Biomed Sci.** vol. 4, p. 89-96, 2008.
- PORTUGAL, C. C. et al. Caveolin-1-mediated internalization of the vitamin C transporter SVCT2 in microglia triggers an inflammatory phenotype. **Sci. Signal.** v. 10, 2017.
- PRIETO, E. I.; KIAT, A. A. The antimicrobial action of silver nanoparticles on *Escherichia coli* as revealed by atomic force microscopy. **Philippine Science Letters.** v. 10, p. 123-129, 2017.

PROFT, F. et al. Atomic charges, dipole moments, and Fukui functions using the Hirshfeld partitioning of the electron density. **Journal of computational chemistry**, v. 23, n. 12, p. 1198-1209, 2002.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Chromoblastomycosis. **Clinical microbiology reviews**. v. 30, 233-276, 2017.

QUELEMES, P. V. et al. Development and antibacterial activity of cashew gum-based silver nanoparticles. **Int. J. Mol. Sci.** v.14, p. 4969–4981, 2013.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Citral reduces nociceptive and inflammatory response in rodents. **Braz. J. Pharmacog.** v. 21, p. 497–502, 2011.

RASHEED, W. et al. Revelation of susceptibility differences due to Hg (II) accumulation in *Streptococcus pyogenes* against CX-AgNPs and Cefixime by atomic force microscopy. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 147, p. 9-16, 2018.

RAHIMI, V. B. et al. Protective effects of hydro-ethanolic extract of *Terminalia chebula* on primary microglia cells and their polarization (M1/M2 balance). **Multiple sclerosis and related disorders**, v. 25, p. 5-13, 2018.

RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **Lancet Infect Dis**. v. 17, n. 8, p. 873-881, 2017.

RAJESHKUMAR, S. et al., Anticancer and enhanced antimicrobial activity of biosynthesized silver nanoparticles against clinical pathogens. **Journal of Molecular Structure**. v. 116, p. 165–173, 2016.

RAMPERSAD, S. N. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. **Sensors**. v. 12, p. 12347-12360, 2012.

RATHINAMOORTHY, R.; THILANGAVATHI, G. *Terminalia chebula*- review on pharmacological and biochemical studies. **Int. J. PharmTech Res**. v. 6, p. 97–116, 2014.

REDDY, D. B. et al. Chebulagic acid, a COX–LOX dual inhibitor isolated from the fruits of *Terminalia chebula* Retz., induces apoptosis in COLO-205 cell line. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 124, p. 506-512, 2009.

REDGRAVE, L. S. et al. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. **Cell Press**. v. 22, n. 8, p. 438-445, 2014.

REPP, K. K.; MENOR, S. A.; PETTIT, R. K. Microplate Alamar blue assay for susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **Med Mycol**. v. 45, n. 7, p. 603–607, 2007.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 31, n. 5, p. 986-1000, 2011.

RICHARDSON, J. P.; MOYES, D. L. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection. **Virulence**, v. 6, n. 4, p. 327-337, 2015.

ROCK, K. L. et al. The sterile inflammatory response. **Annu Rev Immunol.** v. 28, p. 321–342, 2010.

RÓNAVÁRI, A. et al. Biosynthesized silver and gold nanoparticles are potent antimicrobials against opportunistic pathogenic yeasts and dermatophytes. **International journal of nanomedicine**, v. 13, p. 695, 2018.

ROY, N.; BARIK, A. Green Synthesis of Silver Nanoparticles from the Unexploited Weed Resources. **International Journal of Nanotechnology and Applications**, v. 4, n. 2, p. 95–101, 2010.

RUPPÉ, E.; WOERTHER, P.-L.; BARBIER, F. Mechanisms of Antimicrobials Resistance in Gram-negative Bacilli. **Annals of Intensive Care.** v. 5, p. 21-35, 2015.

SAÉNZ, A. T. et al. Use of ORAC to assess antioxidant capacity of human milk. **Journal of Food Composition and Analysis.** v. 22, p. 694–698, 2009.

SAHA, S.; VERMA, R. J. Antioxidant activity of polyphenolic extract of Terminalia chebula Retzius fruits. **Journal of taibah university for science**, v. 10, n. 6, p. 805-812, 2016.

SAHA, S.; ROY, R. K.; AYERS, P. W. Are the Hirshfeld and Mulliken population analysis schemes consistent with chemical intuition?. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 109, n. 9, p. 1790-1806, 2009.

SALEM, J. K. et al. Effect of anionic surfactants on the surface plasmon resonance band of silver nanoparticles: determination of critical micelle concentration. **Journal of Molecular Liquids**, v. 223, p. 771-774, 2016.

SALOPEK, B.; KRASIC, D.; FILIPOVIC, S. Measurement and application of zeta-potential. **Rudarsko-geolosko-naftni zbornik**, v. 4, n. 1, p. 147, 1992.

SANGLARD, D. Emerging Threats in Antifungal- Resistant Fungal Pathogens. **Frontiers in Medicine.** v. 3, p. 1-10, 2016.

SARDI, J. C. et al. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **J Med Microbiol.** 2013 Jan. 62. p. 10-24. 10.1099/jmm.0.045054-0. Epub. Nov 22. 2012.

SASIDHARAN, S. et al. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **Afr J Tradit Complement Altern Med.** v. 8, p. 1-10, 2011.

SASIREKHA. R. et al. Biosynthesis, characterization antibacterial effects of silver nanoparticle by using Carica papaya fruit extract and it's interaction with an anticancer drug (5-fluorouracil). **Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2018.

SATHISHKUMAR, G. et al. Facile biosynthesis of antimicrobial zinc oxide (ZnO) nanoflakes using leaf extract of Couroupita guianensis Aubl. **Materials Letters**, v. 188, p. 383-386, 2017.

- SCORZONI, L. et al. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. *PloS one*, v. 8, n. 3, p. e60047, 2013.
- SCORZONI, L. et al. Antifungal therapy: new advances in the understanding and treatment of mycosis. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 36, 2017.
- SELDERS, G. S. et al. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. **Regen Biomater**. p. 55–68, 2017.
- SHAH, W.; PATIL, U.; SHARMA, A. Green synthesis of silver nanoparticles from stem bark extract of *Terminalia tomentosa* Roxb. (Wight & Arn.). **Scholars Research Library**. v. 6, p. 197-202, 2014.
- SHARMA, D.; KANCHI, S.; BISETTY, K. Biogenic synthesis of nanoparticles: A review. **Arabian Journal of Chemistry**. p. 1-21, 2015.
- SHAY, J. et al. Molecular Mechanisms and Therapeutic Effects of (–)-Epicatechin and Other Polyphenols in Cancer, Inflammation, Diabetes, and Neurodegeneration. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 1-13, 2015.
- SHCHERBAKOVA, D. M. et al. Bright monomeric near-infrared fluorescent proteins as tags and biosensors for multiscale imaging. **Nat Commun**. v. 19, n. 7, p. 12405, 2016.
- SHIH, R.-H.; WANG, C.-Y.; YANG, C.-M. NF-kappaB signaling pathways in neurological inflammation: a mini review. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 8, p. 77, 2015.
- SHORE, A. C.; COLEMAN, D. C. Staphylococcal cassette chromosome *mec*: Recent advances and new insights. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 303, p. 350-359, 2013.
- SHRIVASTAVA, S. et al. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 18, p. 1-9, 2007.
- SHUPING, D. S. S.; ELOFF, J. N. The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: A review. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v. 14, n. 4, p. 120, 2017.
- SINGH, N.; RAJINI, P. S. Antioxidant-mediated protective effect of potato peel extract in erythrocytes against oxidative damage. **Chemico-Biological Interactions**, v. 173, n. 2, p. 97-104, 2008.
- SITAPHA, O. et al. Antifungal activities of *Terminalia ivorensis* A. Chev. bark extracts against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **J Intercult Ethnopharmacol**. v. 2, n. 1, p. 49-52, 2013.
- SOARES-NETO, R. L.; CORDEIRO, L. S.; LOIOLA, M. I. B. Flora of Ceará, Brazil: Combretaceae. **Rodriguésia**, v. 65, n. 3, p. 685-700, 2014.

SOCODATO, R. et al. c-Src deactivation by the polyphenol 3-O-caffeoylquinic acid abrogates reactive oxygen species-mediated glutamate release from microglia and neuronal excitotoxicity. **Free Radic Biol Med.** v. 79, p. 45-55, 2015.

SOCODATO, R. et al. Dopamine promotes NMDA receptor hypofunction in the retina through D1 receptor-mediated Csk activation, Src inhibition and decrease of GluN2B phosphorylation. **Sci. Rep.** v. 7, 40912, 2017.

SOCODATO, R. et al. Redox tuning of Ca²⁺ signaling in microglia drives glutamate release during hypoxia. **Free Radic Biol Med.** v. 118, p. 137-149, 2018.

SOLLEIRO-VILLAVICENCIO, S.; RIVAS-ARANCIBIA, S. Effect of Chronic Oxidative Stress on Neuroinflammatory Response Mediated by CD4⁺T Cells in Neurodegenerative Diseases. **Front Cell Neurosci.** v. 12, p. 114, 2018.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova.** v. 30, p. 351-355, 2007.

SUGANTHI, M. et. al. Pathogenesis and clinical significance of dermatophytes: A comprehensive review. **Innovations in Pharmaceuticals and Pharmacotherapy.** Vol 4 (1), 62-70, 2017.

SUNA, Q. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using tea leaf extract and evaluation of their stability and antibacterial activity. **Colloid Surf A: Physicochem Eng Aspects.** v. 444, p. 226–231, 2014.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **Journal of molecular modeling,** v. 19, n. 1, p. 1-32, 2013.

SVRAKA, Emira et al. Physical Therapy in Elderly Suffering from Degenerative Diseases. **Materia socio-medica,** v. 29, n. 4, p. 272, 2017.

TAN, F. et al. Phylogenetic relationships of Combretaceae (Combretaceae) inferred from plastid, nuclear gene and spacer sequences. **Journal of Plant Research.** v. 115, p. 475–481, 2002.

TALWAR, S. et al. Anti-inflammatory activity of Terminalia paniculata bark extract against acute and chronic inflammation in rats. **J Ethnopharmacol.** v.134, n. 2, p. 323-328, 2011.

TEODORO, G. R. et al. Antifungal activity of extracts and isolated compounds from Buchenavia tomentosa on Candida albicans and non-albicans. **Future microbiology,** v. 10, n. 6, p. 917-927, 2015.

TERÇAS, A. G. et al. Phytochemical Characterization of *Terminalia catappa* Linn. Extracts and Their antifungal Activities against *Candida* spp. **Frontiers in Microbiology.** v. 8, p. 1-13, 2017.

THAIPONG, K. et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating

antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 19, p. 669–675, 2006.

TILLOTSON, G. S.; THERIAULT, N. New and alternative approaches to tackling antibiotic resistance. **F1000Prime Reports**. v. 5, p. 51-59, 2013.

TIWARI, P. et al. Phytochemical screening and Extraction: A Review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**. v. 1, p. 98-106, 2011.

TOLAYMAT, T. M. et al. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 5, p. 999-1006, 2010.

TOMASI, J.; MENNUCCI, B.; CAMMI, R. Quantum mechanical continuum solvation models. **Chemical reviews**, v. 105, n. 8, p. 2999-3094, 2005.

TUNGMUNNITHUM, D. et al. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: an overview. **Medicines**, v. 5, n. 3, p. 93, 2018.

TSABANG, N. et al. Herbal Medicine and Treatment of Diabetes in Africa: Case Study in Cameroon, **Diabetes Case Reports**, p. 1-6, 2016.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 10, n. 1, p. 65, 2010.

VALLI, M. et al. Tropical Biodiversity: has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry?. **Quim. Nova**. v. 35, n. 11, p. 2278-2287, 2012.

VANDEPUTTE, P. et al. Identification and functional characterization of Rca1, a transcription factor involved in both antifungal susceptibility and host response in *Candida albicans*. **Eukaryotic cell**, p. EC. 00134-12, 2012.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International journal of microbiology**, v. 2012, 2011.

VAN WIJCK, Y. et al. Therapeutic application of an extract of *Helicobacter pylori* ameliorates the development of allergic airway disease. **The Journal of Immunology**, p. ji1700987, 2018.

VÁZQUEZ, H. et al. Energy level alignment at metal/organic semiconductor interfaces: “Pillow” effect, induced density of interface states, and charge neutrality level. **The Journal of chemical physics**, v. 126, n. 14, p. 144703, 2007.

VENKATALAKSHMI, P.; VADIVEL, V.; BRINDHA, P. Phytopharmacological significance of *Terminalia catappa* L.: an update review. **Int. J. Res. Ayurveda Pharm.** v. 7, p. 130-137, 2016.

VEERAPUTHIRAN, V. Bio-catalytic synthesis of silver nanoparticles. **Int J Chem Tech Res.** v. 5, p. 255–262, 2013.

VEGA, R. J. S. et al. Terpenes from Natural Products with Potential Anti-Inflammatory Activity. In: **Terpenes and Terpenoids**. IntechOpen, 2018.

WANG, J. et al. Development and testing of a general amber force field. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 9, p. 1157-1174, 2004.

WHO – World Health Organization. **Antimicrobial resistance**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>. Acesso em: 06 de Jan. 2018.

WINTER, C. A., RISLEY, E. A., NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc Soc Exp Biol Med.** v. 111, p. 544-547, 1962.

XIA, T. et al. Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties. **ACS Nano.** v. 2, p. 2121–2134, 2008.

YADAV, R.; AGARWALA, M. Phytochemical analysis of some medicinal plants. **Journal of Phytology**, v. 3, n. 12, 14 dez. 2011.

YANG, W.; MORTIER, W. J. The use of global and local molecular parameters for the analysis of the gas-phase basicity of amines. **J. Am. Chem. Soc.** v. 108, p. 5708–5711, 1986.

YANG, S.-W. et al. Three New Ellagic Acid Derivatives from the Bark of *Eschweilera coriacea* from the Suriname Rainforest. **J Nat Prod.** v. 61, n. 7, p. 901-906, 1998.

YAP, P. R.; GOH, K. L. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) Induced Dyspepsia. **Curr Pharm Des.** v. 21, n. 35, p. 5073-81, 2015.

YE, M. et al. Analysis of Phenolic compounds in rhubarbs using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.** v. 18, p. 82–91, 2007.

ZHANG, X.-F. et al. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. **Int. J. Mol. Sci.** v. 17, 1534, 2016.

ANEXOS

ANEXO A – ARTIGOS PUBLICADOS

A Tese resultou em dois artigos que foram publicados em periódicos internacionais. Todos os direitos das publicações em sua totalidade são reservados à Elsevier®.

Journal of Ethnopharmacology 240 (2019) 111941



Antifungal and anti-inflammatory potential of eschweilenol C-rich fraction derived from *Terminalia fagifolia* Mart



Alyne Rodrigues de Araújo^a, Bruno Iles^b, Kerolayne de Melo Nogueira^b, Jhones do Nascimento Dias^c, Alexandra Plácido^{d,e}, Artur Rodrigues^d, Patrícia Albuquerque^c, Ildinete Silva-Pereira^c, Renato Socodatto^d, Camila C. Portugal^d, João B. Relvas^d, Leiz Maria Costa Vêras^b, Filipe Camargo Dalmatti Alves Lima^f, Augusto Batagin-Neto^g, Jand-Venes Rolim Medeiros^a, Paulo Humberto Moreira Nunes^h, Peter Eatonⁱ, José Roberto de Souza de Almeida Leite^{a,j,*}

^a The Northeast Biotechnology Network, RENORBIO, Federal University of Piauí, Teresina, PI, Brazil

^b Biotechnology and Biodiversity Center Research, Biotec, Federal University of Piauí, Parnaíba, Piauí, Brazil

^c Laboratory of Molecular Biology of Dimorphic and Pathogenic Fungi, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil

^d Glial Cell Biology Laboratory, Institute for Research and Innovation in Health, i3S, University of Porto, Porto, Portugal

^e Bioprospectum, Lda, UPTEC, Porto, Portugal

^f Federal Institute of Education, Science and Technology of São Paulo, Campus Matão, Matão, Brazil

^g São Paulo State University, UNESP, Campus of Itapeva, Itapeva, Brazil

^h Medicinal Plants Research Center, NPPM, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

ⁱ LAQV/REQUIMTE, Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences of the University of Porto, Porto, Portugal

^j Center for Research in Applied Morphology and Immunology, NuPMA, University of Brasília, Brasília, Brazil

Industrial Crops & Products 137 (2019) 52–65



Identification of Eschweilenol C in derivative of *Terminalia fagifolia* Mart. and green synthesis of bioactive and biocompatible silver nanoparticles



Alyne Rodrigues de Araujo^{a,b}, Joilson Ramos-Jesus^b, Taiane Maria de Oliveira^b, Andressa Maria A. de Carvalho^c, Paulo Humberto M. Nunes^d, Tatiane Caroline Daboit^c, Ana P. Carvalho^e, Maria Fátima Barroso^c, Miguel Peixoto de Almeida^f, Alexandra Plácido^{g,h}, Artur Rodrigues^g, Camila C. Portugal^g, Renato Socodatto^g, João B. Relvas^g, Cristina Delerue-Matos^e, Durcilene Alves da Silva^{a,b}, Peter Eaton^f, José Roberto de Souza de A. Leite^{b,i,*}