

ANDRÉ MARTINS NARCISO

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA
APLICAÇÃO EM ENXERTOS ÓSSEOS DE USO ODONTOLÓGICO**

Dissertação de Mestrado, vinculada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Ambiente e Saúde da Universidade do Planalto Catarinense, apresentado à Banca Examinadora de Defesa.

Orientadora: Profa. Dra. Anelise Viapiana Masiero

Co-orientadora: Dra. Cleonice Gonçalves da Rosa

Linha de pesquisa: Ambiente, Saúde e Sociedade.

LAGES

2020

Ficha Catalográfica

N222d

Narciso, André Martins.

Desenvolvimento de nanopartículas de prata para aplicação em enxertos ósseos de uso odontológico/André Martins Narciso – Lages, SC, 2020.
80 p.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Planalto Catarinense. Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Saúde da Universidade do Planalto Catarinense.

Orientadora: Anelise Viapiana Masiero

Coorientadora: Cleonice Gonçalves da Rosa

1. Biomateriais. 2. Enxertos Ósseos. 3. Implantodontia. 4. Nanopartículas de Prata. I. Masiero, Anelise Viapiana. II. Rosa, Cleonice Gonçalves da. III. Título.

CDD 617.6

Catálogo na Fonte: Biblioteca Central

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA APLICAÇÃO EM ENXERTOS ÓSSEOS DE USO ODONTOLÓGICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ambiente e Saúde da Universidade do Planalto Catarinense, para obtenção do título de Mestre em Ambiente e Saúde.

Aprovada em 28 de abril de 2020.

Banca Examinadora:
Participação remota – Instrução normativa 04/PPGAS/2020

Profa. Dra. Anelise Viapiana Masiero
(Orientadora e Presidente da Banca Examinadora – PPGAS/UNIPLAC)

Profa. Dra. Cleonice Gonçalves da Rosa
(Coorientadora)

Prof. Dr. Jefferson Viapiana Paes
(Examinador Titular Externo – UNIPLAC)

Profa. Dra Bruna Fernanda da Silva
(Examinadora Titular Interna - PPGAS/UNIPLAC)

RESUMO

A nanotecnologia tem revolucionado diversas áreas da saúde, e a sua utilização na odontologia se justifica pela melhoria das propriedades físico-químicas dos materiais. Em especial, nanopartículas de prata sintetizadas por método verde de biorredução, possuem uma grande superfície de contato, com propriedades antimicrobianas e baixa toxicidade. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver nanopartículas de prata para aplicação em enxertos ósseos de uso odontológico. Desta forma, foram avaliadas as propriedades físico-químicas e antimicrobianas de nanopartículas de prata obtidas por biorredução usando folhas de araçá-vermelho (*Psidium catelanium* Sabine), óleo essencial extraído da casca da laranja (*Citrus sinensis*) e óleo essencial de laranja comercial, quando isoladas ou em associação ao enxerto ósseo bovino de uso odontológico. As propriedades físico-químicas de potencial zeta, índice de polidispersão e diâmetro médio foram investigadas nas formulações, e as amostras de nanopartículas com óleo de laranja foram selecionadas para dar prosseguimento ao estudo de atividade antimicrobiana e funcionalização com enxerto ósseo bovino. A análise da atividade antimicrobiana por difusão em disco foi realizada em oito microrganismos usualmente encontrados nas infecções orais. A biorredução do extrato aquoso das folhas de araçá apresentou capacidade antioxidante, atribuída aos compostos fenólicos. As nanopartículas apresentaram um diâmetro médio de $258,3 \pm 5$ nm e índice de polidispersão de 0,300 e estabilidade eleftrorética, com valores de potencial zeta de $-21,0 \pm 4$ mV. A formação das nanopartículas de prata utilizando os dois agentes redutores (extrato de folhas de araçá e óleo essencial de laranja foi confirmada pelo aparecimento de uma banda em 400 nm nos espectros de UV-vis, característicos da Superfície de Ressonância Plasmônica (SPR). No óleo de laranja extraído, o composto majoritário identificado por Cromatografia Gasosa foi o D-limoneno (96,42 %), seguido pelo β -mirceno (1,46 %), linalol (1,25 %) e α -pineno (0,33 %). O diâmetro médio das nanopartículas, observados por Microscopia Eletrônica de Transmissão, variou entre 50 e 80 nm para as nanopartículas com óleo de laranja extraído e comercial, respectivamente. Esses resultados corroboram com os diâmetros obtidos por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS). As nanopartículas obtidas com óleo de laranja extraído apresentaram melhores resultados de estabilidade físico-química no armazenamento, podendo ser atribuído ao maior conteúdo de D-Limoneno na sua constituição. Além disso, as nanopartículas de prata com óleo de laranja apresentaram melhores resultados de atividade antioxidante por dois métodos avaliados: DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico), quando comparados aos óleos essenciais individualizados. Os enxerto ósseos funcionalizado com nanopartículas de prata com óleo de laranja apresentaram maiores ações antagonicas frente aos microrganismos estudados, quando comparados aos óleos essenciais individualizados. Com esses resultados, é possível afirmar que as nanopartículas de prata possuem excelentes propriedades físico-químicas para a utilização como agentes antimicrobianos em biomateriais de uso odontológico.

Palavras chave: Nanopartículas de prata. Enxertos ósseos. Implantodontia. Biomateriais.

ABSTRACT

Nanotechnology has revolutionized several areas of health, and its use in dentistry is justified by the improvement of the physical-chemical properties of materials, in particular, the silver nanoparticles synthesized by the green bioreduction method, have a large contact surface, with properties antimicrobials and low toxicity. In view of the above, the present study aimed to evaluate the physicochemical properties of silver nanoparticles obtained by bioreduction using red araçá leaves (*Psidium catelanium* Sabine), essential oil extracted from orange peel (*Citrus sinensis*) and essential oil from commercial orange. The physical-chemical properties of zeta potential, polydispersity index and average diameter were investigated in the formulations, and samples of nanoparticles with orange oil were selected to continue the study, of antimicrobial activity and functionalization with bovine bone grafts. The bioreduction of the aqueous extract of the leaves of araçá showed antioxidant capacity, attributed to the phenolic compounds. And the nanoparticles had an average diameter of 258.3 ± 5 nm and a polydispersity index of 0.300 and electrophoretic stability, with zeta potential values of -21.0 ± 4 mV. The formation of silver nanoparticles using the two reducing agents (extract of araçá leaves and orange essential oil) was confirmed by the appearance of a band at 400 nm in the UV-vis spectra, characteristic of the Plasmonic Resonance Surface (SPR). In the extracted orange oil, the major compound identified by Gas Chromatography was D-limonene (96.42%), followed by β -myrcene (1.46%), linalool (1.25%) and α -pinene (0.33%). The average diameter of the nanoparticles obtained by Transmission Electron Microscopy, varied between 50 and 80 nm, for the nanoparticles with extracted and commercial orange oil, respectively. These results corroborate with the diameters obtained by DLS. The nanoparticles obtained with extracted orange oil showed better results of physical-chemical stability in storage, which can be attributed to the higher content of D-Limonene in its constitution. In addition, the nanoparticles with orange oil showed better results of antioxidant activity by two methods evaluated: DPPH and ABTS, when compared to individualized essential oils. The nanoparticles with orange oil and the bone grafts functionalized with these nanoparticles, showed greater antagonistic actions compared to the microorganisms studied, when compared to individualized essential oils.

With these results, it is possible to state that silver nanoparticles have excellent physical-chemical properties for use as antimicrobial agents in biomaterials for dermal use.

Keywords: Silver Nanoparticles. Bone Grafts. Implantology. Biomaterials.

LISTA DE FIGURAS

4. SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA USO EM BIOMATERIAIS ODONTOLÓGICOS

Figura 1. Representação do efeito ressonante com um grupo elétron-doador. 28

Figura 2. Mecanismo de síntese nas nanopartículas de prata **Erro! Indicador não definido.**

Figura 3. Processo de formação das nanopartículas de prata sintetizadas com extrato vegetal..... 29

Figura 4. Espectro de UV-visível das AgNPs; b) Imagens de MET das AgNPs. 30

5. ENXERTOS ÓSSEOS BOVINO DE USO ODONTOLÓGICO FUNCIONALIZADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA OBTIDAS POR SÍNTESE VERDE

Figura 1. Mecanismo químico de biossíntese das nanopartículas de prata utilizando D-Limoneno como agente redutor..... 45

Figura 2. a) Micrografia de MET da amostra NPs-OLE; b) espectro de UV-Vis da amostra NPs-OLE..... 47

Figura 3. a) Micrografia de MET da amostra NPs-OLC; b) espectro de UV-Vis da amostra NPs-OLC. 48

Figura 4. Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura: a) enxerto ósseo (EO); b) amostras EO+NPs-OLE; c) amostra EO+NPs-OLC. **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

5. ENXERTOS ÓSSEOS BOVINO DE USO ODONTOLÓGICO FUNCIONALIZADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA OBTIDAS POR SÍNTESE VERDE

Tabela 1. Caracterização química do óleo essencial de laranja por CG/MS 44

Tabela 2. Estabilidade físico-química das nanopartículas de prata obtidas por síntese verde com óleo essencial de laranja, durante 60 dias de armazenamento em temperatura de refrigeração. 49

Tabela 3. Análises de atividade antioxidante por DPPH, ABTS e FRAP..... 51

Tabela 4. Atividade antimicrobiana de diferentes microrganismos frente aos óleos essenciais, as NPs de pratas e dos EO funcionalizados com as NPs. 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ζ	Potencial zeta
Ag-NPT	Nanopartícula de prata
AA	Atividade antioxidante
ANOVA	Análise de variância
CG/MS	Cromatografia Gasosa acoplada ao espectro de massas
DLS	<i>Dynamic light Scatering</i> / Espalhamento de luz dinâmico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EO	Enxerto ósseo
EO+NPs-OLE	Enxerto ósseo funcionalizado com nanopartícula de prata com óleo essencial de laranja extraído
EO+NPs-OLC	Enxerto ósseo funcionalizado com nanopartícula de prata com óleo essencial de laranja extraído
IP	Índice de polidispersão
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NPs	Nanopartícula de prata
NPs-OLE	Nanopartícula de prata com óleo essencial de laranja extraído
NPs-OLC	Nanopartícula de prata com óleo essencial de laranja comercial
OLE	Óleo essencial de laranja extraído
OLC	Óleo essencial de laranja comercial
RPS	Ressonância Plasmônica de Superfície
UV	Ultravioleta
Z-ave	<i>Mean particle size</i> /diâmetro médio de partícula
ζ	<i>Zeta potential</i> /potencial zeta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo geral	12
2.2. Objetivos específicos	12
3. REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1 Usos de enxertos ósseos na Odontologia	13
3.2 Tipos de enxertos ósseos	13
3.2.1 Enxertos ósseos autógenos	14
3.2.2 Enxertos Ósseos Alógenos ou Homogêneos	15
3.2.3 Enxertos Ósseos Heterogêneos	15
3.2.4 Enxertos Aloplásticos	16
3.3 Princípios biológicos para o sucesso dos enxertos ósseos	16
3.4 Origem dos insucessos: Infecções e Rejeições	17
3.5 Nanotecnologia aplicada a Odontologia	19
4. SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA USO EM BIOMATERIAIS ODONTOLÓGICOS.	22
4.1 Resumo	22
4.2 Abstract	22
4.3 Introdução	23
4.4 Material e Métodos	25
4.4.1 Caracterização das folhas de araçá vermelho (<i>Psidium Cattleianum</i> Sabine)	26
4.4.2 Síntese e caracterização das nanopartículas de prata	26
4.5 Resultados e Discussão	27
4.6 Conclusão	31
4.7 Referências	31
5. ENXERTOS ÓSSEOS BOVINO DE USO ODONTOLÓGICO FUNCIONALIZADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA OBTIDAS POR SÍNTESE VERDE	34
5.1 Resumo	34
5.2 Abstract	35
5.3 Introdução	36
5.4 Material e métodos	39
5.4.1 Material	39
5.4.2 Extração e caracterização do óleo essencial	39

5.4.3 Biossíntese das nanopartículas de prata (NPs)	40
5.4.4 Espectroscopia no UV-Vis das NPs	40
5.4.5 Análises morfológicas das NPs	40
5.4.6 Estabilidade físico-química das NPs	41
5.4.7 Atividade antioxidante das NPs.....	41
i) DPPH	41
ii) ABTS	42
iii) FRAP	42
5.4.8 Ensaio <i>in vitro</i> dos enxertos ósseos funcionalizado com as NPs	42
5.4.9 Atividade antimicrobiana	42
5.4.10 Análises morfológicas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	43
5.4.11 Avaliações estatísticas	43
5.5 Resultados e Discussão.....	44
5.5.1 Caracterização do óleo essencial de laranja extraído (OLE).....	44
5.5.2 Mecanismo químico de biossíntese das NPs	45
5.5.3 Espectroscopia no UV-vis e Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	46
5.5.4 Estabilidade físico-química das NPs	49
5.5.5 Atividade antioxidante das NPs.....	51
5.5.6 Ensaio <i>in vitro</i> dos enxertos ósseos funcionalizado com NPs.....	52
i) Atividade antimicrobiana	52
ii) Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	54
5.6 Conclusão	57
5.7 Referências	58
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
REFERÊNCIAS GERAIS	64
ANEXO A - Artigo “Síntese Verde de Nanopartículas de Prata para uso em Biomateriais Odontológicos” publicado na “Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde”	69

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma ciência interdisciplinar e multidisciplinar que visa contribuir com inovações para a solução de problemas enfrentados pela sociedade, nas diferentes áreas do conhecimento, com aplicações em nanomateriais, nanoeletrônica, nanofotônica, nanobiotecnologia, *nanofoods*, nanoenergia, nanoambiente, entre outras (CADIOLI; SALLA, 2015). A nanociência tem por princípio trabalhar nos níveis atômicos, moleculares e supramoleculares a fim de entender, criar e usar a estrutura de materiais, dispositivos e sistemas com novas propriedades e funções resultantes de suas pequenas estruturas (ROCCO; WILLIAMS; ALIVISATOS, 2000).

Todos os sistemas biológicos e os criados pelo homem têm o primeiro nível de organização em nanoescala, ou seja, esta já é a forma que a natureza se organiza em seus sistemas vivos e ambientes (ROCCO; WILLIAMS; ALIVISATOS, 2000). A nanobiotecnologia é definida como um campo que aplica princípios e técnicas em nanoescala para entender e transformar biosistemas (vivos ou não vivos) e que utiliza princípios biológicos e materiais para criar novos dispositivos e sistemas integrados a partir de escalas nanométricas (ROCCO; WILLIAMS; ALIVISATOS, 2000).

Especificamente na Odontologia, a nanotecnologia tem contribuído para melhorar as propriedades mecânicas e físicas dos materiais, introduzindo novas modalidades diagnósticas e sistemas de carregamento de nanopartículas (KANAPARTHY; KANAPARTHY, 2011). Dentre as áreas de aplicação na Odontologia destacam-se: Semiologia, Odontologia Preventiva, Materiais Dentários, Prótese, Endodontia, Dentística, Periodontia, Implantodontia e Odontologia Regenerativa (ALKAHTANI, 2018).

Neste trabalho, foi investigada a aplicabilidade da nanotecnologia na área da Implantodontia e Cirurgia Bucomaxilofacial. A capacidade de regeneração óssea utilizando enxertos com osso liofilizado pode ser limitada quando ocorre uma ação bacteriana no local, ou até mesmo totalmente perdida. A maioria do defeito ósseo está relacionada com alguma forma de lesão patológica, perda precoce dos elementos dentais, histórico de trauma maxilofacial ou infecção crônica de origem bacteriana (AMROLLAHI *et al.*, 2016).

Entretanto, é preciso considerar que as bactérias são de extrema importância para a vida no planeta, pois sem elas não existiria vida da forma que conhecemos. Mas ao mesmo tempo, quando esta relação com o ser humano não ocorre de forma

harmônica (simbiose), estabelecem-se os problemas. Em particular, na Odontologia, elas são responsáveis pelos principais problemas bucais (cárie, doença periodontal, infecção endodôntica). Especificamente na área de cirurgia bucomaxilofacial e implantodontia podem comprometer implantes, áreas de enxerto ósseo, grandes cirurgias de reconstruções ósseas (ELLINGTON *et al.*, 2003; ALKAHTANI, 2018;).

Partindo do pressuposto que na maioria das vezes nas cirurgias de enxertos ósseos (seja por biomateriais ou blocos de osso humano), faz-se necessário realizar a antibioticoterapia pré e pós operatória, com a finalidade de evitar a infecção bacteriana, que levaria ao insucesso e perda do enxerto. Mesmo com o uso de antibióticos sistêmicos, em determinadas situações o insucesso ocorre pela infecção que pode ter variadas causas: bactérias resistentes, não colaboração do paciente no cuidado pós-operatório, descuido do profissional com a cadeia asséptica. Nestas situações é necessária nova reintervenção cirúrgica e longos períodos de antibioticoterapia sistêmica (ALYAHYA; SWENNEN, 2019).

Neste contexto, o uso de novos materiais odontológicos com propriedades regenerativas e antimicrobianas tem sido investigadas, com destaque para os biomateriais contendo nanopartículas de prata, produzidas sem a utilização de solventes tóxicos e a geração de resíduos químicos, diminuindo os riscos à saúde (SONG; KIM, 2009; LU *et al.*, 2016).

Dentre os critérios, para implantar os métodos da química verde, inclui o uso de matéria-prima oriunda de fontes renováveis e a síntese de produtos atóxicos, são aspectos relevantes para desenvolver e produzir um novo produto, pois espera-se que o processo seja economicamente viável e sustentável, sem gerar substâncias tóxicas no meio ambiente (MANAHAN, 2006).

Portanto, a biossíntese de nanopartículas de prata obtidas por bioedução de extratos naturais de plantas, como as folhas de araçá *Psidium catelanium* Sabine e óleo essencial da casca da laranja (*Citrus sinensis*), atendem aos princípios da química verde (SANA; DOGIPARTHI, 2018).

O mecanismo geral para a redução dos íons de prata e a consequente formação das nanopartículas de prata, por meio da síntese verde, consiste na doação de elétrons de um agente antioxidante. Ao doar um elétron para a prata oxidada (Ag^+), que se transforma em prata reduzida (Ag^0), o composto antioxidante “oxidado” é estabilizado por ressonância (NUNES *et al.*, 2018). Dessa forma, é de extrema importância avaliar as

propriedades físico-químicas dos compostos naturais e das nanopartículas, para a sua posterior aplicação em materiais odontológicos.

Diante do exposto, o presente trabalho se caracteriza como uma pesquisa interdisciplinar inter-relacionando diferentes ciências com um objetivo comum que é o desenvolvimento de um novo material com biodisponibilidade para uso odontológico.

A inovação do trabalho é confirmada pela inexistência na literatura de relatos sobre a funcionalização de enxertos osséos heterogêneos com nanopartículas de prata obtidas por síntese verde. Espera-se potencializar a ação antimicrobiana nas áreas de infecção óssea, e contribuindo para: (a) diminuição do uso de antibiótico sistêmico; (b) diminuição de reintervenções cirúrgicas; (c) potencialização do reparo ósseo. Dessa forma, expõe-se o paciente a menos riscos, e contribui-se para sucesso das cirurgias e consequentemente, qualidade de vida dos pacientes (ALYAHYA; SWENNEN, 2019) e consequentemente, contribui-se com o desenvolvimento da ciência e tecnologia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver nanopartículas de prata para aplicação em enxertos ósseos de uso odontológico.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar o extrato de araçá vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) e o óleo essencial da casca da laranja (*Citrus sinensis*).
- Sintetizar e caracterizar as nanopartículas de prata obtidas por biorredução com araçá vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) e o óleo essencial da casca da laranja (*Citrus sinensis*).
- Verificar o potencial antibimicrobiano das nanopartículas de prata frente aos principais microrganismos envolvidos com as infecções odontogênicas.
- Avaliar as propriedades antimicrobianas das nanopartículas de prata associada a enxerto ósseo bovino liofilizado.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A presente seção tem por propósito apresentar a indicação para o uso de enxertos ósseos e os diferentes tipos de enxertos utilizados na odontologia, bem como os princípios biológicos para o sucesso dos enxertos ósseos. Ainda, para os casos insatisfatórios, quais as formas de tratamentos convencionais. Por fim, será discorrido a respeito da aplicação da nanotecnologia na odontologia e a possibilidade de uso nas áreas de Cirurgia Bucomaxilofacial e Implantodontia.

3.1 Usos de enxertos ósseos na Odontologia

Atualmente a reposição dos elementos dentais através de implantes dentários tornou-se uma prática comumente utilizada, devido à redução dos custos e o aumento no número de profissionais aptos a realizar esses procedimentos (SOUZA *et al.*, 2010). Os principais fatores que contribuem para o sucesso do implante dentário são a quantidade e qualidade do osso no sítio receptor (SOUZA *et al.*, 2010).

Em determinadas situações o reparo pode ser limitado pela extensão do defeito ósseo, dificultando o reparo espontâneo. Nestes casos indicam-se os enxertos ósseos para um melhor prognóstico (CARNEIRO *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2010).

Isto pode ocorrer, por exemplo, quando o paciente possui perda de elemento dental precoce, ou patologias associada à perda ou extração do dente, levando a reabsorção do alvéolo dentário e ossos maxilomandibulares. A falta de estrutura óssea na região impossibilita a colocação direta do implante dentário (SOUZA *et al.*, 2010).

3.2 Tipos de enxertos ósseos

O tecido ósseo é classificado em duas partes, como cortical e medular óssea. A parte cortical óssea consiste em um osso compacto, com arranjo sem cavidades; e a medular óssea, apresenta-se como um osso poroso, com arranjo trabecular, delimitando pequenas cavidades (GARTER; HIATT, 1999).

O enxerto ósseo a ser utilizado para realizar a reconstrução do sítio receptor, depende de vários fatores, como: tipos de enxertos, capacidade de osseointegração dos enxertos (osteoindução e osteocondução), volume de osso necessário, planejamento do cirurgião, saúde, expectativa e poder aquisitivo do paciente (LYFORD *et al.*, 2003).

Dentre os tipos de enxertos ósseos, o osso autógeno (do próprio paciente) é considerado o padrão ouro, por ser o único com propriedades osteogênicas. Porém, faz-

se necessário uma segunda cirurgia para sua retirada, resultando mais desconforto pós-operatório, além limitar a quantidade de tecido (HIROTA *et al.*, 2009). Ainda, tem-se a opção do osso alógeno (oriundo de banco de ossos humanos), osso alógeno ou homogêneos (ossos de outras espécies, como por exemplo, osso bovino) ou heterogêneos que são materiais substitutos ao osso, como a hidroxiapatita (BOSSHARDT; SCHENK, 2010).

3.2.1 Enxertos ósseos autógenos

Os enxertos autógenos são os únicos que se compõem de tecidos do próprio indivíduo. Estes fornecem células ósseas vivas imunocompatíveis, essenciais à osteogênese, que é responsável pela proliferação das células ósseas, em especial do osteóide (BARONE *et al.*, 2009). Assim, quanto mais células vivas forem transplantadas, mais tecido ósseo será formado (BARONE *et al.*, 2009). Com relação à localização dos enxertos autógenos podem ser classificados em Intra-bucais ou Extra-orais. As principais áreas doadoras de enxertos autógenos intra-bucais são a tuber da maxila, mento (sínfise mandibular), ramo da mandíbula (região retro molar) (BARONE *et al.*, 2009).

Na escolha do sítio doador, alguns fatores devem ser levados em consideração, como o bem-estar do paciente, custos econômicos, qualidade óssea, quantidade de osso disponível e nível de morbidade no pós-operatório. Um exemplo a ser citado, é a sínfise mandibular. Esta é considerada uma das melhores áreas intrabucais pela quantidade e qualidade óssea, pois apresenta uma cortical óssea espessa (KUABARA *et al.*, 2000; MISCH, 1997). No entanto, apresenta como complicações a formação de edemas, hematomas, hemorragia, parestesia labial temporária ou definitiva, parestesia dental temporária ou definitiva, apicectomia, e desvitalização pulpar (KUABARA *et al.*, 2000; MISCH, 1997).

Os enxertos autógenos extra-orais, são oriundos de regiões como a calota craniana, osso ilíaco, fíbula entre outros. O osso do ilíaco é o favorito pela maioria dos cirurgiões-dentistas, por apresentar propriedades de osseointegração, como osseindutor, osseocondutor e osseoformador. E apresenta uma porção óssea cortical e medular, utilizado para reconstruções de áreas amplas (KUABARA *et al.*, 2000).

3.2.2 Enxertos Ósseos Alógenos ou Homogêneos

Ainda, tem-se a opção do osso alógeno ou homogêneos (oriundo de banco de ossos humanos), sendo os mais utilizados o osso alógeno desmineralizado, seco e congelado e o osso alógeno seco e congelado. Esses enxertos são biocompatíveis, pois apresentam sucesso no reparo tecidual ósseo e ausência de reações imunológicas. Além disso, possuem funções osteocondutoras, e baixo poder osteoindutivo (CAMMACK *et al.*, 2005; TANAKA *et al.*, 2008).

Os doadores de ossos alógeno ou homogêneo são indivíduos que tiveram morte cerebral (doação consentida pela família), ou pacientes saudáveis que foram submetidos a procedimentos cirúrgicos de remoção de fragmentos ósseos, como artroplastias de quadril. No entanto, a utilização de enxertos homogêneos pode contaminar o paciente receptor com uma possível doença infectocontagiosa presente no doador (ROSS; CAMISA; MICHELIN, 2000; DEL VALLE; CARVALHO; GONZALEZ, 2006).

Com o intuito de reduzir os riscos de contaminações, os hospitais passaram a criar bancos de tecidos musculoesquelético. Dessa forma, os ossos e tecidos são estocados e utilizados de forma regular, garantindo ao paciente e ao cirurgião uma maior segurança e sucesso no procedimento (DEL VALLE; CARVALHO; GONZALEZ, 2006).

3.2.3 Enxertos Ósseos Heterogêneos

Outra opção são os enxertos ósseos heterogêneos, utilizados nas cirurgias de reconstruções ósseas dos maxilares, defeitos ósseos provenientes de perdas dentárias precoces, fenestrações em implantodontia, correção da pneumatização do seio maxilar (levantamento do seio maxilar), aumentar o volume em pequenas áreas da região vestibular da maxila, preenchimento de alvéolos, maxilo mandibulares ou recobrimento de implantes, patologias ou infecções no maxilar (ENCARNAÇÃO *et al.*, 2011).

A matriz óssea bovina é um enxerto heterogêneo muito utilizado com propriedades osteocondutoras. Os enxertos de origem bovina são disponibilizados comercialmente na forma de pó liofilizado ou em blocos, com granulometrias variadas. Além disso, apresentam vantagens como o preço acessível, biocompatível e propriedades osteocondutoras (BETTI, 2004).

Dentre as principais características dos enxertos ósseos heterogêneos, é possível destacar a ausência de matéria orgânica, matriz óssea desprovido do formato original, reabsorvível, denso ou poroso, cristalino ou amorfo. Sua composição química a base de apatita, é composta por carbonatos e grupos hidroxílicos reduzidos, com propriedades osteoindutivas, formando um arcabouço para a neoformação óssea (SOUZA *et al.*, 2010).

Os enxertos ósseos heterogêneos são alternativas ao uso do osso autógeno nas reconstruções ósseas maxilares, apresentando vantagens como maior disponibilidade de material, menor tempo cirúrgico, atenuação nas hemorragias, redução no uso dos anestésico, e bem-estar do paciente no pós-operatório (ROTHAMEL *et al.*, 2009).

3.2.4 Enxertos Aloplásticos

Os enxertos aloplásticos, são constituídos de materiais substitutos ao osso como hidroxiapatitas, fosfato de cálcio, sulfato de cálcio, colágeno. São essencialmente de origem sintética e bicompatível (PALMA, 2004). Podem ser reabsorvíveis ou não reabsorvíveis, inertes e com nenhuma atividade osteoindutora. São enxertos que ganharam aceitação no mercado em razão da facilidade do uso e manipulação, apresentam baixa morbidade do sítio cirúrgico, antigenicidade, fonte ilimitada, redução do tempo cirúrgico, e estão disponíveis em uma variedade de formatos e tamanhos (PALMA, 2004). No entanto, esses materiais estão sujeitos a maiores riscos de rejeição e infecção e levando ao paciente a uma nova intervenção cirúrgica (PALMA, 2004).

3.3 Princípios biológicos para o sucesso dos enxertos ósseos

Os princípios biológicos de osteoindução e osteocondução são fundamentais para o sucesso dos enxertos ósseos (CURY *et al.*, 2002; FRANCISCHONE, 2006). A osteoindução é definida pela capacidade do material em induzir células mesenquimais diferenciadas a se diferenciar em odontoblastos. A osteoindução é regulada por proteínas morfogênicas ósseas, enzima específicas, inibidores de enzimas, fatores de crescimento fibroblástico e fatores de crescimento derivados de plaquetas (CURY *et al.*, 2002; FRANCISCHONE, 2006). A osteocondução consiste em um processo pelo qual o enxerto funciona como um verdadeiro alicerce para a neoformação óssea. Esse processo

ocorre pela invasão das células osteogênitoras e capilares do leito receptor no material enxertado (CURY *et al.*, 2002; FRANCISCHONE, 2006).

Os enxertos autógenos compõem-se de tecidos ósseos do próprio indivíduo. Nesses casos, é realizado um transplante de tecido de células vivas do próprio paciente, ao leito do sítio receptor (BARONE *et al.*, 2009). . Esses enxertos fornecem células ósseas vivas imunocompatíveis, essenciais à osteogênese e responsáveis pela proliferação do osteóide. Assim, quanto mais células vivas forem transplantadas, mais tecido ósseo será formado, favorecendo o sucesso do tratamento (BARONE *et al.*, 2009). No entanto, a utilização de enxertos ósseos autógenos apresenta como desvantagem, a maior incidência de feridas cirúrgicas no sítio doador e tamanho limitado do material possível de doação. (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

3.4 Origem dos insucessos: Infecções e Rejeições

Apesar das taxas de sucesso satisfatórias dos enxertos ósseos a capacidade de regeneração óssea pode ser prejudicada quando ocorre uma ação bacteriana no local (AGHALOO; MOY, 2007).

As bactérias são responsáveis pelos principais problemas bucais tanto em infecções primárias (cárie, doença periodontal, infecção endodôntica) quanto em infecções secundárias (peri-implantite, lesões endodônticas persistentes, entre outras) e rejeições (ELLINGTON *et al.*, 2003). A proteção imunológica do paciente também é de extrema importância para evitar infecções, sendo que quando comprometida o paciente fica mais suscetível às infecções (ELLINGTON *et al.*, 2003).

A maior parte das infecções bucais e maxilofaciais são no seu início de fácil tratamento desde que o paciente procure com brevidade por atendimento, o que muitas vezes não acontece (ELLINGTON *et al.*, 2003). Nestes casos, a infecção pode se estender aos tecidos adjacentes, e nos casos mais sérios levar a uma infecção óssea. Esta por sua vez, já é mais difícil de ser eliminada completamente, particularmente quando acompanhada de grandes defeitos ósseos. O *Staphylococcus aureus* é o principal agente patogênico bacteriano, sendo responsável por 80% da osteomielite humana (ELLINGTON *et al.*, 2003).

Especificamente na área de cirurgia bucomaxilofacial, a presença de infecção pode comprometer implantes, áreas de enxertos ósseos, grandes cirurgias de reconstruções ósseas com a utilização de placas e parafusos (ELLINGTON *et al.*, 2003;

ALKAHTANI, 2018).

As infecções ósseas podem ser agudas ou crônicas, a maior parte das regiões onde se encontra um defeito ósseo está relacionada com alguma forma de lesão patológica, perda precoce dos elementos dentais, histórico de trauma maxilofacial ou infecção crônica de origem bacteriana (AMROLLAHI *et al.*, 2016).

As infecções bacterianas crônicas, como a periodontite e a peri-implantite. São doenças inflamatórias que envolvem dentes naturais e implantes dentários como a perda do osso de suporte em razão de uma contaminação bacteriana. A prevalência de periodontite grave com bolsas periodontais profundas varia de 10% a 15% em adultos (PETERSEN; OGAWA, 2012).

A peri-implantite exhibe uma inflamação mais pronunciada na mucosa do que a periodontite. Além disso, a lesão inflamatória da peri-implantite se estende mais rapidamente para a medula óssea e, portanto, resulta em uma perda óssea mais extensa do que periodontite (HEITZ-MAYFIELD; LANG, 2010). A peri-implantite pode levar ao insucesso dos implantes e causar danos à saúde do paciente, além de aumentar os custos financeiros com os tratamentos e serviços de saúde (HEITZ-MAYFIELD; LANG, 2010). Ambas as doenças têm bactérias patológicas semelhantes, como *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia*, espécies complexas, por exemplo, *Prevotella intermedia* (HEITZ-MAYFIELD; LANG, 2010).

Na maioria das vezes em cirurgias de enxertos ósseos (com uso de biomateriais ou blocos de osso humano), faz-se necessário realizar a antibioticoterapia pré e pós operatória como tratamento convencional, com a finalidade de evitar a infecção bacteriana, uma vez que sua presença, resulta em insucesso e perda do enxerto (ALYAHYA; SWENNEN, 2019). Entretanto, mesmo com o uso de antibióticos sistêmicos, em determinadas situações o insucesso ocorre em razão: da presença de bactérias resistentes, da não colaboração do paciente no cuidado pós-operatório, do descuido do profissional com a cadeia asséptica. Nestas situações é necessária nova reintervenção cirúrgica e longos períodos de antibioticoterapia sistêmica (ALYAHYA; SWENNEN, 2019).

Neste contexto, desenvolver novos sistemas de transporte de agentes antimicrobianos pode ser importante no tratamento destas afecções (ZHANG *et al.* 2010). A nanotecnologia pode surgir como uma aliada importante para potencializar a regeneração óssea. Considerando características antimicrobianas das nanopartículas de prata, com sua aplicação, espera-se potencializar o processo de reparo, reduzir o uso de

antibióticos sistêmicos e consequentemente diminuam o risco de novas reintervenção cirúrgicas (SHRESTHA; KISHEN, 2016).

3.5 Nanotecnologia aplicada a Odontologia

As nanopartículas exibem propriedades que dependem do seu tamanho, forma e morfologia permitindo suas aplicações na indústria farmacêutica (ULLAHA *et al.*, 2016), em biomateriais, (LU *et al.*, 2016) e biosensores (MADURAIVEERAN; SASIDHARAN; GANESAN, 2018). A biosíntese de nanopartículas de prata envolve enzimas, bactérias, fungos, leveduras e extratos de plantas (NUNES *et al.*, 2018; SIDDIQI).

São relatados na literatura diversos estudos utilizando sais e nanopartículas metálicas como agentes antimicrobianos (DHIVYA; AJITA; SELVAMURUGAN, 2015; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2015; LU *et al.*, 2016; CHÁVEZ-ANDRADE *et al.*, 2017). Dentre as nanopartículas, sais de prata e nanopartículas metálicas se destacam como eficientes agentes contra a ação dos microrganismos, tendo sua efetividade comprovada na área odontológica, associados a enxertos ósseos, na engenharia de tecidos, em tratamentos endodônticos e materiais dentários (DHIVYA; AJITA; SELVAMURUGAN, 2015; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2015; LU *et al.*, 2016; CHÁVEZ-ANDRADE *et al.*, 2017). As nanopartículas de prata apresentam excelentes propriedades antimicrobiana, mesmo em estado sólido contra uma ampla variedade de microrganismos, como *B. subtilis*, *E. faecalis*, *V. cholerae*, *E.coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. typhus*, entre outros. As nanopartículas de prata vêm sendo utilizadas como tratamento alternativo na Odontologia, contra bactérias e vírus resistentes a antibióticos, sendo estes causados por mutações, poluição e alterações das condições ambientais (LU *et al.*, 2016).

Estudo realizado por Holla *et al.* (2012) identificou que a concentração inibitória mínima das nanopartículas de pratas é de aproximadamente 0,003 mg.mL⁻¹ para *Fusobacterium nucleatum*, 0,04 mg.mL⁻¹ for *Streptococcus mutans* e 0,5 mg.mL⁻¹ para *Actinomyces oris*.

Dentre os mecanismos de ação antimicrobiana das nanopartículas destacam-se: a atração eletrostática, a adsorção e a penetração na membrana celular da bactéria. A ação das nanopartículas também depende da composição, modificação da superfície, propriedades intrínsecas e tipos de microrganismos (SHRESTHA; KISHEN, 2016;

NUNES *et al.*, 2018).

As nanopartículas de prata por apresentarem tamanho em escala nanométrica, entre 10 a 100 nm, possuem uma grande superfície de contato, sendo capazes de penetrar na membrana celular da bactéria ou aderir na superfície bacteriana. Nunes *et al.* (2018), obtiveram nanopartículas de prata pelo método de biorredução utilizando extrato de *Lippia alba*, sendo a atividade antibacteriana das nanopartículas atribuída à liberação do cátion de prata. O íon Ag^+ permeia e se infiltra através da parede celular das bactérias, formando falhas na mesma. O estudo apontou que em consequência, a parede celular se rompe levando a desnaturação proteica e morte do microrganismo.

Shrestha e Kishen (2016) propuseram em sua revisão que as nanopartículas de prata são capazes de se fixar na superfície da membrana celular por atração eletrostática não permitindo sua permeação e a respiração celular. A camada externa de bactérias gram-negativas é composta de uma camada de lipopolissacarídeo e a interna por uma cadeia polissacarídica linear formando uma rede tridimensional com peptídeos. Ainda, as nanopartículas de prata se acumulam devido à atração entre a carga negativa dos polissacarídeos e carga positiva fraca nas nanopartículas de prata.

A ação das nanopartículas de prata frente às bactérias pode ser desencadeada também pela formação de radicais livres de oxigênio, chamados de ROS. Quando os ROS são produzidos, podem causar ruptura da membrana e afetar a sua permeabilidade (YUSUF *et al.*, 2018).

Pesquisas recentes demostram que a utilização das nanopartículas de prata sintetizadas pelo método verde não apresentam risco à saúde humana, pois sua toxicidade é considerada baixa. A aplicação das nanopartículas de prata (20 $\mu\text{g/mL}$) resultou na melhora de parâmetros clínicos e redução da infecção microbiana, sendo efetivas na prevenção de filmes de tetraciclina em doenças periodontais (SHAWKY *et al.*, 2015), demonstrando aplicação na área odontológica (NISKA *et al.*, 2016). Além disso, as nanopartículas de prata sintetizadas pelo método de biorredução demonstram atividade citotóxica contra células tumorais, em diferentes linhas celulares (KHORRAMI *et al.*, 2018; SHI; SUN; HE, 2018), sendo indicadas para o tratamento de tumores (Sukirtha *et al.*, 2012; Yu-Guo *et al.*, 2018). Senthil *et al.* (2017) relatam que as nanopartículas de prata podem ser usadas como materiais antibacterianos eficazes sem afetar as células epiteliais, provando assim sua não-toxicidade. Desse modo, ao avaliar a toxicidade no modelo da *Artêmia salina*, Shriniwas e Subhash (2017) concluíram que as nanopartículas de prata apresentam LD_{50} de 514.50 $\mu\text{g/ml}$, sendo

considerada como não tóxicas. Além disso, em estudos pré-clínicos, aplicando as nanopartículas de prata em filmes de quitosana. Oryan *et al.* (2018) evidenciaram que o sistema promoveu a epitelização completa na cicatrização de feridas por queimaduras, pois aceleram significativamente o processo de cura, reduzindo as células inflamatórias, aumentando a proliferação, migrações e proliferação de fibroblastos e melhorando a maturação do tecido de granulação. Portanto, podem-se utilizar as nanopartículas de prata em estudos que envolvam a saúde humana, desde que comprovada a sua não toxicidade.

4. SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA USO EM BIOMATERIAIS ODONTOLÓGICOS.¹

4.1 Resumo

A nanotecnologia tem revolucionado diversas áreas da saúde, dentre elas a odontologia. O uso de nanopartículas associada aos materiais odontológicos se justifica pela melhoria das propriedades físico-químicas dos materiais. Em especial nanopartículas de prata sintetizadas pelo método de biorredução possuem uma grande superfície de contato, com propriedades antimicrobianas e características não citotóxicas. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar as propriedades físico-químicas de nanopartículas de prata obtidas por biorredução usando folhas de araçá-vermelho (*Psidium catelanium* Sabine). A formação das nanopartículas de prata (AgNPs) foi confirmada pelo aparecimento de uma banda em 400 nm nos espectros de UV-vis, característicos da Superfície de Ressonância Plasmônica (SPR). As AgNPs apresentaram um diâmetro médio de $258,3 \pm 5$ nm e índice de polidispersão de 0,300 e estabilidade eleftrorética, com valores de potencial zeta de $-21,0 \pm 4$ mV. Os extratos das folhas de *Psidium catelanium* Sabine mostraram boa atividade antioxidante frente à inibição do radical livre DPPH e excelente conteúdo de compostos fenólicos. Os resultados demostram excelentes propriedades físico-químicas das nanopartículas de prata obtidas por biorredução usando folhas de araçá-vermelho com potencial de desenvolvimento de um biomaterial inovador para uso odontológico.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Nanopartículas de prata. Odontologia.

4.2 Abstract

Nanotechnology has revolutionized many areas of health, including dentistry, improving the physicochemical properties of dental materials and developing new ways of diagnosing and treating related diseases. Silver nanoparticles (AgNPs) synthesized by the bioreduction method have a large contact surface with antimicrobial properties and

¹ NARCISO, A. M., PAIM, B., DA ROSA C. G., PAES, J. V., NUNES, M. R., MASIERO, A. V. Síntese verde de nanopartículas de prata para uso em biomateriais odontológicos. **Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde**, v. 9, p. 64-73, 2019.

non-cytotoxic characteristics. Given the exposed, the present work aimed to evaluate the physicochemical properties of silver nanoparticles obtained by bioreduction using leaves of araçá vermelho (*Psidium catelanium* Sabine). The formation of AgNPs was confirmed by the appearance of a band at 400 nm in the UV-vis spectra characteristic of the surface plasmon resonance (SPR). AgNPs had an average diameter of 258.3 ± 5 nm, with a polydispersion index of 0.300 and electrophoretic stability, with zeta potential values of -21.0 ± 4 mV. *Psidium catelanium* Sabine leaf extracts showed good antioxidant activity against DPPH free radical inhibition and excellent phenolic compound content. The results demonstrate the development potential of an innovative biomaterial with non-toxic properties and antimicrobial action to enhance the repair process, reduce the use of systemic antibiotics and reduce the risk of new surgical interventions in dentistry.

Keywords: Nanotechnology. Silver nanoparticles. Dentistry.

4.3 Introdução

A nanotecnologia é uma ciência que estuda estruturas, materiais e partículas, em que uma de suas dimensões está em escala nanométrica (nm) (BUSQUETS; MBUNDI, 2017). A nanociência tem revolucionado diversas áreas da saúde (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007), dentre elas, a odontologia (BAPAT *et al.*, 2018). Neste contexto, íons e nanopartículas metálicas se destacam como agentes antimicrobianos com propriedades atóxicas associados a enxertos ósseos, na engenharia de tecidos, em tratamentos endodônticos (LU *et al.*, 2016; BARUA *et al.* 2017; CHÁVEZ-ANDRADE *et al.*, 2017; NORONHA *et al.* 2017; BAPAT *et al.*, 2018) e no aprimoramento das propriedades físico-químicas dos materiais odontológicos (ALKAHTANI, 2018).

As técnicas comumente empregadas para sintetizar materiais nanoestruturados são chamadas de “*bottom up*” do inglês “de baixo para cima” e “*top down*” do inglês “de cima para baixo” (FERREIRA; RANGEL, 2009). A técnica “*top down*” utiliza processos de ruptura de uma porção maior do material em nanopartículas (FERREIRA; RANGEL, 2009), normalmente partículas obtidas por este método apresentam defeitos em sua estrutura, pois é necessário realizar tensão entre os átomos para produzir as nanopartículas (PIRES, 2013). A técnica “*bottom up*”, consiste no processo de agregação e auto-organização dos átomos e moléculas de metal (FERREIRA;

RANGEL, 2009), sendo que as partículas obtidas por este método geralmente são mais uniformes e homogêneas (PIRES, 2013).

As nanopartículas e os materiais nanoestruturados disponíveis são classificados de acordo com o material de origem (JEEVANANDAM *et al.*, 2018). Nanomaterial a base de carbono, são encontrados em morfologias como tubos ocos, elipsóides ou esferas e são representados por nanotubos de carbono ou nanofibras de carbono. Nanomateriais inorgânicos são representados pelas nanopartículas metálicas, obtidas a partir da redução de sais ou óxidos metálicos. Nanomateriais a base de moléculas orgânicas incluem micelas, lipossomas e nanopartículas poliméricas. Estas estruturas se valem de interações não covalentes (fracas) para a sua automontagem. Por fim os nanocompósitos são estruturas multifásicas, com uma fase na dimensão em nanoescala, que pode combinar nanopartículas com outras nanopartículas ou nanopartículas combinadas com materiais em dimensões maiores (JEEVANANDAM *et al.*, 2018).

Para sintetizar as nanopartículas existem diversos métodos que podem ser empregados, tais como os métodos químicos, os físicos e os biológicos. De maneira geral, os métodos físicos e químicos apresentam limitações, pois envolvem custos elevados, necessita da utilização de agentes redutores altamente poluentes, o que resulta em nanopartículas instáveis e tóxicas à saúde humana, fato que restringe a aplicabilidade (IRAVANI *et al.*, 2014; RAJA; RAMESH; THIVAHARAN, 2017; RAJ; MALI; TRIVEDI, 2018).

A síntese das nanopartículas usando os princípios da “química verde” visa reduzir ou eliminar a geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao meio ambiente. Anastas e Warner (1998) estabeleceram critérios que devem ser seguidos para implantar os métodos da química verde. Dentre os critérios, o uso de matéria-prima oriunda de fontes renováveis e a síntese de produtos atóxicos, são aspectos relevantes para desenvolver e produzir um novo produto, pois espera-se que o processo seja economicamente viável e sustentável, sem gerar substâncias tóxicas no meio ambiente (MANAHAN, 2006).

Neste contexto de síntese de nanopartículas metálicas de maneira rápida, sustentável, economicamente viável e conveniente para uma produção em larga escala, há relatos na literatura de que as nanopartículas podem ser obtidas por bio-redução de extratos naturais de plantas, como as folhas de araquá *Psidium catelanium* Sabine (SANA; DOGIPARTHI, 2018). Ainda, pesquisas recentes demonstram que a utilização das nanopartículas de prata sintetizadas pelo método verde não apresentam risco à saúde

humana, em razão de sua baixa toxicidade (KHORRAMI *et al.* 2018; SHI; SUN; HE, 2018).

O mecanismo geral para a redução dos íons de prata e a consequente formação das nanopartículas de prata, por meio da ação biológica, consiste na doação de elétrons de um agente antioxidante, onde o composto fenólico (flavonoide) reduzido doa um elétron para a prata oxidada (Ag^+), que se transforma em prata reduzida (Ag^0), e o flavonoide “oxidado” é estabilizado por ressonância (NUNES *et al.*, 2018).

Inicialmente o extrato da planta reduz os íons de prata, e estes átomos ficam neutros, com carga zero, em seguida, no processo de nucleação, os átomos sem carga colidem entre si formando um núcleo estável (ALBERNAZ, 2014). Logo após este processo, os átomos colidem novamente e formam partículas maiores (processo de crescimento), finalmente haverá o esgotamento dos íons metálicos e o recobrimento das partículas por compostos presentes no extrato vegetal e promove a estabilização do sistema (ALBERNAZ, 2014). Desta forma, grande parte dos compostos antioxidantes presente no extrato vegetal irá aderir à superfície das nanopartículas, conferindo assim características peculiares e únicas, como atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica (ALBERNAZ, 2014).

Diante do exposto, observa-se que as nanopartículas de prata podem ser utilizadas em estudos que envolvam a saúde humana, desde que comprovada a sua não toxicidade. Assim, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar nanopartículas de prata por biorredução por meio de folhas de araçá-vermelho (*Psidium catelanium* Sabine) e avaliar suas propriedades físico-químicas na perspectiva de associação futura a biomateriais odontológicos.

4.4 Material e Métodos

O experimento caracteriza-se como um estudo experimental conduzido na Universidade do Planalto Catarinense (UNIPLAC), em colaboração com o Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC) e a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), realizado em duas etapas. Na primeira etapa foi realizada a caracterização das folhas de araçá vermelho, e posteriormente foi realizada a síntese e caracterização das nanopartículas de prata.

4.4.1 Caracterização das folhas de araçá vermelho (*Psidium Cattleianum* Sabine)

As folhas da planta de araçá vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) foram coletadas na UNIPLAC, Lages, Brasil (27°48'S, 50°20'W). Primeiramente, as folhas foram secas em estufa com circulação de ar a 40°C por 24 horas e, em seguida trituradas. Para obtenção do extrato aquoso, as amostras trituradas foram homogeneizadas com água destilada e posteriormente aquecidas a 75 °C por 2 minutos na proporção 10 gramas de folha para 100 mL de água e filtradas em papel filtro.

O teor de fenólicos totais foi determinado nos extratos aquosos das folhas de araçá-vermelho utilizando o método descrito por Singleton *et al.* (1999). Como tratamento controle foi utilizada água em substituição aos extratos. Na análise dos compostos fenólicos totais, inicialmente 104 µL de extrato aquoso das folhas foram homogeneizados com 104 µL de reagente Folin-Cicalteau 0,25N. A mistura reagiu por 3 minutos e posteriormente foram adicionados 208 µL de Na₂CO₃ 1N, e reagidos por mais 2h. Decorrido, esse período em repouso a amostra foi analisada em espectrofotômetro UV-Vis Bel Photonics M51 a 725 nm. O teor de fenólicos totais foi quantificado a partir de uma curva de calibração externa em ácido gálico nas concentrações de 0, 20, 50, 100, 200, 300, 350, 450 µg.mL⁻¹. E o teor de fenólicos totais dos extratos foram expressos em mg de ácido gálico por 100 mg de amostra.

A atividade antioxidante dos extratos das folhas de araçá vermelho foi determinada pela capacidade dos compostos presentes nas amostras em inibir o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) de acordo com o método descrito por Brand-Williams *et al.* (1998). Para avaliar a atividade antioxidante, uma alíquota de 1000 µL de amostra foram adicionados a 3,9 mL de DPPH (0,1 mmol.L⁻¹) e analisados após 30 min em espectrofotômetro UV-Vis Bel Photonics M51, em comprimento de onda de 517 nm.

4.4.2 Síntese e caracterização das nanopartículas de prata

As nanopartículas de prata foram sintetizadas pela técnica de bio-redução de acordo com metodologia descrita por Nunes *et al.* (2018). Inicialmente 2 mL da solução de nitrato de prata (3.10⁻⁴ mol.L⁻¹), foi reduzida na presença de 10 mL do extrato aquoso das folhas de araçá vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine).

A formação das nanopartículas foi confirmada a partir da análise de varredura nos comprimento de onda do espectro de UV-VIS realizada em espectrofotômetro UV-visível Bel Photonics M51 usando uma célula de quartzo.

A determinação do tamanho da partícula (Z-ave), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta ζ (mV) das nanopartículas foram obtidos por meio da técnica de espalhamento de luz (DLS), utilizando um equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments). As amostras foram diluídas apropriadamente com água filtrada Milli-Q®, e as medições foram realizadas a 25° C a um ângulo de 173°. Para as medições, as amostras foram colocadas em célula de eletroforese.

A morfologia das nanopartículas de prata foi verificada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), utilizando microscópio JEOL, modelo JEM-1011, operando a 80 kV. A dispersão das nanopartículas foi colocada em grids de cobre revestida de carbono (malha 200 mesh). As grids foram observadas ao microscópio após terem sido secas à temperatura ambiente.

4.5 Resultados e Discussão

Os radicais livres podem ser definido como qualquer espécie molecular que contenham um elétron não emparelhado em um orbital atômico. Muitos radicais são instáveis e altamente reativos. Eles podem doar um elétron ou aceitar um elétron de outras moléculas, comportando-se como oxidantes ou redutores. Essas são espécies altamente reativas, capazes de danificar o núcleo e as membranas celulares, além de reagir com moléculas biologicamente relevantes, como DNA, proteínas, carboidratos e lipídios (LOBO *et al.* 2010).

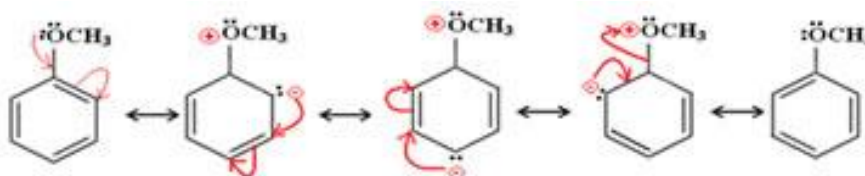
O valor de inibição do radical livre DPPH foi $0,028 \pm 0,001$ mg de Trolox equivalente mL⁻¹ para o extrato das folhas de araçá vermelho. Esse resultado mostra que o extrato de *Psidium cattleianum* Sabine apresenta grande potencial antioxidante. Um antioxidante é uma molécula estável o suficiente para doar um elétron a um radical livre e neutralizá-lo, reduzindo assim sua capacidade de reagir com outras moléculas. Os antioxidantes do extrato de *Psidium cattleianum* Sabine podem interagir com os radicais livres e interromper a reação em cadeia antes que as moléculas vitais sejam danificadas.

O principal mecanismo de atuação dos antioxidantes é a doação de um elétron ao radical livre, sem que o antioxidante se torne um novo radical livre. Os antioxidantes naturais mais proeminentes são os compostos fenólicos (Nunes *et al.* 2018). O resultado de compostos fenólicos totais para o extrato de *Psidium cattleianum* Sabine foi $0,037 \pm$

0,002 mg de ácido gálico equivalente mL⁻¹ de extrato. Estes resultados comprovam que as folhas de araçá possuem compostos fenólicos na sua composição corroborando como os achados de Pereira *et al.* (2018).

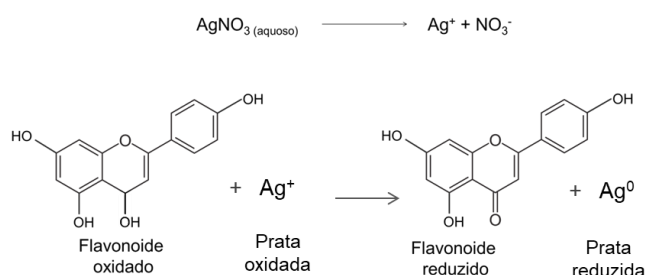
As hidroxilas fenólicas podem atuar como agente redutor, doando prótons (H⁺). A ressonância do anel benzênico mantém o equilíbrio eletrônico da estrutura química (NUNES *et al.* 2018). O efeito ressonante é a atração ou repulsão que ocorre entre os elétrons da ligação π , no anel benzênico. Esse efeito pode ocorrer em ligações π de ligações duplas ou triplas. Se o grupo substituinte for um doador de elétrons, ele realizará a ressonância dentro do anel, isto é, deslocará a carga negativa ao longo do anel benzênico. Um grupo que realiza esse mecanismo é o radical arila (-OCH₃) (HANSEN; KOCH; KLEINPETER, 2018). Na Figura 1 é possível observar que o oxigênio doa elétrons para o anel benzênico, fornecendo mais um contribuinte de ressonância e aumentando a estabilização dela. Isso aumenta a densidade eletrônica no anel, o que faz com que a próxima reação de substituição ocorra com maior velocidade, pois o grupo que irá atacar é eletrofílico (possui carga positiva) e está ávido para ganhar elétrons. Dessa forma, quando um grupo ligante ao anel age dessa forma, como elétron-doador, é chamado de ativante e irá orientar o grupo seguinte para se ligar nas posições *orto* e *para* do anel (HANSEN; KOCH; KLEINPETER, 2018). Estes resultados mostram que os extratos de araçá vermelho podem atuar como agentes redutores, para biosíntese de nanopartículas de prata.

Figura 1. Representação do efeito ressonante com um grupo elétron-doador.



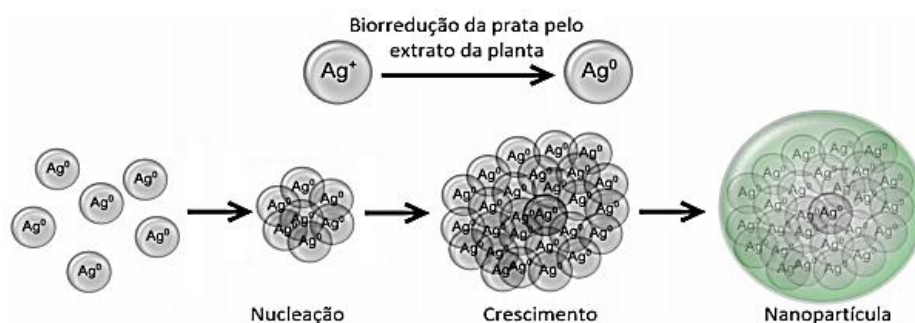
Fonte: Hansen; Koch; Kleinpeter, (2018).

A redução dos íons Ag⁺ presentes na solução de AgNO₃ resultam na formação de nanopartículas metálicas, de acordo com o mecanismo mostrado na Figura 2, proposto por Sana e Dogiparthi (2018).

Figura 2. Mecanismo de síntese nas nanopartículas de prata

Fonte: Sana e Dogiparthi (2018), com modificações.

A formação das AgNPs por nucleação (Figura 3) foi confirmada pelo aparecimento de bandas em 400 nm nos espectros de UV-vis, característicos da superfície de ressonância plasmônica (SPR) das nanopartículas de prata (Figura 4).

Figura 3. Processo de formação das nanopartículas de prata sintetizadas com extrato vegetal.

Fonte: Albernaz (2014).

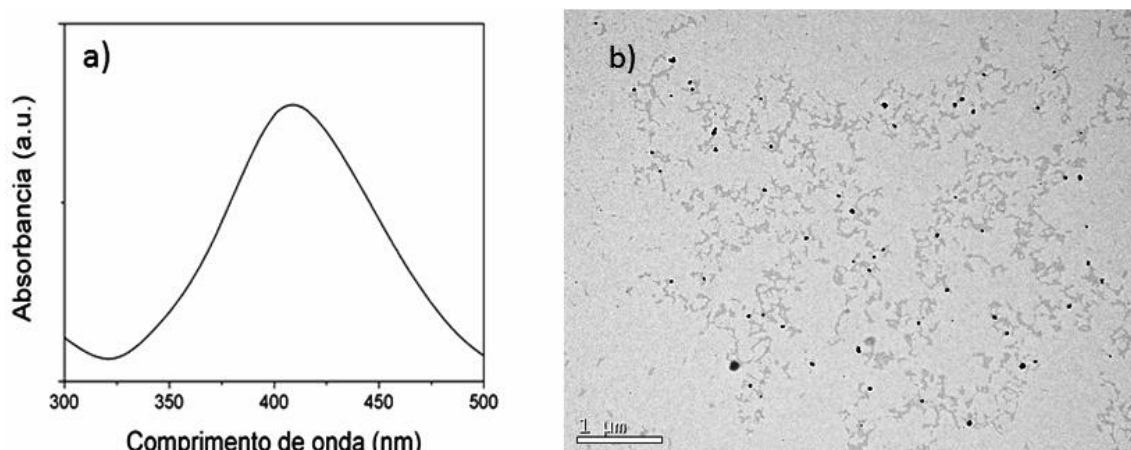
Na Figura 4, são mostradas as imagens de MET das nanopartículas de prata obtidas. Pode-se observar a formação de partículas esféricas com tamanhos extremamente reduzidos. Por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmico do inglês “*Dynamic Light Scattering*” (DLS) foi obtido um diâmetro médio de partícula de $258,3 \pm 5$ nm e índice de polidispersão de 0,300. Estes resultados corroboram com os obtidos por MET, que indicam a formação de partículas pequenas (em escala manométrica) e altamente dispersas, isto é, partículas que não estão aglomeradas, visto que elas apresentam tendência à aglomeração devido à energia superficial resultante dos domínios reduzidos (NUNES *et al.*, 2012). Desta forma se faz necessário a utilização de

agentes estabilizadores para a obtenção de diâmetros mais reduzidos, impedindo a coalescência e aglomeração das partículas (NUNES *et al.*, 2012).

O presente trabalho confirma que o extrato aquoso de arazá vermelho, além de atuar como agente redutor nas nanopartículas, também age como agente estabilizante das mesmas. As nanopartículas obtidas neste trabalho apresentaram estabilidade, com valores de potencial zeta de $-21,0 \pm 4$ mV. Valores de potencial zeta próximos a +30 mV e -30 mV e conferem estabilidade das cargas em uma dispersão de nanopartículas (da ROSA *et al.*, 2015). Uma camada de moléculas adsorvida na superfície das partículas, altera o potencial zeta. O potencial zeta é em função da carga superficial da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio e da natureza e composição do meio que a circunda. Esse potencial reflete a carga efetiva nas partículas, se correlaciona com a repulsão eletrostática entre elas e com a estabilidade da suspensão.

O potencial zeta é um indicador útil da carga das partículas e pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais (da ROSA *et al.*, 2015). Quanto maior ou menor o potencial zeta mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera a tendência natural à agregação (da ROSA *et al.*, 2020).

Figura 4. Espectro de UV-visível das AgNPs; b) Imagens de MET das AgNPs.



4.6 Conclusão

Com o presente estudo, conclui-se que as nanopartículas de prata podem ser obtidas por biorredução, utilizando extrato aquoso de folhas de aracá vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine). Este extrato possui boa atividade antioxidante e elevado conteúdo de compostos fenólicos. Os resultados obtidos por Espectroscopia no UV-Vis, DLS e MET, mostraram partículas com tamanhos reduzidos e estáveis nas condições estudadas. Desta forma observa-se que, estas nanopartículas de prata excelentes propriedades físico-químicas para futuras associações a biomateriais de uso odontológico

4.7 Referências

- ALKAHTANI, R. N. The implications and applications of nanotechnology in dentistry: A review. **The Saudi Dental Journal**, v. 30, p. 107-116, 2018.
- ANASTAS, P.; WARNER, J. **Green Chemistry: Theory and Practice**. New York: Oxford University Press, 1998.
- BAPAT, R. A. *et al.* An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry. **Materials Science and Engineering: C**. v. 91, p. 881-898, 2018.
- BARUA, S. *et al.* Silver Nanoparticles as Antibacterial and Anticancer Materials Against Human Breast, Cervical and Oral Cancer Cells. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 17, p. 968-976, 2017.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, p.25-30, 1995.
- BUSQUETS, R., MBUNDI, L. **Emerging Nanotechnologies in Food Science: Micro and Nano Technologies. Chapter One - Concepts of Nanotechnology**. Amsterdã: Elsevier, p. 1-9, 2017.
- CHÁVEZ-ANDRADE, G. M. *et al.* Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial activity of poly(vinyl alcohol)-coated silver nanoparticles and farnesol as irrigating solutions. **Archives of Oral Biology**, v. 84, p. 89-93, 2017.
- DA ROSA, C. G. *et al.* Application in situ of zein nanocapsules loaded with *Origanum vulgare* Linneus and *Thymus vulgaris* as a preservative in bread. **Food Hydrocolloids**, v. 99, p. 105339, 2020.
- FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1860-1870, 2009.

HANSEN, P. E., KOCH, A., KLEINPETER, E. Ring current and anisotropy effects on OH chemical shifts in resonance-assisted intramolecular H-bonds. **Tetrahedron Letters**, v. 59, p. 2288–2292, 2018.

JEEVANANDAM, J. *et al.* Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 9, p. 1050–1074, 2018.

KHORRAMI, S. *et al.* Selective cytotoxicity of green synthesized silver nanoparticles against the MCF-7 tumor cell line and their enhanced antioxidant and antimicrobial properties. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 8013–8024, 2018.

LOBO, V., PATIL, A., PHATAK, A., CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Review**, v. 4, p. 118–126, 2010.

LU, H. *et al.* Biomaterials with antibacterial and osteoinductive properties to repair infected bone defects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 334, 2016.

MANAHAN, S. E. **Environmental chemistry**. 8. ed. Florida: Boca Raton, 2006.

NORONHA, V. T. *et al.* Silver nanoparticles in dentistry. **Dental Materials**. v. 33, p. 1110-1126, 2017.

NUNES, M. R. *et al.* Antioxidant and antimicrobial methylcellulose films containing Lippia alba extract and silver nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 192, p. 37-43, 2018.

NUNES, M. R. *et al.* Charged silsesquioxane used as a vehicle for gold nanoparticles to perform the synthesis of catalyst xerogels. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 63, p. 258–265, 2012.

PEREIRA, E. S. *et al.* Psidium cattleianum fruits: A review on its composition and bioactivity. **Food Chemistry**, v. 258, p. 95–103, 2018.

RAJ, S.; CHAND MALI, S.; TRIVEDI, R. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using Enicostemma axillare (Lam.) leaf extract. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 503, p. 2814-2819, 2018.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. Nanomedicine: Nanotechnology, **Biology and Medicine**, v. 3, p. 20–31, 2007.

SANA, S. S.; DOGIPARTHI, L. K. Green synthesis of silver nanoparticles using Givotia moluccana leaf extract and evaluation of their antimicrobial activity. **Materials Letters**, v. 226, p. 47–51, 2018.

SHI, T.; SUN, X.; HE, Q. Cytotoxicity of Silver Nanoparticles Against Bacteria and Tumor Cells. **Current Protein and Peptide Science**, v. 19, p. 525 – 536, 2018.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymology**, v. 299, p.152 -178, 1999.

5. ENXERTOS ÓSSEOS BOVINO DE USO ODONTOLÓGICO FUNCIONALIZADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA OBTIDAS POR SÍNTESE VERDE

5.1 Resumo

No presente estudo, enxertos ósseos (EO) bovino de uso odontológico, foram funcionalizados com nanopartículas de prata (NPs) obtidas por biorredução com óleo essencial de laranja extraído (OLE) da casca dos frutos de *Citrus sinensis* e óleo de laranja comercial (OLC). As propriedades físico-químicas e antimicrobianas do óleo essencial de laranja e sua aplicação na biossíntese de NPs, e posterior funcionalização dos enxertos ósseos foram investigados. O OLE foi caracterizado e identificado por Cromatografia Gasosa com detector de espectrometria de massa (CG/MS). A formação das NPs foi confirmada e caracterizada por espectrofotometria de UV-Vis. e por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). A estabilidade físico-química das NPs foi estudada por um período de 60 dias, em temperatura de refrigeração (6 ± 2 °C), quanto ao diâmetro médio de partícula (Z-ave, nm), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (ζ , mV), pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). A atividade antioxidante dos óleos essenciais (OLE e OLC) e das nanopartículas (NPs-OLE e NPs-OLC) foram determinadas pela capacidade dos compostos presentes nas amostras em inibir os radicais DPPH e ABTS e o poder de redução do íon ferro, FRAP. Os EO funcionalizados com as NPs foram caracterizados quanto a morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e por atividade antibacteriana. No OLE, o composto majoritário identificado foi o D-limoneno (96,42 %), seguido pelo β -mirceno (1,46 %), linalol (1,25 %) e α -pineno (0,33 %). O pico de ressonância plasmônica na superfície das NPs foi em 400 nm e o diâmetro médio obtido por TEM variou entre 50 e 80 nm, para NPs-OLE e NPs-OLC, respectivamente. Esses resultados corroboram com os diâmetros obtidos por DLS. NPs-OLE apresentaram melhores resultados de estabilidade físico-química no armazenamento, podendo ser atribuído ao maior conteúdo de D-Limoneno na sua constituição. Além disso, as NPs de pratas apresentaram melhores resultados de atividade antioxidante por dois métodos avaliados: DPPH e FRAP, quando comparados aos óleos essenciais individualizados. As NPs e os enxertos ósseos funcionalizados apresentaram maiores ações antagônicas frente aos microrganismos estudados, do que os óleos essenciais individualizados. Com esses

resultados, é possível afirmar a importância biológica da biossíntese das NPs de prata para utilização como agente antimicrobiano, em biomateriais odontológicos.

Palavras-chaves: Nanopartículas de prata. Enxertos ósseos. Biorredução

5.2 Abstract

In the present study, bovine bone grafts (EO) for dental use were functionalized with silver nanoparticles (NPs) obtained by bioreduction with orange essential oil extracted (OLE) from the peel of *Citrus sinensis* fruits and commercial orange oil (OLC). The physicochemical and antimicrobial properties of orange essential oil and its application in the biosynthesis of NPs, and subsequent functionalization of bone grafts were investigated. OLE was characterized and identified by Gas Chromatography with a mass spectrometry detector (CG / MS). The formation of NPs was confirmed and characterized by UV-Vis spectrophotometry. and Transmission Electron Microscopy (MET). The physical-chemical stability of the NPs was studied for a period of 60 days, in refrigeration temperature (6 ± 2 ° C), regarding the average particle diameter (Z-ave, nm), polydispersion index (IP) and potential zeta (ζ , mV), by the dynamic light scattering (DLS) technique. The antioxidant activity of essential oils (OLE and OLC) and nanoparticles (NPs-OLE and NPs-OLC) were determined by the ability of the compounds present in the samples to inhibit the DPPH and ABTS radicals and the iron ion reduction power, FRAP. The EO functionalized with the NPs were characterized by morphology by Scanning Electron Microscopy (SEM) and by antibacterial activity. In OLE, the major compound identified was D-limonene (96.42%), followed by β -myrcene (1.46%), linalool (1.25%) and α -pinene (0.33%). The plasmon resonance peak on the surface of the NPs was at 400 nm and the average diameter obtained by TEM varied between 50 and 80 nm, for NPs-OLE and NPs-OLC, respectively. These results corroborate with the diameters obtained by DLS. NPs-OLE showed better results of physical-chemical stability in storage, which can be attributed to the higher content of D-Limonene in its constitution. In addition, silver NPs showed better results of antioxidant activity by two methods evaluated: DPPH and FRAP, when compared to individualized essential oils. NPs and functionalized bone grafts showed greater antagonistic actions against the studied microorganisms, than individualized essential oils. With these results, it is possible to affirm the biological importance of the biosynthesis of silver NPs for use as an antimicrobial agent in dental biomaterials.

Keywords: Silver nanoparticles. Bone grafts. Bioreduction

5.3 Introdução

Os seres humanos ao longo da vida são frequentemente infectados por microrganismos, como bactérias, fungos, leveduras e vírus (STOKES *et al.*, 2019). Nas cirurgias bucomaxilofaciais e na prática clínica de implantodontia, quando um enxerto ou um preenchimento ósseo é implantando em um corpo vivo, independente do material e do método de aplicação, poderá ocasionar uma resposta inflamatória do corpo (FARDIN *et al.*, 2010). Dessa forma os processos de infecção não são incomuns durante a cicatrização e osseointegração dos enxertos, devido à dificuldade de penetração dos antibióticos (FARDIN *et al.*, 2010).

Muitas vezes as infecções, e os insucessos nas cirurgias podem ser ocasionados pela natureza do material utilizado (BOYCE; KLEMONS, 2015). Enxertos heterogêneos, a base de hidroxiapatita apresentam algumas desvantagens quando comparados a enxertos ósseos alógenos ou homogêneos (MOUSSA; DYM, 2020). Nos materiais, substitutos ao osso, como a hidroxiapatita, substâncias como proteínas, aminoácidos e outros compostos orgânicos podem ser facilmente absorvidos, levando à adsorção e replicação de bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermis* (WU *et al.*, 2009; BOYCE; KLEMONS, 2015).

Uma forma de tratamento *in loco* é a utilização de antibióticos tópicos (ODENIYI *et al.*, 2020). No entanto, a resistência dos microrganismos a vários antimicrobianos aumentou de forma escalonada pelo uso generalizado de antibióticos tópicos. Idealmente, nenhum antibiótico destinado a uso sistêmico deve ser aplicado topicamente, devido aos riscos de promover resistência ao mesmo (STOKES *et al.*, 2019). A resistência antimicrobiana aos antibióticos disponíveis é um dos principais problemas enfrentados pela saúde global (ODENIYI *et al.*, 2020). Esta constante ameaça tem aumentado a necessidade de novas substâncias com propriedades antimicrobianas.

Diante dessa problemática, devido aos constantes surtos de doenças infecciosas ocasionados por diferentes bactérias patogênicas, e a resistência aos antibióticos, faz-se necessária à busca por novos agentes com propriedades antimicrobianas (ODENIYI *et al.*, 2020). Pesquisas em materiais com propriedades antibacterianas contendo substâncias naturais e inorgânicas têm sido estudados intensivamente (NUNES *et al.*,

2018; MACIEL *et al.*, 2019, NARCISO *et al.*, 2019; de MELLO *et al.*, 2020; SGANZERLA *et al.*, 2020).

Frente a esse cenário, como substitutos aos métodos tradicionais de tratamento com antibióticos, surgem os materiais em nanoescala (BHATTE *et al.*, 2012). Nanopartículas metálicas apresentam características físico-químicas únicas, como alta superfície de contato, ação antimicrobiana e antioxidante, ação efetiva e pouca toxicidade em baixas concentrações (BHATTE *et al.*, 2012).

Dentre as diversas nanopartículas metálicas já sintetizadas, como ouro, platina, zinco, cobalto paládio e titânio, temos as nanopartículas metálicas de prata (ODENIYI *et al.*, 2020). Estas nanopartículas apresentam propriedades inibitórias e antimicrobiana contra bactérias, vírus e fungos (NIRMALA, 2010). A prata é um dos metais mais utilizados na forma de nanopartículas, devido a seu excelente efeito catalítico, boa condutividade elétrica e estabilidade química (VIJAY *et al.*, 2014). Este metal tem sido aplicado em diversos campos da saúde, agricultura e tratamento de água (ODENIYI *et al.*, 2020). A prata tem sido empregada como agente antibacteriano na sua forma iônica, metálica e nanoparticulada (LIM *et al.*, 2018).

As nanopartículas metálicas podem ser sintetizadas por substâncias químicas, físicas e processos biológicos (ODENIYI *et al.*, 2020). Processos químicos empregados na síntese das nanopartículas incluem; sol gel, redução química, condensação (TAHIR *et al.*, 2013). Os processos físicos envolvem ultra-sonicação, pirólise em chama, moagem com bolas ou esferas e ablação a laser, entre outros (FARIAS *et al.*, 2014). Os métodos físico-químicos apresentam inúmeras desvantagens, como alto custo, toxicidade e não biodegradabilidade (GUZMAN *et al.*, 2009).

A síntese verde de nanopartículas de prata usando microrganismos e plantas é uma alternativa aos métodos físicos e químicos (ODENIYI *et al.*, 2020). Essa metodologia apresenta como vantagem, a simplicidade, baixo custo, curto tempo de produção, acessibilidade à produção em larga escala, condições moderadas de operação (pressão e temperatura), eliminação de substâncias e reagentes tóxicos, permitindo suas aplicações *in vivo* (HU *et al.*, 2008; MIEET *et al.*, 2014). Este método consiste em utilizar o princípio de redução ecológica de sais de metais para nanopartículas (de MELLO *et al.*, 2020).

A utilização de microrganismos, na biossíntese de nanopartículas metálicas é limitada, pois existe a necessidade de etapas de purificação, para eliminar os microrganismos após a síntese, levando a perda da capacidade de redução (REDDY *et*

al., 2015). Como alternativa a utilização dos microrganismos, plantas têm sido utilizadas como agentes redutores na biossíntese das nanopartículas metálicas (MACIEL *et al.*, 2019).

A síntese de nanopartículas metálicas a partir extratos de plantas e óleos essenciais tem a vantagem adicional da formação de nanopartículas mais estáveis, visto que as biomoléculas vegetais têm um efeito duplo, de reduzir e recobrir as nanopartículas biossintetizadas atuando como agente estabilizante (ADEBAYO-TAYO *et al.*, 2016). Além disso, as propriedades biológicas intrínsecas dos extratos vegetais e dos óleos essenciais podem ser melhoradas quando combinadas com as nanopartículas metálicas, resultando em um efeito sinérgico devido à combinação dos dois materiais (NUNES *et al.*, 2018).

O óleo de laranja é comumente utilizado na odontologia, como solvente em cimento Guta-percha em tratamento endodôntico, e apresenta vantagens de ser mais biocompatível quando comparado a outros solventes como o xilol e eucaliptol (KARATAŞ *et al.*, 2015). O óleo de laranja tem como componente majoritário, o D-Limoneno (OZTURK *et al.*, 2019). Este composto é o principal responsável, por atribuir ao óleo de laranja propriedades redutoras, antimicrobianas, antidiabéticas, anticâncer, anti-inflamatória, antioxidante, antinoceptiva, antisséptica, anti-hiperalgésico, antiviral e efeitos gastroprotetores e também, como preventivo no desenvolvimento de síndrome metabólica (LI *et al.*, 2018; VIEIRA *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2020).

Estas propriedades benéficas são atribuídas às duplas ligações conjugadas presentes nos terpenóides e estão relacionadas de forma direta ao conteúdo de D-Limoneno no óleo (ALMEIDA; AGUIAR; CARDOSO, 2015). O óleo de laranja, utilizado na odontologia é obtido a partir da casca de laranja doce (MAQUIRA, 2020). Essa matéria-prima apresenta como inconveniente o reduzido conteúdo de D-Limoneno, variando entre 40,9 a 76% (KHAN *et al.*, 2012). Diante disso, óleos essenciais de casca de laranja suco, possuem um conteúdo aproximado de 96 % de D-Limoneno.

Diante disso no presente trabalho, comparou-se como o conteúdo de D-Limoneno em diferentes óleos essenciais, obtidos a partir da casca da laranja, pode influenciar nas propriedades físico-químicas das nanopartículas de prata.

A realização do presente trabalho se justifica pela inexistência de estudos na literatura com a incorporação de nanopartículas de prata, sintetizadas com óleo de laranja em enxertos ósseos homogêneos. Estão disponíveis na literatura, pesquisa

incorporando as nanopartículas de prata em compósitos a base de hidroxiapatita (NIRMALA *et al.*, 2012). No entanto os métodos de síntese das nanopartículas são a base solventes orgânicos tóxicos como N, N-dimetilformamida (NIRMALA *et al.*, 2012).

No presente estudo objetivou-se funcionalizar enxertos ósseos bovinos com nanopartículas de prata sintetizadas por método verde de biorredução, com óleo de laranja extraído e comercial, e avaliar suas características físico-químicas e microbiológicas.

5.4 Material e métodos

5.4.1 Material

Enxerto ósseo bovino natural (EO) (Straumann® Cerabone®), Solvente de Guta-percha - óleo de laranja (OLC) (Maquira), Nitrato de prata (AgNO_3), Cloreto de ferro anidro (FeCl_3), TPTZ (2,4,6-*tris*(2-pyridyl)-s-triazine), Trolox (($\pm$)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico) foram utilizados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.), Agar Mueller-Hinton foi adquirido na HiMedia Laboratories (Mumbai, India) e óleo essencial de laranja extraído (OLE) do subproduto da produção de suco de laranja.

5.4.2 Extração e caracterização do óleo essencial

Foram utilizados como matéria-prima para a obtenção do óleo essencial de laranja (OLE) os subprodutos da produção do suco de laranja (cascas), obtidos no comércio local (Lages-SC), e posteriormente extraídas por arraste de vapor utilizando aparato Clevenger por 6 horas.

O OLE foi caracterizado e identificado por cromatografia gasosa acoplado com detector de espectrometria de massa (CG/MS), modelo GCMS - QP2010 (Shimadzu). Foi utilizada coluna capilar ZB-5MS, 30 m x 0,25 mm x filme 0,25 μm . Temperatura de injetor foi de 250°C, fluxo de gás de arraste hélio de 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O forno do cromatógrafo foi otimizado com temperatura inicial de 60°C por 4 minutos até atingir 210°C, permanecendo por 6 minutos, totalizando 35 minutos no total de corrida cromatográfica. As amostras de óleos foram diluídas 200 vezes em hexano grau

cromatográfico para posterior injeção no CG/MS. A quantificação de cada componente foi determinada pela normalização das áreas (%) dos picos no cromatograma de íons totais (TIC, *Total Ions Chromatogram*), sendo a área total a somatória de todas as áreas dos picos eluídos (100%).

Os índices de retenção foram calculados segundo Van Den Doll; Kratz, (1963) a partir de padrões de n-alcenos (C7-C30), nas mesmas condições cromatográficas das amostras dos óleos essenciais.

A identificação por CG-MS foi baseada na comparação dos espectros de massas com bibliotecas de dados NIST-05, e também pela comparação dos índices de retenção calculados com os encontrados na literatura (bases de dados – WebNIST, GMD).

5.4.3 Biossíntese das nanopartículas de prata (NPs)

As nanopartículas de prata (NPs) foram sintetizadas pela técnica de bioedução na presença do óleo de laranja extraído (OLE) por arraste de valor, denominadas nesse estudo como (NPs-OLE) e o óleo essencial de laranja comercial (OLC) utilizado na odontologia como Solvente de gutta-percha, e denominadas como NPs-OLC, de acordo com metodologia descrita por Nunes *et al.* (2018) e de Melo *et al.* (2020). Inicialmente 30 mL da solução de nitrato de prata (3.10^{-4} mol.L⁻¹), foi reduzido na presença de 3 mL de óleo essencial de laranja, diluído 1:170 em acetona. O pH da suspensão foi ajustado para 9,0 na presença de NaOH 0,1 M, e homogeneizado por 30 min em agitador magnético a 100 °C.

5.4.4 Espectroscopia no UV-Vis das NPs

A análise de espectroscopia no UV-vis foi realizada para confirmar a síntese verde das NPs-OLE e NPs-OLC, em equipamento UV- visível Bel Photonics M51, usado no modo de varredura no intervalo de comprimento de onda de 300 a 800 nm.

5.4.5 Análises morfológicas das NPs

As análises morfológicas das NPs foram realizadas por MET nas NPs-OLE e NPs-OLC em microscópio eletrônico JEOL-modelo JEM-1011 (Tóquio, Japão) operando a 70 kV. As dispersões contendo as nanopartículas foram previamente

diluídas em água ultrapura Milli-Q®, e cerca de 5 µL de cada amostra foi depositada sobre *grids* de cobre revestidas com carbono (200 *mesh*). Após secagem à temperatura ambiente, os *grids* foram observados no microscópio.

5.4.6 Estabilidade físico-química das NPs

A estabilidade físico-química das NPs-OLE e NPs-OLC foi estudada por um período de 60 dias (1, 30 e 60 dias), em temperatura de refrigeração (6 ± 2 °C). As amostras foram armazenadas em vidros âmbar de 30 mL e analisadas em triplicata, quanto ao diâmetro médio de partícula (Z-ave, nm), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (ζ , mV), pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), utilizando um equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). As amostras foram diluídas apropriadamente com água filtrada Milli-Q®, e as medições foram realizadas a 25 °C a um ângulo de 173°. Para as medições, as amostras foram colocadas em célula de eletroforese.

5.4.7 Atividade antioxidante das NPs.

A atividade antioxidante dos óleos essenciais (OLE e OLC) e das nanopartículas (NPs-OLE e NPs-OLC) foram determinadas pela capacidade dos compostos presentes nas amostras em inibir os radicais DPPH e ABTS e o poder de redução do íon ferro, FRAP (do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*).

i) DPPH

A determinação da capacidade antioxidante foi realizada utilizando a técnica de remoção do radical DPPH, conforme descrito por Brand-Williams *et al.* (1995), em comprimento de onda de 515 nm. Inicialmente foram adicionados 150 µL da suspensão de cada formulação de NPs a 2850 µL de solução de DPPH 0,1 mmol L.⁻¹, incubadas a 22 ± 2 °C, na ausência de luz por 24 h, e analisadas em espectrofotômetro (UV - visível 752D, Labman, China). A curva externa de calibração foi obtida com solução de Trolox 1 mM. Os resultados de atividade antioxidante foram expressos em mg de Trolox Equivalente por mL da dispersão das nanopartículas.

ii) ABTS

A atividade antioxidante das NPs foi determinada avaliando a capacidade da amostra para remover o radical ABTS, conforme descrito por Re *et al.* (1999), com modificações. Inicialmente 3000µL da solução de ABTS foi adicionada a 30 µL de suspensão de NPs e homogeneizada em agitador de tubos. Após 6 min, a absorbância foi analisada a 734 nm em espectrofotômetro e o padrão de trolox (solução de 2 mmol.L⁻¹) foi utilizado como curva de calibração externa. Os resultados de atividade antioxidante foram expressos em mg de Trolox Equivalente por mL da dispersão das nanopartículas.

iii) FRAP

A capacidade antioxidante foi determinada através do poder de redução do íon ferro – FRAP, seguindo a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996), com modificações descritas por Arnous, Makris e Kefalas (2002). Alíquotas de 100µL de NPs foram adicionados a 100µL de cloreto férrico (3 mM) e 1800µL de solução TPTZ (1 mM). A reação foi mantida por 30 min em um banho-maria a 37 ° C. A absorbância foi medida a 620 nm (UV-visível) e o Trolox (solução 1 mM) foi utilizado para a curva de calibração externa. Os resultados de atividade antioxidante foram expressos em mg de Trolox Equivalente por mL da dispersão das nanopartículas.

5.4.8 Ensaio *in vitro* dos enxertos ósseos funcionalizado com as NPs

O ensaio *in vitro* foi conduzido pela homogeneização de 0,40g de enxerto ósseo bovino (EO) com 300 µL de cada formulação de NP-OLE ou NP-OLC. As nanopartículas funcionalizadas com o EO foram caracterizados quanto a morfologia e atividade antibacteriana. Os EO funcionalizados com as nanopartículas foram denominados de EO+NPs-OLE e EO+NPs-OLC.

5.4.9 Atividade antimicrobiana

As amostras das nanopartículas NPs-OLE, NPs-OLC; e das nanopartículas homogeneizadas com os enxertos: EO+NP-OLE, EO+NPs-OLC e dos controles: OLE, OLC e EO, foram submetidos à análise da atividade antimicrobiana por difusão em

disco, frente a 8 microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. *Typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Os microrganismos foram inoculados em caldo BHI a 37 ° C, por 24 horas e diluídos em solução salina de NaCl 9 g.L⁻¹ até 0,5 McFarland (1 - 2 x 10⁸ UFC mL⁻¹). Discos de embalagem de 6 mm de diâmetro foram aplicados em placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton, previamente inoculadas com os microrganismos. Os controles positivos e negativo com antibiótico e antifúngico (*C. albicans*) foram testados com cada microrganismo sensível e resistente. Em seguida, as placas com os discos foram deixadas a 37 ° C e os halos foram medidos após 24 horas.

A atividade antimicrobiana foi avaliada por medição do diâmetro das zonas de inibição (mm) em torno dos discos.

5.4.10 Análises morfológicas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias do enxerto ósseo (EO) individualizado, e deste funcionalizado com as formulações das nanopartículas, denominados de EO+NPs-OLE e EO+NPs-OLC foram obtidas usando microscópio eletrônico de varredura JEOL modelo JSM-6390LV (Tóquio, Japão). As amostras foram fixadas em um suporte metálico de cobre (*stubs*) com auxílio de uma fita dupla-face de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro em recobridora a vácuo Leica EM SCD500 (Leica, EUA). A visualização foi realizada em aumentos de 2200 vezes, com uma voltagem de excitação de 10 a 15 kV. A análise de tamanho dos poros das micrografias foi realizada pelo *software* ImageJ®.

5.4.11 Avaliações estatísticas

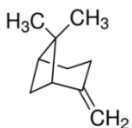
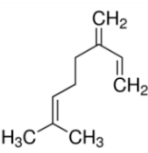
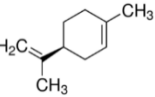
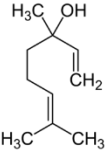
Os dados obtidos foram expressos como médias e desvio padrão das determinações realizadas em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias foi realizada pelo Teste de *Tukey* com nível de significância de 5 %, utilizando-se o programa STATISTICA 7.

5.5 Resultados e Discussão

5.5.1 Caracterização do óleo essencial de laranja extraído (OLE)

A Tabela 1 apresenta a estrutura química e os compostos identificados do óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis*) por CG/MS. O óleo de laranja é constituído por hidrocarbonetos monoterpenoides como constituintes prevalentes, e em menores quantidades monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos (de ARAÚJO *et al.*, 2020).

Tabela 1. Caracterização química do óleo essencial de laranja por CG/MS.

Compostos	Estrutura Molecular	Rlc	Rli	Composição (%)
α -Pino		935	933	0,33
β -Mirceno		991	989	1,46
D-Limoneno		1032	1028	96,42
Linalool		1101	1100	1,25
Total identificado		-	-	99,46

Rlc = Índice de retenção calculado; Rli= Índice de retenção da literatura; Composição % = Porcentagem dos compostos no óleo essencial.

No presente estudo o composto majoritário identificado foi o D-limoneno (96,42 %), seguido pelo β -mirceno (1,46 %), linalol (1,25 %) e α -pino (0,33 %). Estudos realizados por Ozturk *et al.* (2019), identificou o D-Limoneno como componente majoritário do óleo de laranja. A literatura atribui ao D-Limoneno propriedades antimicrobianas, antidiabéticas, anticâncer, anti-inflamatória, antioxidante, antinoceptiva, antisséptica, anti-hiperalgésico, antiviral e efeitos gastroprotetores e também, tem sido utilizado como preventivo no desenvolvimento de síndrome

metabólica (KUMAR *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2018; VIEIRA *et al.*, 2018). Estas propriedades benéficas são atribuídas aos terpenóides e as duplas ligações conjugadas, que por apresentar baixa toxicidade em humanos, possuem amplas aplicações na indústria alimentícia e na indústria farmacêutica (THANISSERY; KATHARIOU; SMITH, 2014). Na odontologia é utilizado como solvente de guta-percha para tratamentos endodônticos (SCELZA *et al.*, 2006).

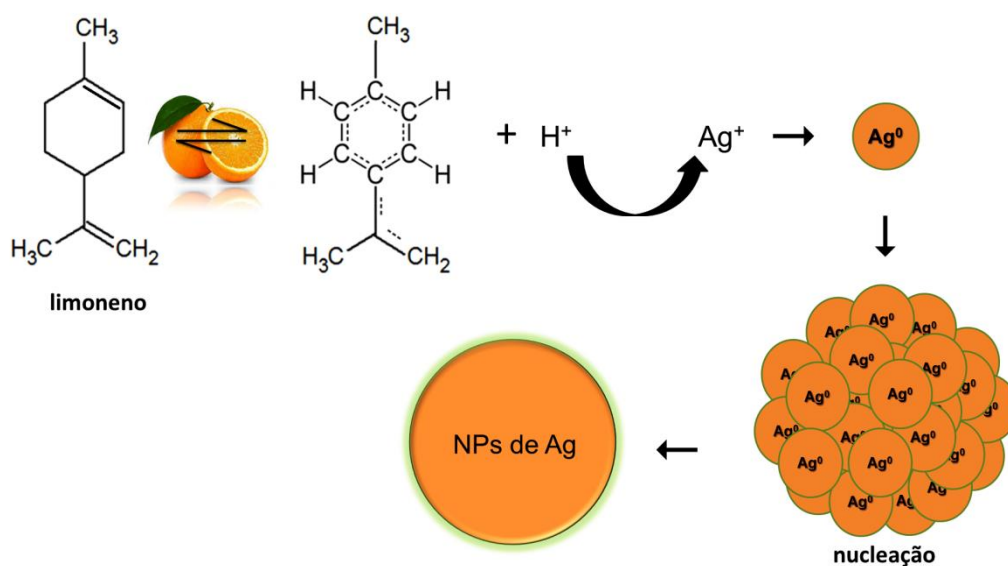
Nos seres humanos, o D-Limoneno é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal e facilmente metabolizável (FILIPOWICZ *et al.*, 2003). Os demais componentes do óleo essencial de laranja, como β -mirceno, também apresenta propriedades antimicrobianas (do EVANGELHO *et al.*, 2019).

A literatura também atribui ao óleo de laranja efetividade na redução de peso *in vivo*, e nos níveis de endotoxinas produtoras de inflamação em ratos, aumentando a disponibilidade de *Bifidobacterium* (LI *et al.*, 2018).

5.5.2 Mecanismo químico de biossíntese das NPs

As nanopartículas de prata foram biossintetizadas de acordo com o mecanismo proposto na Figura 1.

Figura 1. Mecanismo químico de biossíntese das nanopartículas de prata utilizando D-Limoneno como agente redutor.



Fonte: Autores

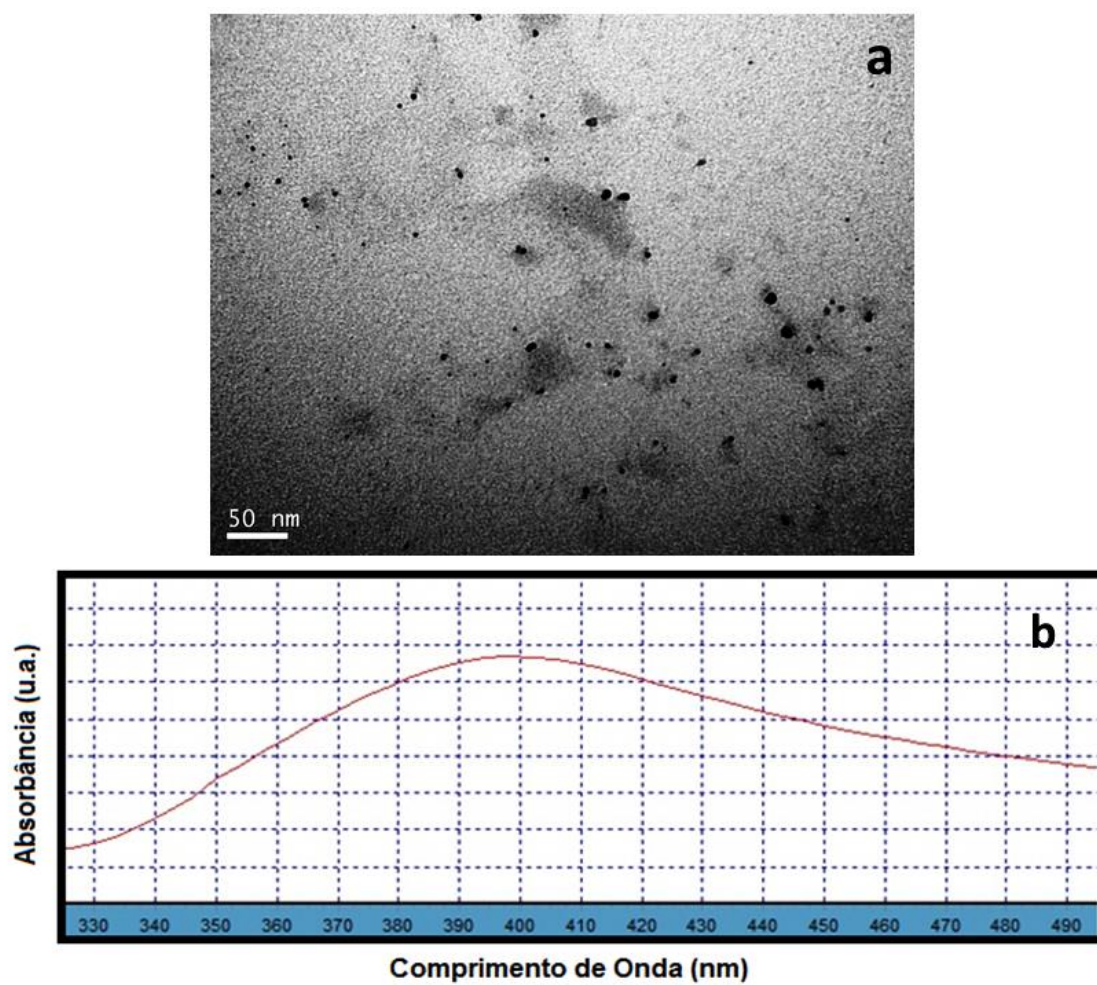
Conforme apresentado na Tabela 1 (seção 5.5.1), o D-Limoneno é o composto majoritário presente no óleo essencial de laranja (96,42%). Desta forma o mecanismo químico de biossíntese foi realizado com base nesse composto. Com a dissociação do composto iônico AgNO_3 , os íons Ag^+ presentes no meio reacional são reduzidos pelos prótons H^+ doados pelo D-Limoneno. O hidrogênio doado, como pode ser visto na Figura 1, preferencialmente está em carbonos que dão origem aos radicais terciários e secundários, os quais possuem maior estabilização por ressonância do que os respectivos radicais primários (ALMEIDA; AGUIAR; CARDOSO, 2015). Visto que o potencial de redução de Ag^+ (+ 0,80 V) é maior do que o potencial de redução do H^+ (0,00 V), a reação no sentido da formação da prata metálica é altamente favorável. A prata metálica (Ag^0) não é considerada uma nanopartícula, no entanto, uma sequência de aglomeração dos átomos de Ag^0 , denominada nucleação forma as nanopartículas (NARCISO *et al.*, 2019). Esta nanopartícula pode ser estabilizada pela presença de íons presentes no meio e pela presença do próprio óleo essencial de laranja na dispersão após a síntese.

5.5.3 Espectroscopia no UV-vis e Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A ressonância plasmônica de superfície (RPS) consiste na oscilação coletiva dos elétrons de condução quando excitados por radiação eletromagnética. Tratando-se de nanopartículas metálicas, onde os elétrons estão confinados em três dimensões, a oscilação dos elétrons induz a um campo elétrico, ao seu redor, o qual pode ser mais intenso que a luz incidente. Se os elétrons estão colocados na posição de equilíbrio e posteriormente o campo eletromagnético é removido, os elétrons irão oscilar com determinada frequência, sendo esta denominada de frequência plasmônica (GARCIA, 2011).

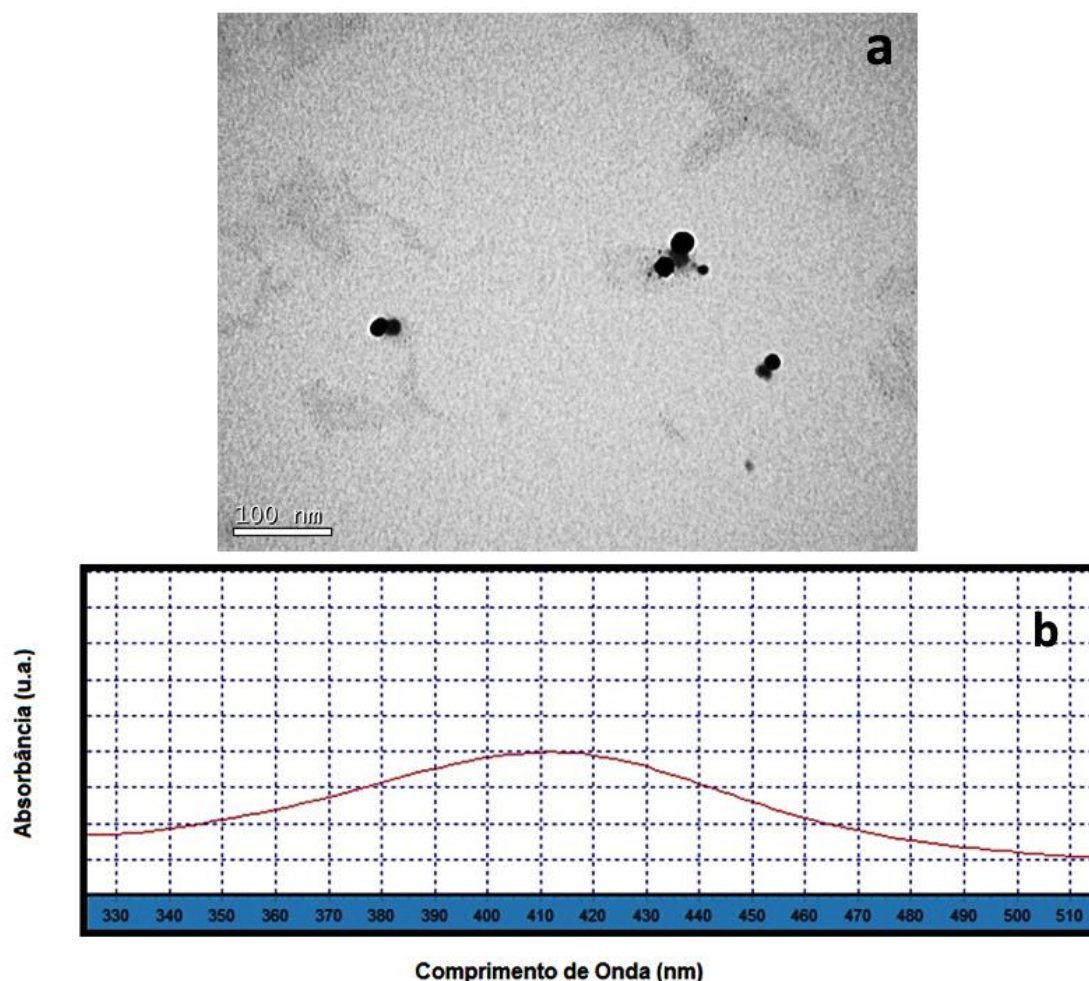
A Espectroscopia UV-vis e a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) são métodos amplamente utilizados na caracterização de nanopartículas. A formação das nanopartículas de prata comumente pode ser acompanhada por Espectroscopia no UV-Vis com o aparecimento de uma banda na região de 400 nm, devido a sua RPS. No presente estudo, as nanopartículas de prata apresentaram diâmetros pequenos, menores que 100 nm, como observado nas imagens obtidas por MET (Figuras 2 e 3).

Figura 2. a) Micrografia de MET da amostra NPs-OLE; b) espectro de UV-Vis da amostra NPs-OLE.



Fonte: Autores

Figura 3. a) Micrografia de MET da amostra NPs-OLC; b) espectro de UV-Vis da amostra NPs-OLC.



Fonte: Autores

Assim, as nanopartículas, apresentam características distintas tanto dos átomos como dos sólidos metálicos. Nesse contexto, a energia de transição eletrônica, representado através da cor das nanopartículas, e seu máximo de absorbância no UV-Vis dependem da densidade dos estados eletrônicos, do tamanho e da forma das nanopartículas. Um aumento no tamanho das partículas ocasiona um deslocamento no máximo de absorbância para comprimentos de onda superiores.

No presente trabalho para a amostra NPs-OLE foi observado um tamanho médio de partícula de 50 nm como mostrado na (Figura 2a) nas imagens de MET, e um máximo de absorbância em 400 nm (Figura 2b). Para a amostra NPs-OLC, foi observado um tamanho médio de partícula de 80 nm nas imagens de MET (Figura 3a), e um máximo de absorbância em 410 nm (Figura 3b). Em todas as amostras as partículas apresentaram

formato esférico. Estes resultados corroboram os resultados obtidos por espalhamento de luz dinâmico no item 5.5.4

5.5.4 Estabilidade físico-química das NPs

A estabilidade físico-química das nanopartículas de prata biossintetizadas com óleo de laranja foi analisada a 6 ± 2 ° C, simulando a temperatura de refrigeração, durante 60 dias de armazenamento, sendo avaliados o potencial zeta, índice de polidispersão e o tamanho das partículas, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Estabilidade físico-química das nanopartículas de prata obtidas por síntese verde com óleo essencial de laranja, durante 60 dias de armazenamento em temperatura de refrigeração.

Amostra	Tempo de armazenamento	Potencial Zeta (ζ , mV)	Índice de Polidispersão (IP)	Tamanho de partícula (nm)
NPs-OLE	1 dia	$-19,00 \pm 0,3^c$	$0,280 \pm 0,01^c$	$52,08 \pm 0,4^c$
	30 dias	$-27,3 \pm 1,7^d$	$0,346 \pm 0,04^{bc}$	$49,3 \pm 1,7^c$
	60 dias	$-27,7 \pm 2,2^d$	$0,300 \pm 0,03^{bc}$	$57,3 \pm 1,8^c$
NPs-OLC	1 dia	$-12,57 \pm 0,7^b$	$0,590 \pm 0,09^a$	$81,9 \pm 3,4^b$
	30 dias	$-12,77 \pm 0,8^b$	$0,642 \pm 0,01^a$	$84,2 \pm 4,0^b$
	60 dias	$-8,9 \pm 0,2^a$	$0,409 \pm 0,04^b$	$118,3 \pm 10,1^a$

Resultados são expressos em médias $\pm$ desvio padrão ($n=3$).

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p<0.05$), quando analisadas pelo teste de *Tukey*.

O potencial zeta é um indicativo da estabilidade da suspensão coloidal, controlando o comportamento das nanopartículas principalmente durante o período de armazenamento, ocasionando mudanças de potencial na superfície e na força repulsiva que existe entre as partículas (da ROSA *et al.*, 2020). Valores de potencial zeta superiores a ± 30 mV demonstram que as dispersões coloidais são estáveis, devido à repulsão entre as partículas, impedindo sua agregação (de MELO *et al.*, 2020).

No presente estudo, a presença das moléculas carregadas negativamente, oriundas dos constituintes do óleo essencial e dos íons Na^+ (provenientes da biossíntese das nanopartículas, Figura 1) na superfície das NPs de prata atuam como

estabilizadores, impedindo a aglomeração das nanopartículas. O potencial zeta é uma abreviação do potencial eletrocinético em sistemas coloidais; é a diferença de potencial entre o meio em que o sólido está disperso e sua interface sólida. Portanto, o potencial zeta é função da carga superficial da partícula, da camada adsorvida em sua interface e da natureza e composição do meio suspenso circundante (LU; GAO, 2010).

Para a amostra, NPs-OLE pode-se perceber que ocorreu um aumento na estabilidade obtida por potencial zeta nos tempos de 30 dias ($-27,3 \pm 1,7$ mV) e 60 dias ($-27,7 \pm 2,2$ mV) em comparação ao tempo 1 dia ($-19,00 \pm 0,3$ mV). Para os tempos 30 e 60 dias o potencial zeta ficou muito próximo da faixa teórica de estabilidade (30 mV). Este fato pode ser atribuído à adsorção crescente de íons e moléculas carregadas na superfície das nanopartículas (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

No caso da amostra NPs-OLC os valores de potencial zeta ficaram mais distantes do valor ideal. Para os tempos de 1 dia ($-12,57 \pm 0,7$ mV) e 30 dias ($-12,77 \pm 0,8$ mV) os valores não apresentaram diferença significativa entre eles ($p > 0,05$). Para o tempo 60 dias o valor $-8,9 \pm 0,2$ mV apresenta uma redução significativa na estabilidade ($p > 0,05$) em relação aos dias anteriores. Uma menor estabilidade obtida por potencial zeta para as amostras sintetizadas utilizando o óleo essencial comercial é associada ao menor conteúdo de D-Limoneno e de compostos ativos presentes no óleo comercial, com relação ao óleo extraído. No presente estudo, foi encontrado um conteúdo de 96,42% de limoneno (seção 5.5.1). A amostra de OLC utilizado é obtida a partir da casca de laranja doce, sendo que são encontrados na literatura conteúdos de limoneno, variando de 40,9 a 76,0 %, nesse óleo essencial (KHAN *et al.*, 2012).

O índice de polidispersão (IP) é um parâmetro usado para verificar a homogeneidade na distribuição do tamanho das partículas, baixos valores de IP garantem a estabilidade da dispersão coloidal, sem a formação de aglomerados ou precipitados (MACIEL *et al.*, 2019). Os valores de IP obtidos indicaram que as nanopartículas de prata apresentam uma distribuição homogênea de tamanho durante o período de armazenamento avaliado. Para a amostra NPs-OLE ocorreu um aumento no IP para os tempos de 30 e 60 dias ($p > 0,05$). No caso da amostra NPs-OLC somente para o tempo de 60 dias ocorreu um aumento de IP ($p > 0,05$).

Na avaliação do tamanho das nanopartículas por espalhamento de luz, para a amostra NPs-OLE não ocorreu um aumento dos diâmetros, no período de armazenamento avaliado ($p > 0,05$). Na amostra de NPs-OLC, ocorreu um aumento do tamanho das partículas ($118,3 \pm 10,1$ nm), para o tempo de 60 dias. Este resultado está

diretamente relacionado ao valor de potencial zeta obtido para esta amostra ($-8,9 \pm 0,2$ mV). Uma diminuição no potencial zeta afeta a estabilidade das nanopartículas com uma tendência a agregação e consequente aumento no diâmetro das partículas (da ROSA *et al.*, 2020).

5.5.5 Atividade antioxidante das NPs

A capacidade antioxidante dos óleos essenciais (OLE e OLC) e das nanopartículas (NPs-OLE e NPs-OLC) estão apresentados na Tabela 3. Os resultados de atividade antioxidante foram expressos em mg de Trolox Equivalente por mL da dispersão das nanopartículas.

Tabela 3. Análises de atividade antioxidante por DPPH, ABTS e FRAP.

Amostra	DPPH*	ABTS*	FRAP*
OLE	$0,47 \pm 0,1b$	$13,0 \pm 0,8c$	$15,6 \pm 1,8b$
OLC	$0,39 \pm 0,2b$	$13,9 \pm 1,2bc$	$22,6 \pm 0,2a$
NPs-OLE	$3,0 \pm 0,2a$	$23,3 \pm 6,2a$	$4,7 \pm 0,2c$
NPs-OLC	$3,1 \pm 0,2a$	$22,1 \pm 1,8ab$	$7,5 \pm 0,5c$

Resultados são expressos em médias $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p<0.05$), quando analisadas pelo teste de *Tukey*.

* mg de Trolox Equivalente por mL da dispersão das nanopartículas.

A atividade antioxidante do óleo essencial de laranja é atribuída ao seu componente majoritário: D-Limoneno. As duplas ligações conjugadas, presentes na estrutura química desses monoterpenos, são capazes de conferir o caráter antioxidante nesses óleos essenciais (VEISI *et al.*, 2019). Numa reação de oxidação este composto atua na fase terminal do processo oxidativo (de ARAÚJO *et al.*, 2020).

Aliado a isso, o caráter redutor e antioxidante das duplas ligações conjugadas dos monoterpenos é responsável pela biossíntese das nanopartículas de prata (conforme mecanismo demonstrado no item 5.5.2).

No presente estudo, os resultados de atividade antioxidante para as amostras com as NPs de prata foram mais eficientes que nos óleos essenciais individualizados ($p> 0,05$), por duas técnicas avaliadas: DPPH e ABTS. Esses resultados são atribuídos aos grupos funcionais bioredutores presentes nas moléculas do óleo essencial de laranja, e devido a sua capacidade de aderir às superfícies das nanopartículas (BHAKYA *et al.*,

2016). Esse fenômeno ocasiona um efeito sinérgico, aumentando a ação antioxidante do sistema (NUNES *et al.*, 2018).

Nos resultados de atividade antioxidante obtidos por FRAP, os óleos essenciais individualizados apresentaram valores superiores às NPs ($p > 0,05$), com comportamento diferenciado das outras duas técnicas (DPPH e ABTS) utilizadas no estudo. Isso pode ser atribuído, ao fato dos óleos essenciais apresentarem maior poder de reduzir os íons Fe^{3+} para Fe^{+2} do que as NPs associadas aos óleos essenciais.

O D-limoneno (componente majoritário do óleo de laranja) é um efetivo antioxidante em sistemas biológicos, com capacidade para atenuar o estresse oxidativo em ratos diabéticos e elevar os níveis das enzimas antioxidantes, comumente utilizadas como marcadores antioxidantes endógenos (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione transferase) (MURALI *et al.*, 2013; VIEIRA, 2018); além de apresentar efeito antinociceptivo, prevenindo a hiperalgesia e modulando a produção de citocinas e a expressão da enzima superóxido dismutase (PICCINELLI *et al.*, 2017). Além disso, o D-Limoneno não apresenta danos genotóxicos em baixas concentrações em linfócitos e fibroblastos (ROBERTO *et al.*, 2010).

5.5.6 Ensaio *in vitro* dos enxertos ósseos funcionalizado com NPs

i) Atividade antimicrobiana

No presente estudo, as amostras de óleo essencial (OLE e OLC), apresentaram menor capacidade de inibição ($p > 0,05$), quando comparados às amostras das nanopartículas (NPs-OLE e NPs-OLC); e dos enxertos ósseos funcionalizados com as nanopartículas (EO+NPs-OLE e EO+NPs-OLC), conforme demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4. Atividade antimicrobiana de diferentes microrganismos frente aos óleos essenciais, as NPs de pratas e dos EO funcionalizados com as NPs.

Bactéria	Difusão em discos (mm)						
Gram-positiva	OLE	OLC	AgNPs-OLE	AgNPs-OLC	EO+AgNP-OLE	EO+AgNP-OLC	Amoxicilina*
<i>S. aureus</i>	2,7 ± 0,2abDE	2,03 ± 0,2abE	7,3 ± 0,6abBC	9,3 ± 1,2abB	9,6 ± 0,6aB	5,0 ± 1,0cdCD	24,0 ± 1,7bcA
<i>S. epidermidis</i>	2,5 ± 0,5abD	2,2 ± 0,2aD	9,0 ± 1,0aBC	10,0 ± 0,0aB	7,3 ± 0,6bC	8,3 ± 0,6aBC	28,3 ± 1,5abA
<i>E. faecalis</i>	2,1 ± 0,2bC	2,1 ± 0,2abC	6,3 ± 0,6bcB	7,7 ± 0,6bcB	7,6 ± 1,2bB	7,3 ± 0,6abB	24,3 ± 1,2bcA
Gram-negativa							
<i>E. coli</i>	2,9 ± 0,2aC	2,2 ± 0,2abC	4,3 ± 0,6cBC	7,3 ± 0,6bcB	5,0 ± 0,6cdBC	4,3 ± 0,6cdBC	26,7 ± 2,9abcA
<i>S. typhimurium</i>	0,0	0,0	4,3 ± 0,6cC	7,0 ± 0,0cB	6,3 ± 0,6bcB	5,7 ± 0,6bcBC	29,3 ± 1,2aA
<i>S. flexneri</i>	2,9 ± 0,1aC	1,7 ± 0,2bC	8,7 ± 0,6aB	9,0 ± 1,0abcB	10,0 ± 0,0aB	8,3 ± 0,6aB	27,3 ± 2,5abA
<i>P. aeruginosa</i>	0,0	0,0	6,3 ± 0,6bcB	7,0 ± 0,0cB	6,3 ± 0,6bcB	3,3 ± 0,6dC	25,0 ± 0,0abcA
Fungo diplóide							Nistatina*
<i>C. albicans</i>	2,23 ± 0,25abDE	1,9 ± 0,1abE	9,3 ± 1,2aB	9,3 ± 1,2abB	4,3 ± 0,6dCD	4,7 ± 1,2cdC	22,0 ± 0,0cA

Resultados são expressos em médias ± desvio padrão (n=3). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (p<0.05), e letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p<0.05), quando analisadas pelo teste de Tukey.

Amoxicilina*: controle positivo para bactérias; Nistatina*: controle positivo para fungo

As bactérias gram-negativas *S. typhimurium* e *P. aeruginosa* não apresentaram nenhuma inibição na presença dos óleos essenciais individualizados. Com esses resultados, é possível afirmar a importância biológica da biossíntese das nanopartículas de prata para utilização como agente antimicrobiano, em materiais odontológicos, como substituição aos óleos essenciais individualizados.

A presença das NPs de prata no meio contribui de forma antagonista ao crescimento dos microrganismos, devido às interações do metal com a superfície microbiana (ODENIYI *et al.*, 2020). Os mecanismos com efeitos inibitórios, dos óleos essenciais de laranja e das NPs metálicas sobre os microrganismos, têm sido associados com alterações na permeabilidade da membrana celular, causando perda dos constituintes intracelulares, necessários para manter a viabilidade e sobrevivência celular (de ARAUJO *et al.*, 2020).

Além disso, a utilização de NPs de prata potencializa a ação antimicrobiana nas áreas de infecção óssea e contribui para a diminuição do uso de antibiótico sistêmico (LU *et al.*, 2016). Neste contexto, pesquisas envolvendo novos materiais odontológicos com propriedades regenerativas e antimicrobianas tem sido desenvolvidas, com o intuito de combater os frequentes casos de resistência bacteriana e de insucessos em cirurgias bucomaxilofaciais (LU *et al.*, 2016). Aliado a isso, ocorre à diminuição de reintervenções cirúrgicas e potencialização do reparo ósseo. Dessa forma, expõe-se o paciente a menos riscos, e contribui-se para o sucesso das cirurgias e consequentemente, qualidade de vida dos pacientes (ALYAHYA; SWENNEN, 2019).

Os resultados do presente estudo estão em concordância com a literatura. de Barros, 2018 e seus colaboradores, afirmam que a presença das NPs de prata, podem ocasionar o aparecimento de cavidades na membrana celular bacteriana, extravasamento do conteúdo celular, e acumulação na superfície, com consequente invasão celular pelos íons de prata. Posteriormente, os íons de prata podem interagir com grupos tióis das proteínas, inativando ou interagindo com o DNA, e interrompendo sua capacidade de replicação.

As amostras das nanopartículas com o óleo de laranja comercial (NPs-OLC) e destas associadas aos enxertos ósseos (EO+NPs-OLC), apresentaram maior efetividade de inibição contra o *S. epidermidis* (gram positivas), e menores inibições para a *P. aeruginosa* (gram negativas). Estudos relatam que as bactérias gram-positivas são mais sensíveis aos antimicrobianos do que as bactérias gram-negativas (da ROSA *et al.*, 2020). O presente estudo está de acordo com a literatura, pois a maioria das amostras apresentaram maiores efetividades de inibições contra as bactérias gram-positivas.

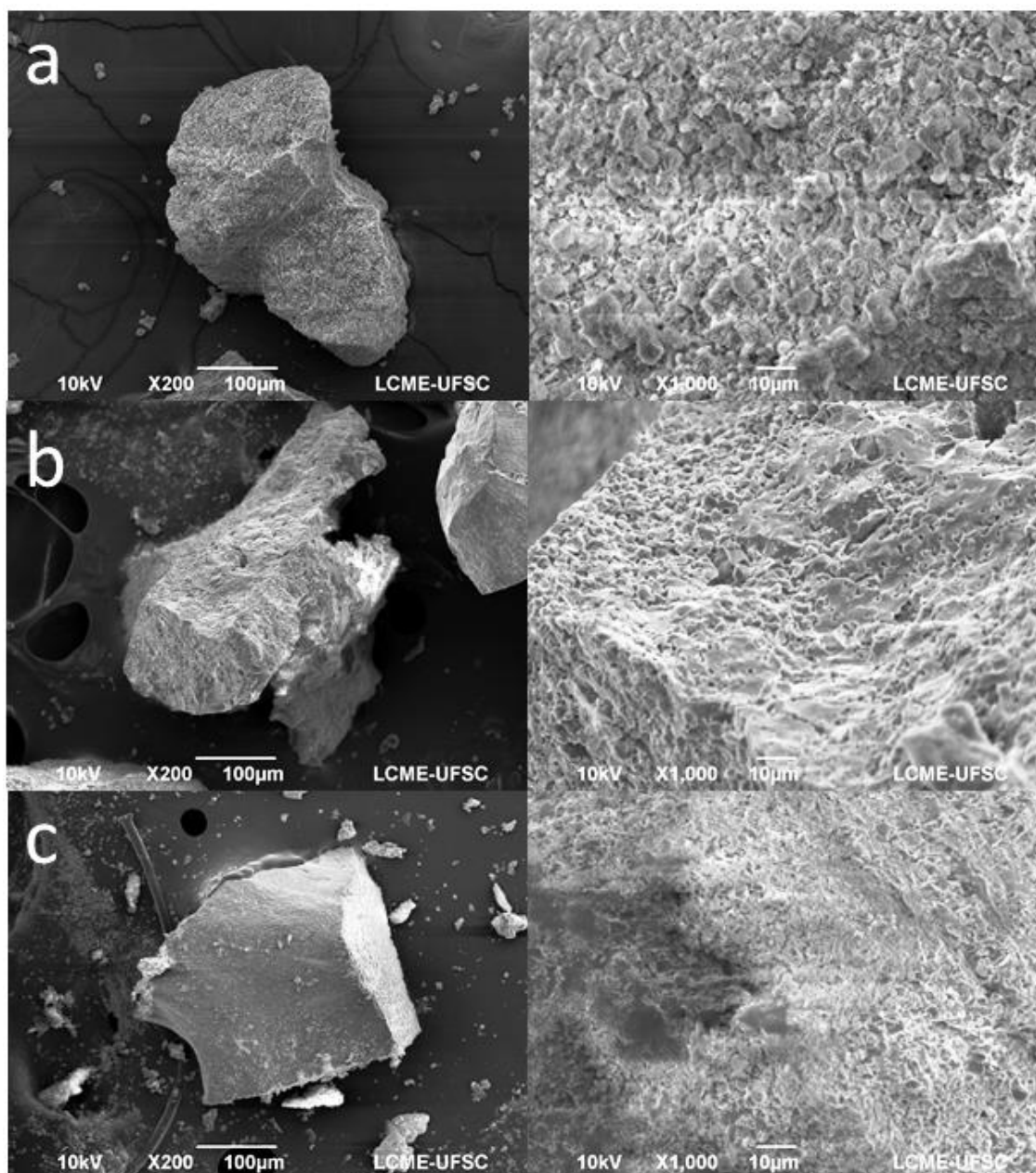
A menor sensibilidade para bactérias gram negativas frente às nanopartículas pode ser explicada pelo fato desses microrganismos apresentarem na sua membrana, uma camada externa lipopolissacarídica (LPS) limitando a difusão dos compostos para o seu interior. Os agentes antimicrobianos, como as NPs metálicas e os óleos essenciais, apresentam capacidade de desintegrar essa membrana externa da bactéria gram-negativa, liberando o LPS, alterando a permeabilidade passiva da célula, e assim aumentando a permeabilidade da adenosina trifosfato (ATP), na membrana citoplasmática (GUARDA *et al.*, 2011). No entanto, é necessária uma maior concentração de agente antimicrobiano para obter o mesmo efeito obtido nas bactérias gram-positivas para as bactérias gram-negativas (da ROSA *et al.*, 2020).

As amostras dos enxertos ósseos funcionalizados com as NPs de prata apresentaram maiores inibições para a bactéria gram-negativa *S. flexneri*. Esse comportamento não foi observado para as NPs individualizadas. Esses resultados podem ser explicados pela possível ruptura mecânica da camada externa das bactérias gram-negativas, ocasionada pelas partículas de enxerto ósseo.

ii) Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias de MEV das amostras de osso bovino liofilizado Bioss®, com e sem as nanopartículas de prata são mostrados na Figura 4. Para todas as amostras foram observados um grande número de pequenos poros, em uma estrutura constituída de agregados de pequenas partículas, provavelmente cristais de hidroxiapatita, que é a parte inorgânica do osso bovino remanescente após o processo de liofilização. A estrutura microscópica do enxerto ósseo (EO) revelou uma estrutura contendo pequenos poros ($1,43 \pm 0,5 \mu\text{m}$) como mostrado na Figura 4a em diferentes magnificações. Após o processo de adsorção das nanopartículas de prata, a estrutura manteve a característica desse tipo de tecido como pode ser observado para as amostras EO+NPs-OLE, (diâmetros de poros de $1,21 \pm 0,4 \mu\text{m}$) mostrada na Figura 4b e para a amostra EO+NPs-OLC (diâmetro de poros de $1,40 \pm 0,3 \mu\text{m}$) conforme apresentada na Figura 4c.

Figura 4. Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura: a) enxerto ósseo (EO); b) amostras EO+NPs-OLE; c) amostra EO+NPs-OLC.



Fonte: Autores

A presença dos poros e a manutenção da estrutura cristalina do enxerto ósseo, com a adsorção das nanopartículas de prata, são fatores fundamentais para sucesso dos fenômenos celulares de deposição de células osteoprogenitoras sobre o enxerto, reabsorção do mesmo e formação de osso novo no lugar. A presença de poros nos enxertos faz com que a colonização celular do tecido ósseo seja facilitada, ajuda na

vascularização e colonização celular, de maneira a diminuir riscos de infecção (ZIELAK *et al.*, 2010).

O tamanho e o formato dos poros pode influenciar a vascularização do enxerto, e desta forma uma maior porosidade do biomaterial, faz com que ocorra uma maior possibilidade de absorção das partículas do biomaterial e consequentemente a substituição por novo tecido ósseo. Como as nanopartículas de prata apresentam tamanhos inferiores a 100 nm, estas não causam a oclusão ou o fechamento dos poros do enxerto ósseo, corroborando com os resultados de diâmetro de poros do material.

5.6 Conclusão

O presente trabalho demonstrou que os enxertos ósseos (EO) de origem bovina para uso odontológico, podem ser funcionalizados de forma eficiente com nanopartículas de prata (NPs) obtidas por biorredução com óleo essencial de laranja extraído (OLE) da casca dos frutos de *Citrus sinensis* e óleo de laranja comercial (OLC).

A formação das nanopartículas de prata é atribuída à ação redutora do óleo essencial de laranja, especialmente ao seu componente majoritário, o D-Limoneno. A biossíntese das nanopartículas foi confirmada pelo aparecimento de uma banda na região de 400 nm no espectro eletromagnético de UV-vis, característicos da Ressonância Plasmônica de Superfície (RPS).

As nanopartículas apresentaram diâmetro médio de partículas inferiores a 100 nm e formato esférico conforme observados nas análises de DLS e MET. Além disso, as nanopartículas apresentaram estabilidade físico-química no armazenamento, conforme as análises de potencial de zeta e índice de polidispersão.

Foi observado, que as nanopartículas de prata foram efetivas na capacidade antioxidante frente aos radicais livres: DPPH e ABTS, quando comparados aos óleos essenciais individualizados.

As NPs de prata e os enxertos ósseos funcionalizados apresentaram capacidade antimicrobiana frente aos oito microrganismos avaliados, com efetiva ação contra bactérias gram-positivas, gram-negativa e fungo diploide.

Neste contexto, pesquisas envolvendo novos materiais odontológicos com propriedades regenerativas e antimicrobianas apresentam potencial para serem desenvolvidas, com o intuito de combater os frequentes casos de resistência bacteriana e de insucessos em cirurgias bucomaxilofaciais

5.7 Referências

- ADEBAYO-TAYO, B.C., TEMITAYO, A.O., ODENIYI, O.A., 2016. Phytochemical composition and comparative evaluation of antimicrobial activities of the juice extract of *Citrus aurantifolia* and its silver nanoparticles. **Nigerian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 59–64, 2016.
- ALMEIDA, N.E.C., AGUIAR, I., CARDOSO, D.R. Mechanism of Hop-Derived Terpenes Oxidation in Beer. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, p. 2362-2368, 2015.
- ALYAHYA, A.; SWENNEN, G. R. J. Bone grafting in orthognathic surgery: a systematic review. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 48, p. 322-331, 2019.
- BENZIE, I.F.F., STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the frap assay. **Analytical Biochemistry**, v.239, p.70-76, 1996.
- BHAKYA, S., MUTHUKRISHNAN, S., SUKUMARAN, M., MUTHUKUMAR, M. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their antioxidant and antibacterial activity. **Applied Nanoscience**, v. 6, p. 755–766, 2016.
- BHATTE, K. D., DESHMUKH, K.M., PATIL, Y.P., SAWANT, D.N., FUJITA, S.-I., ARAI, M., BHANAGE, B.M. Synthesis of powdered silver nanoparticles using hydrogen in aqueous medium. **Particuology**, v. 10, p. 140–143, 2012.
- BOYCE, R. A., KLEMONS, G. Treatment Planning for Restorative Implantology. **Dental Clinics of North America**, v. 59, p. 291–304, 2015
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSER, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p.25-30, 1995.
- FARDIN, A. C., JARDIM, E. C. G., PEREIRA, F. C., GUSKUMA, M. H., ARANEGA, A. M., JÚNIOR, I. R. G. Enxerto ósseo em odontologia: revisão de literatura. **Innovations Implant Journal**, v. 5, p. 48-52, 2010.
- da ROSA, C.G., DE MELO, A.P.Z., SGANZERLA, W.G., MACHADO, M.H., NUNES, M.R., MACIEL, M.V.O.B., BERTOLDI, F.C., BARRETO, P.L.M. Application in situ of zein nanocapsules loaded with *Origanum vulgare* Linneus and *Thymus vulgaris* as a preservative in bread. **Food Hydrocolloids**, v. 99, p. 105339, 2020.
- de ARAÚJO, J. S. F., DE SOUZA, E. L., OLIVEIRA, J. R., GOMES, A. C. A., KOTZEBUE, L. R. V., AGOSTINI, D. L. S., DE OLIVEIRA, D. L. V., MAZZETTO, S. E., DA SILVA, A. L., CAVALCANTI, M. T. Microencapsulation of sweet orange

essential oil (*Citrus aurantium* var. *dulcis*) by liophylization using maltodextrin and maltodextrin/gelatina mixtures: Preparation, characterization, antimicrobial and antioxidante activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 143, p. 991–999, 2020.

de BARROS, C. H. N., CRUZ, G. C. F., MAYRINK, W., TASIC, L. Bio-based synthesis of silver nanoparticles from orange waste: effects of distinct biomolecule coatings on size, morphology, and antimicrobial activity. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 11, p. 1–14, 2018.

de MELO, A.P.Z., MACIEL, M.V.O.B., SGANZERLA, W.G., DA ROSA, A.A., DE ARMAS, R.D., MACHADO, M.H., DA ROSA, C.G., NUNES, M.R., BERTOLDI, F.C., BARRETO, P.L.M. Antibacterial activity, morphology, and physicochemical stability of biosynthesized silver nanoparticles using thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil. **Materials Research Express**, v. 7, p. 15087, 2020.

do EVANGELHO, J. A., DANNENBERG, G. S., BIDUSKI, B., EL HALAL, S. L. M., KRINGEL, D. H., GULARTE, M. A., FIORENTINI, A. M., ZAVAREZE, E. R. Antibacterial activity, optical, mechanical, and barrier properties of corn starch films containing orange essential oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 222, p. 114981, 2019.

LU, G. W., GAO, P. Emulsions and microemulsions for topical and transdermal drug delivery. **Handbook of non-invasive drug delivery systems**, p. 59–94, 2010.

FARIAS, C.B., FERREIRA SILVA, A., DINIZ RUFINO, R., MOURA LUNA, J., GOMES SOUZA, J.E., SARUBBO, L.A. Synthesis of silver nanoparticles using a biosurfactant produced in low-cost medium as stabilizing agent. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 122–125, 2014.

FILIPOWICZ, N., KAMINSKI, M., KURLEND, J., ASZTEMBORSKA, M., OCHOCKA, R. J. Antibacterial and Antifungal Activity of Juniper Berry Oil and its Selected Components. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 227–231, 2003.

GARCIA, M.A. Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 44, p. 283001, 2011.

GUARDA, A.; RUBILAR, J. F.; MILTZ, J.; GALOTTO, M. J. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 144–150, 2011.

GUZMÁN, M.G., DILLE, J., GODET, S., 2009. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2, p. 104–111, 2009.

HU, B., WANG, S.-B., WANG, K., ZHANG, M., YU, S. Microwave-assisted rapid facile “green” synthesis of uniform silver nanoparticles: self-assembly into multilayered films and their optical properties. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, p. 11169–11174, 2008.

KARATAŞ, E., KOL, E., BAYRAKDAR, İ. Ş., ARSLAN, H. The effect of chloroform, orange oil and eucalyptol on root canal transportation in endodontic retreatment. **Australian Endodontic Journal**, v. 42, p. 37–40, 2015.

KHAN, M. M., IQBAL, M., HANIF, M. A., MAHMOOD, M. S., NAQVI, S. A., SHAHID, M., & JASKANI, M. J. (2012). Antioxidant and Antipathogenic Activities of Citrus Peel Oils. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 15, p. 972–979, 2012.

KUMAR, M. P., POORNIMA, MAMIDALA, E., AL-GHANIM, K., ALMISNED, F., AHMED, Z., MAHBOOB, S. Effects of D-Limonene on aldose reductase and protein glycation in diabetic rats. **Journal of King Saud University – Science**, v. x, p. xxx, 2020.

LI, D., WU, H., DOU, H., GUO, L., HUANG, W. Microcapsule of sweet orange essential oil changes gut microbiota in diet-induced obese rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 505, p. 991-995, 2018.

LIM, S.H., PARK, Y. Green synthesis, characterization and catalytic activity of gold nanoparticles prepared using rosmarinic acid. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 18, p. 659–667, 2018.

LU, H.; LIU, Y.; GUO, J.; WU, H.; WANG, J.; WU, G. Biomaterials with antibacterial and osteoinductive properties to repair infected bone defects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 334, 2016.

MACIEL, M. V. O. B., ALMEIDA, A. R., MACHADO, M. H., DE MELO, A. P. Z., DA ROSA, C. G., DE FREITAS, D. Z., NORONHA, C. M., TEIXEIRA, G. L., DE ARMAS, R. D., BARRETO, P. L. M. *Syzygium aromaticum* L. (Clove) Essential Oil as a Reducing Agent for the Green Synthesis of Silver Nanoparticles. **Open Journal of Applied Sciences**, v. 09, p. 45-54, 2019.

MAQUIRA. Óleo de laranja - solvente gutta-percha. Disponível em: <https://maquira.com.br/produto/oleo-de-laranja/> Acesso em 10 de março de 2020.

MIE, R., SAMSUDIN, M.W., DIN, L.B., AHMAD, A., IBRAHIM, N., ADNAN, S.N.A. Synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity using the lichen *Parmotrema praesorediosum*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 121–127, 2014.

MOUSSA, N. T., DYM, H. Maxillofacial Bone Grafting Materials. **Dental Clinics of North America**, v. 64, p. 473-490, 2020.

MURALI, R., KARTHIKEYAN, A., SARAVANAN, R. Protective effects of d-limonene on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 112, p. 175–181 2013, 2013.

NARCISO, A. M., PAIM, B., ROSA, C. G., PAES, J. V., NUNES, M. R., MASIERO, A. V. Síntese verde de nanopartículas de prata para uso em biomateriais odontológicos. **Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde**, v. 9, p. 64-73, 2019.

- NUNES, M. R., CASTILHO, M. S. M., VEECK, A. P. L., DA ROSA, C. G., NORONHA, C. M., MACIEL, M. V. O. B., BARRETO, P. M. Antioxidant and antimicrobial methylcellulose films containing *Lippia alba* extract and silver nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 192, p. 37-43, 2018.
- REDDY, M. C., MURTHY, K. S. R., SRILAKSHMI, A., RAO, K. R. S., PULLAIAH, T. Photosynthesis of Eco-friendly silver nanoparticles and biological applications - a novel concept in nanobiotechnology. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 222–247, 2013.
- SGANZERLA, W. G., LONGO, M., DE OLIVEIRA, J. L., da ROSA, C. G., VEECK, A. P. L., de AQUINO, R. S., MASIERO, A. V., BERTOLDI, F. C., BARRETO, P. L. M., NUNES, M. R. Nanocomposite poly (ethylene oxide) films functionalized with silver nanoparticles synthesized with *Acacia senegal* extracts. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.xx, p. 125125, 2020.
- ODENIYI, M. A., OKUMAH, V. C., ADEBAYO-TAYO, B. C., ODENIYI, O. A. Green synthesis and cream formulations of silver nanoparticles of *Nauclea latifolia* (African peach) fruit extracts and evaluation of antimicrobial and antioxidant activities. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 15, p. 100197, 2020.
- OLIVEIRA, G. Z. S., LOPES, C. A. P., SOUSA, M. H., SILVA, L. P. Synthesis of silver nanoparticles using aqueous extracts of *Pterodon emarginatus* leaves collected in the summer and winter seasons. **International Nano Letters**, v. 9, p. 109–17, 2019.
- OZTURK, B., WINTERBURN, J., GONZALEZ-MIQUEL, M. Orange peel waste valorisation through limonene extraction using bio-based solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v.151, p. 107298, 2019.
- PICCINELLI, A. C., MORATO, P. N., BARBOSA, M. S., CRODA, J., SAMPSON, J., KONG, X., KONKIEWITZ, E. C., ZIFF, E. B., AMAYA-FARFAN, J., KASSUYA, C. A. L. Limonene reduces hyperalgesia induced by gp120 and cytokines by modulation of IL-1 β and protein expression in spinal cord of mice, **Life Sciences**, v. 174, p. 28–34, 2017.
- RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.26, p.1231–1237, 1999.
- ROBERTO, D., MICUCCI, P., SEBASTIAN, T., GRACIELA, F., C. ANESINI, C. Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: relation to H₂O₂ modulation and cell proliferation, **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 106, p. 38–44, 2010.
- SCELZA, M. F. Z., OLIVEIRA, L. R. L., CARVALHO, F. B., FARIA, S. C-R. In vitro evaluation of macrophage viability after incubation in orange oil, eucalyptol, and chloroform. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v.102, p. e24-e27, 2006.

STOKES, J. M., LOPATKIN, A. J., LOBRITZ, M. A., COLLINS, J. J. Bacterial Metabolism and Antibiotic Efficacy. **Cell Metabolism**. v. 30, p. 251-259, 2019.

TAHIR, M. N., NATALIO, F., CAMBAZ, M. A., PANTHÖFER, M., BRANSCHIED, R., KOLB, U., TREMEL, W. Controlled synthesis of linear and branched Au ZnO hybrid nanocrystals and their photocatalytic properties. **Nanoscale** v. 5, p. 9944–9949, 2013.

THANISSERY, R., KATHARIOU, S., SMITH, D. P. Rosemary oil, clove oil, and a mix of thyme-orange essential oils inhibit *Salmonella* and *Campylobacter* in vitro. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 23, p. 221-227, 2014.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p. 463–471, 1963.

VEISI, H., DADRES, N., MOHAMMADI, P., HEMMATI, S. Green synthesis of silver nanoparticles based on oil-water interface method with essential oil of orange peel and its application as nanocatalyst for A_3 coupling. **Materials Science and Engineering: C**, v. 105, p. 110031, 2019.

VIEIRA, A.J., BESERRA, F.P., SOUZA, M.C., TOTTI, B.M., ROZZA, A.L. Limonene: Aroma of innovation in health and disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 283, p. 97–106, 2018.

VIJAY, K. P., PAMMI, S., KOLLU, P., SATYANARAYANA, K., SHAMEEM, U. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Boerhaavia diffusa* plant extract and their antibacterial activity. **Industrial Crops and Products**, v. 52, 562–566, 2014.

WU, Y., JIA, W., AN, Q., LIU, Y., CHEN, J., LI, G. Multi-action antibacterial nanofibrous membranes fabricated by electrospinning: an excellent system for antibacterial applications. **Nanotechnology**, v. 20, p. 245101–245108, 2009.

ZIELAK, J.C., LOCATELLI, P., POZZAN, S., GIOVANINI, A.F., DELIBERADOR, T.M., URBAN, C.A., BARATTO-FILHO, F. Avaliação ultraestrutural comparativa de biomaterial particulado de origem ovina. **RSBO (Online)**, v. 8, p. 40-47, 2011.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os objetivos propostos e a partir dos resultados obtidos no presente trabalho, as seguintes considerações podem ser feitas:

- ❖ As nanopartículas de prata sintetizadas por método verde de biorredução possuem uma grande superfície de contato e propriedades antimicrobianas.
- ❖ A biorredução do extrato aquoso das folhas de araquá apresentou capacidade antioxidante frente ao radical DPPH, atribuída aos compostos fenólicos.
- ❖ As nanopartículas de prata, biossintetizadas com o extrato aquoso das folhas de araquá vermelho, apresentaram um diâmetro médio de $258,3 \pm 5$ nm e índice de polidispersão de 0,300 e estabilidade eleftrorética, com valores de potencial zeta de $-21,0 \pm 4$ mV.
- ❖ A formação das nanopartículas de prata utilizando os três agentes redutores (extrato de folhas de araquá, óleo essencial de laranja extraído e comercial foram confirmadas pelo aparecimento de uma banda em 400 nm nos espectros de UV-vis, característicos da SPR.
- ❖ No óleo de laranja extraído, o composto majoritário identificado por Cromatografia Gasosa foi o D-limoneno (96,42 %), seguido pelo β -mirceno (1,46 %), linalol (1,25 %) e α -pineno (0,33 %).
- ❖ O diâmetro médio das nanopartículas obtidos por Microscopia Eletrônica de Transmissão variou entre 50 e 80 nm, para as nanopartículas com óleo de laranja extraído e comercial, respectivamente.
- ❖ As nanopartículas obtidas com óleo de laranja extraído apresentaram melhores resultados de estabilidade físico-química no armazenamento, podendo ser atribuído ao maior conteúdo de D-Limoneno na sua constituição.
- ❖ As nanopartículas com óleo de laranja apresentaram melhores resultados de atividade antioxidante por dois métodos avaliados: DPPH e ABTS, quando comparados aos óleos essenciais individualizados.
- ❖ As nanopartículas com óleo de laranja e os enxertos ósseos funcionalizados com estas nanopartículas, apresentaram maiores ações antagônicas frente aos microrganismos estudados, quando comparados aos óleos essenciais individualizados.
- ❖ Apesar dos resultados satisfatórios *in vitro*, há necessidade de estudos futuros que testem a biocompatibilidade do enxerto ósseo funcionalizado com nanopartículas de prata.

REFERÊNCIAS GERAIS

AGHALOO, T.L.; MOY, P. K. Which hard tissue augmentation techniques are the most successful in furnishing bony support for implant placement? **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 22, n. 7, 2007.

ALKAHTANI, R. N. The implications and applications of nanotechnology in dentistry: A review. **The Saudi Dental Journal**, 2018.

ALYAHYA, A.; SWENNEN, G. R. J. Bone grafting in orthognathic surgery: a systematic review. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 48, p. 322-331, 2019.

AMROLLAHI, P.; SHAH, B.; SEIFI, A.; TAYEBI, L. Recent advancements in regenerative dentistry: A review. **Materials Science and Engineering C**, v. 69,p. 1383–1390, 2016.

BARONE, A., *et al.* Deep-frozen allogenic onlay bone grafts for reconstruction of atrophic maxillary alveolar ridges: a preliminary study. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 67, p. 1300-1306, 2009.

BENDJEDDOU, K.; FONS, M.; STROCKER, P.; SADOON. D. Characterization and purification of a bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BMK2005, an intestinal isolate active against multidrug-resistant pathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1543–1552, 2012.

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

BETTI, L. V. **Análises microscópica e radiográfica do reparo de defeitos confeccionados em fêmures de coelhos preenchidos com matriz óssea bovina medular em bloco ou cortical em microgrânulos**, Tese de Doutorado em Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru, 152f, 2010.

BOSSHARDT, D. D.; SCHENK, R.K. **Base biológica da Regeneração Óssea**. In: BUSSER, D. (Ed.). 20 anos de Regeneração óssea guiada na Implantodontia. São Paulo:, Quintessence Editora Ltda, pp. 15-46. (2010).

CADIOLI, L. P.; SALLA, L. D. Nanotecnologia: um estudo sobre seu histórico, definição e principais aplicações desta inovadora tecnologia. **Revista de Ciências Exatas e Tecnologia**, v. 1, p. 98-105, 2015.

CAMMACK, G. V. *et al*, Histologic Evaluation of Mineralized and Desmineralized Freeze-Dried Bone Allograft for Ridge and Sinus Augmentations. **The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, v.25, p. 231-237, 2005.

CARNEIRO, E.; GARCIA, R.B.; OLIVEIRA, R.C D.; MORAES, F.G.D.; MENEZES, R.; LETRA, A. E.; GRANJEIRO, J. M. Microscopic and radiographic analysis of the effect of particle size of demineralized bovine cancellous bone matrix on the repair of

bone defects in femurs of rabbits. **Journal of Applied Oral Science**, v. 13, p. 157-162, 2005.

CHÁVEZ-ANDRADE, G. M.; TANOMARU-FILHO, M.; RODRIGUES, E. M.; GOMES-CORNÉLIO, A. L.; FARIA, G.; BERNARDI, M. I. B.; GUERREIRO-TANOMARU, J. M. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial activity of poly(vinyl alcohol)-coated silver nanoparticles and farnesol as irrigating solutions. **Archives of Oral Biology**, v. 84, p. 89-93, 2017.

Clinical evaluation of freeze-dried block allografts for alveolar ridge augmentation: a case series. **The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**. v. 23, p. 417- 425, 2003.

CURY, A. A.; QUERIDO, M. R. M.; PEGORARO, M.; TRANQUITELLA, F. B. **Reconstrução de maxilas atrofica com enxertos autógenos de crista ilíaca. Implantes Osseointegrados – Técnicas e Arte**. Editora Santos: São Paulo, 2002.

DEL VALLE, R. A.; CARVALHO, M. L.; GONZALEZ, M. R. Estudo do comportamento de enxerto ósseo com material doador obtido dos bancos de tecidos músculo - esqueléticos. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 18, p. 189-194, 2006.

DHIVYA, S.; AJITA, J.; SELVAMURUGAN, N. Metallic nanomaterials for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, p. 1675-1700, 2015.

ELLINGTON, J. K.; HARRIS, M.; WEBB, L.; SMITH, B.; SMITH, T.; TAN, K.; HUDSON, M. Intracellular Staphylococcus aureus: A mechanism for the indolence of osteomyelitis. **The Journal of Bone and Joint Surgery. British**, v. 85, p. 918–921, 2003.

ENCARNAÇÃO, I. C.; BULLEN, C. E. M.; LUNA, M. P.; NETO, A. R. L. P.; CORDERO, E. B.; CABRERA, A. E. B. Aumento horizontal com osso xenógeno em bloco: alternativa viável ao uso do osso autógeno. **Implant News**, v. 8, p. 339–43, 2011.

FRANCISCHONE, C. E.; FILHO, H. N.; MATOS, D. A. D.; **Osseointegração e o tratamento multidisciplinar**. Editora Quintessence: São Paulo, 2006.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia em cores**. 2º ed. Editora: Guanabara Koogan, 1999.

HEITZ-MAYFIELD, L.J.; LANG, N.P. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. Peri-implantitis. **Periodontology** 2000, v. 53, p. 167–181, 2010.

HIROTA, M.; MATSUI, Y.; MIZUKI, N.; KISHI, T.; WATANUKI, K.; OZAWA, T.; FUKUI, T.; SHOJI, S.; ADACHI, M.; MONDEN, Y.; IWAI, T.; TOHNAI, I. Combination with allogenic bone reduces early absorption of β -tricalcium phosphate (β -TCP) and enhances the role as a bone regeneration scaffold. Experimental animal study in rat mandibular bone defects. **Dental Materials Journal**, v. 28, n. 2, p. 153-161, 2009.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION.ISO 10993-2.
Guidance on selection of tests: biological evaluation of medical devices,
Switzerland, ISO, 1992.

KANAPARTHY, R.; KANAPARTHY, A. The changing face of dentistry:
nanotechnology. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 2799, 2011.

KHORRAMI, S.; ZARRABI, A.; KHALEGHI, M.; DANAIE, M.; MOZAFARI, M.
Selective cytotoxicity of green synthesized silver nanoparticles against the MCF-7
tumor cell line and their enhanced antioxidant and antimicrobial properties.
International Journal of Nanomedicine, v. 13, p. 8013–8024, 2018.

KUABARA, M. R.; VASCONCELOS, L. W.; CARVALHO, P. S. P. Técnicas cirúrgicas
para obtenção de enxerto ósseo autógeno. **Revista da Faculdade de Odontologia de
Lins**. v. 12, p. 44-51, 2000.

KUABARA, M. R.; VASCONCELOS, L. W.; CARVALHO, P. S. P. Técnicas cirúrgicas
para obtenção de enxerto ósseo autógeno. **Revista da Faculdade de Odontologia de
Lins**. v. 12, p. 44-51, 2000.

LU, H.; LIU, Y.; GUO, J.; WU, H.; WANG, J.; WU, G. Biomaterials with antibacterial
and osteoinductive properties to repair infected bone defects. **International Journal of
Molecular Sciences**, v. 17, p. 334, 2016.

LYFORD, R. H.; MILLS, M. P.; KNAPP, C. I.; SCHEYER, E. T.; MELLONIG, J.T.
MADURAVEERAN, G.; SASIDHARAN, M.; GANESAN, V. Electrochemical sensor
and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical
applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 103, p. 113-129, 2018.

MISCH, C. M., MISCH, C.E. Autogenous mandibular bone grafts for reconstruction of
ridge deficiencies prior to implant placement. **The International Journal of Oral and
Maxillofacial Implants**, v. 8, p. 117, 1993.

NISKA, K.; KNAP, N.; KĘDZIA, A.; JASKIEWICZ, M.; KAMYSZ, W.;
INKIELEWICZ-STEPNIAK, I. Capping Agent-Dependent Toxicity and Antimicrobial
Activity of Silver Nanoparticles: An In Vitro Study. Concerns about Potential
Application in Dental Practice. **International Journal of Medical Sciences**, v. 13, p.
772–782, 2016.

NUNES, M. R.; CASTILHO, M. S. M.; VEECK, A. P. L.; DA ROSA, C. G.;
NORONHA, C. M.; MACIEL, M. V. O. B.; BARRETO, P. M. Antioxidant and
antimicrobial methylcellulose films containing Lippia alba extract and silver
nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 192, p. 37-43, 2018.

OLIVEIRA, S. M.; MIJARES, D. Q.; TURNER, G.; AMARAL, I. F.; BARBOSA, M.
A.; TEIXEIRA, C. C. Engineering Endochondral Bone: In Vivo Studies. **Tissue
Engineering Part A**, v.15, p.635-643, 2009.

ORYAN, A.; ALEMZADEH, E.; TASHKHOURIAN, J.; NAMI ANA, S. F. Topical delivery of chitosan-capped silver nanoparticles speeds up healing in burn wounds: A preclinical study. **Carbohydrate Polymers**, v. 200, p. 82–92, 2018.

PALMA, F. R. **Reparo Ósseo após implantes com hidroxiapatita e osso liofilizado: estudo histológico em ratos**. Dissertação de Mestrado em Odontologia, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2004.

PETERSEN, P.E.; OGAWA, H. The global burden of periodontal disease: Towards integration with chronic disease prevention and control. **Periodontology** 2000, v. 60, p. 15–39, 2012.

ROCCO, M. C.; WILLIAMS, R. S.; ALIVISATOS, P. **Nanotechnology Research Directions**: IWGN Workshop Report, WREC, 1999.

ROOS, M. V.; CAMISA J. R., A.; MICHELIN, A. F. Procedimentos de um banco de ossos e a aplicabilidade dos enxertos por ele proporcionados. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.8, p. 122-127, 2000.

ROTHAMEL, D.; SCHWARZ, F.; HERTEN, M.; FERRARI, D.; MISCHKOWSKI, R.; SAGER, M. Vertical ridge augmentation using xenogenous bone blocks: a histomorphometric study in dogs. **The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**. v. 24, p. 243-50, 2009.

SENTHIL, B.; DEVASENA, T.; PRAKASH, B.; RAJASEKAR, A. Non-cytotoxic effect of green synthesized silver nanoparticles and its antibacterial activity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 177, p. 1–7, 2017.

SHAWKY, H.; SOHA, M. B.; GIHAN, A. E. L. B. Evaluation of Clinical and Antimicrobial Efficacy of Silver Nanoparticles and Tetracycline Films in the Treatment of Periodontal Pockets. **Journal of Medical and Dental Sciences**. v. 14, p. 113-123, 2015.

SHI, T.; SUN, X.; HE, Q. Cytotoxicity of Silver Nanoparticles Against Bacteria and Tumor Cells. **Current Protein and Peptide Science**, v. 19, p. 525 – 536, 2018.

SHRESTHA, A.; KISHEN, A. Antibacterial nanoparticles in endodontics: A Review. **Journal of Endodontics**, v. 42, p.1417–1426, 2016.

SHRINIWAS, P. P.; SUBHASH, T.K. Antioxidant, antibacterial and cytotoxic potential of silver nanoparticles synthesized using terpenes rich extract of Lantana camara L. leaves. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 76–81, 2017.

SONG, Y. J.; KIM, S.B. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, p.79-84, 2009.

SOUZA, S. L. S.; *et al.* **Biomateriais na instalação de implantes osseointegrados**. Periodontologia e implantodontia, soluções estéticas e recursos clínicos. 1ª ed. Ed. Napolião, APCD, 2010.

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

TANAKA, R. *et al.*, Incorporação dos enxertos ósseos em bloco: processo biológico e considerações relevantes. **Con Scientiae Saúde**, v. 7, p. 323-327, 2008.

ULLAHA, H.; WAHID, F.; SANTOS, H. A.; KHAN, T. Advances in biomedical and pharmaceutical applications of functional bacterial cellulose-based nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 330–352, 2016.

YU-GUO, Y.; SHIMIN, Z.; JI-YOON, H.; IL-KEUN, K. Silver Nanoparticles Potentiates Cytotoxicity and Apoptotic Potential of Camptothecin in Human Cervical Cancer Cells, **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 21, 2018.

YUSUF, A.; BROPHY, A.; GOREY, B.; CASEY, A. Liposomal encapsulation of silver nanoparticles enhances cytotoxicity and causes induction of reactive oxygen species-independent apoptosis. **Journal of Applied Toxicology**, v. 38, p. 616-627, 2018.

ZHANG, L.; PORNPATTANANANGKU, D.; HU, C. M.; HUANG, C. M. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. **Current Medicinal Chemistry**. v. 17, p. 585–594, 2010.

ANEXO A - Artigo “Síntese Verde de Nanopartículas de Prata para uso em Biomateriais Odontológicos” publicado na Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde.



Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde da UNIARP
ISSN: 2238-832X

SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA USO EM BIOMATERIAIS ODONTOLÓGICOS

André Narciso¹

Cirurgião-Dentista, Mestrando
em Ambiente e Saúde,
Universidade do Planalto
Catarinense, E-mail:
andre.narciso@hotmail.com

Brenda Paim²

Graduanda em Medicina,
Universidade do Planalto
Catarinense, E-mail:
brenda-paim@hotmail.com

**Cleonice Gonçalves da
Rosa³**

Química de Alimentos, Doutora
em Ciência dos Alimentos,
Universidade do Planalto
Catarinense, E-mail:
cleosagm@yahoo.com.br

**Jefferson Viapiana
Paes⁴**

Cirurgião-Dentista, Doutor em
Odontologia, Universidade do
Planalto Catarinense, E-mail:
drpaes@gmail.com

Michael Ramos Nunes⁵

Químico, Doutor em Química,
Instituto Federal de Santa
Catarina, E-mail:
michael.nunes@ifsc.edu.br

**Anelise Viapiana
Masiero⁶**

Cirurgião-Dentista, Doutora em
Odontologia, Universidade do
Planalto Catarinense, E-mail:
avmasiero@gmail.com

GREEN SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES FOR USE IN DENTAL BIOMATERIALS

RESUMO

A nanotecnologia tem revolucionado diversas áreas da saúde, dentre elas a odontologia. O uso de nanopartículas associada aos materiais odontológicos se justifica pela melhoria das propriedades físico-químicas dos materiais. Em especial nanopartículas de prata sintetizadas pelo método de biorredução possuem uma grande superfície de contato, com propriedades antimicrobianas e características não citotóxicas. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar as propriedades físico-químicas de nanopartículas de prata obtidas por biorredução usando folhas de araçá-vermelho (*Psidium catelanium Sabine*). A formação das nanopartículas de prata foi confirmada pelo aparecimento de uma banda em 400 nm nos espectros de UV-vis, característicos da superfície de ressonância plasmônica (SPR). As AgNPs apresentaram um diâmetro médio de $258,3 \pm 5$ nm e índice de polidispersão de 0,300 e estabilidade eletrolítica, com valores de potencial zeta de $-21,0 \pm 4$ mV. Os extratos das folhas de *Psidium catelanium Sabine* mostraram boa atividade antioxidante frente a inibição do radical livre DPPH e excelente conteúdo de compostos fenólicos. Os resultados demonstram excelentes propriedades físico-químicas das nanopartículas de prata obtidas por biorredução usando folhas de araçá-vermelho com potencial de desenvolvimento de um biomaterial inovador para uso odontológico.

PALAVRAS-CHAVE: Nanotecnologia. Nanopartículas de prata. Odontologia.

ABSTRACT

Nanotechnology has revolutionized many areas of health, including dentistry, improving the physicochemical properties of dental materials and developing new ways of diagnosing and treating related diseases. Silver nanoparticles (AgNPs) synthesized by the bioreduction method have a large contact surface with antimicrobial properties and non-cytotoxic characteristics. Given the exposed, the present work aimed to evaluate the physicochemical properties of silver nanoparticles obtained by bioreduction using leaves of araçá vermelho (*Psidium catelanium Sabine*). The formation of AgNPs was confirmed by the appearance of a band at 400 nm in the UV-vis spectra characteristic of the surface plasmon resonance (SPR). AgNPs had an average diameter of $258.3 \pm$

5 nm, with a polydispersion index of 0.300 and electrophoretic stability, with zeta potential values of $-21.0 \pm 4\text{mV}$. *Psidium catelanium* Sabine leaf extracts showed good antioxidant activity against DPPH free radical inhibition and excellent phenolic compound content. The results demonstrate the development potential of an innovative biomaterial with non-toxic properties and antimicrobial action to enhance the repair process, reduce the use of systemic antibiotics and reduce the risk of new surgical interventions in dentistry.

KEYWORDS: Nanotechnology. Silver nanoparticles. Dentistry.

INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma ciência que estuda estruturas, materiais e partículas, em que uma de suas dimensões está em escala nanométrica (nm) (BUSQUETS; MBUNDI, 2017). A nanociência tem revolucionado diversas áreas da saúde (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007), dentre elas, a odontologia (BAPAT et al., 2018). Neste contexto, íons e nanopartículas metálicas se destacam como agentes antimicrobianos com propriedades atóxicas associados a enxertos ósseos, na engenharia de tecidos, em tratamentos endodônticos (BAPAT et al. 2018, BARUA et al. 2017, CHÁVEZ-ANDRADE et al., 2017; LU et al., 2016, NORONHA et al. 2017) e no aprimoramento das propriedades físico-químicas dos materiais odontológicos (ALKAHTANI, 2018).

As técnicas comumente empregadas para sintetizar materiais nanoestruturados são chamadas de “bottom up” do inglês “de baixo para cima” e “top down” do inglês “de cima para baixo” (FERREIRA; RANGEL, 2009). A técnica “top down” utiliza processos de ruptura de uma porção maior do material em nanopartículas (FERREIRA; RANGEL, 2009), normalmente partículas obtidas por este método apresentam defeitos em sua estrutura, pois é necessário realizar tensão entre os átomos para produzir as nanopartículas (PIRES, 2013). A técnica “bottom up”, consiste no processo de agregação e auto-organização dos átomos e moléculas de metal (FERREIRA; RANGEL, 2009), sendo que as partículas obtidas por este método geralmente são mais uniformes e homogêneas (PIRES, 2013).

As nanopartículas e os materiais nanoestruturados disponíveis são classificados de acordo com o material de origem (JEEVANANDAM et al., 2018). Nanomaterial a base de carbono, são encontrados em morfologias como tubos ocos, elipsóides ou esferas e são representados por nanotubos de carbono ou nanofibras de carbono. Nanomateriais inorgânicos são representados pelas nanopartículas metálicas, obtidas a partir da redução de sais ou óxidos metálicos. Nanomateriais as bases de moléculas orgânicas incluem micelas, lipossomas e nanopartículas poliméricas. Estas estruturas se valem de interações não covalentes (fracas) para a sua automontagem. Por fim os nanocompósitos são estruturas multifásicas, com uma fase na dimensão em nanoescala, que pode combinar nanopartículas com outras nanopartículas ou nanopartículas combinadas com materiais em dimensões maiores (JEEVANANDAM et al. 2018).

Para sintetizar as nanopartículas existem diversos métodos que podem ser empregados, tais como os métodos químicos, os físicos e os biológicos. De maneira geral, os métodos físicos e químicos apresentam limitações, pois envolvem custos elevados, necessitam da utilização de agentes redutores

altamente poluentes, o que resulta em nanopartículas instáveis e tóxicas à saúde humana, fato que restringe a aplicabilidade (IRAVANI et al., 2014; RAJA; RAMESH; THIVAHARAN, 2017; RAJ; MALI; TRIVEDI, 2018).

A síntese das nanopartículas usando os princípios da “química verde” visa reduzir ou eliminar a geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao meio ambiente. Anastas e Warner (1998) estabeleceram critérios que devem ser seguidos para implantar os métodos da química verde. Dentre os critérios, o uso de matéria-prima oriunda de fontes renováveis e a síntese de produtos atóxicos, são aspectos relevantes para desenvolver e produzir um novo produto, pois espera-se que o processo seja economicamente viável e sustentável, sem gerar substâncias tóxicas no meio ambiente (MANAHAN, 2006).

Neste contexto de síntese de nanopartículas metálicas de maneira rápida, sustentável, economicamente viável e conveniente para uma produção em larga escala, há relatos na literatura de que as nanopartículas pode ser obtida por biorredução de extratos naturais de plantas, como as folhas de araçá *Psidium catelanium* Sabine (SANA; DOGIPARTHI, 2018). Ainda, pesquisas recentes demonstram que a utilização das nanopartículas de prata sintetizadas pelo método verde não apresenta risco à saúde humana, em razão de sua baixa toxicidade (KHORRAMI et al. 2018; SHI; SUN; HE, 2018).

O mecanismo geral para a redução dos íons de prata e a consequente formação das nanopartículas de prata, por meio da ação biológica, consiste na doação de elétrons de um agente antioxidante, onde o composto fenólico (flavonoide) reduzido doa um elétron para a prata oxidada (Ag^+), que se transforma em prata reduzida (Ag^0), e o flavonoide “oxidado” é estabilizado por ressonância (NUNES et al., 2018).

Inicialmente o extrato da planta reduz os íons de prata, e estes átomos ficam neutros, com carga zero, em seguida, no processo de nucleação, os átomos sem carga colidem entre si formando um núcleo estável (ALBERNAZ, 2014). Logo após este processo, os átomos colidem novamente e formam partículas maiores (processo de crescimento), finalmente haverá o esgotamento dos íons metálicos e o recobrimento das partículas por compostos presentes no extrato vegetal e promove a estabilização do sistema (ALBERNAZ, 2014). Desta forma, grande parte dos compostos antioxidantes presente no extrato vegetal irá aderir à superfície das nanopartículas, conferindo assim características peculiares e únicas, como atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica (ALBERNAZ, 2014).

Diante do exposto, observa-se que as nanopartículas de prata podem ser utilizadas em estudos que envolvam a saúde humana, desde que comprovada a sua não toxicidade. Assim, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar nanopartículas de prata por biorredução por meio de folhas de araçá-vermelho (*Psidium catelanium* Sabine) e avaliar suas propriedades físico-químicas na perspectiva de associação futura a biomateriais odontológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento caracteriza-se como um estudo experimental conduzido na Universidade do Planalto Catarinense (UNIPAC), em colaboração com o Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC) e a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), realizado em duas etapas. Na primeira etapa foi realizada a caracterização das folhas de araçá vermelho, e posteriormente foi realizada a síntese e caracterização das nanopartículas de prata.

Caracterização das folhas de araçá vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine)

As folhas da planta de araçá vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) foram coletadas na UNIPLAC, Lages, Brasil (27°48'S, 50°20'W). Primeiramente, as folhas foram secas em estufa com circulação de ar a 40°C por 24 horas e, em seguida trituradas. Para obtenção do extrato aquoso, as amostras trituradas foram homogeneizadas com água destilada e posteriormente aquecidas a 75 °C por 2 minutos na proporção 10 gramas de folha para 100 ml de água e filtradas em papel filtro.

O teor de fenólicos totais foi determinado nos extratos aquosos das folhas de araçá-vermelho utilizando o método descrito por Singleton et al. (1999). Como tratamento controle foi utilizada água em substituição aos extratos. Na análise dos compostos fenólicos totais, inicialmente 104 µL de extrato aquoso das folhas foram homogeneizados com 104 µL de reagente Folin-Cicalteau 0,25N. A mistura reagiu por 3 minutos e posteriormente foram adicionados 208 µL de Na₂CO₃ 1N, e reagidos por mais 2h. Decorrido, esse período em repouso a amostra foi analisada em espectrofotômetro UV-Vis Bel Photonics M51 a 725 nm. O teor de fenólicos totais foi quantificado a partir de uma curva de calibração externa em ácido gálico nas concentrações de 0, 20, 50, 100, 200, 300, 350, 450 µg.mL⁻¹. E o teor de fenólicos totais dos extratos foram expressos em mg de ácido gálico por 100 mg de amostra.

A atividade antioxidante dos extratos das folhas de araçá vermelho foi determinada pela capacidade dos compostos presentes nas amostras em inibir o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) de acordo com o método descrito por Brand-Williams et al. (1998). Para avaliar a atividade antioxidante, uma alíquota de 1000 µL de amostra foram adicionados a 3,9 mL de DPPH (0,1 mmol.L⁻¹) e analisados após 30 min em espectrofotômetro UV-Vis Bel Photonics M51, em comprimento de onda de 517 nm.

Síntese e caracterização das nanopartículas de prata

As nanopartículas de prata foram sintetizadas pela técnica de bioredução de acordo com metodologia descrita por Nunes et al. (2018). Inicialmente 2 mL da solução de nitrato de prata (3.10⁻⁴ mols.L⁻¹), foi reduzida na presença de 10 mL do extrato aquoso das folhas de araçá vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine). A formação das nanopartículas foi confirmada a partir da análise de varredura no comprimento de onda do espectro de UV-VIS realizada em espectrofotômetro UV-visível Bel Photonics M51 usando uma célula de quartzo.

A determinação do tamanho da partícula (Z-ave), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta ζ (mV) das nanopartículas foram obtidos por meio da técnica de espalhamento de luz (DLS), utilizando um equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments). As amostras foram diluídas apropriadamente com água filtrada Milli-Q®, e as medições foram realizadas a 25° C a um ângulo de 173°.

Para as medições, as amostras foram colocadas em célula de eletroforese. A morfologia das nanopartículas de prata foi verificada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), utilizando microscópio JEOL, modelo JEM-1011, operando a 80 kV. A dispersão das nanopartículas foi colocada em grids

de cobre revestida de carbono (malha 200 mesh). As grids foram observadas ao microscópio após terem sido secas à temperatura ambiente.

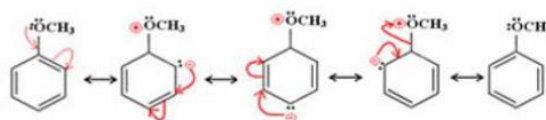
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os radicais livres podem ser definidos como qualquer espécie molecular que contenham um elétron não emparelhado em um orbital atômico. Muitos radicais são instáveis e altamente reativos. Eles podem doar um elétron ou aceitar um elétron de outras moléculas, comportando-se como oxidantes ou redutores. Essas são espécies altamente reativas, capazes de danificar o núcleo e as membranas celulares, além de reagir com moléculas biologicamente relevantes, como DNA, proteínas, carboidratos e lipídios (LOBO et al. 2010).

O valor de inibição do radical livre DPPH foi $0,028 \pm 0,001$ mg de Trolox equivalente mL⁻¹ para o extrato das folhas de araçá vermelho. Esse resultado mostra que o extrato de *Psidium cattleianum* Sabine apresenta grande potencial antioxidante. Um antioxidante é uma molécula estável o suficiente para doar um elétron a um radical livre e neutralizá-lo, reduzindo assim sua capacidade de reagir com outras moléculas. Os antioxidantes do extrato de *Psidium cattleianum* Sabine podem interagir com os radicais livres e interromper a reação em cadeia antes que as moléculas vitais sejam danificadas. O principal mecanismo de atuação dos antioxidantes é a doação de um elétron ao radical livre, sem que o antioxidante se torne um novo radical livre. Os antioxidantes naturais mais proeminentes são os compostos fenólicos (Nunes et al. 2018). O resultado de compostos fenólicos totais para o extrato de *Psidium cattleianum* Sabine foi $0,037 \pm 0,002$ mg de ácido gálico equivalente mL⁻¹ de extrato. Estes resultados comprovam que as folhas de araçá possuem compostos fenólicos na sua composição corroborando como os achados de Pereira et al. (2018).

As hidroxilas fenólicas podem atuar como agente redutor, doando prótons (H⁺). A ressonância do anel benzênico mantém o equilíbrio eletrônico da estrutura química (NUNES et al. 2018). O efeito ressonante é a atração ou repulsão que ocorre entre os elétrons da ligação π , no anel benzênico. Esse efeito pode ocorrer em ligações π de ligações duplas ou triplas. Se o grupo substituinte for um doador de elétrons, ele realizará a ressonância dentro do anel, isto é, deslocalizará a carga negativa ao longo do anel benzênico. Um grupo que realiza esse mecanismo é o radical arila (-OCH₃) (Hansen; Koch e Kleinpeter, 2018). Na Figura 1 é possível observar que o oxigênio doa elétrons para o anel benzênico, fornecendo mais um contribuinte de ressonância e aumentando a estabilização dela. Isso aumenta a densidade eletrônica no anel, o que faz com que a próxima reação de substituição ocorra com maior velocidade, pois o grupo que irá atacar é eletrofílico (possui carga positiva) e está ávido para ganhar elétrons. Dessa forma, quando um grupo ligante ao anel age dessa forma, como elétron-doador, é chamado de ativante e irá orientar o grupo seguinte para se ligar nas posições orto e para do anel (Hansen; Koch e Kleinpeter, 2018). Estes resultados mostram que os extratos de araçá vermelho podem atuar como agentes redutores, para biossíntese de nanopartículas de prata.

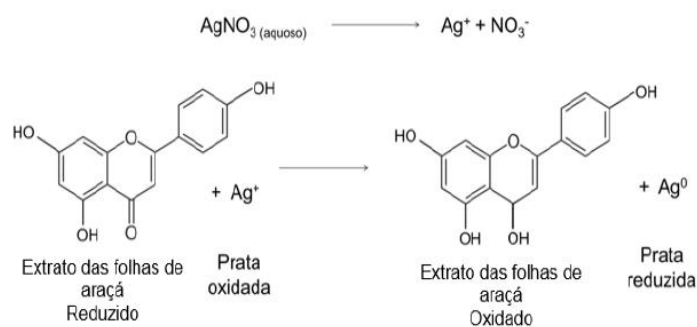
Figura 1. Representação do efeito ressonante com um grupo elétron-doador.



Fonte: Hansen; Koch e Kleinpeter, (2018).

A redução dos íons Ag^+ presentes na solução de AgNO_3 resultam na formação de nanopartículas metálicas, de acordo com o mecanismo mostrado na Figura 2, proposto por Sana e Dogiparthi (2018).

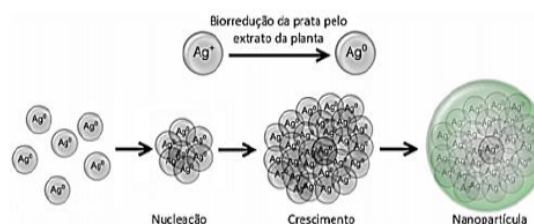
Figura 2: Mecanismo de síntese nas nanopartículas de prata



Fonte: Sana e Dogiparthi (2018), com modificações.

A formação das AgNPs por nucleação (Figura 3) foi confirmada pelo aparecimento de bandas em 400 nm nos espectros de UV-vis, característicos da superfície de ressonância plasmônica (SPR) das nanopartículas de prata (Figura 4).

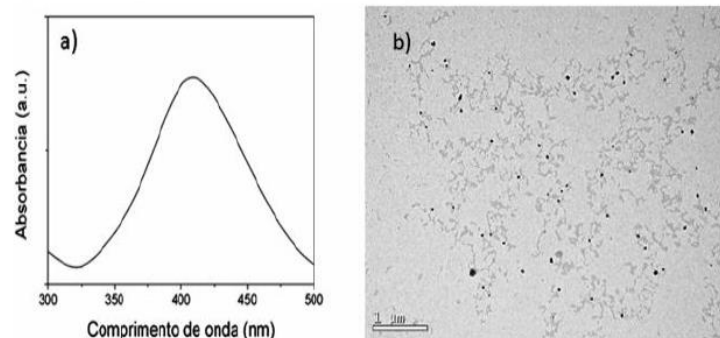
Figura 3: Processo de formação das nanopartículas de prata sintetizadas com extrato vegetal.



Fonte: Albermaz (2014).

Na Figura 4, são mostradas as imagens de MET das nanopartículas de prata obtidas. Pode-se observar a formação de partículas esféricas com tamanhos extremamente reduzidos. Por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmico do inglês "Dynamic Light Scattering" (DLS) foi obtido um diâmetro médio de partícula de $258,3 \pm 5$ nm e índice de polidispersão de 0,300. Estes resultados corroboram com os obtidos por MET, que indicam a formação de partículas pequenas (em escala nanométrica) e altamente dispersas, isto é, partículas que não estão aglomeradas, visto que elas apresentam tendência à aglomeração devido à energia superficial resultante dos domínios reduzidos (NUNES et al. 2012). Desta forma se faz necessário a utilização de agentes estabilizadores para a obtenção de diâmetros mais reduzidos, impedindo a coalescência e aglomeração das partículas (NUNES et al. 2012). O presente trabalho confirma que o extrato aquoso de araraúba vermelho, além de atuar como agente redutor nas nanopartículas, também age como agente estabilizante das mesmas. As nanopartículas obtidas neste trabalho apresentaram estabilidade, com valores de potencial zeta de $-21,0 \pm 4$ mV. Valores de potencial zeta próximos a +30 mV e -30 mV conferem estabilidade das cargas em uma dispersão de nanopartículas (da ROSA et al. 2015). Uma camada de moléculas adsorvida na superfície das partículas, altera o potencial zeta. O potencial zeta é em função da carga superficial da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio e da natureza e composição do meio que a circunda. Esse potencial reflete a carga efetiva nas partículas, se correlaciona com a repulsão eletrostática entre elas e com a estabilidade da suspensão. O potencial zeta é um indicador útil da carga das partículas e pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais (da ROSA et al. 2015). Quanto maior ou menor o potencial zeta mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera a tendência natural à agregação (da ROSA et al. 2020).

Figura 4. a) Espectro de UV-visível das AgNPs; b) Imagens de MET das AgNPs.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o presente estudo pode-se concluir que as nanopartículas de prata podem ser obtidas por biorredução, utilizando extrato aquoso de folhas de araçá vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine). Este extrato possui boa atividade antioxidante e elevado conteúdo de compostos fenólicos. Os resultados obtidos por Espectroscopia no UV-Vis, DLS e MET, mostraram partículas com tamanhos reduzidos e estáveis nas condições estudadas. Desta forma observa-se que, estas nanopartículas de prata excelentes propriedades físico-químicas para futuras associações a biomateriais de uso odontológico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, ao CNPQ, Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME – UFSC) e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação de Santa Catarina - FAPESC (Termo de Outorga 2019TR70) pelo apoio.

REFERÊNCIAS

- ALKAHTANI, R. N. The implications and applications of nanotechnology in dentistry: A review. **The Saudi Dental Journal**, v. 30, p. 107-116, 2018.
- ANASTAS, P.; WARNER, J. **Green Chemistry: Theory and Practice**. New York: Oxford University Press, 1998.
- BAPAT, R. A. et al. An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry. **Materials Science and Engineering: C**, v. 91, p. 881-898, 2018.

BARUA, S. et al. Silver Nanoparticles as Antibacterial and Anticancer Materials Against Human Breast, Cervical and Oral Cancer Cells. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 17, p. 968-976, 2017.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, p.25-30, 1995.

BUSQUETS, R., MBUNDI, L. Emerging Nanotechnologies in Food Science: Micro and Nano Technologies. **Chapter One** - Concepts of Nanotechnology. Amsterdã: Elsevier, p. 1-9, 2017.

CHÁVEZ-ANDRADE, G. M. et al. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial activity of poly (vinyl alcohol) - coated silver nanoparticles and farnesol as irrigating solutions. **Archives of Oral Biology**, v. 84, p. 89-93, 2017.

DA ROSA, C. G. et al. Application in situ of zein nanocapsules loaded with *Origanum vulgare* Linneus and *Thymus vulgaris* as a preservative in bread. **Food Hydrocolloids**, v. 99, p. 105339, 2020.

FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1860-1870, 2009.

HANSEN, P. E., KOCH, A., KLEINPETER, E. Ring current and anisotropy effects on OH chemical shifts in resonance-assisted intramolecular H-bonds. **Tetrahedron Letters**, v. 59, p. 2288–2292, 2018.

JEEVANANDAM, J. et al. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 9, p. 1050–1074, 2018.

KHORRAMI, S. et al. Selective cytotoxicity of green synthesized silver nanoparticles against the MCF-7 tumor cell line and their enhanced antioxidant and antimicrobial properties. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 8013–8024, 2018.

LOBO, V., PATIL, A., PHATAK, A., CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Review**, v. 4, p. 118–126, 2010.

LU, H. et al. Biomaterials with antibacterial and osteoinductive properties to repair infected bone defects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 334, 2016.

MANAHAN, S. E. **Environmental chemistry**. 8. ed. Florida: Boca Raton, 2006.

NORONHA, V. T. et al. Silver nanoparticles in dentistry. **Dental Materials**. v. 33, p. 1110-1126, 2017.



NUNES, M. R. et al. Antioxidant and antimicrobial methylcellulose films containing Lippia alba extract and silver nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 192, p. 37-43, 2018.

NUNES, M. R. et al. Charged silsesquioxane used as a vehicle for gold nanoparticles to perform the synthesis of catalyst xerogels. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 63, p. 258-265, 2012.

PEREIRA, E. S. et al. Psidium cattleianum fruits: A review on its composition and bioactivity. **Food Chemistry**, v. 258, p. 95-103, 2018.

RAJ, S.; CHAND MALI, S.; TRIVEDI, R. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using Enicostemma axillare (Lam.) leaf extract. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 503, p. 2814-2819, 2018.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, p. 20-31, 2007.

SANA, S. S.; DOGIPARTHI, L. K. Green synthesis of silver nanoparticles using Givotia moluccana leaf extract and evaluation of their antimicrobial activity. **Materials Letters**, v. 226, p. 47-51, 2018.

SHI, T.; SUN, X.; HE, Q. Cytotoxicity of Silver Nanoparticles Against Bacteria and Tumor Cells. **Current Protein and Peptide Science**, v. 19, p. 525 - 536, 2018.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymology**, v. 299, p.152 -178, 1999.

Recebido em: 29-09-2019

Aceito em: 11-11-2019