



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

RONY LUCAS DA SILVA VIANA

**SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO PRATA E
XILANA DO SABUGO DE MILHO: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-
QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA FRENTE A PROTOZOÁRIO E A FUNGOS.**

**NATAL
2017**

RONY LUCAS DA SILVA VIANA

**SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO PRATA E
XILANA DO SABUGO DE MILHO: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-
QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA FRENTE A PROTOZOÁRIO E A FUNGOS.**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Bioquímica da Universidade Federal do Rio
Grande do Norte como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Alexandre Oliveira
Rocha

Co-Orientador: Dr. Raniere Fagundes de Melo
Silveira

**NATAL
2017**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - -Centro de Biociências - CB

Viana, Rony Lucas da Silva.

Síntese verde de nanopartículas contendo prata e xilana do sabugo de milho: caracterização físico-química e avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana frente a protozoário e a fungos / Rony Lucas da Silva Viana. - Natal, 2017.

68 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha.

Coorientador: Prof. Dr. Raniere Fagundes de Melo Silveira.

1. Polissacarídeos - Dissertação. 2. Fungos - Dissertação. 3. Antiparasitário - Dissertação. 4. Subproduto agrícola - Dissertação. I. Rocha, Hugo Alexandre de Oliveira. II. Silveira, Raniere Fagundes de Melo. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 557.458

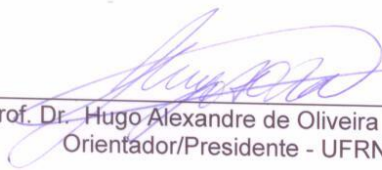
RONY LUCAS DA SILVA VIANA

Síntese verde de nanopartículas contendo prata e xilana do sabugo de milho: caracterização físico-química e avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana frente a protozoário e a fungos


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado em: 30/10/2017.

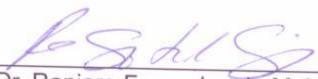
BANCA EXAMINADORA




Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha
Orientador/Presidente - UFRN



Prof^a. Dr^a. Giuliana Paiva Viana de Andrade Souza
Examinadora Externa ao Programa - UFRN



Prof. Dr. Ranieri Fagundes de Melo Silveira
Examinador Externo à Instituição - UFRN



Prof^a. Dr^a. Jailma Almeida de Lima
Examinadora Externa à Instituição - CRI

Dedico esta obra

Ao autor e consumidor da minha fé, que me permitiu o fôlego de vida e me deu as “ferramentas” necessárias para que eu pudesse estar onde me encontro hoje. Não a nós, Senhor, mas a Ti toda honra e glória (Livro de Salmos 115:1a).

Aos meus familiares, que com toda certeza, se não fosse aos esforços em conjunto deles eu não conseguiria. Juntos somos mais fortes!

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pois suas misericórdias se renovam a cada manhã, me permitindo o aprendizado necessário para concluir esta etapa da minha vida.

Aos meus pais, Paula e Samuel, que por muitas vezes renunciaram alguns de seus sonhos para dar prioridade a minha formação moral, física e acadêmica. Basearam-se no conselho de Salomão no livro de Provérbios (22:6) - Ensina a criança no Caminho em que deve andar, e mesmo quando for idoso não se desviará dele. Podem ter certeza que suas atitudes refletiram diretamente em minha vida.

As minhas duas irmãs, Raphaela e Raiana, que dividiram e dividem comigo muitos momentos, sejam bons ou ruins, e aos “aderentes” da família: Abner (que já está dentro e tem uma linda filha junto a minha irmã Raphaela) e Rodolpho (ainda tentando entrar). Obrigado pelos conselhos e por sempre desejarem o melhor para mim.

Aos meus familiares, um pouco mais distantes, mas não menos importantes (tanto os paternos quanto os maternos), obrigado por sempre me receberem com grande amor, carinho e atenção. Deixo meu agradecimento a minha tia Jaci, que por influência dela conheci meu grande amigo e orientador Hugo Rocha.

À Natalia Moura, o meu grande amor e eterna namorada, que me conhece melhor do que ninguém. Obrigado pelo seu cuidado, paciência, por sua amizade e por seu amor. Seus sorrisos me proporcionam ânimo para sempre ir mais adiante. Sempre presente em minha vida nos bons momentos e segura minha mão naqueles não tão bons assim. Você consegue ser na mesma pessoa o amor da minha vida e minha melhor amiga. Sem esquecer da sua família: irmão, pais, tios, tias, avô e avós, que me tratam como filho e fazem questão que eu me sinta em casa, seja qual for a situação.

Ao meu grande amigo e Professor, Hugo, obrigado por ter me aceito de tão bom agrado, sei que a concorrência era grandiosíssima em meu processo de seleção KKKKKK. Doutor, obrigado por ter me iniciado na ciência e com muita paciência, sem medir esforços, me ensinou muitas lições, sejam as científicas e aquelas nem tão científicas assim. Saiba que seu amor pela ciência nos inspira.

Ao meu Co-Orientador, Dr. Raniere, que com todo o altruísmo me concedeu lições e parte de sua pesquisa para meu crescimento científico. Cara, saiba que suas lições se perpetuam e você é um modelo de ótimo profissional. Tenho orgulho de ter você como um grande “pai” científico. Desejo-lhe todo sucesso. Lembro-me que estávamos juntos seja para R.U., almoço do lab. e até mesmo para Marica’s Food almoçando 2 coxinhas as 17:00 hrs.

A família BIOPOL Jailma, Monique, Mariana, Rafael, Leandro, Ruth, Popó, Lucas, Carla, Adriana, Maíra, Leonardo’s, Gabriel, Moacir, Joanna, Pablo, Karol, Éder, Cíntia, Jefferson, Dayanne, Cíntia, Letícia, Talita, Arthur, Vinícius, Maxsuell, Cauê, Marília, Mônica, Pablo, Danielle, Jefferson, Almino Afonso, Jéssyka, Polyana, Leandro, Larisse, Flávia, Thiago e Ivan.

Jailma, obrigado por sempre ajudar a todos do BIOPOL, principalmente a mim, em todos os testes possíveis e imagináveis. Talita, por ser uma mistura de mãe e irmã, me ajudando e tirando meu juízo, que já é pouco (vale salientar). A Ivan, popó e a Leo por sempre conversarmos assuntos cientificamente incorretos.

Aos meus grandes amigos do laboratório alguns fazem parte e outros já concluíram seu trajeto: Max (meu brother de graduação), obrigado pelas parcerias nas viagens. Moacir, Vinicius, Marília, Maíra, Polyana, Day, Jeff, Thiago... (na verdade são todos novamente kkkkkk), sei que mecho com todos em todos os horários. Obrigado por me ajudarem, me aceitarem e o mais importante, me aturarem.

A Gabriel (grande irmão), Karol (grande irmã) e Monique Gabriela por serem amigos de convivência diária, não pela conveniência, mas sim pela afinidade. A Monique (a professora mais nova do pedaço) não poderia de deixar meu agradecimento especial, OBRIGADO por nos ensinar grandes e valiosas lições só com o seu exemplo. Obrigado por sua grande amizade, sei que sou seu amigo mais chato. Além da senhora (isso mesmo) ser uma colaboradora do trabalho és uma das amigas que mais tenho proximidade diária, tornando-se muito especial. Desejo-lhe todo sucesso que o dinheiro não pode comprar, pois o sucesso que pode ser comprado não é problema para senhora kkkkkkkk.

A toda a minha turma de mestrado, pelos intensos e calorosos momentos vividos no primeiro ano de disciplinas e depois também.

A minha banca de qualificação, Prof. Dr. Lenadro Silva, Profª Dra. Monique Gabriela e a Dra. Dayanne Gomes, pelas excelentes colaborações.

A Profª Giulianna Paiva e a Dra. Jailma Almeida, por aceitarem participar da minha banca de defesa.

A Professora Raquel Cordeiro por ter aberto as portas do seu laboratório para execução de parte das análises que constam nesse trabalho.

Aos demais colegas, funcionários e professores do departamento de bioquímica pela atenciosidade e respeito.

A CAPES e o CNPq pelo financiamento que permitiu a execução deste trabalho.

A todos não foram citados aqui, mas que me ajudaram e torceram por mim meus agradecimentos.

*Toda boa dádiva e todo dom
perfeito vêm do alto, descendo do
Pai das luzes, em quem não há
mudança nem sombra de variação.
Epístola de Tiago 1:17.*

RESUMO

Síntese verde de nanopartículas contendo prata e xilana do sabugo de milho: caracterização físico-química e avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana frente a protozoário e a fungos

O sabugo de milho é um subproduto do cultivo do milho que é pouco utilizado economicamente o que leva ao desperdício de milhões de toneladas desse material anualmente. Do sabugo pode-se extrair moléculas, inclusive um polissacarídeo bioativo, rico em xilose, denominado de xilana. Neste trabalho, foram produzidas, por um método sustentável ao meio ambiente (síntese verde), nanopartículas de prata contendo xilanas de sabugo de milho (nanoxilanas). Para tal, a xilana de sabugo de milho foi extraída com o auxílio de ondas de ultrassom. Análises químicas mostraram que esta não estava contaminada por proteínas nem por compostos fenólicos. A xilana foi hidrolisada e seus componentes monossacarídicos foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Na análise monossacarídica identificou-se os componentes sendo eles, xilose: glucose: galactose: manose: ácido glucurônico nas seguintes proporções 50: 21: 14: 9: 2,5: 2,5, respectivamente. A formação das nanoxilanas foi acompanhada por espectroscopia UV-visível com $k_{max} = 469$ nm. Análises de espectroscopia de infravermelho confirmaram a presença da prata e xilana na nanopartícula. Já as análises de dispersão dinâmica de luz e microscopia (DLS) e de força atômica (MFA) mostraram que o tamanho das partículas foi em média de 102 nm e que essas tinham um formato arredondado. Os dados de DLS também mostraram que as nanoxilanas permaneceram estáveis por 12 meses quando armazenadas a 4 °C e protegidas da luz. Dados de espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado (ICP OES) mostraram que o percentual de prata na nanoxilana foi de 19%. A nanoxilana reduziu a viabilidade das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (*L. amazonensis*) (IC_{50} 25 µg/mL), enquanto a xilana não foi efetiva nessa concentração. Além disso, a nanoxilana apresentou um valor de 7,5 µg/mL correspondente a concentração mínima inibitória para três diferentes fungos *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, e *Cryptococcus neoformans*. Adicionalmente, a nanoxilana não alterou de forma negativa a redução de MTT a formazan por células normais (3T3). Os dados aqui apresentados mostram o potencial biotecnológico da nanoxilana e futuros ensaios, inclusive *in vivo*, devem ser feitos para confirmar o potencial antimicrobiano da nanoxilana.

PALAVRAS-CHAVE: Polissacarídeos; Fungos; Antiparasitário; Subproduto agrícola.

ABSTRACT

Green synthesis of nanoparticles containing silver and xylan from corn cob: physicochemical characterization and evaluation of its antioxidant and antimicrobial activities against protozoa and fungi.

Corn cob is an agricultural by-product that annually produces a huge amount of waste estimated at thousands of tons, and it is a source of xylan, a bioactive polysaccharide. In this article, silver nanoparticles containing xylan (nanoxylan) were synthesized using an environmentally friendly synthesis method. Therefore, for such, we extracted the xylan from corn cob using ultrasound. Proteins or phenolic compounds did not contaminate this xylan. In addition, HPLC analysis showed that it contains xylose: glucose: arabinose: galactose: mannose: glucuronic acid in a molar percentage ratio of 50: 21: 14: 9.0: 2.5: 2.5, respectively. The formation of nanoxylan was analyzed by UV–vis spectroscopy at $\lambda_{max} = 469$ nm. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) confirmed the presence of silver and xylan in nanoxylan. Dynamic Light Dispersion (DLS) and Atomic Force Microscopy (AFM) showed size of ± 102.0 nm and spherical shaped nanoparticles, respectively. DLS also showed nanoxylans were stable for 12 months. Coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) showed nanoxylan contain 19% of silver. Nanoxylan reduced viability of the promastigotes of *Leishmania amazonensis* (*L. amazonensis*) (IC_{50} 25 $\mu\text{g/mL}$), while xylan was not effective. In addition, nanoxylan showed antifungal activity on *Candida albicans* (MIC = 7.5 $\mu\text{g/mL}$) *Candida parapsilosis* (MIC = 7.5 $\mu\text{g/mL}$) and *Cryptococcus neoformans* (MIC = 7.5 $\mu\text{g/mL}$). The data obtained here lead us to the conclusion that it is possible to synthesize silver nanoparticles with xylan and that these nanoxylans showed an antileishmanial and antifungal activities superior to the polysaccharide used for its synthesis, and that this can be used as a promising antiparasitic agent against these microorganisms.

KEYWORDS: Polysaccharides; Fungi; Antiparasitic; Agricultural byproduct.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplos e Sabugo de milho.....	18
Figura 2 - Evolução do número de publicações sobre química verde ao longo dos 20 últimos anos.	23
Figura 3 - Interações entre a prata e os polissacarídeos.....	25
Figura 4 - Foto das soluções envolvidas na síntese de nanoxilana e da suspensão de nanoxilana.	42
Figura 5 - Espectros de UV-visível obtido durante a varredura da suspensão de nanoxilanas.....	42
Figura 6 - Microscopia de força atômica das nanoxilanas sintetizadas com a xilana de sabugo de milho.....	43
Figura 7 - Tamanho das nanoxilanas determinado pela técnica de DLS.....	44
Figura 8 - Espectros de infravermelho da xilana (preto) e nanoxilana (azul) na região de 4000 a 400 cm ⁻¹ sobrepostos.....	45
Figura 9 - Espectros de infravermelho da xilana (preto) e nanoxilana (azul) na região de 1900 a 400 cm ⁻¹ sobrepostos.....	46
Figura 10 - Porcentagem de quelação de ferro da xilana e da nanoxilana.....	47
Figura 11 - Taxa de sobrevivência <i>L. amazonensis</i> na forma promastigota após exposição a diferentes concentrações da xilana e das nanoxilanas.	48
Figura 12 - Capacidade redutora de MTT a formazan de células 3T3 (fibroblasto murino) incubadas com xilana e nanoxilana por 24 horas.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nanopartículas de prata com polissacarídeos e algumas de suas aplicações na área da saúde.	25
Tabela 2 - Dosagens químicas referentes a composição monossacarídica e aos teores de açúcares totais, proteínas totais e compostos fenólicos presentes na amostra.	41
Tabela 3 - Concentração inibitória mínima (CIM) de Anf B (anfotericina B), Nanoxilana, Xilana e AgNO ₃ sobre <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. neoformans</i> no tempo de 48 horas.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

3T3	Células de fibroblastos de rato
Ag	Prata
Ag⁺	Prata oxidada
Ag⁰	Prata reduzida
AgNO₃	Nitrato de prata
ATCC	American Type Culture Collection
BIOPOL	Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DLS	Espalhamento Dinâmico da Luz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazol
OMS	Organização Mundial da Saúde
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
USDA	United States Department of Agriculture
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Importância econômica do milho	17
1.1.1 Sabugo de Milho e seu potencial biotecnológico	18
1.1.2 Xilana do sabugo de milho (xilana).	19
1.2 Nanopartículas: visão geral.....	20
1.2.1 Nanopartículas metálicas.....	21
1.2.2 Nanopartículas de prata.....	21
1.2.3 Síntese verde de nanopartículas de prata.....	23
1.2.4 Nanopartículas de prata com polissacarídeos	24
1.3 Atividade antimicrobiana da prata e de nanopartículas de prata contendo polissacarídeos	28
1.4 Atividades antioxidantes de nanopartículas de prata contendo polissacarídeos	29
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 Materiais biológicos	32
3.1.1 Farinha do sabugo de milho.....	32
3.1.2 Cepas de <i>Leishmania amazonensis</i> na forma promastigota	32
3.1.3 Fungos utilizados no ensaio antifúngico.	32
3.1.4 Fibroblastos murínicos 3T3	33
3.2 Outros materiais	33
3.2.1 Reagentes.....	33
3.2.2 Equipamentos.....	33
3.3 Extração dos polissacarídeos.....	34
3.4 Remoção do conteúdo proteico	34

3.5 Determinação da composição química dos polissacarídeos obtidos	35
3.5.1 Dosagem de açúcares totais	35
3.5.2 Dosagem de proteínas	35
3.5.3 Compostos fenólicos	35
3.5.4 Determinação da composição monossacarídica da xilana.....	35
3.5.5 Espectroscopia de infravermelho	36
3.6 Síntese das nanoxilanas	36
3.7 Caracterização das nanopartículas.....	36
3.7.1 Espectroscopia de UV-vísivel.....	36
3.7.2 Dispersão de luz dinâmica (DLS)	36
3.7.3 Determinação quantitativa de prata nas nanoxilanas por técnica de Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado (ICP OES).....	37
3.7.4 Análise de microscopia de Força Atômica (MFA)	37
3.7.5 Espectroscopia de infravermelho da nanoxilana.....	38
3.8 Avaliação in vitro do efeito das amostras em diferentes testes.....	38
3.8.1 Avaliação da capacidade quelante de ferro (Fe ²⁺) da xilana e da nanoxilana	38
3.8.2 Atividades antimicrobianas	38
3.9 Avaliação da capacidade redutora de MTT a formazan da xilana e das nanoxilanas	39
3.10 Análises estatísticas	40
4. RESULTADOS	41
4.1 Obtenção e análises químicas do extrato bruto de xilana:	41
4.2 Síntese de nanopartículas de prata com xilana (nanoxilana):	41
4.3 Análises morfológicas e estabilidade das nanoxilanas:	43
4.3.1 Análise de MFA:.....	43
4.3.2 Análise de DLS:	44
4.4 Análises químicas das nanoxilanas:	44
4.4.1 Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado (ICP OES):.....	44

4.4.2 Análise da espectroscopia de infravermelho com a transformada de fourier (FTIR)	44
4.5 Determinação da atividade quelante de íons de ferro da xilana e da nanoxilana.	46
4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana da xilana e da nanoxilana.	47
4.6.1 Avaliação do efeito da xilana e da nanoxilana frente a forma promastigota L. amazonensis.	47
4.6.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da nanoxilana frente a diferentes fungos.	48
4.7 Avaliação do efeito da nanoxilana sobre a capacidade de redução do MTT de células 3T3.	49
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 Importância econômica do milho

O milho (*Zea mays*) é o cereal mais produzido no mundo, segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), em 2017, a produção mundial chegará a 1.040,21 bilhão de toneladas. E nesse ano os Estados Unidos, China, Brasil e Argentina serão os maiores produtores, responsáveis por cerca de 70% da produção mundial.

O milho é classificado como uma das culturas mais antigas do mundo. Dados arqueológicos e geológicos, bem como, dados obtidos através de medições por desintegração radioativa demonstram que o milho já era cultivado há mais de cinco mil anos, na região que hoje se encontra o México (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, 2010)

No Brasil, dados da EMBRAPA mostram que o milho é cultivado, em praticamente, todo o território, majoritariamente nas regiões sul, sudeste e centro-oeste. A região nordeste, nos últimos anos (5 anos), tem apresentado variações no cultivo de milho no que diz respeito a área plantada, tendo como motivo principal desta variação a seca que castiga a região no período citado.

O milho e suas aplicabilidades estão diretamente relacionadas com o aspecto social. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), do ano de 2014, revelam que 59,84% dos estabelecimentos que produzem milho consomem a produção na propriedade e que menos da metade dos estabelecimentos se preocupam com a produção comercial e com altos índices de produtividade, investindo assim em tecnologias de produção e aprimoramento de técnicas, a fim de aumentar a produção e assim a lucratividade de suas lavouras de milho.

O milho no mercado Brasileiro tem sido amplamente utilizado para fins alimentícios, tanto para humanos quanto para o consumo animal. Mesmo com a grande versatilidade de aplicações em outras áreas, a produção nacional de milho tem acompanhado, basicamente, o crescimento da produção agropecuária brasileira e mundial (USDA, 2017), tendo como explicação ser o principal ingrediente das formulações utilizadas no processo de confinamento para engorda de bovinos, suínos e de frangos.

No mercado internacional, o milho brasileiro tem sido exportado como matéria-prima para produção de energia na forma de biocombustíveis, principalmente para os Estados Unidos. É importante ressaltar que todo o processo de produção gera produtos subutilizados, e no caso do milho, gera quantidades elevadas de subprodutos: palhas da espiga do milho e, principalmente, sabugo de milho, que por muitas vezes não são utilizados (BHATTACHARYA *et al.*, 2005).

1.1.1 Sabugo de Milho e seu potencial biotecnológico

Como mostrado na figura 1, o sabugo de milho é a parte central da espiga de milho, onde estão presos os grãos de milho. Estruturalmente, divide-se o sabugo de milho em quatro partes fundamentais: palha fina, a região externa do sabugo; palha grossa, camada que se segue à palha fina; anel lenhoso, região interna do sabugo; e a medula, região interna do anel lenhoso (FOLEY; VANDER-HOOVEN, 1981). A palha fina constitui aproximadamente 5% do sabugo de milho em peso; a palha grossa 33%; o anel lenhoso 60% e a medula, 2%. Contudo, estas proporções e as características físicas de cada parte do sabugo de milho podem variar de acordo com o cultivar.

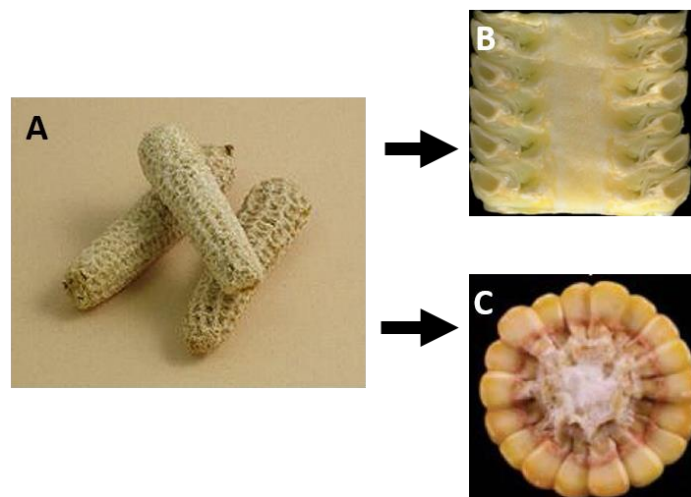


Figura 1 - Exemplos e Sabugo de milho. A: *sabugo de milho inteiro*; B: Corte longitudinal do sabugo de milho; C: Corte transversal do sabugo de milho. Fontes: adaptado de “ta fod** blog” (acessado em 10 de agosto de 2017).

Em relação a espiga de milho, o sabugo corresponde a 18% da massa de uma espiga total, o que proporcionará para o ano de 2017, algo em torno de 180 milhões de toneladas produzidas mundialmente, segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). Apesar da grande quantidade de material produzido, ainda não se tem uma exploração total do potencial do sabugo de milho, e seu uso ainda está associado a produtos de baixo valor agregado, como o de aditivo alimentar para animais (IMAIZUMI, 2005) e o de fonte de carboidratos para a produção de etanol (CAI *et al.*, 2016).

É possível identificar estudos em algumas áreas com intuito de indicar outros possíveis usos do sabugo de milho. Uma das áreas em que os estudos estão mais avançados é a do uso do sabugo como absorvente de poluentes. Vários trabalhos apontam o uso do sabugo de milho como agente que pode ser utilizado como adsorvente, no caso, como fonte de materiais utilizados para a produção de diferentes tipos de carvão ativado (TSAI *et al.*, 2001). Em outros trabalhos, o sabugo *in natura*, submetido apenas a processos físicos, ou modificado, nesse caso,

submetido a processos químicos que introduzem leves modificações em sua estrutura, é apontado como agente absorvente de pesticidas como atrazine e imidacloprida (MANDAL; SINGH; NAIN, 2017), de metais como cromo (KOSTIC *et al.*, 2017), urânio (MAHMOUD, 2016), chumbo, cádmio, níquel (GOYAL; SRIVASTAVA, 2009). Encontra-se também trabalhos em que o sabugo pode ser associado a outros agentes, como por exemplo ao alginato e a sílica, para a produção de micropartículas (*beads*) de sabugo-sílica-alginato que removem fenol, cobre e cádmio de água oriunda de indústria do petróleo (SHIM *et al.*, 2014); o sabugo pode ser também associado a óxido de titânio, para assim, serem produzidos filmes capazes de remover diferentes corantes de soluções aquosas (GAN; LEO; ONG, 2017).

O sabugo de milho também está sendo avaliado como substrato para a produção de cogumelos medicinais (LIN *et al.*, 2017) e/ou comestíveis (CLEAVER; BAILEY; HOLLIDAY, 2012). Bem como, vem sendo avaliado como componente em diferentes meios de cultivo de fungos e bactérias no intuito de otimizar a produção de enzimas de interesse econômico (HAN *et al.*, 2017), de biogás (PÉREZ-RODRÍGUEZ; GARCÍA-BERNET; DOMÍNGUEZ, 2016) e xilitol, um álcool com propriedades bactericidas (KOGJE; GHOSALKAR, 2016).

Além do uso do sabugo de milho, suas biomoléculas constituintes também possuem importância biomédica, no tocante a moléculas, destaca-se o polissacarídeo rico em xilose, conhecido como xilana. Este polímero é apontado como imunomodulador (EBRINGEROVÁ; HROMÁDKOVÁ; HŘIBALOVÁ, 1997), mitogênico, no caso, de células do timo e camundongos (EBRINGEROVÁ; HROMÁDKOVÁ; HŘIBALOVÁ, 1995), antioxidante, antiproliferativo frente a células tumorais, e anticoagulante (MELO-SILVEIRA, 2010; MELO-SILVEIRA *et al.*, 2012; MELO-SILVEIRA *et al.*, 2014; MELO-SILVEIRA, 2014),

1.1.2 Xilana do sabugo de milho (xilana).

Ainda são poucos os trabalhos que utilizaram a xilana do sabugo de milho como alvo de estudos, mas os existentes mostram que as xilanas, no geral, são constituídas, principalmente por ácido 4-0-metil-D-glucurônico, L-arabinose e D-xilose (SILVA; CARVALHO; FONSECA, 1998). Entretanto, a proporção dos monossacarídeos da xilana purificada do sabugo pode variar dependendo do método de extração, cultivar e fatores ambientais (EBRINGEROVÁ; HROMÁDKOVÁ; HŘIBALOVÁ, 1998). Ebringerová e colaboradores (1995), avaliaram a atividade mitogênica e co-mitogênica de várias xilanas (extraídas de sabugo de milho), diferentes estruturalmente, solúveis e insolúveis em água. Esse grupo relata que as arabinoglucoronoxilanas solúveis em água mostraram altíssimo potencial mitogênico

comparada ao imunomodulador zimosan, também um composto glicídico, enquanto que as xilanas insolúveis em água não apresentaram atividade mitogênica. O estudo mostrou ainda que a cadeia lateral dissacarídica presente apenas na arabionoglucoronoxilanas parece ser importante na ação imunoestimulatória dessas xilanas (EBRINGEROVÁ; HROMÁDKOVÁ; HŘIBALOVÁ, 1995). Em outro trabalho, o mesmo grupo acima citado, desenvolveu um método para potencializar a extração de xilana. Nesse trabalho, para a extração da xilana o grupo utilizou meio alcalino em diferentes concentrações de NaOH, e ultrassom em diferentes potências em variados períodos de tempo, além de realizar testes imunoestimulatórios com os produtos extraídos. A partir dos seguintes parâmetros de extração: 5% de NaOH e 10 minutos de ultrassom a 60 °C, foi que se alcançou o melhor rendimento, e com os produtos dessa extração, a melhor atividade mitogênica (em tímócitos de ratos). Além disso, foi concluído que a utilização de ultrassom não alterou substancialmente as características estruturais da xilana solúvel em água extraídas do sabugo de milho (EBRINGEROVÁ; HROMÁDKOVÁ; HŘIBALOVÁ, 1998).

Outros autores também trabalharam com a xilana, como é o caso de Melo-Silveira e colaboradores, (2012), que utilizaram o mesmo método empregado por Ebringerová e colaboradores (1998) e mostraram uma xilana com atividade anticoagulante, antimicrobiana e antiproliferativa, neste caso, frente a células de câncer de colón de uterino (HeLa). Esse trabalho também mostrou a caracterização monossacarídica de tal xilana. Ela se encontra majoritariamente formada por xilose, mas também apresenta em sua composição glicose, arabinose, galactose, manose e ácido glucurônico.

A xilana é um polissacarídeo e muitos polissacarídeos, por apresentarem uma boa biocompatibilidade e biodegradabilidade, são utilizados para a formação de nanocompostos como nanotubos, nanogeis e nanopartículas (MIZRAHY & PEER, 2012). No caso das nanopartículas, muitos são os relatos na literatura que mostram que polissacarídeos na forma de nanopartículas apresentam atividades novas ou melhoradas em comparação a sua forma nativa. Como exemplo pode-se citar quitosana (HUANG & LI, 2014), fucoidan (EBRAHIMIASL et al., 2015); e acetato de quitosana (KUMAR et al. 2015), que se apresentaram como agentes antioxidante, antibiofilme e antibacteriano mais potentes na forma de nanopartículas em comparação a sua forma original. Porém, até o momento, não se identificou estudos com nanopartículas sintetizadas com xilana.

1.2 Nanopartículas: visão geral

As nanopartículas podem ser conceituadas como coloides sólidos, estáveis, que possuem tamanho variando entre 10 a 1000 nm. Devido a estas partículas possuírem dimensões desta ordem, elas possuem uma grande área superficial por unidade de volume, implicando num grande número de átomos na superfície e na camada mais próxima à superfície. A redução nas dimensões destes materiais pode causar alterações nas propriedades dependentes do tamanho tais como: aumento na atividade catalítica (EDER; MOTTA; WINDLE, 2009), mudanças no ponto de fusão e maior área superficial (MOITRA *et al.*, 2008). Adicionalmente, as nanopartículas podem ser formadas com uma grande variedade de materiais, ter capacidade condutora ou semicondutores, atribuindo as nanopartículas propriedades magnéticas ou de fluorescência. Por essa e outras propriedades as nanopartículas atraíram a atenção de pesquisadores, governo e indústria, fomentando assim as pesquisas (FERRARI, 2005)

As nanopartículas podem ser sintetizadas com diferentes materiais e assim apresentarem uma diversidade de tamanhos, formatos e funcionalidades (WANG; WANG, 2014), desde que os materiais utilizados apresentem propriedades químicas e físicas adequadas às condições de síntese e às aplicações pretendidas. Assim as nanopartículas podem ser classificadas de acordo com o material que as compõe. As nanopartículas podem ser poliméricas, lipossomais, magnéticas, e por fim, tem-se as metálicas (STARK *et al.*, 2015).

1.2.1 Nanopartículas metálicas

As nanopartículas metálicas possuem características próprias em comparação aos outros tipos citados anteriormente, exemplo disso é o menor tamanho e a maior superfície de reatividade, o que permite a interação com outras moléculas de interesse (PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012). Por tais motivos essas nanopartículas são encontradas em diversas áreas da indústria, tais como a aeroespacial, química, eletrônica, energética, cosmetológica (STARK *et al.*, 2015), alimentícia, ambiental e biomédica, dentre outras (MULLER; SHEGOKAR; KECK, 2011). Essas partículas podem ser compostas por diversos metais como ouro, prata, cobre, zinco ou estrôncio (CHO *et al.*, 2008; PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012).

Na área biomédica, elas estão sendo estudadas como agentes antiproliferativos frente a células de câncer (GOVINDARAJU *et al.*, 2015), para detecção de moléculas como a hemoglobina, toxinas, vírus e proteínas ligadas ao câncer (VALDEZ *et al.*, 2016; QIAN; NIE, 2008); no diagnóstico por imagem e como agentes liberadores de fármacos (MANIVASAGAN *et al.*, 2016).

1.2.2 Nanopartículas de prata

A prata, desde os primórdios, vem chamando a atenção por suas diversas aplicações na área médica como no caso do tratamento de queimaduras (CASTELLANO *et al.*, 2007) e de algumas infecções de pele ou tecido subcutâneo, como abscessos perianais (KLASEN, 2000). Em escala nanométrica, a prata tem gerado interesse de pesquisadores de diferentes áreas desde o início da era da nanotecnologia. A prata é moldável e maleável, possui elevada condutividade térmica e elétrica, além de ser um oxidante forte. Nanopartículas de prata apresentam aplicações promissoras em diversos campos da ciência e tecnologia (RAO *et al.*, 2015).

As nanopartículas de prata são agregados de átomos de prata que variam de diâmetro e apresentam diferenças em relação às propriedades da prata metálica. Estas possuem propriedades biológicas importantes. Alguns exemplos são a atividade antiviral contra o Vírus Herpes Simples Tipo 2 (ORLOWSKI *et al.*, 2014) e contra o Influenza H3N2 (XIANG *et al.*, 2013), atividade antifúngica contra o *Cladosporium cladosporoides*, o *Aspergillus niger* e também contra a *Candida albicans* (KIM *et al.*, 2009). Além disso, apresenta ainda as atividades antiinflamatória (YILMA *et al.*, 2013), citotóxica (GURUNATHAN *et al.*, 2013; KASSAS; ATTIA, 2014) e antiangiogênica (BAHARARA *et al.*, 2014).

Diante das propriedades que as nanopartículas de prata apresentam e visando utilizá-las na terapêutica é interessante entender o processo de síntese, como no caso do processo de síntese em fase líquida ou coloidal que apresentam reações químicas em solventes conduzindo à formação de coloides. Muitos dos solventes utilizados para formação desses coloides envolvem métodos físicos e químicos economicamente dispendiosos e extremamente laboriosos. Além de serem muito prejudiciais ao meio ambiente. Portanto, atualmente, clama-se pelo desenvolvimento de métodos sustentáveis de produção de nanopartículas metálicas que não utilizem produtos químicos tóxicos, afim de evitar efeitos adversos em sistemas biológicos (MORONES *et al.*, 2005).

Os métodos que se aproximam desses princípios são incluídos numa classe cuja terminologia utilizada para defini-la é conhecida de “síntese verde”. A síntese verde diz respeito ao uso de métodos como menor número de etapas de execução, solventes e reagentes atóxicos ou pouco tóxicos e que gerem pouco ou nenhum resíduo (DIPANKAR; MURUGAN, 2012). A síntese verde vem ganhando espaço dentro da nanotecnologia por utilizar agentes redutores menos poluentes. Neste tipo de síntese prioriza-se a água como solvente, o que garante uma maior biocompatibilidade em frente a solventes orgânicos. Além disso, utiliza-se extratos, frações ou moléculas redutoras que são pouco agressivas ao meio ambiente, por serem biodegradadas rapidamente. Uma das fontes de substâncias que podem ser utilizadas na síntese

verde de nanopartículas de prata são os polissacarídeos de fontes naturais (YOUSEFZADIA *et al.*, 2014).

1.2.3 Síntese verde de nanopartículas de prata

Para falar sobre síntese verde, é necessário primeiro discorrer sobre a química verde. Esta emergiu de uma série de ideias existentes e de esforços para se fazer pesquisas no período que precedeu a década de 1990, no contexto de dar atenção aos problemas da poluição química e do esgotamento de recursos. O desenvolvimento da química verde na Europa e nos Estados Unidos foi ligado a uma mudança nas estratégias para resolver problemas ambientais através de novos métodos (VACCARO, 2016). A relevância desses novos métodos pode ser melhor entendida ao se pesquisar no site “PubMed” o descritor “green chemistry” (pesquisa feita em 18 de setembro de 2017). Nesse site é possível encontrar um histórico de publicações sobre o assunto, como é mostrado na Figura 2:

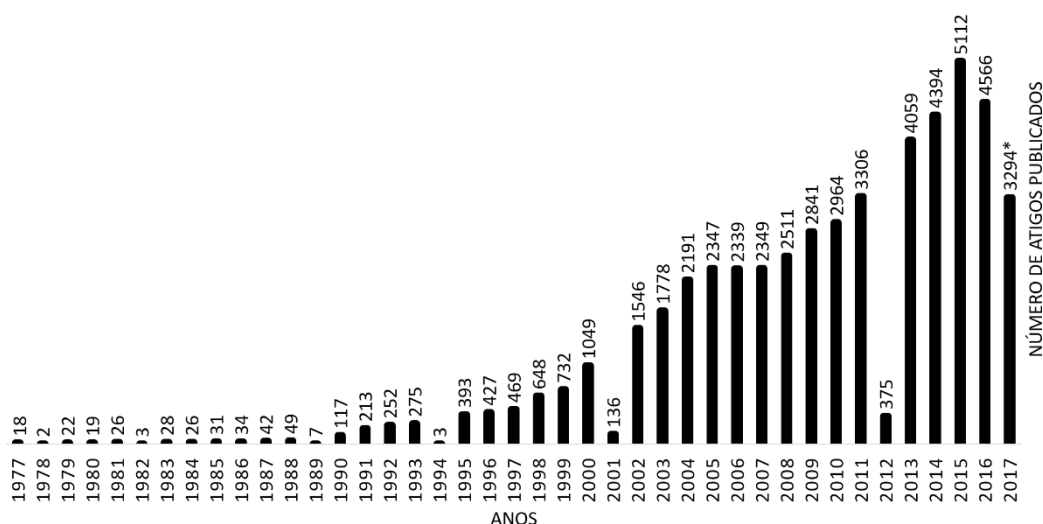


Figura 2 - Evolução do número de publicações sobre química verde ao longo dos 20 últimos anos.

*Os dados do ano de 2017 são referentes ao dia 18 de setembro. Pesquisa realizada no “PubMed” com o descritor “green chemistry”.

Este avanço da química verde é também acompanhado pelo avanço dos estudos que utilizam a síntese verde. Este avanço ocorre, dentre outras coisas, porque a síntese verde concentra-se na utilização de materiais de baixo custo, eficazes, biocompatíveis, que causam poucos danos ao meio ambiente e originam nanopartículas estáveis para diversas aplicações, ainda assim, com um menor número de passos de execução para chegada do produto final. A síntese “completamente verde” é tida um avanço a mais na síntese verde, pois nesse caso utiliza-se apenas água, como solvente, e extratos aquosos de vegetais e moléculas extraídas de fontes

naturais, como no caso de algas, como redutores e/ou estabilizantes (RAVEENDRAN; FU; WALLEN, 2003).

Para a síntese das nanopartículas a partir extratos vegetais, podem ser utilizados extratos de raiz, folha, casca, sementes, flores e fruto. Os extratos são misturados a uma solução de sal de prata e deixados nas condições de síntese. A formação das nanopartículas é acompanhada pela mudança de coloração. Decorrido o tempo de síntese, a mistura é centrifugada e as nanopartículas de prata são coletadas (MOHAPATRA; KURIAKOSE; MOHAPATRA, 2015; KHAN; KHAN; NADHMAN, 2016; SINGH *et al.*, 2016).

1.2.4 Nanopartículas de prata com polissacarídeos

A síntese de nanopartículas constituídas de polissacarídeos pode ocorrer por diversos métodos (AKMAZ *et al.*, 2013; MORI *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2011). Além disso, os polissacarídeos atendem a critérios para serem utilizados na síntese verde, pois são moléculas de baixa toxicidade e ótima biocompatibilidade (LEMARCHAND; GREF; COUVREUR, 2004; LIU *et al.*, 2008). Ademais, nanopartículas sintetizadas com polissacarídeos tendem a agregar-se bem menos do que nanopartículas feitas com outros materiais (ELSABAHY; WOOLEY, 2012). Fazendo com que as nanopartículas contendo polissacarídeos sejam menos citotóxicas (TRAVAN *et al.*, 2009).

Ainda, na síntese verde com polissacarídeos, os átomos de prata, depois de reduzidos, costumam ficar “enovelados” ou circundados pelos polissacarídeos. Como se vê na ilustração esquemática abaixo (Figura 3), os elétrons de oxigênio dos polissacarídeos formam interações

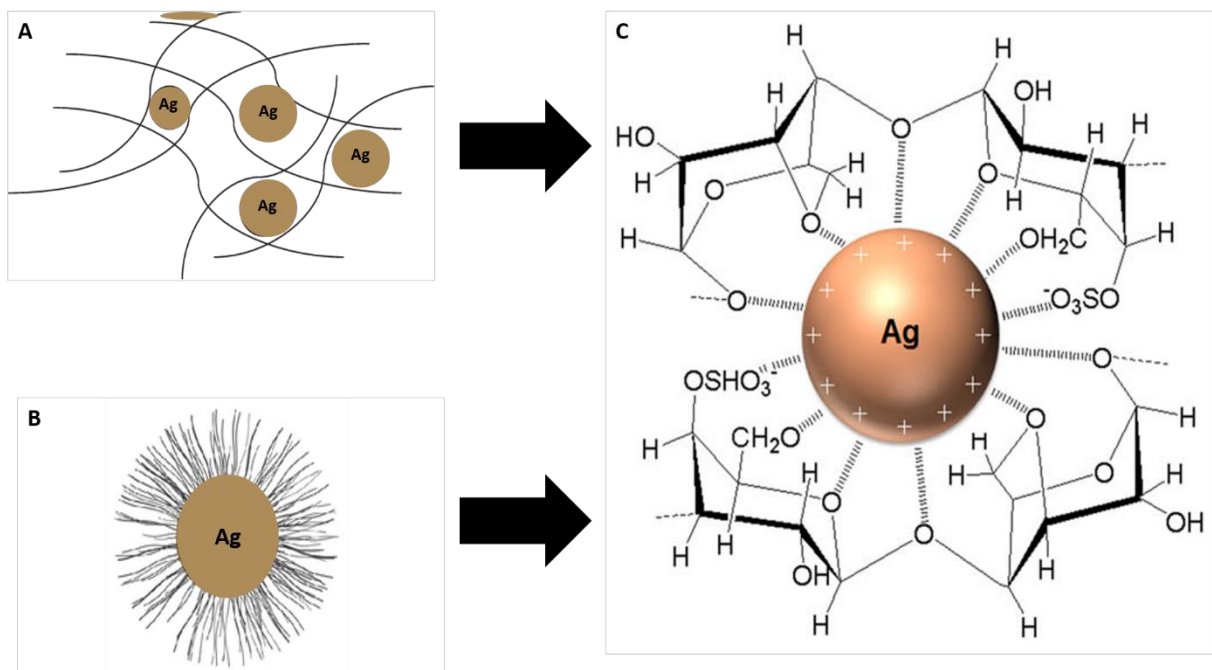


Figura 3 – Modelos de que mostram a possível interações entre a prata e os polissacarídeos.

a) Nanopartículas de prata. Prata enovelada por polissacarídeos.

b) Nanopartícula de prata. Centro metálico (Ag) circundado por polissacarídeos. **c)** interações entre polissacarídeos e o centro metálico (Ag) da nanopartícula.

FONTE: Fariad *et al.*, 2016.

com o átomo de prata por meio das forças de van der Waals, gerando estruturas em forma de rede ou revestimento, estabilizando assim as nanopartículas.

Muitas são as atividades relatadas na literatura de nanopartículas de prata com polissacarídeos, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 - Nanopartículas de prata com polissacarídeos e algumas de suas aplicações na área da saúde.

Atividades		Redutor da nanopartícula	Referências
Antibacteriana	Bactérias		
	<i>E. coli</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , e <i>P. aeruginosa</i>	1-deoxilactit-1-il chitosan (Chitlac)	TRAVAN <i>et al.</i> , 2009
	<i>Streptococcus mitis</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , e <i>S. oralis</i>	Chitlac	GIULIO, <i>et al.</i> , 2013
	<i>E. coli</i> ; <i>S.aureus</i>	Quitosana	YOKSAN; CHIRACHANCHAI, 2009
	<i>E. coli</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Quitosana	AKMAZ <i>et al.</i> , 2013; JENA <i>et al.</i> , 2012
	<i>S.aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Proteus mirabilis</i> e <i>Acinetobacter Baumannii</i>	Acetato de quitosana	HUANG <i>et al.</i> , 2011
	<i>E. coli</i> ; <i>S.aureus</i>	Policelulose, celulose microcristalina, carboxilmetil cellulose e quitosana	HASSABO, <i>et al.</i> , 2015
	<i>Bacillus cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Vibrio cholerae</i>	Polissacarídeos de <i>Sargassum tenerrimum</i>	KUMAR <i>et al.</i> , 2012

	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i>	Exopolissacarídeo de <i>Clonorchis sinensis</i>	CHEN; YAN; WU, 2015
	<i>E. coli</i> ; <i>S.aureus</i>	Polissacarídeos de <i>Pterocladia capillacea</i> , <i>Jania rubins</i> , <i>Ulva faciata</i> , e <i>Colpomenia sinusa</i>	EL-RAFIE; EL-RAFIE; ZAHARAN, 2013
	<i>E. coli</i> ; <i>S.aureus</i>	Polissacarídeo sulfatado de <i>Porphyra vietnamensis</i>	VENKATPURWAR; POKHARKAR, 2011
	<i>Listeria monocytogenes</i> ; <i>E. coli</i>	Citrato trissódico/agar	RHIM; WANG; HONG, 2013
	<i>E. coli</i> ; <i>S.aureus</i>	Hialuronato e heparina	KEMP <i>et al.</i> , 2010
	<i>E. coli</i> ; <i>S.aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Goma de <i>Anogeissus latifolia</i>	KORA; BEEDU; JAYARAMAN, 2012
	<i>E. coli</i> ; <i>S.aureus</i>	Polissacarídeo de <i>Spatoglossum schröderi</i> ; <i>Sargassum filipendula</i> ; <i>Dictyopteris justii</i> ; <i>Dictyota mertensii</i>	NEGREIROS, 2015
	<i>E. coli</i> ; <i>S.aureus</i>	Pululana	COSERI <i>et al.</i> , 2015
Antifúngica	<i>Cordyceps militaris</i> ; <i>Antrodia cinnamomea</i> .	Quitosana	LUNG-SHUO <i>et al.</i> , 2015.
Anticoagulante		Condroitin sulfato; fucoidam com quitosana; heparina; quitosana sulfatada	SILVA <i>et al.</i> , 2012; CHEN, <i>et al.</i> , 2009; EHMANN <i>et al.</i> , 2015;
Antiangiogenica		Heparina	KEMP, <i>et al.</i> , 2009
Antioxidante		Quitosana e fucoidam	HUANG; LI, 2014; EBRAHIMIASL <i>et al.</i> , 2015; KUMAR <i>et al.</i> 2015; RAVEENDRAN <i>et al.</i> , 2015
		Polissacarídeo de <i>Spatoglossum schröderi</i> ; <i>Sargassum filipendula</i> ; <i>Dictyopteris justii</i> ; <i>Dictyota mertensii</i>	NEGREIROS, 2015

Antiviral	Goma-arábica; quitosana	ROGERS <i>et al.</i> , 2008; MORI, <i>et al.</i> , 2013
Antibiofilme	Chitlac	GIULIO <i>et al.</i> , 2013;
Imunomodulatório	Polissacarídeo de <i>Ganoderma lucidum</i> ; <i>Phragmites australis</i> ; <i>Sargassum binderi</i> ; <i>Sargassum duplicatum</i> ; <i>Sargassum fulvarum</i> ; <i>Temora turbinata</i>	WANG <i>et al.</i> , 2014
	Polissacarídeo de <i>Sargassum filipendula</i> ; <i>Dictyopteris justii</i> ; <i>Dictyota mertensii</i>	NEGREIROS, 2015
Anticâncer	Fucoidam; polissacarídeo de Spirulina	KIMURA <i>et al.</i> , 2013; YANG <i>et al.</i> , 2012;
	Polissacarídeo de <i>Spatoglossum schröderi</i> ; <i>Dictyopteris justii</i> ; <i>Dictyota mertensii</i>	NEGREIROS, 2015
	Fucana da alga <i>S. schröderi</i> ;	AMORIM, 2016
	Polissacarídeos de <i>S. schröderi</i> ;	DANTAS, 2017

Fonte: Adaptado de Negreiros (2015)

A produção da nanopartícula com polissacarídeo em alguns casos, deu ao polissacarídeo em questão, propriedades que ele não possuía. Como por exemplo, a fucana da alga *S. schröderi*, que não apresentava atividade antibacteriana, mas a nanopartícula formada de prata contendo essa fucana apresentou atividade antibacteriana, inclusive maior do que aquela observada quando se utilizou apenas a prata (NEGREIROS, 2015). Porém na maioria dos casos citados na Tabela 1, o que se observou foi uma potencialização da atividade do polissacarídeo, ou seja, a nanopartícula apresentava uma atividade maior do que o polissacarídeo nativo que lhe deu origem. Esse é mais um dos motivos que leva a busca por síntese e estudos de nanopartículas de prata contendo polissacarídeos que ainda não foram usados para esse fim.

1.3 Atividade antimicrobiana da prata e de nanopartículas de prata contendo polissacarídeos

Ao se olhar a Tabela 1 também se verifica que o maior número de atividades descrita para as nanopartículas de prata contendo polissacarídeos está relacionada com microrganismos (bactérias, fungos e vírus). Este perfil é semelhante quando se avalia as atividades de nanopartículas de prata contendo outros materiais, e parece estar relacionado com uma das propriedades inerentes da prata, a de ser microbicida (MIJNENDONCKX *et al.*, 2013)

A prata tem gerado grande interesse das pesquisas nas áreas de cunho biológico, pois seu potencial antimicrobiano tem se mostrado mais eficiente quando comparado a outros metais como mercúrio, cobre, chumbo, cromo e estanho. Essas pesquisas têm sido alavancadas com o aparecimento de bactérias multirresistentes aos antibióticos, resultando em uma nova era para o renascimento da busca dessa ação biológica em metais, sobretudo a prata (MIJNENDONCKX *et al.*, 2013).

Muitos produtos tópicos a base de prata vem sendo desenvolvidos, como resultado desse fato, são eles: pomadas, géis, ataduras, entre outros. Os materiais impregnados com esse metal exibem baixa resistência à lavagem, saindo muito facilmente com água, o que resulta em uma dificuldade de manutenção dos níveis de liberação desse íon e conseqüentemente um tempo de vida curto de atividade antimicrobiana, além da sua já conhecida atividade citotóxica (RAI; YADAV; GADE, 2009). Outro inconveniente da utilização da prata em sua formulação tradicional (nitrato de prata ou sulfadiazina de prata) é a ligação que os íons prata fazem com alguns componentes teciduais da ferida, reduzindo assim a sua atuação nas células microbianas e conseqüentemente a sua atividade biológica nesse sentido (HUANG *et al.*, 2007).

Apesar de ter um grande potencial antimicrobiano muitas complicações decorrentes do da absorção de prata são descritas na literatura. Entre elas, a mais comum é a mudança da coloração da pele, unhas e mucosas gerando uma mancha escura que pode ser até permanente (MOIEMEN *et al.*, 2011). Diante desses inconvenientes, os materiais que utilizam nanoestruturas de prata ganharam especial atenção para controlar infecções, já que a utilização da prata em escala reduzida a nanopartículas tem demonstrado resultados promissores (BEER, *et al.*, 2012). Entre as vantagens, as principais devem-se ao fato de que mesmo em concentrações nanomolares, as nanopartículas de prata, mostram-se mais eficazes do que em concentrações micromolares e também devido a não demonstrarem ação tóxica sobre células humanas (PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012).

Baseando-se nisso, muitas atividades antimicrobianas são testadas e relatadas na literatura para as nanopartículas de prata, como os exemplos demonstrados na Tabela 1, observando-se essa tabela verifica-se que a atividade antibacteriana é que mais se destaca. Acredita-se que os íons de prata liberados das nanopartículas durante sua interação com a membrana celular das bactérias podem atuar nos grupos fosfato das moléculas do DNA, inativando a replicação desta molécula (CHEN; YAN; WU, 2015). Outra teoria fundamenta-se na ideia de que a nanopartícula de prata, quando em contato com a membrana celular da bactéria, causa danos estruturais a membrana, forçando a dissipação de prótons e, assim, a morte celular (SONDI; SALOPEK - SONDI, 2004; LOK *et al.*, 2006). Uma terceira teoria seria a reação da prata com proteínas contendo enxofre (grupos tióis), induzindo a inibição de funções enzimáticas, inclusive, as respiratórias (GUPTA *et al.*, 1998; MATSUMURA *et al.*, 2003).

Como dito anteriormente, muitas vezes o racional da síntese de nanopartículas de prata com polissacarídeos tem como intuito potencializar a atividade dos polissacarídeos utilizados. Apesar disso, muitos polissacarídeos, mesmo aqueles encontrados facilmente em grandes quantidades, como a xilana, ainda não foram utilizados como agentes constituintes de nanopartículas de prata. O que seria interessante, já que em estudo feito por Melo-Silveira e colaboradores (2012), a xilana extraída do sabugo de milho apresentou ação antimicrobiana, impedindo o crescimento da bactéria *Klebsiella pneumoniae* em cultura, porém nesse estudo, a atividade relatada foi classificada como baixa.

1.4 Atividades antioxidantes de nanopartículas de prata contendo polissacarídeos

Como visto na Tabela 1, as nanopartículas de prata com polissacarídeos são descritas com atividade antioxidante em vários trabalhos. Por exemplo, Raveendran e colaboradores (2015), que constataram que nanopartículas com polissacarídeos não induziram a oxidação em diversos testes, mas apresentaram atividade antioxidante nos ensaios de glutathione reduzida e glutathione reductase. Isso no mínimo é uma observação intrigante, uma vez que outras nanopartículas de prata são conhecidas por proporcionarem a formação de ROS através da NADPH oxidase, além de catalisar a reação de mais ROS pela reação de Fenton (WEI; CAI; RAHN, 1996). Este é o mecanismo mais aceito de toxicidade de nanopartículas na literatura (BUYUKHATIPOGLU; CLYNE, 2011; NEL, *et al.*, 2006).

Kumar e colaboradores (2015) também observaram atividade antioxidante para nanopartículas de quitosana nos ensaios de sequestro de DPPH (84% de atividade com 0,5 mg/mL) e sequestro de radical hidroxila (75% de atividade com 0,5 mg/mL). Ebrahimiasl e

colaboradores (2015) também observaram atividade antioxidante pelo ensaio de sequestro de DPPH com nanopartículas de zinco com quitosana e polipirrol. Assim como, Huang e Li (2014) mostraram nanopartículas com fucoidan com grande atividade antioxidante nos ensaios de sequestro de DPPH e determinação de espécies reativas de oxigênio. Estes dados em conjunto indicam que a atividade antioxidante do polissacarídeo é transferida, e as vezes, potencializada pela nanopartícula.

Contudo, outros polissacarídeos como diferentes tipos de glucanas (SOEIRO *et al.*, 2016), glicosaminoglicanos (ABDELHEDI *et al.*, 2016), que apesar de terem atividade antioxidante, ainda não foram utilizados para síntese de nanopartículas de prata com atividade antioxidante. O que seria interessante, pois confirmariam mais ainda esta hipótese.

A xilana de sabugo de milho apresenta atividade antioxidante, como mostrado em trabalhos anteriores realizados por integrantes do grupo de pesquisa em que se insere esta dissertação (MELO-SILVEIRA *et al.*, 2012). Contudo, ainda não se tem relatos sobre a síntese de nanopartículas de prata contendo este polímero, nem, obviamente, da avaliação das atividades dessas nanopartículas. O que não se justifica, pois, além das possíveis vantagens elencadas aqui de se trabalhar com nanopartículas de prata contendo polissacarídeos, existe a xilana, que é produzida em grande quantidade e não tem seu potencial totalmente explorado. Espera-se que os dados aqui apresentados comecem a impulsionar estudos e aplicações de nanopartículas contendo xilana de sabugo de milho.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Sintetizar, caracterizar e avaliar o potencial antioxidante, antimicrobiano e citotóxico das nanopartículas constituídas por prata e xilana do sabugo de milho.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair polissacarídeos do sabugo de milho;
- Caracterizar os polissacarídeos extraídos do sabugo de milho como xilanas;
- Produzir nanopartículas de prata com as xilanas obtidas a partir do sabugo de milho;
- Analisar as nanoxilanas físico-química e morfologicamente.
- Analisar a atividade antioxidante *in vitro* das nanoxilanas;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* das nanoxilanas.
- Avaliar a citotoxicidade das nanoxilanas frente a fibroblastos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais biológicos

3.1.1 Farinha do sabugo de milho

Os sabugos de milho utilizados neste trabalho pertencem a espécie *Zea mays*. As espigas de milho foram compradas em mercado local da cidade de Natal-RN. Para se obter a farinha do sabugo de milho, os grãos de milho foram extraídos e os sabugos passaram pelo processo de secagem, em estufa a 40 °C, e trituração, para assim dar origem a farinha de sabugo de milho. Afim de eliminar lipídios e pigmentos foram adicionados 200 mL de etanol para cada 10 g de farinha e o material ficou sob maceração por 12 h. O processo foi repetido até que não fosse visualizado pigmentos no álcool.

3.1.2 Cepas de *Leishmania amazonensis* na forma promastigota

Cepas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) foram coletadas e identificadas com base em anticorpos monoclonais e isoenzimas, posteriormente essas cepas foram cultivadas *in vivo* em patas de camundongo tipo BALB/c com 8 semanas de idade para que mantivesse sua infectividade, os animais foram alojados no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (São Paulo, Brasil) e o cultivo das cepas no Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil). Para manipulação das leishmanias, os parasitas foram extraídos da pata dos camundongos, isolados e cultivados a 25 °C em meio Roswell Park Memorial Institute 1640 - RPMI 1640 (Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) suplementado a 10% soro fetal bovino inativado, 10 µg/mL gentamicina e 100 UI/mL penicilina. O parasita foi usado na forma promastigota em fase estacionária de crescimento.

3.1.3 Fungos utilizados no ensaio antifúngico.

Foram utilizadas 3 espécies de leveduras, duas do gênero *Candida* (*C. albicans* e *C. parapsilosis*) e uma do gênero *Cryptococcus* (*Cryptococcus neoformans*) que foram cedidas pela professora Raquel Cordeiro Theodoro, do Departamento de Biologia Celular e Genética – UFRN. Os fungos foram cultivados no meio Sabouraud Dextrose Agar, acrescido de cloranfenicol (50 mg/L), incubados a 37 °C, durante 72 h e, então, mantidos em geladeira (4 °C) até sua utilização no experimento.

3.1.4 Fibroblastos murínicos 3T3

As células normais 3T3 (*Mouse embryonic fibroblast cells* NIH/3T3 ATCC ® CRL-1658™) foram cultivadas em meio DMEM contendo 10 % (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (estreptomicina e penicilina - 15 mg/L de meio -). As células foram cultivadas em condições estéreis a 37 °C com 5% de saturação de CO₂. Em condições de manutenção, as células 3T3 foram subcultivadas cada dez dias.

3.2 Outros materiais

3.2.1 Reagentes

- Ácido sulfúrico, álcool metílico, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, hidróxido de sódio, sulfato de ferro heptahidratado foram adquiridos da CRQ (DIADEMA, SP, BRASIL);
- Albumina sérica bovina (BSA); Nitrato de prata; L-fucose, D-xilose, D-galactose, D-manose, D-glucose, D-arabinose, D-ramnose e ácido D-glucurônico foram provenientes da Sigma Chemical Co. (ST. LOUIS, MO, EUA);
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) e Soro fetal Bovino (SFB) obtidos da Cultilab (CAMPINAS, SP, BRASIL).
- Fenol e sulfato de sódio anidro foram comprados da Reagen Quimibrás Indústrias Químicas S.A. (RIO DE JANEIRO, RJ, BRASIL);
- Filtro de seringa de 0,22 µm foi obtido da TPP Spritzen (Switzerland);
- Prozima (Preparação enzimática a base de protease alcalina PROLAV 750);
- Reagente de Bradford da Bio-Rad (NY, EUA);
- Reagente Folin-Ciocalteu, Merk (DARMSTADT, ALEMANHA);
- 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) da Invitrogen
- RPMI 1640 com glutamina e sem bicarbonato - Gibco, Life Technologies – (CALIFORNIA, EUA).

3.2.2 Equipamentos

- Agitador orbital, banho maria e estufa modelo 515 de 2013 foram adquiridos da FANEM Ltda (PIRACICABA, SP, BRASIL);
- Balança analítica de precisão (AY220) e bomba a vácuo (TE-058) foi obtido da TECNAL (PIRACICABA, SP, BRASIL);
- Centrifuga refrigerada 5804 R foi obtida da Eppendorf (SÃO PAULO, SP, BRASIL);

- Destilador de água MA -270 foi obtido da Marconi Ltda (PIRACICABA, SP, BRASIL);
- Espectrofotômetro Epoch de microplacas foi obtido BioTek (CALIFORNIA, EUA);
- Espectrofotômetro (IL-227) foi obtido da FEMTO Ltda (SÃO PAULO, SP, BRASIL);
- Espectrofotômetro UV/Visível Modelo DR5000 (HACH LANGE, ALEMANHA);
- Espectrômetro de emissão em plasma com acoplamento indutivo modelo (ICP-OES) 5100 SVDV, Agilent Technologies (CALIFORNIA, EUA);
- Espectrômetro FTIR Shimadzu Modelo 8400S (BARUERI, SP, BRASIL);
- Fluxo Laminar foi obtido da Pachane Pa300 (PIRACICABA, SP, BRASIL);
- Incubadora de CO₂ com desinfecção UV - Modelo L212 foi obtido da LABOVEN (TÜV – ALEMANHA);
- Liofilizador – FreeZone 4.5 foi obtido da Labcon (CALIFORNIA, EUA);
- Medidor de pH (TEC-5) foi obtido da TECNAL (SP, BRASIL);
- Microscópio de Força Atômica Shimadzu Modelo SPM – 9700;
- Sistema de purificação de água Barnstead™ Nanopure™ –modelo 7146 e 7155 foi obtido da Thermo Scientific (CALIFORNIA, EUA);
- Zeta Plus - Zeta Potential Analyzer, ano 2012, foi obtido da Brookhaven (NEW YORK, EUA).

3.3 Extração dos polissacarídeos

Como descrito por Melo-Silveira (2010), adicionou-se a farinha do sabugo do milho a uma solução de NaOH 1,8 M na proporção de 1 g de farinha para 25 mL de solução. Em seguida, a mistura foi submetida a ondas de ultrassom com potência de 120 W por 30 minutos (três ciclos de 10 minutos com intervalos de 5 minutos a cada ciclo), logo após a solução foi centrifugada por 20 minutos a 8.000 x g, a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e precipitado por 12 h a 4 °C com a adição de quatro volumes de metanol. Depois disso, a amostra foi centrifugada novamente a 8.000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (polissacarídeos) passou pelo processo de remoção de proteínas (Ver tópico 3.4).

3.4 Remoção do conteúdo proteico

Após a passagem do processo de extração, o material foi seco a pressão reduzida para que a amostra fosse submetida à digestão proteolítica com enzima prozima. Para tal, o material foi suspenso em NaCl 0,25 M e o pH ajustado para 8,0. A mistura foi deixada por 12 h a 60 °C. Em seguida, foi submetida a uma centrifugação a 10.000x g durante 15 minutos. O

sobrenadante foi filtrado e essa solução foram adicionados quatro volumes de metanol, arrefecido com gelo, sob agitação suave. A solução foi mantida 4 °C durante 24 h e protegido da luz. Os polissacarídeos precipitados foram recolhidos por centrifugação (10.000 x g, 20 min, a 4 °C) e seco sob pressão reduzida.

3.5 Determinação da composição química dos polissacarídeos obtidos

3.5.1 Dosagem de açúcares totais

Açúcares totais da amostra foram determinados pelo método do fenol/ácido sulfúrico, utilizando-se como padrão xilose para construção da equação da reta a partir da qual se determinou a quantidade de açúcares das amostras. As leituras foram realizadas a 490 nm (DUBOIS *et al.*, 1956).

3.5.2 Dosagem de proteínas

O teor de proteína correspondente da amostra foi determinado com o reagente de Bradford, utilizando-se como padrão albumina bovina. As leituras foram realizadas a 595 nm (SPECTOR, 1978).

3.5.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram avaliados quantitativamente pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, utilizando-se como padrão o ácido gálico, sendo as leituras realizadas a 765 nm (Melo-Silveira *et al.* 2012).

3.5.4 Determinação da composição monossacarídica da xilana

A hidrólise da amostra foi realizada utilizando a condição descrita por Melo-Silveira e colaboradores (2012) (HCl 2,0 M, 2 h). Após a hidrólise, foi realizado a análise de composição de açúcares utilizando o sistema de cromatografia líquida de alta performance (CLAE) LaChrom Elite® VWR-Hitachi com um detector de índice de refração L-2490. Utilizando a coluna LichroCART® 250-4 Lichrospher® 100 NH₂ (10 µm), tendo como fase móvel acetronitrila:agua (80:20) em um fluxo 1 mL/min, a 40 °C. Os seguintes monossacarídeos foram usados como referência: arabinose, D-galactose, D-glicose, ácido D-glucurônico, D-frutose, L-fucose, D-manose, N-acetil-glucosamina, D-galactosamina, D-glucosamina, D-ramnose e D-xilose.

3.5.5 Espectroscopia de infravermelho

Os espectros das amostras foram obtidos utilizando um espectrofotômetro (IRAffinity-1, Shimadzu Corp., Kyoto, Japão) equipado com o software IRsolution1.20. As amostras foram analisadas na forma de pastilhas contendo KBr. O intervalo de frequência de análise foi de 4000 a 400 cm^{-1} . Foram realizadas três análises independentes.

3.6 Síntese das nanoxilanas

As nanoxilanas de prata foram obtidas utilizando procedimento de síntese verde semelhante ao descrito por Dipankar e Murugan (2012), porém, utilizando a xilana de sabugo de milho como bioreductor. A síntese das nanoxilanas foi realizada a partir da adição de uma solução 1,0 mM de nitrato de prata a uma solução de xilana na concentração de 10 mg/mL (1:9 v/v). A solução foi homogeneizada em um balão de fundo redondo, previamente protegido da luz com papel alumínio, e submetida a agitação. Após 24 horas, a suspensão foi centrifugada a 10.000 x g por 15 minutos a 25 °C e o precipitado obtido foi coletado, liofilizado e mantido protegido da luz em dessecador.

3.7 Caracterização das nanopartículas

3.7.1 Espectroscopia de UV-vísivel

A redução da prata (I) pela xilana de sabugo de milho e formação das nanoxilanas foi acompanhada por uma mudança de cor da solução, monitorada por espectroscopia eletrônica na região UV-vísivel. Foram realizadas leituras de 350 a 600 nm nas soluções de nanoxilanas utilizando o espectrofotômetro DR 5000 (Hitach).

3.7.2 Dispersão de luz dinâmica (DLS)

O diâmetro das nanopartículas foi determinado por espectroscopia de correlação de fótons, usando o equipamento DLS da Brookhaven 90 Plus (Brookhaven Instruments Corporation, New York, USA). As nanoxilanas (0,25 mg/mL), em água, foram analisadas em três experimentos independentes, e os valores relatados são referentes aos valores médios obtidos, com os desvios padrões (\pm). Para avaliação da estabilidade das nanopartículas foi preparada uma suspensão (0,25 mg / mL) e essa foi armazenada a 25 °C durante 12 meses, e as medições foram feitas como descrito acima, uma vez por mês, com intervalo de trinta dias entre cada leitura.

3.7.3 Determinação quantitativa de prata nas nanoxilanas por técnica de Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado (ICP OES)

3.7.3.1 Digestão da amostra

Para a digestão da amostra foram adicionados 100 mg da nanoxilana em recipientes de teflon, aos quais foram adicionados 7 mL de ácido nítrico 65%, previamente purificado por destilação sub-boiling (Berghof, Eningen, Alemanha), e 1 mL de peróxido de hidrogênio 30% (Merck, Darmstadt, Germany). Em seguida, os recipientes foram fechados e colocados num digestor de micro-ondas (Start D, Milestone, Itália). A digestão foi realizada em 6 estágios, com aplicação de 1100 W de potência: (1) 5 min a 70 °C; (2) 2 min a 70 °C; (3) 3 min a 120 °C; (4) 2 min a 120 °C; (5) 10 min a 170 °C; (6) 15 min a 170 °C; e por fim 30 min de ventilação antes da remoção do rotor do micro-ondas. O conteúdo digerido foi suspenso em 15 mL de água deionizada e filtrado em membrana de 0,45 µm. As análises foram realizadas em duplicata analítica e brancos analíticos foram realizados seguindo o procedimento, porém, na ausência da amostra.

3.7.3.2 Determinação da Prata

Para a quantificação da prata utilizou-se um espectrômetro de emissão em plasma com acoplamento indutivo (ICP-OES 5100 VDV, Agilent Technologies, Tóquio, Japão) na visão axial, equipado com uma fonte de rádio frequência (RF) de 27 MHz. O equipamento também continha um detector óptico simultâneo, uma bomba peristáltica, uma câmara de nebulização ciclônica de duplo passo, uma tocha de quartzo de 1,8 mm e um nebulizador de vidro *seaspray*. O sistema utiliza argônio líquido 99,996 % (White Martins, SP, Brasil) como gás de plasma. As condições operacionais do equipamento de ICP-OES foram: potência do plasma, 1,5 kW; vazão de argônio, 12,0 L/min; vazão de argônio auxiliar, 1,0 L/min; vazão de nebulização, 0,70 L/min; número de replicatas, 3; tempo de estabilização e de leitura, 15 seg; comprimento de onda, 328,068 nm.

A curva analítica para prata foi preparada por diluição de solução padrão de referência de 1000 mg/L na faixa de 2,5 a 100 µg/L ($r = 0,9999$) em solução de ácido nítrico 5% (v/v) preparado a partir de ácido 65% destilado em sistema subboiling (Distillacid, Berghof, Eningen, Alemanha). Para leitura da amostra foram realizadas diluições sucessivas: i) 0,1 mL/10 mL e ii) 0,2 mL/10 mL.

3.7.4 Análise de microscopia de Força Atômica (MFA)

Imagens de MFA foram realizadas pelo microscópio Scanning Probe Microscope SPM – 9700, SHIMADZU (QUIOTO, JAPÃO), no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura (LABMEV) no Departamento de Engenharia de Materiais (DEMat) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Foram feitas 3 imagens para avaliação das nanoxilanas.

3.7.5 Espectroscopia de infravermelho da nanoxilana

Foi realizada como descrito acima (Tópico 3.5.5)

3.8 Avaliação *in vitro* do efeito das amostras em diferentes testes

3.8.1 Avaliação da capacidade quelante de ferro (Fe^{2+}) da xilana e da nanoxilana

A atividade quelante de ferro da xilana e da nanoxilana foi determinada como descrito por Melo-Silveira et al. (2012). Resumidamente, a mistura reacional foi constituída por xilana ou nanoxilana (de 0,001 a 0,1 mg / mL), FeCl_2 (2 mM) e ferrozina (5 mM). Após 10 min de incubação a 37 °C, foi determinada a absorbância da mistura em 562 nm em leitor de microplacas. Uma solução reacional sem amostra teste foi utilizada como branco. EDTA foi utilizado como controle positivo.

3.8.2 Atividades antimicrobianas

3.8.2.1 Atividade antileishmania contra *L. amazonensis* na forma promastigota

No intuito de avaliar a atividade antileishmania foi utilizado o protocolo descrito por Passero e colaboradores (2007). Foram preparadas soluções estoque em meio RPMI 1640 de xilana e nanoxilana de prata com concentração de 1,0 mg/mL. As concentrações testes utilizadas foram de 5,0; 15,0; 25,0; 50,0 e 100,0 $\mu\text{g/mL}$. As amostras testes foram colocadas em poços de microplacas de 96 poços juntamente a cepa de *Leishmania amazonensis* na forma promastigota, na concentração de 3×10^7 promastigota/mL. As placas contendo as amostras foram incubadas a 25 °C por 24 horas e em seguida foi quantificado em porcentagem de sobrevivência de *L. amazonensis* através do ensaio de MTT. As microplacas contendo amostras foram centrifugadas (4.000 g, 10 °C, 10 min) para que, por conseguinte, se retirasse cuidadosamente o sobrenadante e adicionasse PBS afim de se lavar o poço, esta etapa foi repetida mais uma vez. Em seguida foram adicionados em todos os poços 50 μL de uma solução de MTT a 4 mg/mL em meio RPMI 1640. Passadas as 4 horas, foi acrescentado aos poços, 50 μL de SDS a 10%. O material ficou então sendo incubado por mais 18 horas a 25 °C, por fim as placas foram lidas a 595 nm. A viabilidade das leishmanias foi calculada comparando-se a leitura das placas contendo as amostras e os parasitas e a leitura do branco (placas contendo

somente os parasitas). A percentagem de redução do MTT foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Redução de MTT} = \text{Abs}_{\text{amostra}} (570 \text{ nm}) \times 100 / \text{Abs}_{\text{controle}} (570 \text{ nm})$$

3.8.2.2 Atividade antifúngica sobre *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. neoformans*.

Para avaliação do potencial antifúngico utilizou-se o protocolo do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) com intuito de se determinar da concentração inibitória mínima (CIM) da xilana e da nanoxilana. Como padrão positivo utilizou-se anfotericina B (SIGMA-ALDRICH) e as amostras utilizadas foram a xilana, a nanoxilanas e AgNO₃. Para tal, as referidas amostras foram diluídas em RPMI 1640 sem bicarbonato e contendo glutamina (Gibco, Life Technologies), pH 7.6 (ajustado com HCl 1M) e esterilizado por filtração. A microdiluição de cada amostra foi realizada em placa de 96 poços, tendo-se como concentrações finais valores entre 0,97 a 1000 µg/mL para a xilana e a nanoxilana, 0,19 a 200 µg/mL para o AgNO₃ e de 0,015 - 16 µg/mL para a anfotericina B. Para o preparo do inóculo, todos os fungos foram previamente subcultivados em meio ágar Sabouraud a 35 °C durante 48 h. Desse meio, colônias isoladas foram removidas, suspensas em 5 mL de solução salina (0,85% NaCl) estéril, homogeneizadas e a densidade celular foi comparada a escala 0,5 McFarland. O inóculo foi então ajustado a uma concentração de 1x10³ a 5x10³, em RPMI 1640, após a contagem e mensuração das células em câmara de Neubauer (adotou-se uma diluição 1:10 da escala 0,5 Mcfarland em RPMI 1640, após padronização). Uma alíquota de 100 µL foi adicionada em cada poço que continha previamente as amostras (100 µL da amostra nas 10 diluições testadas), de modo que o inóculo fosse novamente diluído duas vezes (1:1), resultando na concentração final desejada de 0,5x10³ a 2,5x10³ de células por poço, com volume final de 200 µL. Controles positivos (RPMI + veículo da amostra + inóculo fúngico) e controles negativos (RPMI) foram utilizados em cada placa, todos com o mesmo volume final de 200 µL. As leituras foram realizadas após 24 e 48 h de incubação a 35 °C ,para *C. albicans* e *C. parapsilosis* e 48 e 72 h de incubação a 35 °C para *C. neoformans*, através da indicação visual em escala (4 = maior crescimento fúngico a 0 = sem crescimento fúngico) com CIM atribuído como a menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico (poço sem crescimento = escala 0) sempre comparando com os controles (somente fungo = escala 4).

3.9 Avaliação da capacidade redutora de MTT a formazan da xilana e das nanoxilanas

As células (3T3) foram plaqueadas em microplacasde 96 poços (5 x 10³ células por poço) e deixadas em repouso em meio DMEM com soro, para adesão à superfície por 24 horas,

em estufa a 37 °C com 5% de saturação de CO₂. Posteriormente, o meio de cultivo foi aspirado e em seu lugar meio DMEM sem soro fetal bovino foi adicionado para iniciar o processo de carenciamento. Decorrido 24 h, o meio foi aspirado e em seu lugar foram adicionadas diferentes concentrações (0,01; 0,05; 0,1 e 1 mg/mL) da xilana e das nanoxilana diluídos em meio com soro fetal bovino (10%). Após mais 24 h, a capacidade das células em reduzir o MTT foi determinada pelo teste colorimétrico de MTT (MOSMANN, 1983), por meio da adição de uma solução de MTT a 1 mg/mL em DMEM. Após 4 h, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan formados pela redução do MTT foram solubilizados em etanol. A placa contendo este material permaneceu sob lenta agitação por 15 minutos, à temperatura ambiente, posteriormente a placa foi levada um leitor de microplacas a as absorbâncias das soluções contidas em cada poço foi determinada com o uso de um comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram apresentados em porcentagem de redução do MTT, considerando-se a absorbância do controle negativo como 100% de redução.

3.10 Análises estatísticas

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão de pelo menos dois experimentos independentes (n = 3). Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA). O teste Student Newman-Keuls (p<0,05) foi utilizado para determinar diferenças significativas entre as amostras testadas usando o programa GraphPadPrism versão 5.0, 2014 (La Jolla, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1 Obtenção e análises químicas do extrato bruto de xilana:

Após a suspensão da farinha de sabugo de milho em solução alcalina e submissão dessa a ondas de ultrassom foi obtido um extrato rico em polissacarídeos, que será aqui denominado xilana. Com o emprego desse processo de extração teve-se um rendimento igual a $35,0 \pm 2,0\%$ de xilana em relação a massa de farinha de sabugo de milho utilizada.

Após a extração, a xilana foi submetida a algumas análises químicas e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2. Levando em consideração a quantidade de açúcar, proteínas e compostos fenólicos, a extração resultou em uma amostra rica em açúcar (68,2%) e pobre em contaminantes, representados pelos teores de proteínas (1,05%) e compostos fenólicos (0,02%).

Adicionalmente a análise monossacarídica revela que o polissacarídeo obtido é constituído majoritariamente por xilose (50%), mas também apresenta quantidades relevantes, superiores a 10%, de glicose (21%) e arabinose (14%). Como constituintes em menor proporção, inferiores a 10%, estão presentes os monossacarídeos galactose (9%), manose (2,5%) e ácido glucurônico (2,5%).

Tabela 2 - Dosagens químicas referentes a composição monossacarídica e aos teores de açúcares totais, proteínas totais e compostos fenólicos presentes na amostra.

Amostra	Açúcar (%)	Proteínas (%)	C. Fenólicos (%)	Razão Molar ^a (%)					
				Xil	Ara	Gli	Gal	Man	A. Glu
Xilana	68,2 $\pm 1,9$	1,05 $\pm 0,04$	0,02 $\pm 0,01$	50,0	14,0	21,0	9,0	2,5	2,5

Xil: Xilose; Ara: Arabinose; Gli: Glicose; Gal: Galactose; Man: Manose; A. Glu.

^aAnalisado por HPLC após hidrólise ácida a 100 °C por 2 h.

4.2 Síntese de nanopartículas de prata com xilana (nanoxilana):

Utilizando o procedimento descrito em métodos foram obtidas nanopartículas a partir da xilana e de nitrato de prata, estas foram denominadas de nanoxilanas. Na Figura 4 são mostradas as soluções utilizadas nesse processo e a suspensão de nanoxilanas. Em A e B observa-se a solução de nitrato de prata e a solução de xilana, respectivamente. Em C a suspensão de nanopartículas de prata produzidas com a xilana, que tem coloração mais escura que a das duas outras soluções.

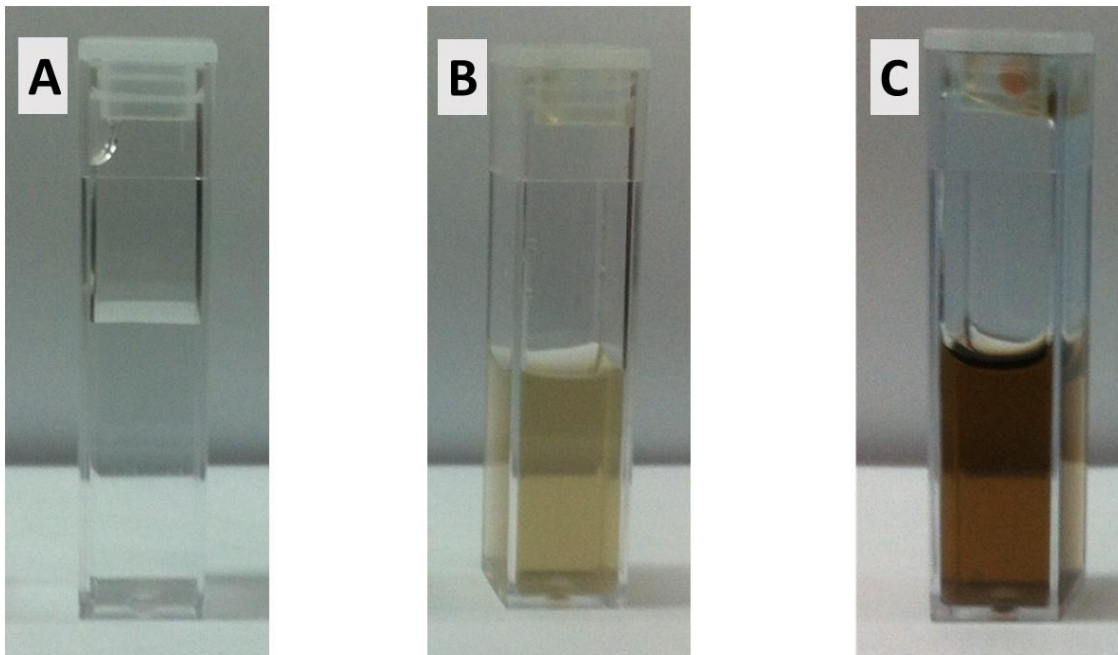


Figura 4 - Foto das soluções envolvidas na síntese de nanoxilana e da suspensão de nanoxilana. **A** – Solução de nitrato de prata a 1mM; **B** – Solução de xilanas a 10 mg/mL. **C** – Suspensão de nanoxilana.

Posteriormente a síntese das nanoxilanas, a suspensão de nanopartículas foi liofilizada e pesada, o que revelou um rendimento de 36,6% em relação as massas de xilana e nitrato de prata utilizados inicialmente.

4.2.1 Análise do espectro de absorção de luz UV-visível:

A formação das nanoxilanas foi acompanhada por espectroscopia de UV-vísivel e na figura 5 mostra-se o perfil de absorção de luz pela suspensão de nanoxilanas que foi obtido a partir de uma varredura de 350 a 600 nanômetros (nm).

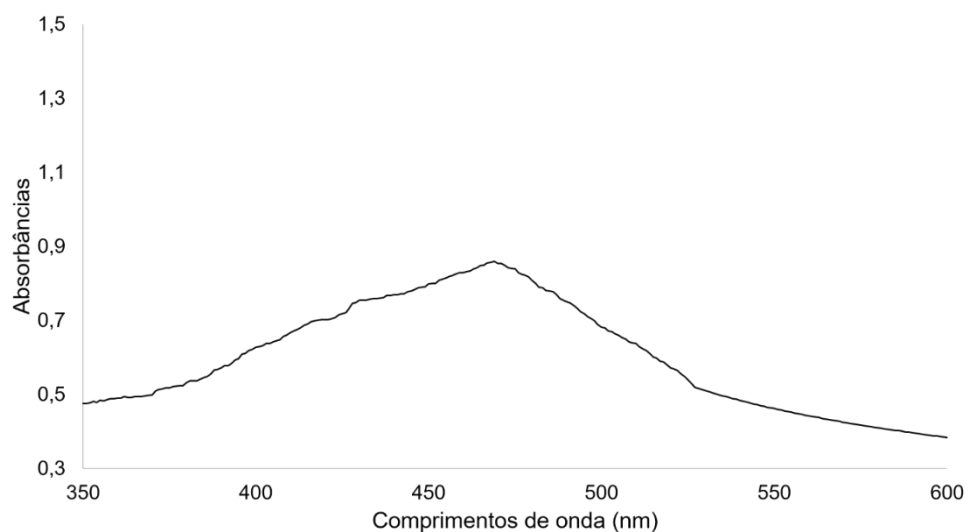


Figura 5 - Espectros de UV-visível obtido durante a varredura da suspensão de nanoxilanas. A análise foi realizada a partir de uma varredura de 350 a 600 nm.

No espectro representativo da absorção de luz que ocorreu durante o processo de síntese das nanopartículas observa-se que na região próxima a 350 nm, os valores de absorbância estão em torno 0,5, contudo esses valores começam a aumentar na região de 400 nm e chegam ao máximo de absorção na região de 469 nm. Por outro lado, quando a solução de xilana isolada foi analisada, o pico de absorção máxima ficou em 360 nm (Dado não mostrado). Nessa mesma faixa de comprimento não foi detectado nenhum sinal de absorção de luz quando se avaliou a solução de nitrato de prata, bem como, a solução de xilana (Dado não mostrado).

4.3 Análises morfológicas e estabilidade das nanoxilanas:

A fim de determinar o tamanho das nanoxilanas foram utilizadas duas técnicas: microscopia de força atômica (MFA) e dispersão de luz dinâmica (DLS). Para a determinação da forma das nanoxilanas utilizou-se apenas a técnica de MFA e para determinar a estabilidade dessas partículas foi utilizada apenas o DLS.

4.3.1 Análise de MFA:

Imagens obtidas do uso da técnica de MFA encontram-se expostas na Figura 6. É possível observar que o diâmetro médio das nanopartículas foi de 40,1 nm (indicado pela seta). Outra característica que pode ser observada pela técnica de MFA é o formato das partículas. Como pode ser percebido nas figuras 6A e 6B, as nanoxilanas possuem formato arredondado/esférico.

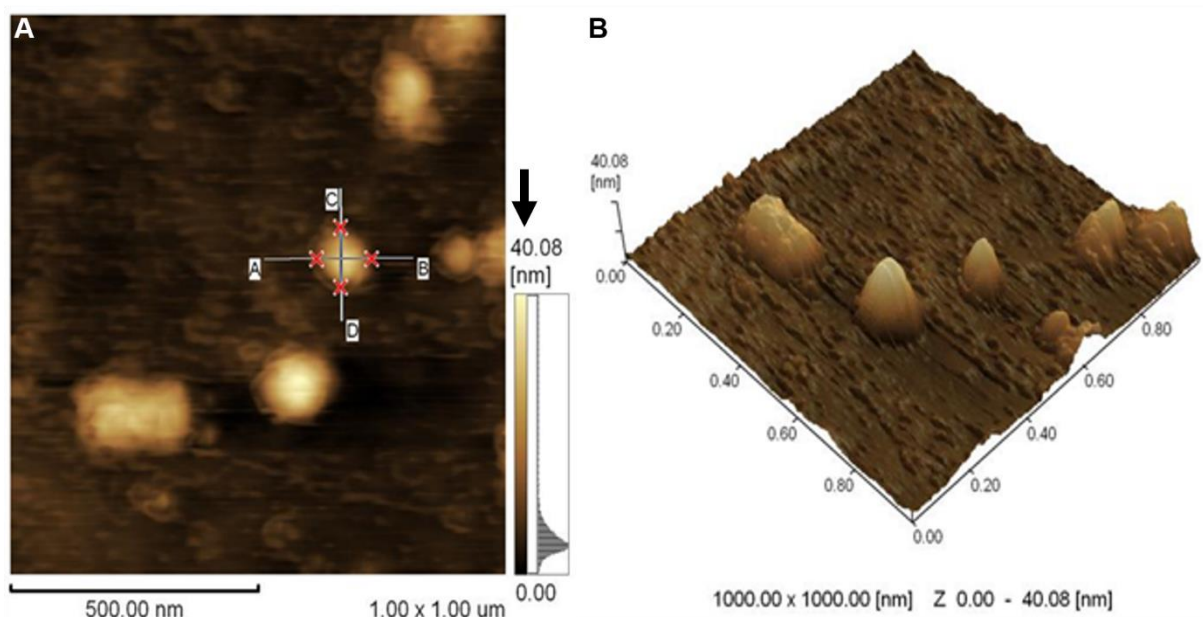


Figura 6 - Microscopia de força atômica das nanoxilanas sintetizadas com a xilana de sabugo de milho. **A**- Imagem em 2 dimensões, pode-se observar as medidas de diâmetros para as nanoxilanas, A-B e C-D, seta indicando de

40,08nm. **B-** Representação da imagem A em 3 dimensões. Também é possível observar um formato arredondado para as partículas.

4.3.2 Análise de DLS:

Quando utilizada a técnica de DLS determinou-se que o tamanho médio das nanoxilanas foi de $101,4 \pm 2,7$ nm. Esse tamanho foi 3 vezes maior que o mostrado na análise de MFA. O tamanho das nanoxilanas foi aferido a cada 30 dias, durante 12 meses, com intuito de se identificar alterações de estabilidade das nanoxilanas. Como se observa na figura 7, o tamanho das nanoxilanas não se alterou significativamente durante o período de análise, pois o tamanho médio das nanoxilanas variou entre $102,3 \pm 1,70$ nm, no primeiro mês, e $100,3 \pm 0,40$ nm no décimo segundo mês.

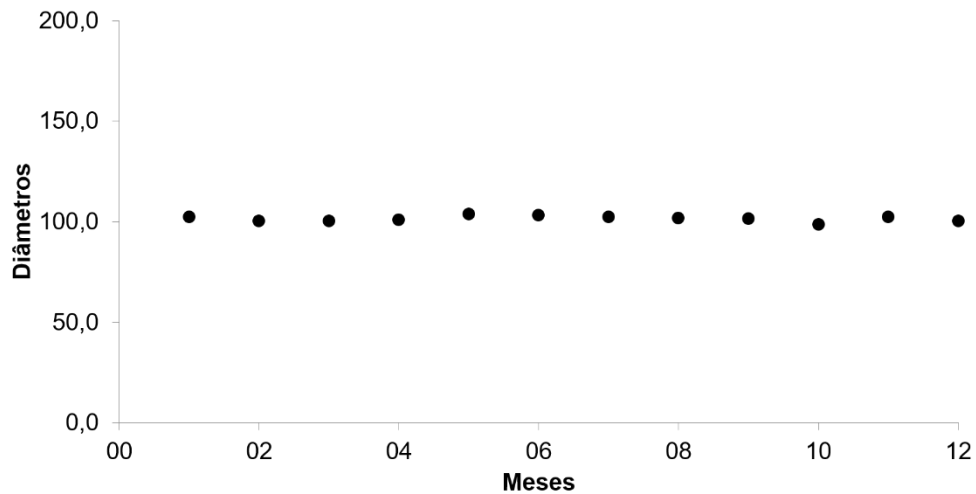


Figura 7 - Tamanho das nanoxilanas determinado pela técnica de DLS. As leituras foram realizadas mensalmente, por um período de 12 meses. Utilizou-se uma suspensão de nanoxilanas (0,25 mg/mL), que foi armazenada em temperatura de 4 °C e protegida da luz. Cada valor representa a média de três determinações \pm desvio padrão, que foram realizadas 1 vez por mês durante 12 meses.

4.4 Análises químicas das nanoxilanas:

4.4.1 Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado (ICP OES):

No intuito de determinar a quantidade de prata presente nas nanoxilanas, estas foram digeridas quimicamente e o produto foi submetido a técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado (ICP OES). Após as análises verificou-se que a quantidade de prata na nanoxilana correspondeu a 19% do peso seco do material.

4.4.2 Análise da espectroscopia de infravermelho com a transformada de fourier (FTIR)

As nanoxilanas e a xilana foram submetidas à análise por espectroscopia de infravermelho (FTIR) e os espectros correspondente a aqueles obtidos pela técnica de FTIR das amostras encontram-se apresentados nas figuras 8 e 9.

Na figura 8 são mostrados os espectros das amostras em um grande faixa de comprimento (400 a 4000 cm^{-1}). É possível observar que os espectros das amostras não se sobrepõem, mas que as bandas existentes no espectro da xilana são encontradas no espectro da nanoxilana, embora as bandas, quando se compara um espectro em relação ao outro, estejam deslocados entre si. Como por exemplo, os modos vibracionais em 3536 cm^{-1} (xilana), 3370 cm^{-1} (nanoxilana); bem como, 2927 cm^{-1} (xilana) e 2898 cm^{-1} (nanoxilana).

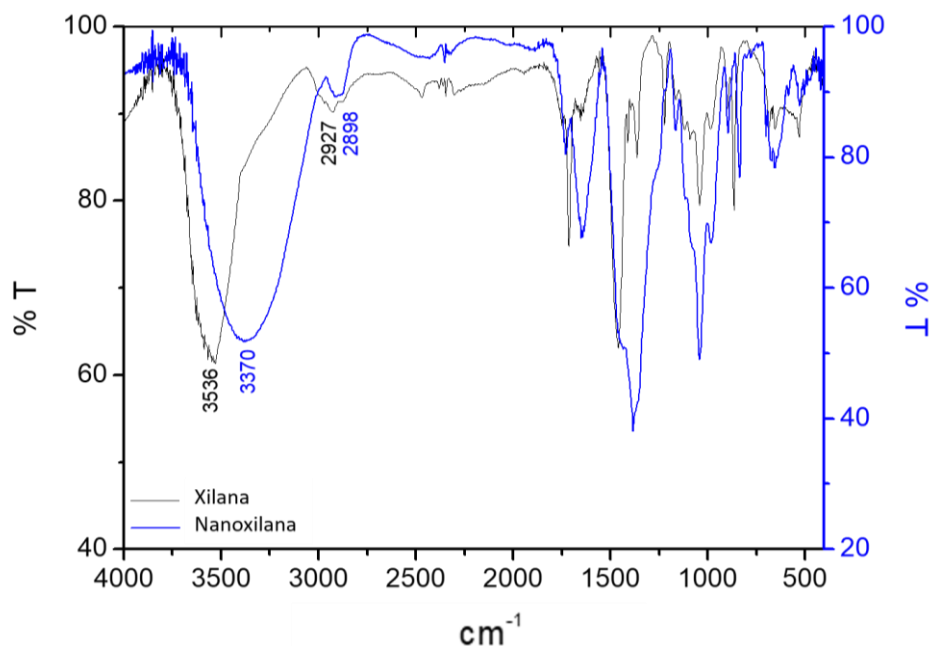


Figura 8 - Espectros de infravermelho da xilana (preto) e nanoxilana (azul) na região de 4000 a 400 cm^{-1} sobrepostos. A figura exposta é um exemplo representativo de três análises.

Ao se ampliar os espectros na região mais rica em bandas, ou seja, entre 400 e 1900 cm^{-1} (Figura 9) é possível explorar melhor a sobreposição desses dois espectros. Nessa figura, ao se comparar os dois espectros entre si pode-se observar que há bandas que são comuns aos dois espectros, e que se diferenciam por estarem pouco deslocadas entre si, como por exemplo 1220 cm^{-1} (xilana) e 1215 cm^{-1} (nanoxilana); 901 cm^{-1} (xilana) e 896 cm^{-1} (nanoxilana). Há ainda, em algumas situações, bandas que estão localizadas na mesma posição nos dois espectros, como 1042 e 1091 cm^{-1} . Por outro lado, algumas alterações marcantes entre os dois espectros podem ser identificadas, por exemplo, uma banda que aparece em 1713 cm^{-1} no espectro na xilana, também aparece no espectro da nanoxilana, todavia, esta se apresenta, nesse espectro, com um a intensidade bem mais baixa do que aquela observada no espectro da xilana. Em contrapartida,

a banda em 1362 cm^{-1} (espectro da xilana) se encontra bem mais intensa no espectro da nanoxilana, além disso o sinal mais forte está deslocado para 1382 cm^{-1} . Situação semelhante se observa na região em torno de 1400 cm^{-1} . Pode-se destacar também que algumas bandas são exclusivas do espectro da nanoxilana: 837 e 1644 cm^{-1}

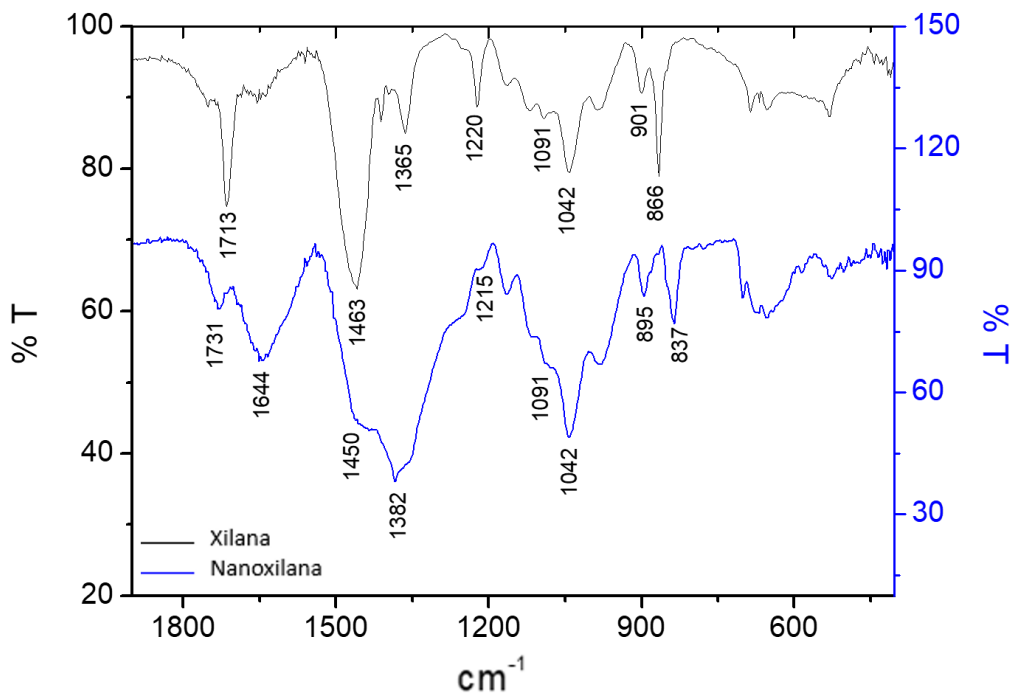


Figura 9 - Espectros de infravermelho da xilana (preto) e nanoxilana (azul) na região de 1900 a 400 cm^{-1} sobrepostos. A figura exposta é um exemplo representativo de três análises.

4.5 Determinação da atividade quelante de íons de ferro da xilana e da nanoxilana.

A fim de comparar uma propriedade já conhecida da xilana com a nanoxilana foi realizado o ensaio de quelação de íons de ferro e os resultados estão expressos em percentagem na Figura 10. Observa-se que a xilana apresentou essa atividade superior à da nanoxilana. A xilana, nas concentrações de $0,001$ e $0,01\text{ mg/mL}$ não apresentou atividade, mas ao atingir a concentração de $0,05\text{ mg/mL}$, esta teve uma atividade máxima em torno de 75% de quelação de ferro, além disso, essa atividade manteve-se constante mesmo com o aumento da concentração para $0,1\text{ mg/mL}$. Já a nanoxilana não apresentou atividade alguma nas concentrações de $0,001$; $0,01$ e $0,05\text{ mg/mL}$, só vindo a apresentar atividade quando se elevou a sua concentração testada ($0,01\text{ mg/mL}$). Entretanto, nessa concentração a atividade não alcançou valores elevados, atingindo cerca de 20% de quelação de ferro.

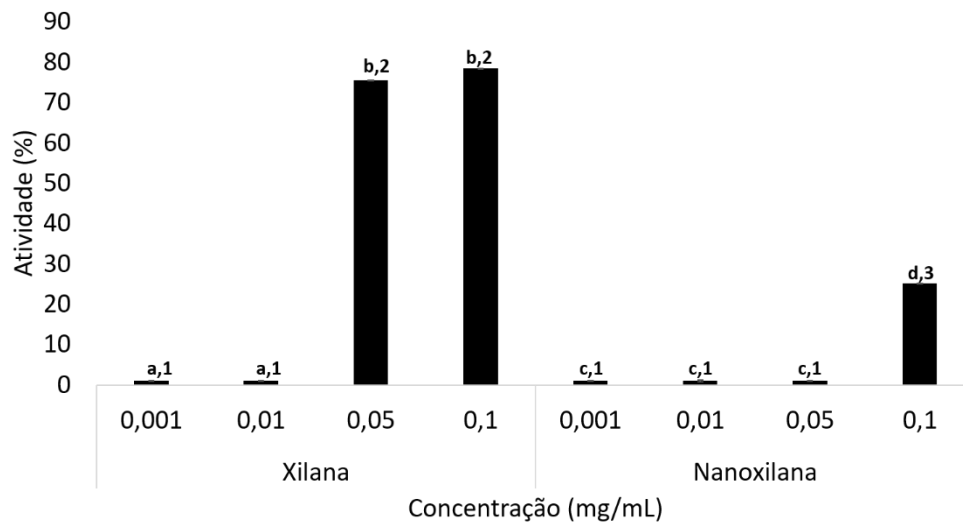


Figura 10 - Porcentagem de quelação de ferro da xilana e da nanoxilana. ^{a, b, c e d} Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre a mesma concentração da xilana e nanoxilana. ^{1, 2 e 3} Números diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre as diferentes concentrações $P < 0,01$.

4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana da xilana e da nanoxilana.

4.6.1 Avaliação do efeito da xilana e da nanoxilana frente a forma promastigota *L. amazonensis*.

A fim de identificar a atividade antileishmania, as formas promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas com xilana e nanoxilana nas concentrações de 5,0; 15,0; 25,0; 50,0 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados são mostrados na figura 11. A xilana apresentou uma baixa atividade antiparasitária, chegando ao máximo em torno de 22% de inibição dos parasitas, já na primeira concentração testada (5 $\mu\text{g/mL}$), porém essa atividade não aumentou mesmo com o aumento das concentrações. Por outro lado, quando se utilizou a nanoxilana, observou-se uma diminuição gradual na sobrevivência do parasita de 20% na concentração de 5,0 $\mu\text{g/mL}$, 40% na concentração de 15,0 $\mu\text{g/mL}$ e chegou ao máximo de 50% na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, esse valor não variou mais, mesmo com o aumento da quantidade de nanopartículas até a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$.

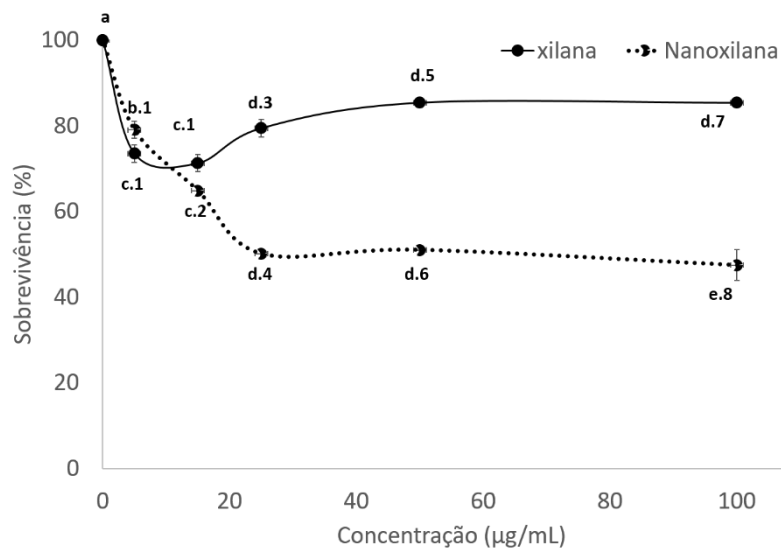


Figura 11 - Taxa de sobrevivência *L. amazonensis* na forma promastigota após exposição a diferentes concentrações da xilana e das nanoxilanas. a, b, c, d, e Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre diferentes concentrações da amostra ($P < 0,05$). 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 Números diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre a mesma concentração das amostras ($P < 0,05$).

4.6.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da nanoxilana frente a diferentes fungos.

Para a determinação do efeito da xilana e da nanoxilana sobre a inibição do crescimento fúngico, foram utilizados tempos diferentes de incubação onde *C. albicans* e *C. parapsilosis* a incubação foi de 24 e 48 horas, e para *C. neoformans* utilizou-se o protocolo descrito em métodos. Como não houve diferenças significativas entre os dados obtidos nos diferentes tempos, na Tabela 3 estão expressos apenas os resultados para o tempo de 48 horas. Na tabela 2 observa-se que a concentração inibitória mínima (CIM) da anfotericina B foi diferente para cada espécie de levedura, sendo a espécie mais susceptível a *C. neoformans*, com CIM = 0,125 µg/mL, e a mais resistente a *C. albicans*, com CIM = 0,5 µg/mL. Para o nitrato de prata, a CIM foi semelhante para todas as leveduras testadas, sendo esta a maior concentração observada no experimento (25 µg/mL). A xilana não demonstrou efeito inibitório frente ao crescimento fúngico. Já a nanoxilana apresentou capacidade inibitória para todas leveduras, com CIM de 7,8 µg/mL.

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima (CIM) de Anf B (anfotericina B), Nanoxilana, Xilana e AgNO₃ sobre *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. neoformans* no tempo de 48 horas.

Organismo	CIM (µg/mL)			
	48 h			
	Anf B	Nanoxilana	Xilana	AgNO ₃
<i>Candida albicans</i>	0,5	7,8	nd	25
<i>Candida parapsilosis</i>	0,25	7,8	nd	25
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,125	7,8	nd	25

4.7 Avaliação do efeito da nanoxilana sobre a capacidade de redução do MTT de células 3T3

As células da linhagem 3T3 foram tratadas com nanoxilana e xilana a fim de se avaliar a influência dessas amostras sobre a capacidade das células em reduzir o MTT. Os resultados obtidos são expostos na Figura 12.

As amostras testes foram aplicadas em diferentes concentrações e nenhuma das concentrações testadas influenciaram na capacidade das células reduzirem o MTT de forma significativa.

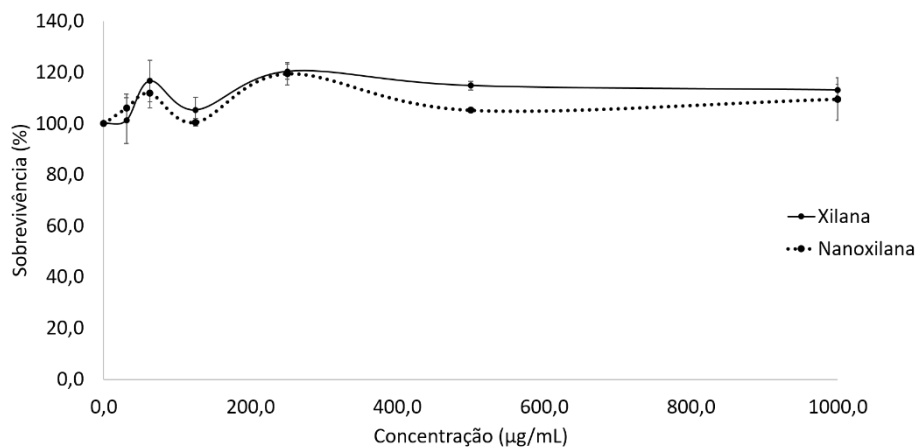


Figura 12 - Capacidade redutora de MTT a formazan de células 3T3 (fibroblasto murino) incubadas com xilana e nanoxilana por 24 horas. Não houve diferença estatisticamente significativa.

5. DISCUSSÃO

A extração realizada por solventes combinada a ondas de ultrassom já é um processo muito utilizado, em que usa energia acústica e solventes para extrair compostos de matrizes de várias plantas (EBRINGEROVÁ *et al.*, 2010). Diversos autores ao fazerem estudos de comparação de eficiência de métodos de extração de polissacarídeos, mostram o uso de ultrassom no protocolo de extração como um passo importante que aumenta o rendimento da extração dessa molécula. Como exemplo, Fidelis e colaboradores (2014) mostraram que o uso de ultrassom permitir a obtenção de uma maior quantidade polissacarídeos da alga vermelha *Gracilaria birdiae* do que quando se utilizou só maceração, mesmo maceração a quente ou na presença de hidróxido de sódio.

O uso do ultrassom no processo de extração da xilana de sabugo de milho já consolidado pelo grupo em que insere esta dissertação (MELO-SILVEIRA, 2010), inclusive foi desmontado que o uso dessa etapa foi mais eficiente do que quando se utilizou apenas água ou soluções básicas como solventes. Portanto, escolheu-se nessa dissertação utilizar o protocolo de extração de xilana de sabugo de milho proposto por Melo-Silveira (2010). Com isso, ao término da extração, verificou-se que o valor do rendimento ($35,0 \pm 2,0$ %) de polissacarídeo em relação a massa de farinha de sabugo de milho utilizada foi semelhante ao alcançado por Melo-Silveira *et al.* (2012), 40 ± 5 % (w/w) e superior aos 15% obtidos por Ebringerová e colaboradores (1998). Porém, este último não fez uso de solução alcalina no processo de extração, o que pode ter contribuído para o menor rendimento da extração.

A composição, percentual, dos monossacarídeos encontrados no presente estudo (Tabela 2) é semelhante à descrita anteriormente por Melo-Silveira e colaboradores (2012), indicando, portanto, a semelhança química entre os materiais avaliados. O que foi confirmado com as análises de espectroscopia de infravermelho. Com isso, as características biológicas descritas anteriormente para este material devem ser também apresentadas pelo polissacarídeo em estudo neste trabalho. Além disso, os baixos teores de proteínas e compostos fenólicos, indicada a adequação do processo de extração e purificação empregados para a matriz utilizada.

A síntese de nanopartículas de prata é realizada com a utilização de um agente redutor que promova a redução do íon Ag^+ para Ag^0 . Dentre os redutores comerciais frequentemente empregados estão o borohidreto de sódio (NaBH_4) e o citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$). Entretanto, redutores provenientes de fontes naturais também podem ser utilizados, tais como monossacarídeos e extratos de plantas, os quais vem ganhando especial destaque com o advento da química verde.

Particularmente, a formação de nanopartículas de prata utilizando polissacarídeos naturais como agentes redutores acaba por possibilitar a obtenção das nanopartículas contendo o polímero. Aliando, portanto, as características biológicas já descritas na literatura tanto para as nanopartículas de prata quanto para os polissacarídeos em um só material, podem fazer uso do sinergismo entre estes componentes (PÉREZ *et al.* 2017).

No método de síntese proposto neste trabalho é um método de síntese verde descrito por Dipankar e Murugan (2012) e a xilana obtida a partir do sabugo de milho foi usada como agente redutor.

Pode-se observar que a suspensão de nanopartículas (figura 4C) tem uma coloração mais escura que a das outras duas soluções. Isso já foi observado por outros autores e ocorre devido a redução dos íons de prata (DIPANKAR; MURUGAN, 2012; AMORIM *et al.*, 2016). Isso também é apontado como indício de formação de nanopartículas.

A espectroscopia UV-Vis tem sido utilizada como uma ferramenta importante tanto para confirmar a obtenção de nanopartículas (DIPANKAR; MURUGAN, 2012). Portanto, após a síntese da nanopartícula, a solução obtida foi avaliada por esta técnica. Como mostrado na figura 5, observou que na região próxima 469 nm há o máximo de absorção. Esse tipo de comportamento também foi observado por outros autores que sintetizaram nanopartículas de prata (PANDEY *et al.*, 2012). E de acordo com Gurunathan e colaboradores (2013) isso ocorre devido a ressonância da superfície de plasmon, que se forma devido a presença da prata reduzida e causa desvio da luz.

Em relação ao rendimento médio da síntese das nanoxilanas, 36,6% em relação a quantidade material colocado (100 mg de xilana e 10 mg de nitrato prata), até o momento não foi encontrado na literatura relatos sobre o rendimento de nanopartículas, por esse motivo não foi possível realizar comparações com outros trabalhos.

Com relação ao tamanho das nanoxilanas, como foi descrito em resultados, as duas técnicas utilizadas (DLS e MFA), revelaram tamanho médio das nanopartículas diferentes. Quando se utilizou o MFA, o tamanho foi 3 vezes (40,1 nm) menor que o observado utilizando a técnica de DLS ($101,4 \pm 2,7$ nm). Essa discrepância pode ser facilmente explicada pelo processo de preparação da amostra para ser submetida a análise de MFA, neste caso a amostra deve ser desidratada, e, por conseguinte, perde volume o que se reflete no tamanho da partícula. Por outro lado, a análise de DLS é feita em solução aquosa o que impede a desidratação da partícula.

Esse tamanho médio observado por DLS foi muito parecido com aquele observado por Chen *et al.* (2015), que foi em torno de 102,0 nm. Vale salientar que esses autores sintetizaram

nanopartículas de prata com polissacarídeos de parede celular de fungo. Esse tamanho de $101,4 \pm 2,7$ nm é muito interessante, pois de acordo com Coradeghini e colaboradores (2013) e Elsabahy e Wooley (2012), as nanopartículas com tamanhos entre 20 e 200 nm, em suspensão, são particularmente indicadas para possíveis aplicações *in vivo* por apresentarem um tamanho que não causará toxicidade em células normais, passando facilmente nas membranas biológicas.

Uma vantagem da utilização da técnica de MFA é a percepção das formas das nanoxilanas, que se apresentaram com formas arredondadas. Até onde se conseguiu identificar, para todas as nanopartículas de prata sintetizadas com polissacarídeos, o formato arredondado foi o único observado, como por exemplo, para aquelas formadas com goma guan (PANDEY *et al.*, 2012) e quitosana (AKMAZ *et al.*, 2013). O que é um ponto positivo para nanopartículas de prata com polissacarídeo, pois há uma relação entre a forma e a característica citotóxica das nanopartículas, e os dados mostram que as formas arredondadas apresentam menor citotoxicidade comparadas outras formas, como por exemplo, triangulares (PAL *et al.*, 2007).

Após verificar a síntese das nanoxilanas, o seu rendimento e analisar o tamanho dessas partículas, utilizou-se a técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado (ICP OES), para aferir a quantidade de prata presente nas nanoxilanas, e verificou-se que a quantidade de prata na nanoxilana corresponde a 19% do seu peso seco. Com o resultado desta análise foi possível inferir que as nanoxilanas são formadas pela xilana do sabugo do milho com a prata. Existem poucos trabalhos que determinaram a quantidade de prata nas nanopartículas de prata, e com relação com nanopartículas de prata contendo polissacarídeos identificou-se 2 trabalhos. Em um, a quantidade de prata correspondeu a 7% da composição da nanopartícula (AMORIM *et al.*, 2016), já em outro, esse valor variou de 24,65 a 36,24% (VASQUEZ *et al.*, 2016). O que indica, que o teor de prata nas nanopartículas aqui sintetizadas pode ser considerado como aceitável quando comparado com as demais nanopartículas.

Um dado muito importante para esse tipo de partícula é a aferição do tamanho por um período de tempo, que dará indícios da estabilidade da partícula. Como mostrado na figura 7. O tamanho médio das nanoxilanas variou entre $102,3 \pm 1,70$ nm, no primeiro mês, a $100,3 \pm 0,40$ nm no décimo segundo mês, mas não foram detectadas diferenças estatisticamente diferentes entre as medidas realizadas. A estabilidade das nanoxilanas foi bem superior a aquelas descritas para outras nanopartículas de prata, pois a maioria dos trabalhos apresentam essas nanopartículas com estabilidade entre 25 e 90 dias (HUANG; LI, 2014; CHEN *et al.*, 2015; MITTAL *et al.*, 2014). E em apenas dois casos, pelo que se conseguiu identificar, foram apresentados nanopartículas de prata com estabilidade superior a 90 dias, no primeiro caso foi de até seis meses (EL-RAFIE *et al.*, 2013), e de até 14 meses, nesse caso nanopartículas de

fucana (AMORIM *et al.*, 2016). Gunsolus e colaboradores (2015) sugerem que a estabilidade das nanopartículas de prata depende da composição química do agente de revestimento das nanopartículas. Portanto, os dados aqui mostrados indicam que alguns polissacarídeos, como fucanas e xilanas, dão uma maior estabilidade as nanopartículas de prata em comparação a outros compostos. Entretanto, seria interessante que novos trabalhos fossem realizados com outras xilanas e outras fucanas, para confirmação dessa hipótese.

Com o propósito de identificar e confirmar quais as biomoléculas estavam envolvidas na redução da prata e estabilização das nanoxilanas foram realizadas análises de FTIR. Esta técnica é adotada para a pesquisa de grupos funcionais nas amostras e está presente nos trabalhos que utilizam a síntese de nanopartículas a partir de polissacarídeos (NEGREIROS, 2015; CHEN *et al.*, 2015; AMORIM *et al.*, 2016). Os dados da nanoxilana foram comparados com o espectro da xilana, de acordo com as figuras 8 e 9 pode-se visualizar os gráficos com os principais sinais obtidos

Os modos vibracionais observados em 3536 e 3370 cm^{-1} (figura 8) foram atribuídos ao estiramento OH presentes, respectivamente, na xilana e nanoxilana. Estes valores estão condizentes com dados da literatura (SILVERSTEIN *et al.*, 2007), bem como o formato da banda observada, ou seja, uma banda larga e forte na região de 3400-3300 cm^{-1} .

É importante enfatizar que o estiramento O-H livre aparece em frequências maiores devido ser necessário maior energia vibracional. Ainda pode ser visualizado a presença dos estiramentos sp^3 C-H, que normalmente ocorrem em frequências menores que 3000 cm^{-1} , observados em 2927 cm^{-1} na xilana e 2898 cm^{-1} na nanoxilana e visto em também em outros polissacarídeos (BARROSO *et al.*, 2008).

Na figura 9 mostra-se o padrão espectral das amostras na região de 1900-400 cm^{-1} , em que é possível verificar algumas alterações nas frequências de vibração da nanoxilana quando comparadas à xilana. As bandas observadas em 1713 cm^{-1} (xilana) e 1731 cm^{-1} (nanoxilana) podem ser atribuídas à vibração de estiramento C=O dos grupos carboxila do ácido urônico. Estas bandas estão deslocadas entre si, provavelmente devido a presença da prata, além disso, a intensidade da banda 1731 cm^{-1} diminui consideravelmente na presença da prata. Segundo Morzyk-Ociepa e Michalska (2012) esta diminuição na intensidade do pico se dá devido a interação dos C=O com a prata, como também foi mostrado na figura 3. Indicando indiretamente a associação da xilana a prata. Adicionalmente, a frequência vibracional em 1644 cm^{-1} presente na nanoxilana pode ser atribuída a água adsorvida ao polímero compondo a camada de solvatação (AMER *et al.*, 2016).

Segundo He e colaboradores (2013) bandas em torno de 1400 cm^{-1} correspondem a presença da prata reduzida. Contudo, quando se observa o espectro a nanoxilana, verifica-se que a região próxima a 1400 cm^{-1} está bastante alargada, indicando sobreposição de outros modos vibracionais referentes a outros grupos.

As bandas observadas na região de $1463\text{-}1220\text{ cm}^{-1}$ (xilana) e $1450\text{-}1215\text{ cm}^{-1}$ (nanoxilana) estão relacionadas com a deformação angular dos grupos C-H e a vibração de estiramento C-O, respectivamente (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2010). Por sua vez, os modos vibracionais em 1091 cm^{-1} e 1042 cm^{-1} são referentes às vibrações do anel glicosídico, deformação angular C-O-H e deformação axial C-O e C-O-C, respectivamente. Vale ainda ressaltar, as bandas em 901 cm^{-1} (xilana) e 895 cm^{-1} (nanoxilana) que são atribuídas à deformação angular C-H do carbono anomérico da ligação β -glicosídica entre os monossacarídeos (AMER *et al.*, 2016). Segundo Kacurákova e colaboradores (1999), as bandas em 866 cm^{-1} (xilana) e 837 cm^{-1} (nanoxilana) correspondem a presença do anel furano.

Após a caracterização estrutural, verificou-se se as nanoxilanas apresentaram maior atividade do que a xilana utilizada na síntese, ambas as amostras foram avaliadas em 3 atividades, sendo 1 antioxidante e 2 antimicrobianas.

Como mostrado na figura 10 a xilana apresentou uma atividade quelante de ferro superior à da nanoxilana. Esta xilana, na concentração de $0,05\text{ mg/mL}$, teve uma atividade máxima em torno de 75% de quelação de ferro, além disso, essa atividade manteve-se constante mesmo com o aumento da concentração avaliada. A nanoxilana, por sua vez, só apresentou atividade quelante na maior concentração avaliada ($0,01\text{ mg/mL}$), entretanto, essa atividade não alcançou valores elevados, atingindo cerca de 20% de quelação de ferro. Estes dados levam a proposição de que o mecanismo de ação quelação de íons de ferro está inteiramente ligada ao polissacarídeo na sua forma “original”. Como também levam a observação de que a síntese de nanopartículas diminui a atividade de quelação de íons de metais do polissacarídeo. Isso pode ser explicado devido a diminuição dos grupamentos carbonila livres do polissacarídeo quando interagiu com a prata, durante a formação da nanoxilana. Segundo Andersen (1999), esses grupos carbonila são importantes para que o polissacarídeo desempenhe sua atividade quelante de ferro, e a sua perda, mesmo que parcial, diminui essa atividade. Como o que ocorre com as nanoxilanas.

Em comparação com o trabalho de Melo-Silveira (2010), a atividade da xilana relatada por esse autor chegou a 70% de quelação de ferro, porém isso só aconteceu na concentração de 2 mg/mL , portanto a xilana extraída aqui nesse trabalho apresentou uma atividade 40 vezes mais potente que o descrito na literatura, este fato deve ao mecanismo empregado na extração

desse polissacarídeo, que adicionou o método de proteolítico enzimático, para quebra de proteínas, assim como descrito por Fidelis e colaboradores (2014) a atividade do polissacarídeo variou com o método de extração, incluindo a proteólise.

Com relação as atividades antimicrobianas, a primeira testada foi a ação da xilana e das nanoxilanas sobre formas promastigotas da *L. amazonensis*. Os resultados, como mostrado na figura 11, a xilana apresentou uma baixa atividade antiparasitária, chegando ao máximo em torno de 22% de inibição dos parasitas quando testada na concentração de 5 µg/mL. Vale salientar que o aumento da concentração até 100 µg/mL não alterou essa atividade. Até onde sabe-se, esse é o primeiro trabalho que avaliou atividade antileishmaniana de xilana de sabugo de milho. Por outro lado, quando se utilizou a nanoxilana, observou-se uma diminuição do percentual de sobrevivência do parasita, que chegou ao máximo 50% na concentração de 25 µg/mL, esse valor não variou mais, mesmo com o aumento da quantidade de nanopartículas.

Não se encontrou outros trabalhos que avaliaram a atividade antileishmaniana de nanopartículas de prata contendo polissacarídeos. Contudo, pode-se dizer que o resultado aqui obtido foi interessante, pois nanopartículas (20- 30 nm) contendo apenas prata quando incubada com promastigotas inibiram 40% da viabilidade desses parasitas, porém na concentração de 100 µg/mL (JEBALI; KAZEMI, 2013), ou seja, 4 vezes maior do que aquela usada com a nanoxilana.

Pode-se também observar que, diferente do que ocorreu com atividade quelante, a produção da nanoxilana potencializou a ação desse polissacarídeo como agente antileishmaniano e abre um novo uso da xilana. Espera-se que em estudos futuros o mecanismo antileishmaniano da nanoxilana seja melhor esclarecido.

Outra atividade antimicrobiana testada foi o ensaio antifúngico, com 3 diferentes fungos, como é mostrado na tabela 3. Como dito anteriormente a concentração inibitória mínima (CIM) da anfotericina B foi diferente para cada espécie de levedura, sendo a espécie mais susceptível a *C. neoformans*, com CIM = 0,125 µg/mL, e a mais resistente a *C. albicans*, com CIM= 0,5 µg/mL. Porém muitos agentes antimicrobianos são limitados em aplicações clínicas por causa de seus efeitos colaterais, são eles a anfotericina B, fluconazol ou cetoconazol (NASROLLAHI *et al.*, 2011). Com isso, alguns trabalhos buscam em biomoléculas atividades que diminua esse problema. Dentre essas moléculas, as nanopartículas de prata são conhecidas por penetrar em células microbianas e afetar a integridade da membrana. Isso perturba suas funções de poder, como permeabilidade, respiração e liberação de conteúdo celular (PANACEK *et al.*, 2006; CHAUHAN *et al.*, 2013).

Com esse intuito, as nanoxilanas sintetizadas nesse trabalho foram avaliadas e apresentaram capacidade inibitória para todas leveduras (*C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. neoformans*), com CIM de 7,8 µg/mL. Anasane e colaboradores (2016) utilizando nanopartículas de prata, apresentaram um CIM *C. albicans* e *C. tropicalis* (40 µg/mL, para ambos), que revela que as nanoxilanas apresentaram uma atividade 5 vezes mais potente. Outros autores relataram que CIMs de nanopartículas de prata contra dermatofitoses de *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, e *Microsporum gypseum* foram determinados em concentrações de 200, 180 e 170 µg/mL, respectivamente (MOUSAVI *et al.*, 2015). Salvo as diferenças de cada trabalho, os dados aqui observados são animadores, pois colocam as nanoxilanas como agentes mais potentes antifúngicos do que outras nanopartículas de prata.

Para compreender se esse efeito seria dos componentes da nanoxilana, de maneira isolada, seguiu-se os testes na presença da xilana e da Prata. Para o nitrato de prata, a CIM foi semelhante para todas as leveduras testadas, sendo ele aproximadamente 3 vezes menos potente que a da nanoxilana (25 µg/mL). A xilana não demonstrou efeito inibitório frente ao crescimento fúngico. Outra vez, diferente do que aconteceu na atividade de quelante, a produção da nanoxilana potencializou a ação do polissacarídeo como agente antifúngico. Espera-se que em estudos futuros o mecanismo antifúngico da nanoxilana seja melhor esclarecido

O último ensaio realizado, que avaliou a influência da nanoxilana em alterar a capacidade das células 3T3 em reduzir o MTT, foi realizado com intuito de se começar a entender um pouco as propriedades citotóxicas da célula. Um fato interessante foi que não avaliamos a capacidade da prata em afetar capacidade das células 3T3 em reduzir o MTT, porém Sun e colaboradores (2016) descreveram que astrócitos tiveram sua capacidade de reduzir o MTT diminuída em 60% devido a presença de prata no meio de cultura. Já Amorim e colaboradores demonstrou que prata (25 µg/mL) diminui em 50% a capacidade de células de melanoma murinico (B16F10) em reduzir o MTT. O que mostra que a prata é um agente citotóxico. Por outro lado, a nanoxilana não foi. Apesar do teste de MTT ser um teste inicial, pois existem várias limitações com relação a interpretação dos dados obtidos, pode-se afirmar que os dados são promissores e espera-se no futuro realizar outros testes que confirmem a baixa toxicidade da nanoxilana, e por conseguinte, a segura de se usar esta partícula em animais e posteriormente em humanos.

6. CONCLUSÃO

Com os dados obtidos no presente trabalho conclui-se que é possível sintetizar nanopartículas de prata contendo xilana de sabugo do milho. Ainda mais, nanoxilanas sintetizadas possuem características bem definidas, como um diâmetro e formato compatíveis com as aplicações *in vivo*, estabilidade por doze meses, além de conservarem uma natureza química semelhante à da xilana. Estas nanoxilanas se mostraram eficazes no combate aos microrganismos testados, sem alterar, de forma negativa, na capacidade de redução do MTT a formazan pelas células 3T3. Espera-se que estudos futuros venham elucidar os mecanismos de ação antimicrobiana das nanoxilanas e assim deixa-la um pouco mais próxima de ter uma aplicação bem definida.

REFERÊNCIAS

- A. MOITRA, S. KIM, J. HOUZE, B. JELINEK, K. SEONG-GON, P. SEONG-JIN, R. M. GERMAN, M. F. HORSTEMEYER, **Journal of Physics D: Applied Physics**, 41 (2008) 185406.
- ABDELHEDI, O.; NASRI, R.; SOUISSI, N.; NASRI, M.; JRIDI, M. Sulfated polysaccharides from common smooth hound: Extraction and assessment of anti-ACE, antioxidant and antibacterial activities. **Carbohydrate Polymers**. v. 5, n. 152, p. 605-614, 2016.
- Agência EMBRAPA de informação tecnológica. **Arvore do conhecimento (milho)**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONTAG01_8_1_68200511157.html>. Acesso em: 08 Ago 2017.
- AKMAZ, S.; AKMAZ, S.; DILAVER, E.; AD, J.; YASAR, M.; ERGUVEN, O. The Effect of Ag Content of the Chitosan-Silver Nanoparticle Composite Material on the Structure and Antibacterial Activity. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2013, p. 12–18, 2013.
- AMER, H.; NYPELO, T.; SULAEVA, I.; BACHER, M.; HENNIGES, U.; POTTHAST, A.; ROSENAU, T. Synthesis and characterization of periodate-oxidized polysaccharides: dialdehyde xylan (DAX). **Biomacromolecules**, p. 2972–2980, 2016.
- AMORIM, M. O.R.; GOMES, D.L.; DANTAS, L. A.; VIANA, R. L.S.; CHIQUETTI, S. C.; ALMEIDA-LIMA, J.; COSTA, L.S.; ROCHA, H. A. O. Fucan-coated silver nanoparticles synthesized by a green method induce human renal adenocarcinoma cell death. **International Journal of Biological Macromolecules Part A**, v. 93, n. 1, p. 57–65, 2016.
- AMORIM, M.O.R. **Nanopartículas de prata com fucana sintetizadas por método verde induzem morte de células de adenocarcinoma renal humano (786-0)**. Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2016.
- ANASANE, N; GOLINSKA, P; WYPIJ, M; RATHOD, D. Acidophilic actinobacteriasynthesisedsilvernanoarticlesshowedremarkable activity against fungi-causing superficial mycoses in humans. **Mycoses**, v. 59, n. 3. p. 157–66, 2016.
- ANDERSEN, O. Principles and recent developments in chelation treatment of metal intoxication. **Chemical Reviews**, v. 9, n. 1, p. 2683–2710, 1999;
- BAHARARA, J.; NAMVAR, F.; RAMEZANI, T.; HOSSEINI, N.; MOHAMAD, R. Green synthesis of silver nanoparticles using *Achillea biebersteinii* flower extract and its anti-angiogenic properties in the rat aortic ring model. **Molecules**. p. 4624–4634, 2014.
- BARROSO, E. M. A.; COSTA, L. S.; MEDEIROS, V. P.; CORDEIRO, S. L.; COSTA, M. S. S. P.; FRANCO, C. R. C.; NADER, H. B.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. D. O. A non anticoagulant heterofucan has antithrombotic activity in vivo. **Planta Medica**, v. 74, n. 7, p. 712–718, 2008.

BEER, C.; FOLDBJERG, R.; HAYASHI, Y.; SUTHERLAND, D.S.; AUTRUP, H.; Toxicity of silver nanoparticles - nanoparticle or silver ion? *Toxicology letters*. **Elsevier Ireland Ltd.** v.3, n.1, p. 208-286, 2012.

BHATTACHARYA, S.C; ABDUL-SALAM, P; HU-RUNQING; SOMASHEKAR, H.I; RACELIS D.A; RATHNASIRI, P.G; RUNGRAWEE-YINGYUAD. An assessment of the potential for non-plantation biomass resources in selected Asian countries for 2010. **Biomass and Bioenergy**, v. 29, n. 3, p.153-166, 2005.

BUYUKHATIPOGLU, K.; CLYNE, A. M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles change endothelial cell morphology and mechanics via reactive oxygen species formation. *Journal of biomedical materials research*. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**. v. 96, n. 1, p. 186-195, 2011.

CAI, D.; DONG, Z.; WANG, Y.; CHEN, C.; LI, P.; QIN, P.; WANG, Z.; TAN, T. Biorefinery of corn cob for microbial lipid and bio-ethanol production: An environmental friendly process. **Carlos**, v.8, no.2, apr./june, 1998.

CASTELLANO, J.J.; SHAFII, S.M.; KO, F.; DONATE, G.; WRIGHT, T.E.; MANNARI, R.J.; PAYNE, W.G.; SMITH, D.J. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. **International Wound Journal**, v. 4, n. 1, p. 114-22, 2007.

CHAUHAN, R.; KUMAR, A.; ABRAHAM, J.; A biological approach to the synthesis of silver nanoparticles with *Streptomyces* sp. JAR1 and its antimicrobial activity. **Scientia Pharmaceutica**, v. 81, n. 1, p. 607–628, 2013.

CHEN, MEI-CHIN; WONG, HEN-SHENG; LIN, KUN-JU; CHEN, HSIN-LUNG; WEY, SHIAW-PYNG; SONAJE, K.; LIN, YU-HSIN; CHU, CHE-YI; SUNG, HSING-WEN. Biomaterials The characteristics, biodistribution and bioavailability of a chitosan-based nanoparticulate system for the oral delivery of heparin. **Biomaterials**, v. 30, n. 34, p. 6629–6637, 2009.

CHEN, X.; YAN, J.; WU, J. Characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles prepared with a fungal exopolysaccharide in water. **Food hydrocolloids**, v. 2, n. 2, p. 1–6, 2015.

CHO, K.; WANG, X.; NIE, S.; CHEN, Z.; SHIN, D.M. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 5, 2008.

CLEAVER, P.D.; BAILEY, C.; HOLLIDAY, J.C.; Simplified and lower cost methods for culinary-medicinal mushrooms cultivation. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 3, n. 1, p. 14-32, 2012.

CLSI - CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**; Fourth Informational Supplement. CLSI document M27-S4. [s.l: s.n.]. v. 28

CLSI - CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard – third edition**. [s.l: s.n.]. v. 28

CORADEGHINI, R.; GIORIA, S.; GARCÍA, C. P.; NATIVO, P.; FRANCHINI, F.; GILLILAND, D.; PONTI, J.; ROSSI, F. Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts. **Toxicology Letters**, v. 217, p. 205–216, 2013.

COSERI, S.; SPATAREANU, A.; SACARESCU, L.; RIMBU, C.; SUTEU, D.; SPIRK, S.; HARABAGIU, V. Green synthesis of the silver nanoparticles mediated by pullulan. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 9–17, 2015.

DANTAS, L. A.; **Síntese verde de nanopartículas contendo prata e uma fração da alga *Spatoglossum schröderi* composta por ácido algínico e fucana A: caracterização físico-química e avaliação da atividade antiproliferativa frente as células de melanoma (B16F10)**. Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2017.

DIPANKAR, C.; MURUGAN, S. The green synthesis, characterization and evaluation of the biological activities of silver nanoparticles synthesized from *Iresine herbstii* leaf aqueous extracts. *Colloids and surfaces*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 98, n. 1 p. 112–121, 2012.

DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.; REBERS, P.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

EBRAHIMIASL, S.; ZAKARIA, A.; KASSIM, A.; BASRI, S. N. Novel conductive polypyrrole / zinc oxide / chitosan bionanocomposite : synthesis, characterization, antioxidant, and antibacterial activities. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 217–227, 2015.

EBRINGEROVÁ, A., et al. Immunomodulatory activity of acidic xylans in relation to their structural and molecular properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 30, p. 1–6, 2002.

EBRINGEROVÁ, A., HROMFIDKOVÁ, Z. The effect of ultrasound on the structure and properties of the watersoluble corn hull heteroxylan. **Ultrasonics Sonochemistry**. v.4, p.305-309, 1997.

EBRINGEROVÁ, A.; HROMÁDKOVÁ, Z.; HŘIBALOVÁ, V. Structure and mitogenic activities of corn cob heteroxylans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 17(6), p. 327-331, 1995.

EBRINGEROVÁ, A.; HROMÁDKOVÁ, Z.; HŘIBALOVÁ, V. The immunologically active xylan from ultrasound-treated corn cobs: extractability, structure and properties. **Carbohydrate Polymers**, v.37, p.231–239, 1998.

EHMANN, H. M. A.; BREITWIESER, D.; WINTER, S.; GSPAN, C.; KORAIMANN, G.; MAVER, U.; SEGA, M.; KÖSTLER, S.; STANA-KLEINSCHKE, K.; SPIRK, S.; RIBITSCH, V. Gold nanoparticles in the engineering of antibacterial and anticoagulant surfaces. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 34–42, 2015.

EL-RAFIE, H. M.; EL-RAFIE, M. H.; ZAHRAN, M. K. Green synthesis of silver nanoparticles using polysaccharides extracted from marine macro algae. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, n. 2, p. 403–410, 2013.

ELSABAHY, M.; WOOLEY, K. L. Strategies toward well-defined polymer nanoparticles inspired by nature: Chemistry versus versatility. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, v. 50, n. 10, p. 1869–1880, 2012.

FARIED, K. M.; SHAMELI; MIKIO, M. A.; HAJALILOU, K.; ZURIATI, Z. H. Synthesis of silver nanoparticles via green method using ultrasound irradiation in seaweed *Kappaphycus alvarezii* media. **Research on Chemical Intermediates**. v. 42, n. 12, p. 7991–8004, 2016.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nature Reviews Cancer**, v.5, pg.161-171, mar, 2005.

FIDELIS, G. P.; CAMARA, R. B. G.; QUEIROZ, M. F.; COSTA, M. S. S. P.; SANTOS, P. C.; ROCHA, H. A. O.; COSTA, L. S. Proteolysis, NaOH and ultrasound-enhanced extraction of anticoagulant and antioxidant sulfated polysaccharides from the edible seaweed, *Gracilaria birdiae*. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 18511–18526, 2014.

FOLEY, K.M.; VANDER-HOOVEN, D.I.B. **Porperties and industrial uses of corncobs. In: POMERANZ, Y.; MUNCK L. Cereals – a renewable resourse. The American Association of Cereal Chemists**, St. Paul, 1981.

GAN, H. Y.; LEOW, L. E.; ONG, S. T. Utilization of Corn Cob and TiO₂ Photocatalyst Thin Films for Dyes Removal. **Acta Chimica Slovenica**. v. 64, n. 1, p. 144-158, 2017.

GIULIO, M. D.; BARTOLOMEO, S. D.; CAMPLI, E. D.; SANCILIO, S.; MARSICH, E.; TRAVAN, A.; CATALDI, A.; CELLINI, L. The Effect of a Silver Nanoparticle Polysaccharide System on Streptococcal and Saliva-Derived Biofilms. **Molecular Sciences**, v. 14, p. 13615–13625, 2013.

GOVINDARAJU, K.; KRISHNAMOORTHY, K.; ALSAGABY, S. A.; SINGARAVELU, G.; PREMANATHAN, M. Green synthesis of silver nanoparticles for selective toxicity towards cancer cells. **IET Nanobiotechnology**, v. 9, n. 6, p. 325–330, 1 dez. 2015.

GOYAL, P.; SRIVASTAVA, S. Characterization of novel Zea mays based biomaterial designed for toxic metals biosorption. **Journal of Hazardous Materials**. v. 1, n. 72, p. 2-3, 2009.

GUNSOLUS, I. L.; MOUSAVI, M. P. S.; HUSSEIN, K.; CHRISTY, STATES, L. U. Effects of humic and fulvic acids on silver nanoparticle stability, dissolution, and toxicity. **Environmental Science & Technology**. v. 49, n. 1, p. 8078–8086, 2015.

GUPTA, A.; MAYNES.M.; SILVER, S. Effects of halides on plasmid-mediated silver resistance in Escherichia coli. *Appl Environmental Microbiology*. v. 64, n. 12, p. 5042-5045, 1998.

GURUNATHAN, S.; RAMAN, J.; MALEK, S. N. A.; JOHN, P. A.; VIKINESWARY, SABARATNAM. Green synthesis of silver nanoparticles using *Ganoderma neo-japonicum* Imazeki: A potential cytotoxic agent against breast cancer cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 4399–4413, 2013.

HAN, X.; LIU, G.; SONG, W.; QU, Y. Production of sodium gluconate from delignified corn cob residue by on-site produced cellulase and co-immobilized glucose oxidase and catalase. **Bioresource Technology**. 2017.

HASSABO, A. G.; NADA, A. A.; IBRAHIM, H. M. Impregnation of silver nanoparticles into polysaccharide substrates and their properties Polysaccharides Chito + Ag Intensity (a. u.) CMC + Ag CP + Ag Ag MCC + Ag Position [2 θ] (Copper (Cu)). **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 343–350, 2015.

HE, Y.; DU, Z.; LV, H. Green synthesis of silver nanoparticles by *Chrysanthemum morifolium* Ramat. Extract and their application in clinical ultrasound gel. **International Journal of Nanomedicine**. v. 8, p. 1809–1815, 2013.

HUANG, L.; DAI, T.; XUAN, Y.; TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R. Synergistic combination of chitosan acetate with nanoparticle silver as a topical antimicrobial: efficacy against bacterial burn infections. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3432–8, jul. 2011.

HUANG, Y.; LI, X.; LIAO, Z.; ZHANG, G.; LIU, Q.; TANG, J. A randomized comparative trial between Acticoat and SD-Ag in the treatment of residual burn wounds, including safety analysis. **Burns. journal of the International Society for Burn Injuries**. v. 33, n. 2, p. 161–6, 2007.

HUANG, Y. C.; LI, R. Y. Preparation and characterization of antioxidant nanoparticles composed of chitosan and fucoidan for antibiotics delivery. **Marine Drugs**, v. 12, n. 8, p. 4379–4398, 2014.

IMAIZUMI, H. **Suplementação protéica, uso de subprodutos agroindustriais e processamento de milho em dietas para vacas leiteiras em confinamento**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade, 2005. 90p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE confirma safra recorde em 2013 e prevê produção ainda maior em 2014. Sala de imprensa, 09/01/2014. Disponível em: <http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?view=noticia&id=1&busca=1&idnoticia=2561>. Acesso em: 20/07/2014.

JEBALI, A.; KAZEMI, B. Nano-based antileishmanial agents: A toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis. **Toxicology in Vitro**. v. 27, n. 1, p. 1896–1904, 2013.

JENA, P.; MOHANTY, S.; MALLICK, R.; JACOB, B.; SONAWANE, A. Toxicity and antibacterial assessment of chitosan-coated silver nanoparticles on human pathogens and macrophage cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2012, n. 7, p. 1805–1818, 2012.

KACURAKOVA, M.; et al. Characterisation of xylan-type polysaccharides and associated cell wall components by FT-IR and FT-Raman spectroscopies. **Food Hydrocolloids** 13, p.35-41, 1999.

KASSAS, H. Y. El, ATTIA ,A. A. Bactericidal Application and Cytotoxic Activity of Biosynthesized Silver Nanoparticles with an Extract of the Red Seaweed *Pterocladia capillacea* on the HepG2 Cell Line. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.1,p. 1299-1306,2014.

KEMP, M. M.; KUMAR, A.; CLEMENT, D.; AJAYAN, P.; MOUSA, S.; LINHARDT, R. J. Hyaluronan- and heparin-reduced silver nanoparticles with antimicrobial properties. **Nanomedicine**, v. 4, n. 4, p. 421–429, 2010.

KEMP, M. M.; KUMAR, A.; MOUSA, S.; DYSKIN, E.; YALCIN, M.; AJAYAN, P.; LINHARDT, R. J.; MOUSA, S. A. Gold and silver nanoparticles conjugated with heparin derivative possess anti-angiogenesis properties. **Nanotechnology**, v. 20, n. 45, p. 455104, 2009.

KHAN, M. A.; KHAN, T.; NADHMAN, A. Applications of plant terpenoids in the synthesis of colloidal silver nanoparticles. **Advances in colloid and interface science**, v. 234, p. 132-141, 2016.

KIM, K.J.; SUNG, W.S.; SUH, B. K. *et al.* Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. **Biometals**, v.22, e.2, p.235-242, 2009.

KIMURA, R.; ROKKAKU, T.; TAKEDA, S.; SENBA, M.; MORI, N. Cytotoxic Effects of Fucoidan Nanoparticles against Osteosarcoma. **Marine Drugs**, v. 11, p. 4267–4278, 2013.

KLASEN, H.J. **Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses.** *Burnes*, 2000, 26, 117-130.

KOGJE, A.; GHOSALKAR, A. Xylitol production by *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing different xylose reductases using non-detoxified hemicellulosic hydrolysate of corncob. **3 Biotech**. v. 6, n. 2, 127-129, 2016.

KORA, A. J.; BEEDU, S. R.; JAYARAMAN, A. Size-controlled green synthesis of silver nanoparticles mediated by gum ghatti (*Anogeissus latifolia*) and its biological activity. **Organic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, n. 17, p. 1–10, 2012.

KOSTIĆ, M.; ĐORĐEVIĆ, M.; MITROVIĆ, J.; VELINOV, N.; BOJIĆ, D.; ANTONIJEVIĆ, M.; BOJIĆ, A. Removal of cationic pollutants from water by xanthated corn cob: optimization, kinetics, thermodynamics, and prediction of purification process. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 24, n. 21, p. 17790-17804, 2017.

KUMAR, P.; ELVI, S. S.; PRABHA, A. L.; KUMAR, K. P.; GANESHKUMAR, R. S.; GOVINDARAJU, M. Synthesis of silver nanoparticles from *Sargassum tenerrimum* and screening phytochemicals for its antibacterial activity. **Nano Biomedicine and Engineering**, v. 4, n. 1, p. 12–16, 2012.

KUMAR, S. P.; BIRUNDHA, K.; KAVERI, K.; DEVI, K. T. R. Antioxidant studies of chitosan nanoparticles containing naringenin and their cytotoxicity effects in lung cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 78, p. 87–95, 2015.

LEMARCHAND, C.; GREF, R.; COUVREUR, P. Polysaccharide-decorated nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 327–341, 2004.

LIN, Q.; LONG, L.; WU, L.; ZHANG, F.; WU, S.; ZHANG, W.; SUN, X. Evaluation of different agricultural wastes for the production of fruiting bodies and bioactive compounds by medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 97, n. 10, p. 3476-3480, 2017.

LIU, Z.; JIAO, Y.; WANG, Y.; ZHOU, C.; ZHANG, Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1650–1662, 2008.

LOK, C. N.; HO, C. M.; CHEN, R.; HE, Q. Y.; YU, W. Y.; SUN, H.; TAM, P. K. H.; CHIU, J. F.; CHE, C. M. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. **Journal of Proteome Research**. v.5, n.4, p.916-924, 2006

LUNG-SHUO, W.; CHIH-YU, W.; CHIH-HUI, Y.; CHEN-LING, H.; SZU-YU, C.; CHI-YEN, S.; JIA-JUNG, W.; KENG-SHIANG, H. Synthesis and anti-fungal effect of silver nanoparticles–chitosan composite particles. **International Journal of Nanomedicine**. v. 10, n. 1, p. 2685–2696, 2015.

MAHMOUD, M. A. Kinetics studies of uranium sorption by powdered corn cob in batch and fixed bed system. **Journal of Advanced Research**. v. 7, n. 1, p. 79-87, 2016.

MANDAL, A.; SINGH, N.; NAIN, L. Agro-waste biosorbents: Effect of physico-chemical properties on atrazine and imidacloprid sorption. **Journal of Environmental Science and Health B**. v. 5, n. 1, p. 1-12, 2017.

MANIVASAGAN, P.; BHARATHIRAJA, S.; BUI, N. Q.; JANG, B.; OH, Y.-O.; LIM, I. G.; OH, J. Doxorubicin-loaded fucoidan capped gold nanoparticles for drug delivery and photoacoustic imaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 578–588, out. 2016.

MATSUMURA, Y.; YOSHIKATA, K.; KUNISAKI, S.; TSUCHIDO, T. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. **Appl Environmental Microbiology**. V.69, n.7, p.4278-4281, 2003

MELO-SILVEIRA R.F.; et al. In vitro antioxidant, anticoagulant and antimicrobial activity and in inhibition of cancer cell proliferation by xylan extracted from corn cobs. **International Journal of Molecular Sciences (Online)**, v. 13, p. 409-426, 2012.

MELO-SILVEIRA, R.F. **Atividades biológicas de xilana de sabugo de milho**. Natal, 2010.85p. Tese (Mestrado em bioquímica).

MELO-SILVEIRA, R.F. **Xilanas de sabugo de milho como agente antioxidante, citotóxico, anticoagulante e imunomodulador**. Natal, 2014. Tese (Doutorado em bioquímica).

MELO-SILVEIRA, R.F.; et al. Antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extract from a neglected agricultural product: corn cobs. **Molecules**, v. 19(4), p. 5360-78, April, 2014.

MIJNENDONCKX, K.; LEYS, N.; MAHILLON, J.; SILVER, S.; VAN HOUDT, R. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. **Biometals. an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**. 2013.

MITTAL, A. K.; KUMAR, S.; BANERJEE, U. C. Quercetin and gallic acid mediated synthesis of bimetallic (silver and selenium) nanoparticles and their antitumor and antimicrobial potential. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 431, p. 194–199, 2014.

MOHAPATRA, B.; KURIAKOSE, S.; MOHAPATRA, S. Rapid green synthesis of silver nanoparticles and nanorods using Piper nigrum extract. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 637, p. 119-126, 2015.

MOIEMEN, N. S.; SHALE, E.; DRYSDALE, K. J.; SMITH, G.; WILSON, Y. T.; PAPINI, R. Acticoat dressings and major burns: systemic silver absorption. **Burns. journal of the International Society for Burn Injuries**. v. 37, n. 1, p. 27–35, 2011.

MORI, Y., ONO, T., MIYAHIRA, Y., NGUYEN, V. Q., MATSUI, T., & ISHIHARA, M. (2013). Antiviral activity of silver nanoparticle/chitosan composites against H1N1 influenza A virus. **Nanoscale research letters**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2013.

MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMÍREZ, J. T.; YACAMAN, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346–2353, 2005.

MORZYK-OCIEPA, B.; MICHALSKA, D. Vibrational spectra of 1-methyluracilate complex with silver(I) and theoretical studies of the 1-MeU anion. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 59, n. 1, p. 1247–1254, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOUSAVI, S. A. A.; SALAR, S.; HADIZADEH, S. Evaluation of antifungal effect of silver nanoparticles against *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum gypseum*. **Iranian Journal of Biotechnology**; v. 13, n. 4, p. 38–42, 2015.

MULLER, R. H; SHEGOKAR, R.; KECK, C. M. 20 years of lipid nanoparticles (SLN & NLC): present state of development & industrial applications. **Current drug discovery technologies**, v. 8, n. 3, p. 207-227, 2011.

NASROLLAHI, A.; POURSHAMSIAN, K.; MANSOURKIAEE, P. Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi. **International Journal of Nano Dimension**. v. 1, n. 1, p. 233-242, 2011.

NEGREIROS, M. M. F. **Nanopartículas de prata contendo polissacarídeos sulfatados de algas: caracterização química, morfológica e identificação de suas atividades**

antioxidante, bactericida, antiproliferativa e imunomodulatória. Dissertação apresentada ao departamento de bioquímica do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Natal, 2015.

NEL, A.; XIA, T.; MÄDLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science (New York, N.Y.)**, v. 311, n. 5761, p. 622–627, 2006.

ORLOWSKI, P.; TOMASZEWSKA, E.; GNIADK, M.; BASKA, P.; NOWAKOWSKA, J.; SOKOLOWSKA, J.; NOWAK, Z.; DONTEN, M.; CELICHOWSKI, G.; GROBELNY, J. Tannic acid modified silver nanoparticles show antiviral activity in herpes simplex virus type 2 infection. **Plos One**. v. 9, n. 1, p. 1–15, 2014.

PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1712–1720, mar. 2007.

PANDEY, S.; GOSWAMI, G. K.; NANDA, K. K. Green synthesis of biopolymer-silver nanoparticle nanocomposite: An optical sensor for ammonia detection. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 583–589, nov. 2012.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 2, p. 147–166, fev. 2012.

PASSERO, L. F. D.; CASTRO, A. A.; TOMOKANE, T. Y.; KATO, M. J.; PAULINETTI, T. F.; CORBETT C. E. P.; LAURENTI, M. D. Anti-leishmania activity of semi-purified fraction of *Jacaranda puberula* leaves. **Parasitology Research**. v. 101, n. 1, p. 677–680, 2007.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; ENGEL'S. R. G. **A Small Scale Approach to Organic Laboratory Techniques**, Third Ed., Brooks Cole, New York, 2010, ISBN-10: 1439049327.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, N.; GARCÍA-BERNET, D.; DOMÍNGUEZ, J. M. Effects of enzymatic hydrolysis and ultrasounds pretreatments on corn cob and vine trimming shoots for biogas production. **Bioresource Technology**. v. 221, n. 1, p. 130-138, 2016.

QIAN, X.-M.; NIE, S. M. Single-molecule and single-nanoparticle SERS: from fundamental mechanisms to biomedical applications. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 5, p. 912–920, 2008.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. RAO, V.K.; VENKATA, A. Conductive silver inks and their applications in printed and flexible electronics. **The Royal Society of Chemistry Adv.**, v. 5, n. 95, p. 77760–77790, 2015.

RAVEENDRAN, P.; FU, J.; WALLEN, S. L. Completely “Green” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 46, p. 13940–13941, 2003.

RAVEENDRAN, S.; PALANINATHAN, V.; NAGAOKA, Y.; FUKUDA, T.; IWAI, S.; HIGASHI, T.; MIZUKI, T.; SAKAMOTO, Y.; MOHANAN, P. V.; MAEKAWA, T.;

KUMAR, D. S. Extremophilic polysaccharide nanoparticles for cancer nanotherapy and evaluation of antioxidant properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 76, p. 310–319, 2015.

RHIM, J. W.; WANG, L. F.; HONG, S. I. Preparation and characterization of agar / silver nanoparticles composite films with antimicrobial activity. **Food hydrocolloids**, v. 33, n. 2, p. 327–335, 2013.

ROGERS, J. V.; A Preliminary Assessment of Silver Nanoparticle Inhibition of Monkeypox Virus Plaque Formation. **Nanoscale Research Letters**, v. 3, p. 129–133, 2008.

SHIM, J.; LIM, J. M.; SHEA, P. J.; OH, B. T. Simultaneous removal of phenol, Cu and Cd from water with corn cob silica-alginate beads. **Journal of Hazardous Materials**. v. 15, n. 1, p.129-36, 2014.

SILVA, T. H.; ALVES, A.; POPA, E. G.; REYS, L. L.; GOMES, M. E.; SOUSA, R. A.; SILVA, S. S.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Marine algae sulfated polysaccharides for tissue engineering and drug delivery approaches. **Biomatter**, v. 2, n. 4, p. 278–289, 2012.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER. F.X. **Spectrometric identification of organic compounds**. Eighth ed. John Wiley & Sons, New York, 2014, pp 71-88, ISBN 0470616377.

SINGH, P.; KIM, Y. J.; ZHANG, D.; YANG, D. C. Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. **Trends in biotechnology**, v. 34, n. 7, p. 588-599, 2016.

SOEIRO, V.; MELO, K.; ALVES, M.; MEDEIROS, M.; GRILO, M.; ALMEIDA-LIMA, J.; PONTES, D.; COSTA, L.; ROCHA, H. Dextran: Influence of Molecular Weight in Antioxidant Properties and Immunomodulatory Potential. **International Journal of Molecular Sciences (Online)**, v. 17, p. 1340, 2016.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**. v.275, n.1, p.177-182, 2004.

STARK, W. J.; STOESEL, P. R.; WOHLLEBEN, W.; HAFNER, A. Industrial applications of nanoparticles. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 16, p. 5793–5805, 2015.

TRAVAN, A.; PELILLO, C.; DONATI, I.; MARSICH, E.; BENINCASA, M.; SCARPA, T.; SEMERARO, S.; TURCO, G.; GENNARO, R. Non-cytotoxic Silver Nanoparticle-Polysaccharide. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 6, p. 1429–1435, 2009.

TSAI W. T.; CHANG, C. Y.; WANG, S. Y.; CHANG, C. F.; CHIEN, S. F.; SUN, H. F. Utilization of agricultural waste corn cob for the preparation of carbon adsorbent. **Journal of Environmental Science and Health B**. v. 36, n. 5, p. 677-86, 2001.

United States Department of Agriculture (USDA). Office of Global Analysis. Foreign Agricultural Service, 2017. Circular Series WAP 03-17 March 2017. [Accessed: 10th June 2017].

VACCARO, L. Green Chemistry. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**. v. 12, p. 2763–2765, 2016.

VALDEZ, J.; BAWAGE, S.; GOMEZ, I.; SINGH, S. R. Facile and rapid detection of respiratory syncytial virus using metallic nanoparticles. **Journal of nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, p. 13, 2016.

VASQUEZ, R. D.; APOSTOL, J. G.; LEON, J. D. DE; MARIANO, J. D.; MIRHAN, C. M. C.; PANGAN, S. S.; REYES, A. G. M.; ZAMORA, E. T. Polysaccharide-mediated green synthesis of silver nanoparticles from *Sargassum siliculosum* J.G. Agardh: Assessment of toxicity and hepatoprotective activity. **OpenNano**, v. 1, p. 16–24, 2016.

VENKATPURWAR, V.; POKHARKAR, V. Green synthesis of silver nanoparticles using marine polysaccharide: Study of in-vitro antibacterial activity. **Materials Letters**, v. 65, n. 6, p. 999–1002, 2011.

WANG, J.; ZHANG, Y.; YUAN, Y.; YUE, T. Immunomodulatory of selenium nano-particles decorated by sulfated *Ganoderma lucidum* polysaccharides. **Food and Chemical Toxicology**, v. 68, p. 183–189, 2014.

WEI, H.; CAI, Q.; RAHN, R. O. Inhibition of UV light- and Fenton reaction-induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 1, p. 73–77, 1996.

XIANG, D.; ZHENG, Y.; DUAN, W.; LI, X.; YIN, J.; SHIGDAR, S.; O'CONNOR, M.L.; MARAPPAN, M.; ZHAO, X.; MIAO, Y.; XIANG, B.; ZHENG, C. Inhibition of a/human/hubei/3/2005 (H3N2) influenza virus infection by silver nanoparticles in vitro and in vivo. **International Journal of Nanomedicine**, v.8, p.4103–4114, 2013.

YANG, F.; TANG, Q.; ZHONG, X.; BAI, Y.; CHEN, T.; ZHANG, Y.; LI, Y.; ZHENG, W. Surface decoration by *Spirulina* polysaccharide enhances the cellular uptake and anticancer efficacy of selenium nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 835–844, 2012.

YILMA, A.N.; SINGH, S.R.; DIXIT, S.; DENNIS, V.A. .Anti-inflammatory effects of silver-polyvinyl pyrrolidone (Ag-PVP) nanoparticles in mouse macrophages infected with live *Chlamydia trachomatis*. **International Journal of Nanomedicine**, v.8, p.2421-2432, jul, 2013.

YOKSAN, R.; CHIRACHANCHAI, S. Silver nanoparticles dispersing in chitosan solution: Preparation by γ -ray irradiation and their antimicrobial activities. **Materials Chemistry and Physics**, v. 115, p. 296–302, 2009.

YOUSEFZADIA, M.; RAHIMI, Z.; GHAFORI, V. The green synthesis, characterization and antimicrobial activities of silver nanoparticles synthesized from green alga *Enteromorpha flexuosa* (wulfen) J. Agardh. **Materials Letters**, v.137, pg.1–4, ago, 2014.