

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Camila Chaud Nunes

Síntese verde de nanopartículas de ouro funcionalizadas com fração orgânica acetato de etila de *Centella asiatica*: Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* e *ex vivo*

UBERLÂNDIA-MG

SETEMBRO DE 2025

Camila Chaud Nunes

**Síntese verde de nanopartículas de ouro funcionalizadas com fração orgânica
acetato de etila de *Centella asiatica*: Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* e *ex vivo***

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de
Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Co-orientadora: M. Sc. Ana Luiza Silva Borges

UBERLÂNDIA-MG

SETEMBRO DE 2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Síntese verde de nanopartículas de ouro funcionalizadas com fração orgânica
acetato de etila de *Centella asiatica*: Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* e *ex vivo*

Camila Chaud Nunes

Orientador:

Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, IBTEC, UFU

Co-orientadora:

M. Sc. Ana Luiza Silva Borges, IBTEC, UFU

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em __/__/__

Coordenadora do Curso:

Prof^ª. Dr^ª. Rute Magalhães Brito

UBERLÂNDIA-MG
SETEMBRO DE 2025

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

N972
2025 Nunes, Camila Chaud, 2002-
Síntese verde de nanopartículas de ouro funcionalizadas com
fração orgânica acetato de etila de Centella asiatica: Avaliação da
capacidade antioxidante in vitro e ex vivo [recurso eletrônico] /
Camila Chaud Nunes. - 2025.

Orientadora: Foued Salmen Espindola.

Coorientadora: Ana Luiza Silva Borges.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade
Federal de Uberlândia, Graduação em Biotecnologia.

Modo de acesso: Internet.

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Biotecnologia. I. Espindola, Foued Salmen, 1958-, (Orient.). II.
Borges, Ana Luiza Silva, 1997-, (Coorient.). III. Universidade
Federal de Uberlândia. Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU: 60

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço incondicionalmente aos meus pais, Cristiane e Wendel, por sempre estarem de mãos dadas comigo em todos os desafios da minha vida. Agradeço por acreditarem em mim e por fazerem sempre o impossível para me permitir sonhar. Concluir mais esta etapa só foi possível devido a eles.

À minha irmã, Geovana, por ser a minha melhor amiga e por tornar a minha vida mais bonita desde o dia em que nasceu.

À todos aqueles familiares e amigos, que sempre estiveram comigo, vibraram comigo, e torceram por mim.

Ao meu namorado, Victor, por seu apoio e carinho incondicional. Obrigada por ser o meu amuleto da sorte, por me fazer sorrir quando não parece possível e me acompanhar aonde quer que eu vá.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, por todas as contribuições fundamentais para a realização deste trabalho. À minha co-orientadora, Ana Luiza Silva Borges, pela orientação, paciência e ensinamentos ao longo de todas as etapas da pesquisa; sem sua presença, nada disso teria sido possível. Agradeço também a toda a equipe do LABIBI, especialmente ao pós-graduando Tarcísio Paiva, por compartilhar seu conhecimento, e me guiar nas rotinas e protocolos do laboratório.

Aos professores da graduação, pelos ensinamentos transmitidos ao longo da minha formação, e aos professores do IFTM – Campus Uberlândia, que me apresentaram a Biotecnologia. Em especial, agradeço à professora Marcely Ferreira Prado, por ter me introduzido à iniciação científica e por despertar em mim o amor pela pesquisa.

RESUMO

Nanopartículas de ouro foram funcionalizadas utilizando a fração acetato de etila do extrato etanólico de *Centella asiatica*, a qual atuou como agente redutor dos sais de ouro durante o processo de síntese. A formação das nanopartículas foi confirmada por espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis). Análises por espalhamento dinâmico de luz (DLS) indicaram um diâmetro hidrodinâmico ligeiramente superior ao esperado para nanopartículas convencionais. Apesar desse aumento de tamanho, os testes biológicos *ex vivo* evidenciaram o potencial científico relevante dessas nanopartículas. A caracterização por potencial zeta e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) demonstrou que a superfície das nanopartículas está recoberta por compostos presentes na fração acetato de etila, conferindo estabilidade coloidal e preservação das propriedades bioativas do extrato. Adicionalmente, os ensaios de capacidade antioxidante ORAC e hemólise reforçaram o perfil antioxidante das nanopartículas, ainda que os testes de FRAP e DPPH não tenham apresentado resultados tão expressivos. Esses achados sugerem que, mesmo com limitações em alguns ensaios, as nanopartículas apresentam atividade antioxidante significativa.

Palavra-chave: Estresse oxidativo, Extrato etanólico, Hemólise.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	6
2 OBJETIVOS.....	9
2.1 Objetivo Geral.....	9
2.2 Objetivos Específicos.....	9
3 METODOLOGIA.....	10
3.1 Síntese Verde.....	10
3.2 Caracterização das Nanopartículas.....	11
3.3 Análise da Capacidade Antioxidante In vitro	11
3.3.1 Método da capacidade de redução do Ferro (FRAP).....	11
3.3.2 Método do sequestro do radical peroxil (ORAC).....	12
3.3.3 Método do sequestro do radical DPPH (DPPH).....	12
3.4 Análise da Capacidade de inibição da hemólise oxidativa.....	13
3.5 Atividade Antioxidante Ex-Vivo.....	14
3.5.1 Processamento do Tecido Hepático	14
3.5.2 Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)	14
3.5.3 Espécies reativas de oxigênio (ROS).....	15
3.5.4 Glutathione Reduzida (GSH).....	15
3.5.5 Conteúdo de Sulfidrilas	15
3.6 Análise Estatística	16
4 RESULTADOS.....	16
4.1 Síntese Verde.....	16
4.2 Caracterização das Nanopartícula.....	16
4.2.1 Espectro UV-visível.....	16
4.2.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	17
4.2.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	18
4.3 Análise da Capacidade Antioxidante In vitro.....	19
4.3.1 Método da capacidade de redução do Ferro (FRAP).....	19
4.3.2 Método do sequestro do radical peroxil (ORAC).....	20
4.3.3 Método do sequestro do radical DPPH (DPPH)	21
4.4 Análise da capacidade hemolítica.....	22
4.5 Atividade Antioxidante Ex-Vivo.....	22
4.5.1 Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)	22
4.5.2 Espécies reativas de oxigênio (ROS).....	23
4.5.3 Glutathione Reduzida (GSH).....	24
4.6 Conteúdo de Sulfidrilas.....	25
5 DISCUSSÃO.....	25
6 CONCLUSÃO.....	31
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é a ciência do diminuto. O prefixo "nano" vem da palavra latina "*nanus*", que significa minúsculo. De acordo com a convenção do Sistema Internacional de Unidades (SI), esse prefixo denota um fator de redução de 10^9 vezes, correspondendo a 1 nanômetro ($1\text{nm} = 10^{-9}\text{ m}$). Assim, a nanotecnologia abrange o estudo de sistemas, materiais e dispositivos em que ao menos uma de suas dimensões se encontra na escala entre 1 e 100 nanômetros (KONWAR e AHMED, 2016). Dentro dessa escala, os materiais passam a apresentar novas propriedades físico-químicas em comparação com suas versões macro estruturadas, isso porque eles possuem uma área superficial muito alta, que permite que os átomos e moléculas fiquem mais expostos, possibilitando que grupos funcionais sejam aderidos a eles, conferindo às nanopartículas (NPs) propriedades químicas, estruturais, mecânicas, elétricas, magnéticas e biológicas interessantes (FIGUEIRA, 2023; PATRA *et al.*, 2016).

Diante disto, estudos no campo da nanomedicina tem emergido muito rapidamente em virtude das nanopartículas serem capazes de interagirem com maior facilidade com as células e tecidos quando comparadas com materiais de tamanho *bulk*, permitindo assim, uma interação direta com o organismo (PATRA *et al.*, 2016; KONWAR e AHMED, 2016; FIGUEIRA, 2023). Além disso, as propriedades das NPs permitem o desenvolvimento de nanomedicamentos com potencial para atuarem no encapsulando drogas, como agentes de entrega ou anexando fármacos e entregando-os aos tecidos-alvo com maior precisão e controle (PATRA *et al.*, 2016). À vista disto, a nanomedicina é uma combinação entre os conhecimentos e técnicas da nanociência e a medicina, com a finalidade de serem usadas em diagnósticos, terapias e na produção de produtos farmacêuticos (PATRA *et al.*, 2016; CHAVVA *et al.*, 2019).

As NPs podem possuir diferentes componentes como carbono, metal ou óxidos metálicos, que proporcionam características singulares com evidente potencial de interação com sistemas biológicos (KUMARI *et al.*, 2021; CHAGAS, 2023). O ouro é largamente utilizado nas NPs devido a sua grande compatibilidade com o sistema humano e à baixa toxicidade, sendo grandemente aplicado em diversos estudos voltados para área médica. As nanopartículas de ouro (AuNPs) têm ganhado notoriedade em tais aplicações dado à sua facilidade de síntese em uma ampla gama de tamanhos (dentro da escala nanométrica), bem

como em diferentes morfologias; à suas propriedades ópticas e elétricas as quais variam conforme suas dimensões e conformações estruturais; e a presença de carga negativa em sua estrutura que facilita a sua funcionalização com variados tipos de biomoléculas, como fármacos, genes e anticorpos. Consequentemente, tais propriedades proporcionam às AuNPs uma ampla gama de aplicações como transportadores de fármacos, biossensores, diagnóstico não invasivo, imagem molecular, dentre outros (KONG *et al.*, 2017; CHAVVA *et al.*, 2019).

Na contemporaneidade, diferentes abordagens químicas, físicas e biológicas já foram desenvolvidas a fim de sintetizar nanopartículas de ouro, cada uma obtendo diferentes características (JUSTINO *et al.*, 2023). Os processos físicos utilizam uma abordagem “*Top-down*” que consiste na manipulação do ouro em escala macro de maneira que ocorre a quebra das partículas até a escala nanométrica (KUMARI *et al.*, 2021; FIGUEIRA, 2023). Já a síntese química, utiliza métodos baseados em reações químicas, com precursores moleculares ou atômicos para a obtenção das nanopartículas de interesse, sendo assim, mais simples e passíveis de controle do processo. Todavia, tais metodologias apresentam algumas desvantagens como custo elevado, toxicidade biológica e impacto ambiental negativo haja vista que produzem resíduos perigosos e utilizam solventes orgânicos tóxicos, características que limitam a sua utilização para fins farmacêuticos e clínico (FIGUEIRA, 2023). Dessa forma, a utilização de compostos bioativos extraídos de plantas são uma alternativa viável à medida que são amplamente disponíveis, de fácil manuseio e desempenham a função de agentes redutores moderando a toxicidade das nanopartículas e adicionando-as às suas propriedades (FARD *et al.*, 2018; JUSTINO *et al.*, 2023).

A síntese verde fitomediada permite a produção eficiente de nanoestruturas. Dado que os vegetais sintetizam metabólitos secundários com propriedades antioxidantes, antimicrobianas e antitumorais, a fitossíntese, síntese de NPs mediada por vegetais, é capaz de reduzir íons metálicos e aderi-los à superfície das nanopartículas de forma que lhes conferem propriedades como boa estabilidade, grande rendimento e baixo custo. Ademais, a síntese verde acontece por meio de uma ação conjunta de biomoléculas como ácido tânico, flavonoides e terpenoides capazes de liberar átomos de hidrogênio, facilitando a redução dos precursores metálicos e promovendo a formação das nanopartículas (SINGH, TIWARI e TIWARI, 2017; JUSTINO *et al.*, 2023).

Sob outro enfoque, a *Centella asiatica* (L.) Urb. é uma planta herbácea pertencente à família Apiaceae, nativa das regiões tropicais da Ásia, como a China e países do sudeste

asiático, podendo ser encontrada em regiões da América Central e do Sul, onde é conhecida como “pennywort” e “gotu kola” (SUN *et al.*, 2020; HASHIM *et al.*, 2011). No Brasil, é denominada como “centelha”, “pata-de-mula” e “cairuçu-asiático” (PITTELLA *et al.*, 2009). É comumente vista no sul africano, Irã, Paquistão e Índia, onde é difundida na medicina Ayurvédica (BORGES *et al.*, 2024).

Retratada como: “*Centella asiatica*, amarga, não tóxica. Adequada para uso em febre e problemas de pele” é, por séculos, grandemente difundida na medicina tradicional chinesa a fim de tratar diferentes doenças como asma, úlceras, lúpus e psoríase, sendo o seu uso mais comum na promoção da cicatrização de feridas (SUN *et al.*, 2020; HASHIM *et al.*, 2011; ADTANI *et al.*, 2011). No limiar deste século, seu amplo potencial terapêutico e seu mecanismo de ação vem sendo estudado *in vitro* e *in vivo*, com o propósito de confirmar seu uso tradicional com base científica, assim, resultados promissores para o tratamento da diabetes mellitus, obesidade e doenças cardiovasculares (KABIR *et al.*, 2014; SUPKAMONSENI *et al.*, 2014), tratamento de doenças neurológicas, melhora de funções cognitivas e memória (HAFIZ *et al.*, 2020; NASIR *et al.*, 2012; RATHER *et al.*, 2018), potencial cicatrizante e tratamento de diversas doenças da pele (ARRIBAS-LÓPES *et al.*, 2022), além do seu potencial anti-inflamatório e antioxidante foram obtidos (BURANASUDJA *et al.*, 2021; SUN *et al.*, 2020; BORGES *et al.*, 2024).

Como descrito por diversos estudos, a *C. asiatica* possui em sua composição uma vasta quantidade de classes químicas diferentes, como compostos fenólicos e triterpenoides (BORGES *et al.*, 2024). Os compostos fenólicos, caracterizam-se pela presença de um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila (-OH), o que confere a essas substâncias propriedades antioxidantes capazes de desempenharem um papel crucial na modulação do estresse oxidativo, um fator etiológico relevante em diversas patologias crônico-degenerativas, incluindo diabetes mellitus, neoplasias e processos inflamatórios (ROCHA *et al.*, 2011). Na *C. asiatica*, esses são encontrados como: flavonoides presentes nas folhas (quercetina e kaempferol), fitosteróis (campesterol, sitosterol e estigmasterol), ácido glucônico, ácido ferúlico e ácido clorogênico (SUN *et al.*, 2020) que auxiliam na capacidade terapêutica da planta.

No entanto, a atividade farmacológica da *C. asiatica* é predominantemente atribuída à presença dos metabólitos secundários majoritários da planta, os triterpenoides (RAZALI *et al.*, 2019). Esses são uma subclasse dos terpenos, compostos de 30 átomos de carbono

originados em plantas a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou piruvato e 3-fosfoglicerato (nos plastídeos). A estrutura química desses compostos é caracterizada pela presença de seis unidades de isopreno, e eles exibem uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas (SILVA *et al.*, 2020).

A identificação dos compostos da planta em questão já foi estabelecida na literatura, assim, o ácido asiático, ácido madecássico e seus derivados glicosilados, asiaticosídeo e madecassoside são os mais expressos (HASHIM *et al.*, 2011; SUN *et al.*, 2020; WONG *et al.*, 2021; BORGES *et al.*, 2024). Outrossim, tais metabólitos isolados são obtidos a partir do extrato de plantas preparados a partir de folhas, flores, raízes, caules ou frutos (SILVA *et al.*, 2020). Nesse sentido, estudos dos extratos etanólico, metanólico e aquoso da *C. asiatica* já foram explorados (WONG *et al.*, 2021; BORGES *et al.*, 2024).

No estudo conduzido por BORGES *et al.*, 2024, investigou-se as atividades antioxidante, antiglicante, antimicrobiana e citotóxica do extrato etanólico da *C. asiatica* e as suas frações orgânicas, indicando as frações acetato de etila e n-butanol como aquelas que obtiveram os resultados mais notáveis nos testes realizados, sendo então as mais indicadas para futuros estudos.

À vista disso, no presente estudo são sintetizadas nanopartículas funcionalizadas com *Centella asiatica* (AuNPs-Ca). Utilizamos o tetracloroaurato de potássio (KAuCl_4) como precursor e funcionalizamos com a fração acetato de etila da *C. asiatica*. As propriedades das AuNPs-Ca sintetizadas são caracterizadas, e a capacidade antioxidante *in vitro* e *ex vivo*, bem como a capacidade hemolítica, é avaliada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar nanopartículas de ouro com fração acetato de etila de *Centella asiatica*, avaliando a sua capacidade hemolítica e antioxidante *in vitro* e *ex vivo*.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar as nanopartículas AuNPs-Ca pelos métodos espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Visível), espalhamento dinâmico de

luz (DLS), mensuração do potencial zeta e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);

- Analisar a capacidade antioxidante *in vitro* das nanopartículas pelos métodos de capacidade de redução do ferro (FRAP), capacidade de sequestro do radical peroxil (ORAC) e sequestro do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH);
- Determinar a capacidade de inibição de hemólise oxidativa das nanopartículas pelo ensaio de inibição da hemólise oxidativa induzida com AAPH;
- Determinar a atividade antioxidante *ex-vivo* das AuNPs-Ca pelos métodos análises de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS); espécies reativas de oxigênio (ROS); glutathiona reduzida (GSH); conteúdo de sulfidrilas.

3 METODOLOGIA

3.1 Síntese Verde

No presente estudo, nanopartículas de ouro funcionalizadas com *Centella asiatica* (AuNPs-Ca) foram sintetizadas utilizando tetracloroaurato de potássio (KAuCl_4) e a fração orgânica acetato de etila (*FAE-Ca*), obtida por meio do particionamento líquido-líquido do extrato etanólico das folhas da planta.

Inicialmente, 1 mL de uma solução de *FAE-Ca* (3 mg/mL) foi diluída em 5 mL de água deionizada sob agitação vigorosa utilizando um agitador magnético por 20 minutos a 50 °C. Em seguida, 120 μL de KAuCl_4 (0,1 M) foram adicionados à mistura, que foi mantida sob agitação leve e protegida da luz por um período de 2 horas a 50 °C. O progresso da síntese foi evidenciado por uma mudança de coloração, passando de incolor para um roxo escuro ao longo do período de reação. O ajuste do pH para 7 foi realizado por adição controlada de solução de KOH 3 M.

As nanopartículas sintetizadas foram submetidas duas vezes a centrifugação a 15.000 $\times g$ a 12 °C durante 15 minutos, seguida de lavagens com água deionizada para remoção de resíduos de *FAE-Ca* ou KAuCl_4 não reagidos. O pellet obtido foi dissolvido em 1 mL de água deionizada e submetido à liofilização por 24 horas para eliminação completa da umidade residual.

O processo de síntese foi repetido múltiplas vezes, a fim de obter quantidade suficiente para a realização dos ensaios físico-químicos e biológicos subsequentes. A metodologia empregada na síntese foi descrita por JUSTINO *et al.* (2023).

3.2 Caracterização das Nanopartículas

De maneira geral, a caracterização das nanopartículas ocorre com base em parâmetros essenciais, como sua dimensão, morfologia e carga superficial, empregando-se metodologias avançadas de análise.

A análise de UV-Vis foi realizada a 25°C, utilizando um espectrofotômetro Perkin-Elmer LS 55 (Massachusetts, EUA), abrangendo a faixa de 190 até 1000 nanômetros, com uma resolução espectral de 1 nm (CHAGAS, 2023), em que leu-se 0,1 mL das nanopartículas recém sintetizadas.

Os resultados de DLS e potencial zeta foram obtidos utilizando um analisador de dispersão de luz DelsaMax Pro da Beckman Coulter Inc. (Atlanta, GA, EUA). Para isso, solubilizou-se em água ultrapura 1 mg/mL das nanopartículas.

No ensaio de FT-IR. as amostras liofilizadas (5mg) foram analisadas na faixa de número de onda de 500 a 4000 cm^{-1} utilizando um espectrômetro Vertex 70 da Bruker Optics (Reinstetten, Alemanha).

3.3 Análise da Capacidade Antioxidante In vitro

3.3.1 Método da capacidade de redução do Ferro (FRAP)

A técnica da capacidade de redução do ferro (FRAP) é amplamente empregada para avaliar a capacidade de um determinado composto em reduzir íons férricos (Fe^{3+}) a íons ferrosos (Fe^{2+}). Nesse método, os íons Fe^{2+} formam um complexo com o reagente 2,4,6-tri-(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), resultando em uma coloração azul intensa (CHAGAS, 2023).

No estudo em questão, as amostras foram preparadas nas concentrações 0,1; 1; 3 e 10 mg/mL e incubadas com o reagente FRAP, composto por tampão acetato de sódio (300 mM, pH 3,6), TPTZ e cloreto férrico (20 mM), na proporção de 10:1:1, respectivamente. A reação foi conduzida em microplacas de 96 poços, a 37 °C, por um período de 6 minutos.

Posteriormente, a absorbância foi medida a 593 nm por meio de uma leitora de microplacas (VersaMax, Molecular Devices, EUA) (BORGES, 2022).

Para garantir a precisão dos resultados, utilizou-se uma curva padrão com Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) na concentração de 2mM, um análogo hidrossolúvel da vitamina E. Os resultados foram expressos em micromoles de Trolox por grama de amostra ($\mu\text{mol eq. Trolox/g}$).

3.3.2 Método do sequestro do radical peroxil (ORAC)

O método tem como objetivo avaliar a capacidade antioxidante das amostras por meio da redução da taxa de decaimento da fluorescência, resultante da oxidação da fluoresceína, uma sonda fluorescente. Esse processo ocorre na presença de radicais peroxila, gerados pela reação com o reagente Azobis (diidrocloreto de 2,2-azobis(2-metilpropionamidina)) (CHAGAS, 2023).

Para a realização do ensaio, as amostras foram incubadas em microplacas de 96 poços na presença de fluoresceína (0,085 mM) e Azobis (153 mM), ambos diluídos em tampão fosfato (75 mM, pH 7,4). A fluorescência foi monitorada ao longo de 90 minutos, com medições realizadas a cada 3 minutos com comprimento de onda de excitação de 485 nm e emissão de 528 nm, sob temperatura controlada de 37 °C (BORGES, 2022).

Além disso, foi estabelecida uma curva padrão analítica utilizando Trolox, a fim de quantificar a capacidade antioxidante das amostras. Como controle negativo, utilizou-se tampão fosfato, enquanto a *FAE-Ca* foi empregada como controle positivo.

3.3.3 Método do sequestro do radical DPPH (DPPH)

Amplamente empregada para determinar a capacidade antioxidante de uma amostra, a técnica baseada no radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) ocorre por meio da neutralização do radical DPPH estável, resultando em sua conversão em hidrazina. A intensidade da atividade antioxidante apresenta uma correlação direta com a variação da coloração da solução. Amostras com elevada atividade antioxidante resultam em uma coloração amarela intensa, refletindo a redução do radical DPPH. Em contrapartida, amostras com menor atividade antioxidante preservam a coloração violeta, indicando a presença do radical DPPH não reduzido (CHAGAS, 2023).

O presente ensaio foi realizado de acordo com Benatti Justino et al., 2023, em que as amostras foram incubadas em microplacas de 96 poços nas concentrações 0,1; 1 e 3mg/mL, na presença do radical DPPH a 60 mM, previamente diluído em metanol. A reação ocorreu por um período de 30 minutos a 37 °C, sob condição de ausência de luz, a fim de evitar degradação fotoquímica do reagente. Após o tempo de incubação, a absorbância foi mensurada a 517nm utilizando um leitor de microplacas (VersaMax, Molecular Devices, EUA).

A atividade antioxidante das amostras foi calculada com base na seguinte equação matemática:

$$DPPH (\%) = \frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle} - A_{branco}} \times 100$$

Figura 1. Equação matemática para calcular a atividade antioxidante do DPPH.

Na equação apresentada acima, o termo "A controle" refere-se à absorbância do radical DPPH diluído em metanol, enquanto "A amostra" corresponde à absorbância do sistema contendo o DPPH na presença da amostra em análise. Já o termo "A branco" representa a absorbância das amostras diluídas em metanol, na ausência do radical DPPH (metanol + amostras). O controle negativo do experimento foi constituído exclusivamente por metanol (BORGES, 2022).

3.4 Análise da capacidade hemolítica

O método foi realizado de acordo com Zhao et al. (2013) e Zheng et al (2022) com modificações. Resumidamente, sangue fresco coletado em tubo contendo heparina de um voluntário saudável foi centrifugado a 1500 g por 10 min a 4 °C. Uma suspensão de eritrócitos a 20% foi obtida após os eritrócitos terem sido lavados três vezes em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4).

A solução de eritrócitos (0,1 mL), foi pré-tratada com 0,10 mL de PBS (absorbância A1) e incubada a 37°C por 20min com agitação suave. Em seguida, adicionamos 0,2 mL de AAPH 200 mM e incubamos a 37 ° C por 2 h com agitação suave (Controle positivo).

Foi adicionado 100 µL do composto antioxidante ácido ascórbico 1,5mM à 0,1 mL da suspensão de eritrócitos e co-incubamos com 0,2mL de PBS como um grupo de controle de toxicidade a 37 ° C por 2 horas com agitação suave. Fez-se o mesmo para as amostras

FAE-Ca nas concentrações 3, 1 e 0,1 mg/mL, AuNPs-Ca nas concentrações 1 e 0,1mg/mL e ouro 2mM.

Finalmente, após a incubação, 100 µL da mistura reacional foi removida e diluída com 1 mL de tampão PBS, depois foi centrifugado a 1500g por 10 min. A absorbância do sobrenadante foi registrada a 540 nm pelo leitor de microplacas.

$\% \text{ hemólise} = ((\text{abs. da amostra} - \text{abs. do branco}) / (\text{abs. do controle} - \text{abs. do branco})) * 100,$

onde o branco é solução de eritrócitos + PBS.

3.5 Atividade Antioxidante *Ex-Vivo*

3.5.1 Processamento do Tecido Hepático

Para a análise da atividade antioxidante, amostras de fígado armazenadas a -70 °C até o dia do procedimento foram homogeneizadas em tampão fosfato com KCl (1:10 p/v, pH 7,4) e centrifugados a 800g por 10 minutos a 4 °C (JUSTINO *et al.*, 2023). A concentração de proteína nas amostras foi avaliada de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.5.2 Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Esta técnica é baseada na reação entre o malondialdeído (MDA), um subproduto liberado quando os radicais livres atacam as membranas lipídicas, e o TBA. O método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizado a fim de avaliar a peroxidação lipídica, de acordo com Vilela et al. (2022). Os homogeneizados de tecido foram misturados com ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v) e TBA a 0,67% (p/v), diluído em Na₂SO₄ a 7,1%. Após, as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 6 minutos a 4 °C e em microplacas de 96 poços foi avaliado a fluorescência do sobrenadante resultante com comprimento de onda de excitação de 515 nm e comprimento de onda de emissão de 553 nm (PerkinElmer LS 55, Boston, MA, EUA). Foi utilizado 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) como composto de referência padrão para realizar uma curva analítica a fim de quantificar a peroxidação lipídica (JUSTINO *et al.*, 2017).

3.5.3 Espécies reativas de oxigênio (ROS)

A determinação dos níveis de ROS ocorreu de acordo com o método descrito por Sommerfeld et al. (2022). Resumidamente, os homogeneizados foram incubados com diacetato de diclorodihidrofluoresceína (10 μ M) e tampão Tris-HCl (5 mM, pH 7,4) durante 3 minutos. Posteriormente, em microplacas de 96 poços foi medido a fluorescência a 530 nm com excitação a 474 nm (Perkin-Elmer LS 55) (SOMMERFELD *et al.*, ; JUSTINO *et al.*, 2023).

3.5.4 Glutathiona Reduzida (GSH)

Com a finalidade de quantificar o conteúdo de glutathiona reduzida (GSH), o homogeneizado foi tratado com ácido metafosfórico (1:1) para que houvesse precipitação das proteínas. A mistura resultante foi submetida à centrifugação a 7000g por 10 minutos, e ao sobrenadante obtido foi adicionado tampão de fosfato de sódio e o-ftalaldeído (1 mg/mL, diluído em metanol).

Em microplacas de 96 poços, foi medido a intensidade da fluorescência com comprimentos de onda de excitação e emissão de 350 nm e 420 nm, respectivamente (Perkin-Elmer LS 55). Foi utilizado GSH na construção de uma curva padrão (VILELA *et al.*, 2021; JUSTINO *et al.*, 2023).

3.5.5 Conteúdo de Sulfidrilas

Tal método é utilizado na determinação dos tióis totais da amostra, sendo assim, é um parâmetro de medida de dano oxidativo às proteínas da mesma. O reagente de cor (DTNB) é reduzido por tióis gerando um derivado amarelo (TNB) no qual é possível ser lido por espectrofotometria a 412 nm (AKSENOV, 2001).

Em uma microplaca de 96 poços foi adicionado 50 μ L de amostra, 980 μ L de PBS pH 7,4 e 30 μ L de DTNB 10 mM. Adicionalmente, para o branco da amostra 50 μ L de amostra e 1010 μ L de PBS. Já para o branco do reagente, 1030 μ L de PBS e 30 μ L de DTNB. Posteriormente, foram incubados em condições de ausência de luz durante 30 minutos. Após o tempo de incubação, a absorbância foi mensurada a 412 nm (Endpoint).

3.6 Análise Estatística

Para avaliar a diferença entre os resultados obtidos foi realizada a análise estatística utilizando a Análise de Variância (ANOVA) para comparação múltipla e pós-teste de Tukey. Os gráficos e análises estatísticas foram realizados utilizando o software Prism versão 10.0. De maneira geral, as análises foram conduzidas em duplicata, e os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) ou média \pm desvio padrão (SD). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 Resultados

4.1 Síntese Verde

A síntese das nanopartículas (AuNPs-Ca) foi observada a partir da mudança de coloração de amarelo claro, característica da FAE-Ca, para roxo escuro (figura 2).

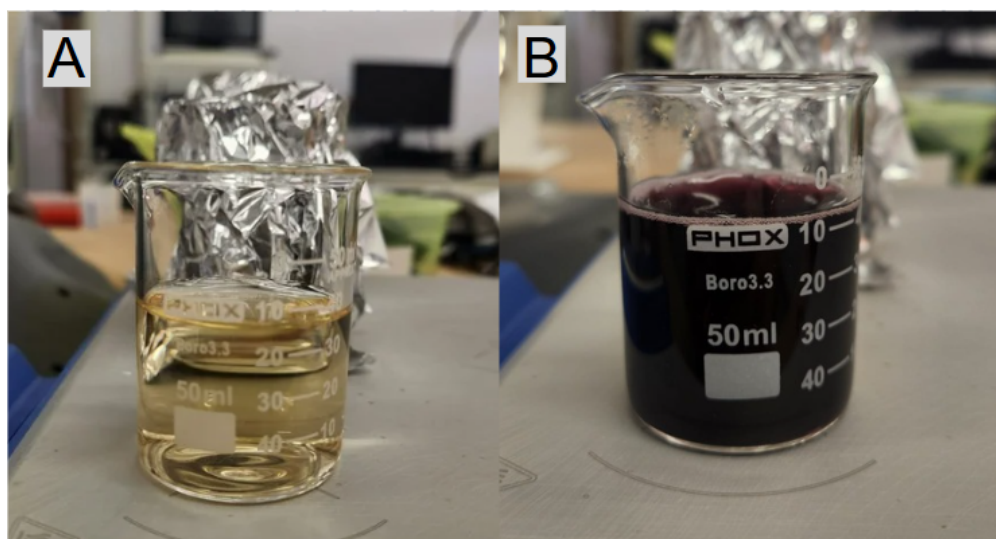


Figura 2. Processo de síntese verde de nanopartículas de ouro funcionalizadas com FAE-Ca.

4.2 Caracterização

4.2.1 Espectros UV-Visível

A espectroscopia UV-visível (figura 3) foi realizada com a finalidade de confirmar a síntese e caracterizar as propriedades de absorção óptica das AuNPS-Ca, FAE-Ca e KAuCl_4 . As AuNPS-Ca apresentam absorção na faixa de 500-550nm enquanto a absorbância do

espectro da *C. asiática* apresenta uma oscilação entre 270-330nm. O KAuCl_4 não apresenta pico de absorbância.

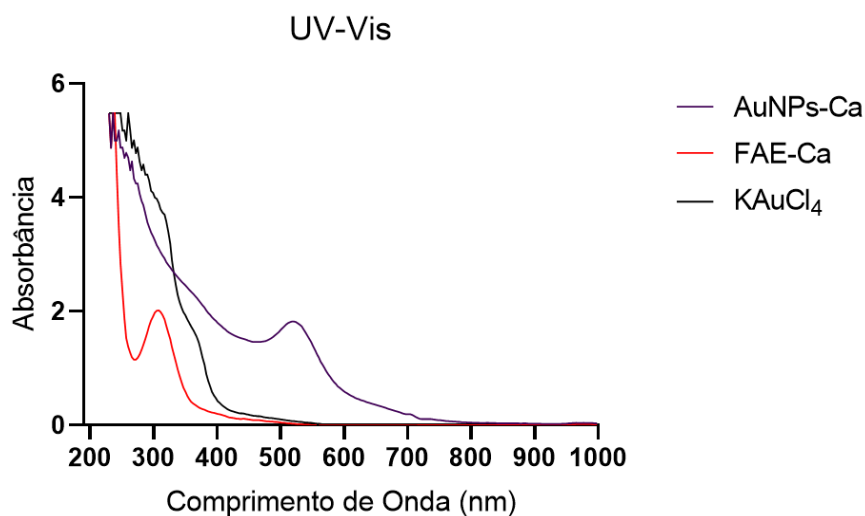


Figura 3. Espectro UV-Visível de nanopartículas de *Centella asiatica* conjugadas com ouro (AuNPs-Ca), fração acetato de etila de *Centella asiatica* (FAE-Ca) e tetracloroaurato de potássio (KAuCl_4).

4.2.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) foi utilizado para avaliar o tamanho médio das partículas. Em conformidade com a Tabela 1, os resultados indicam um índice de polidispersão de 28,9% e um diâmetro hidrodinâmico de 341,1 nanômetros. O coeficiente de difusão encontrado é igual a $1,4 \text{ cm}^2/\text{s}$. O potencial zeta das nanopartículas foi obtido como negativo (-0,7mV) e a condutividade da nanopartícula foi de 0,001 mS/cm.

Tabela 1 - Espalhamento Dinâmico de Luz e Potencial Zeta das nanopartículas de ouro funcionalizadas com *Centella asiática* (AuNPs-Ca).

Diâmetro Hidrodinâmico	341,1nm
Índice de Polidispersão	28,9%
Coeficiente de Difusão	$1,4 \text{ cm}^2/\text{s}$
Potencial Zeta	-0,7mV
Condutividade	0,001mS/cm

4.2.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros de FT-IR das amostras AuNPs-Ca e FAE-Ca encontram-se representados na Figura 4. As análises foram realizadas por espectroscopia na região do infravermelho, abrangendo a faixa de 4000 a 500 cm^{-1} , com o objetivo de identificar os grupos funcionais presentes e caracterizar a composição química e estrutural das amostras. A partir dos espectros obtidos, observaram-se bandas em comprimentos de onda específicos, compatíveis com a presença de grupos funcionais nas nanopartículas e na fração analisada.

O espectro de FTIR revelou bandas características atribuídas ao estiramento O–H de álcoois, observadas em 3288 cm^{-1} , de forma mais intensas na FAE-Ca, mas também presentes nas AuNPs-Ca. Bandas correspondentes ao estiramento C–H foram identificadas em 2900 e 2850 cm^{-1} no extrato de *Centella asiatica*. No mesmo extrato, foi identificado um pico em 1690 cm^{-1} , atribuído ao estiramento C=O de grupos carbonila. Além disso, uma banda em 1600 cm^{-1} foi observada tanto no extrato quanto nas AuNPs-Ca, correspondente ao estiramento C=C de grupos benzênicos. Bandas relacionadas ao estiramento C–N de amins aromáticas, fenóis e amins alifáticas foram identificadas em 1290, 1150 e 1050 cm^{-1} no extrato de *C. asiatica*, apresentando deslocamentos para 1200, 1210 e 1050 cm^{-1} nas AuNPs-Ca.

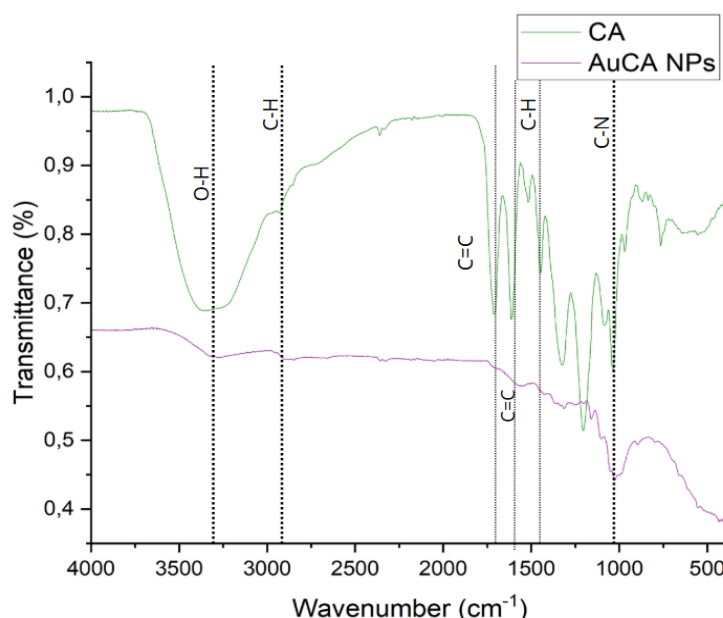


Figura 4. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) de fração acetato de etila de *C. Asiática* (CA) e nanopartículas de ouro sintetizadas com CA (AuCA NPs).

4.3 Análise da Capacidade Antioxidante *in vitro*

4.3.1 Método da capacidade de redução do Ferro (FRAP)

No FRAP (figura 5), os níveis mais elevados de atividade antioxidante foram registrados no extrato acetato de etila (FAE-Ca) na concentração 3mg/mL. Na concentração de 1mg/mL, obteve-se uma atividade antioxidante de $(861,6 \pm 8,5 \mu\text{mol trolox eq.g})$, na concentração de 3mg/mL, a atividade antioxidante foi de $(1796 \pm 81,95 \mu\text{mol trolox eq.g})$. Por outro lado, as AuNPs-Ca apresentaram atividade antioxidante significativamente menor. Na concentração de 1mg/mL, foi de $(0,26 \pm 0,37 \mu\text{mol trolox eq.g})$, e na concentração de 3 mg/mL, foi de $(20,03 \pm 1,25 \mu\text{mol trolox eq.g})$. A quercetina, usada como controle positivo, apresentou atividade antioxidante de $(1829 \pm 30,6 \mu\text{mol trolox eq.g})$ na concentração 0,1mg/mL. O KAuCl_4 não apresentou atividade antioxidante na concentração de uso para a síntese verde.

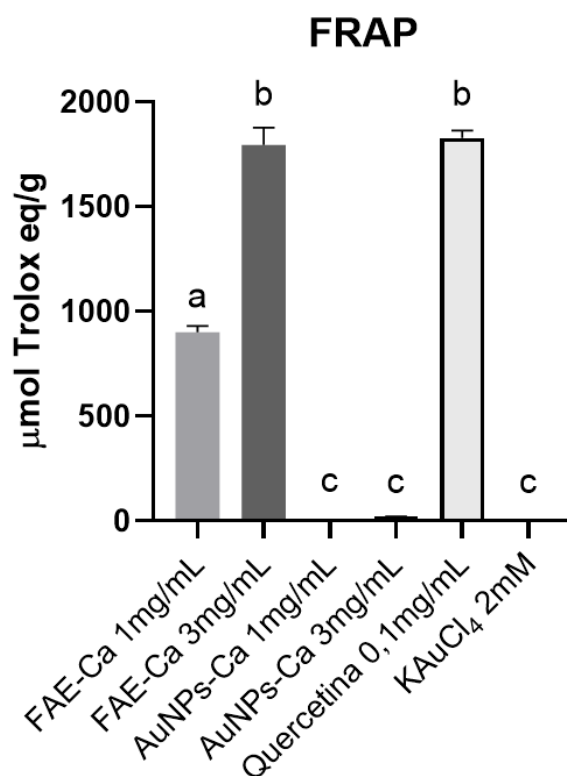


Figura 5. Gráfico da capacidade de redução de Fe^{3+} em Fe^{2+} da quercetina (controle positivo), KAuCl_4 e diferentes concentrações de FAE-Ca (fração acetato de etila de *C. asiatica*) e AuNPs-Ca (nanopartículas de ouro funcionalizadas com *C. asiatica*). As letras similares correspondem às amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si.

4.3.2 Método do sequestro do radical peroxil (ORAC)

Apresentada na Figura 6, a análise dos dados do método ORAC demonstra que a fração orgânica acetato de etila de *Centella asiatica* demonstrou atividade antioxidante na concentração de 1 mg/mL, com um valor de $1499 \pm 74,76$ $\mu\text{mol trolox eq.g}$ e na concentração de 3 mg/mL, com um valor de $1353 \pm 31,65$ $\mu\text{mol trolox eq.g}$. Outrossim, a AuNPs-Ca, na concentração de 3mg/mL, apresentou uma atividade antioxidante de $1338 \pm 7,09$ $\mu\text{mol trolox eq.g}$. No entanto, a concentração 1mg/mL apresentou uma baixa atividade antioxidante de $185,6 \pm 23,77$ $\mu\text{mol trolox eq.g}$. A quercetina, controle positivo, apresentou atividade antioxidante de $(1181 \pm 13,487$ $\mu\text{mol trolox eq.g})$. O KAuCl_4 não apresentou atividade antioxidante na concentração testada.

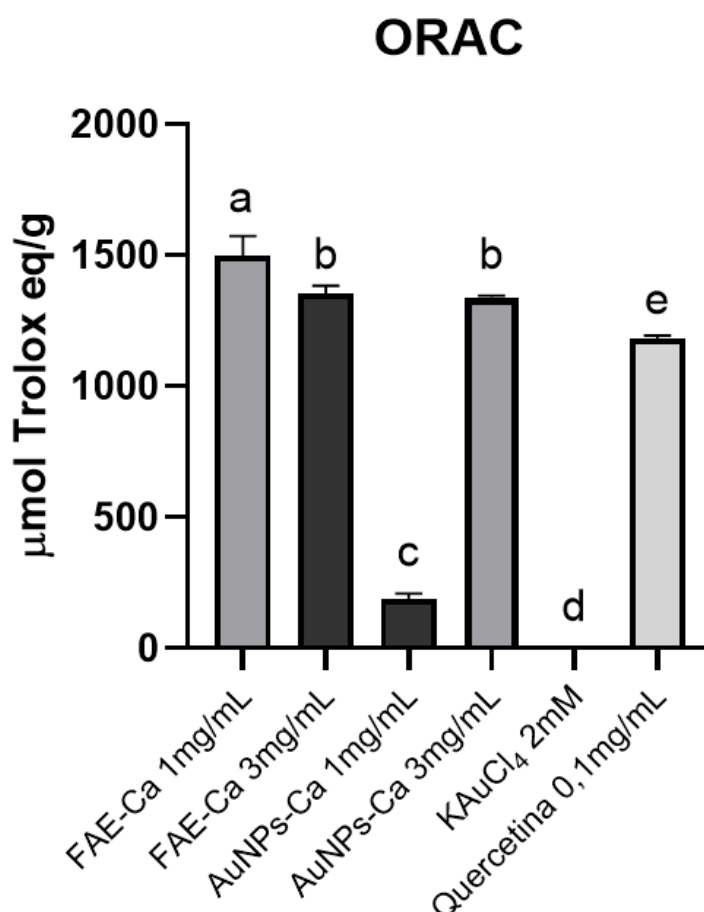


Figura 6. Gráfico da capacidade antioxidante obtida pelo método ORAC do KAuCl_4 , quercetina e diferentes concentrações de FAE-Ca (controle positivo) e AuNPs-Ca (nanopartículas de ouro funcionalizadas com *C. asiatica*). As letras similares correspondem às amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si.

4.3.3 Método do sequestro do radical DPPH (DPPH)

A análise do gráfico (Figura 7) aponta que as AuNPs-Ca, apresentaram uma baixa capacidade de sequestrar o radical livre DPPH, com valores de $(8 \pm 3,5\%)$ na concentração de 1 mg/mL e $(16 \pm 4,9\%)$ na concentração de 3 mg/mL. Em contrapartida, observa-se que a FAE-Ca, em todas as concentrações testadas, apresenta uma maior capacidade de sequestro, com valores de $(94 \pm 1,4\%)$ na concentração de 1 mg/mL e $(97 \pm 0\%)$ na concentração de 3 mg/mL. O tetracloroaurato de potássio (KAuCl₄) não apresentou atividade antioxidante ($0 \pm 0\%$) na concentração de uso da síntese (0,5 mg/mL).

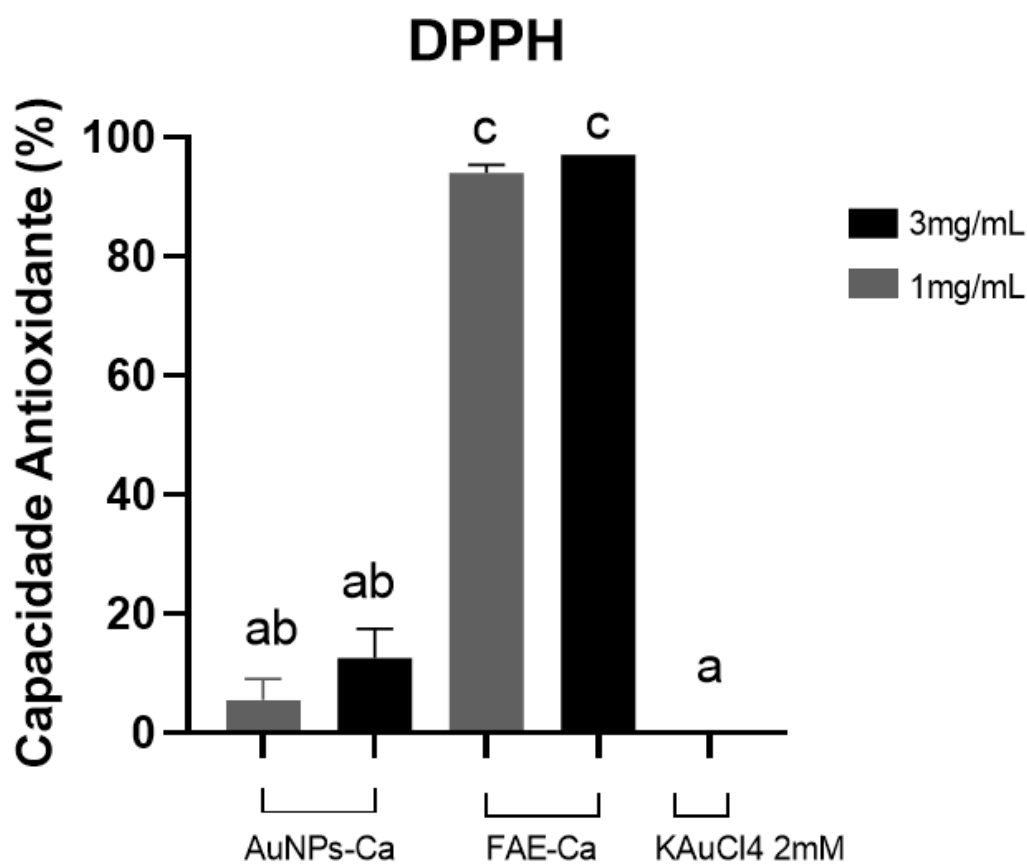


Figura 7. Gráfico da capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) em diferentes concentrações de FAE-Ca (fração acetato de etila de *C. asiatica*), AuNPs-Ca (nanopartículas de ouro funcionalizadas com *C. asiatica*) e KAuCl₄. As letras similares correspondem às amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si.

4.4 Análise da capacidade hemolítica

Os resultados do ensaio de atividade hemolítica (Figura 8) apontam que as AuNPs-Ca apresentam valores de $(10,6 \pm 0,4950\%)$ na concentração de 0,1 mg/mL e $(9,3 \pm 2,192\%)$ na concentração de 1 mg/mL. Além disso, a FAE-Ca apresenta valores de $(10 \pm 2,192\%)$ na concentração de 0,1mg/mL e $(13,7 \pm 1,273\%)$ na concentração de 1 mg/mL. O tetracloroaurato de potássio (KAuCl_4) apresentou um valor de $9,7 \pm 3,465\%$ na concentração de uso da síntese (2mM).

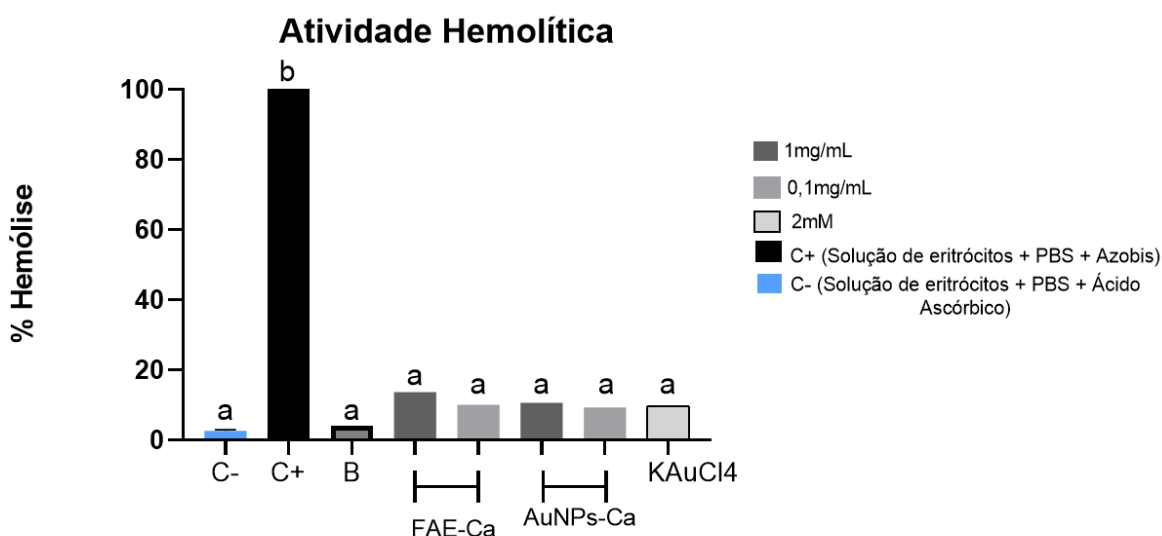


Figura 8. Gráfico da atividade hemolítica em diferentes concentrações de FAE-Ca (fração acetato de etila de *C. asiatica*), AuNPs-Ca (nanopartículas de ouro funcionalizadas com *C. asiatica*) e KAuCl_4 , em que C- é o controle negativo (solução de eritrócitos + PBS + ácido ascórbico 1,5mM), C+ o controle positivo (solução de eritrócitos + PBS + azobis 200mM) e B o branco da amostra (PBS+DMSO). As letras similares correspondem às amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si. A análise estatística foi realizada utilizando Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).

4.5 Atividade Antioxidante *ex-vivo*

4.5.1 Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Os resultados obtidos no ensaio de TBARS (Figura 9) indicam que o tecido hepático tratado com a amostra FAE-Ca apresentou baixos níveis de peroxidação lipídica, tanto na ausência quanto na presença do indutor de estresse oxidativo azobis, com valores de $0,1484 \pm 0,001$ nmol/mg prot e $0,1541 \pm 0,0007$ nmol/mg prot, respectivamente. Esses resultados são similares aos obtidos para a quercetina, que apresentou $0,1567 \pm 0,004$ nmol/mg prot na

ausência e $0,1658 \pm 3,457$ nmol/mg prot na presença de azobis. Adicionalmente, o tecido tratado com as nanopartículas, na ausência do agente indutor de estresse oxidativo, apresentou um percentual de $0,2106 \pm 0,0001$ nmol/mg prot. Na presença do azobis, observou-se um aumento nos valores obtidos ($0,4977 \pm 0,006$ nmol/mg prot).

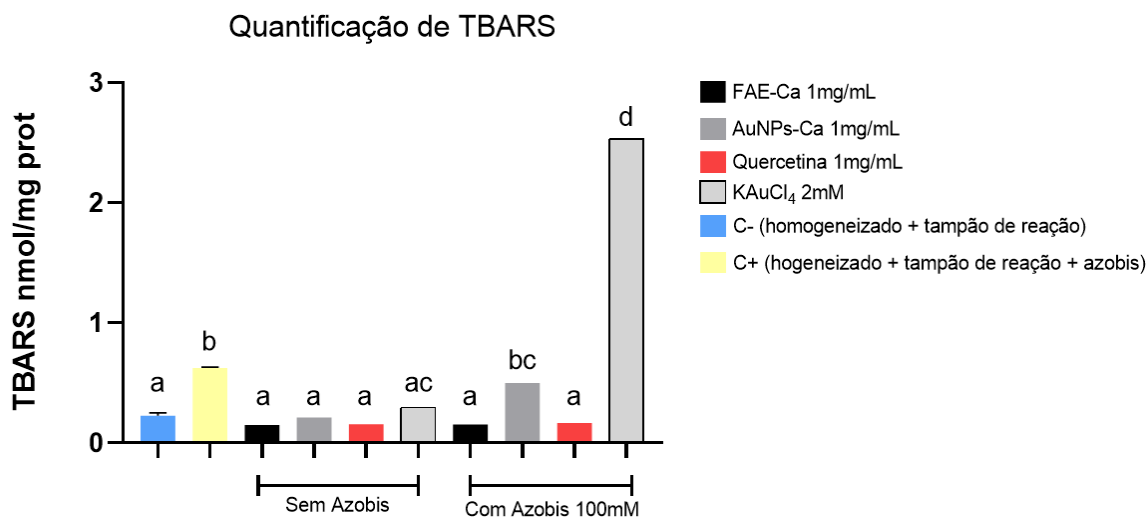


Figura 9. Gráfico comparativo da quantificação, na ausência e presença de azobis, de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) de FAE-Ca (fração acetato de etila de *C. asiatica*), AuNPs-Ca (nanopartículas de ouro funcionalizadas com *C. asiatica*), KAuCl₄ e quercetina. O controle negativo é o homogeneizado junto com o tampão de reação, já o controle positivo, é o homogeneizado + tampão de reação e azobis (100mM). As letras similares correspondem às amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si.

4.5.2 Espécies reativas de oxigênio (ROS)

Os resultados obtidos no ensaio de espécies reativas de oxigênio (Figura 10) demonstram que o tecido hepático em condições basais, tratado tanto a FAE-Ca quanto as nanopartículas apresentou níveis regulares de ROS, com valores de $109344 \pm 3084\%$ e $122469 \pm 831,6\%$, respectivamente. Tais resultados, são similares aos obtidos com o tecido tratado com quercetina, também na ausência de azobis, que apresentou valores de $114205 \pm 4158\%$.

Além disso, o tecido em condições de estresse oxidativo induzido, quando tratado com as AuNPs-Ca, apresentou um resultado expressivo de $107385 \pm 2904\%$, um valor semelhante ao controle positivo ($105279 \pm 6805\%$) e abaixo do obtido para a quercetina ($115375 \pm 2909\%$) nas mesmas condições.

Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio

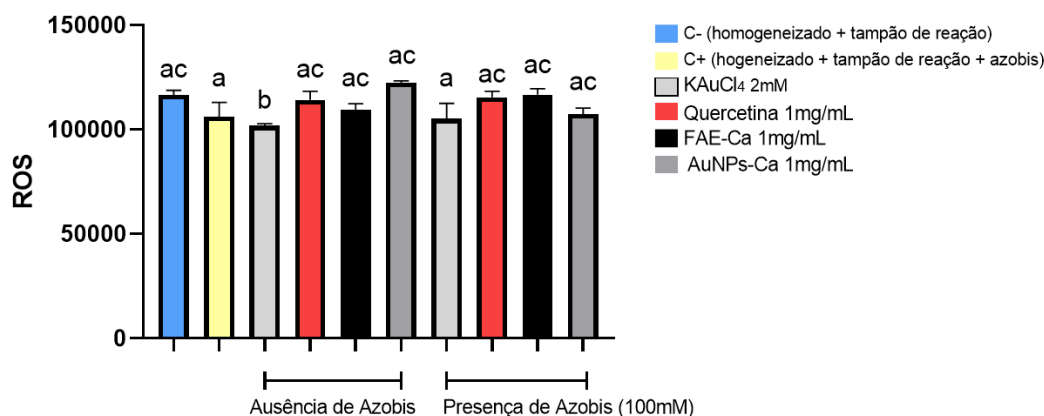


Figura 10. Gráfico comparativo da quantificação, na ausência e presença de azobis, de espécies reativas de oxigênio (ROS) de FAE-Ca (fração acetato de etila de *C. asiatica*), AuNPs-Ca (nanopartículas de ouro funcionalizadas com *C. asiatica*), KAuCl₄ e quercetina. O controle negativo é o homogeneizado junto com o tampão de reação, já o controle positivo é o homogeneizado + tampão de reação e azobis (100mM). As letras similares correspondem às amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si.

4.5.3 Glutationa Reduzida (GSH)

Os resultados obtidos no ensaio de glutathiona reduzida (Figura 11) apontam que o tecido na ausência de azobis, quando tratado com as nanopartículas na concentração de 3mg/mL, apresentou níveis elevados de GSH $0,3548 \pm 0,04$ nmol/mg prot. Tal resultado apontou valores mais expressivos que o tratamento da fração estudada $0,1514 \pm 0,02$ nmol/mg prot e a quercetina $0,0590 \pm 0,005$ nmol/mg prot, ambas amostras notoriamente antioxidantes. De maneira semelhante, sob estresse oxidativo, o tecido tratado com as AuNPs-Ca apresentou um valor de $0,1364 \pm 0,08$ nmol/mg prot.

Quantificação de Glutationa Reduzida

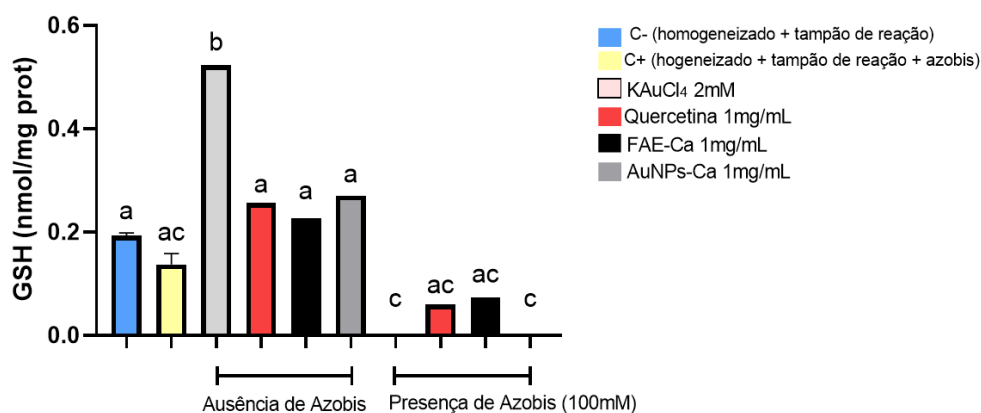


Figura 11. Gráfico comparativo da quantificação, na ausência de azobis, de glutathiona reduzida (GSH) em FAE-Ca (fração acetato de etila de *C. asiatica*), AuNPs-Ca (nanopartículas de ouro funcionalizadas com *C.*

asiatica), KAuCl₄ e quercetina. O controle negativo é o homogeneizado junto com o tampão de reação, já o controle positivo é o homogeneizado + tampão de reação e azobis (100mM). As letras similares correspondem às amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si.

4.5.4 Conteúdo de Sulfidrila

Os resultados obtidos no ensaio de conteúdo de sulfidrila (Figura 12) demonstraram que o tecido tratado com a fração acetato de etila e as nanopartículas apresentou valores de $26,35 \pm 0$ nmol TNB/mg prot e $19,1 \pm 0$ nmol TNB/mg, respectivamente, na ausência de azobis. Além disso, sob estresse induzido, os valores obtidos foram $6,05 \pm 0$ nmol TNB/mg prot para o tratamento de FAE-Ca e $4,35 \pm 0$ nmol TNB/mg prot para o tratamento com as AuNPs-Ca. Sendo superiores ao observado para a quercetina nas mesmas condições ($0,75 \pm 0$ nmol TNB/mg prot).

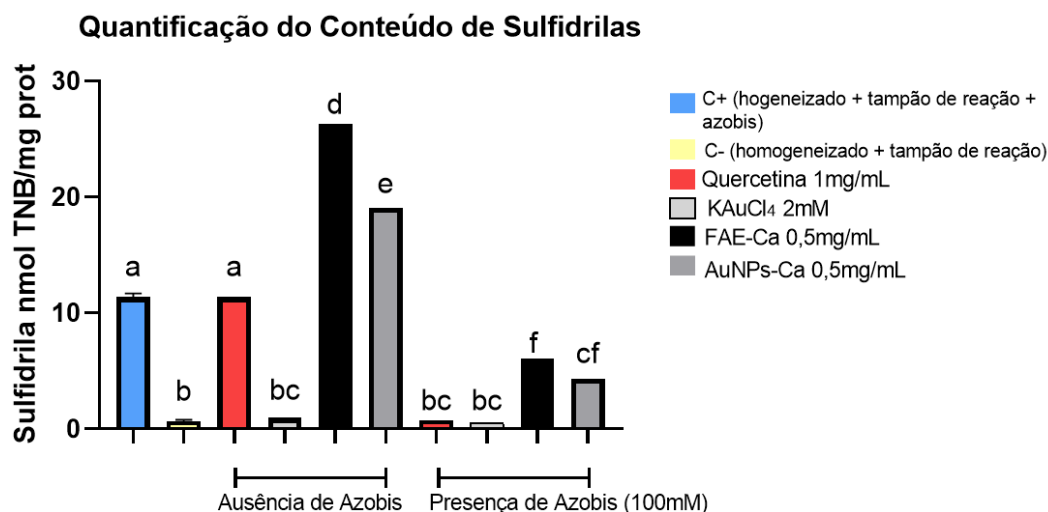


Figura 12. Gráfico comparativo da quantificação, na ausência de azobis, de conteúdo de sulfidrila em FAE-Ca (fração acetato de etila de *C. asiatica*), AuNPs-Ca (nanopartículas de ouro funcionalizadas com *C. asiatica*), KAuCl₄ e quercetina. O controle negativo é o homogeneizado junto com o tampão de reação, já o controle positivo é o homogeneizado + tampão de reação e azobis (100mM). As letras similares correspondem às amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si.

5 DISCUSSÃO

Segundo o estudo realizado por BORGES *et al.* (2024), a fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *Centella asiatica* (FAE-Ca) apresentou grande capacidade antioxidante, além de baixa toxicidade dado a grande presença de flavonoides e compostos fenólicos em sua composição. Tais metabólitos estão amplamente envolvidos na formação de nanopartículas por síntese verde devido a sua capacidade de redução de íons metálicos

(BHARADWAJ, *et al.*, 2021). Nesta perspectiva, sintetizamos nanopartículas de ouro funcionalizadas com fração acetato de etila de *Centella asiatica*, caracterizando-as e avaliando o seu potencial antioxidante *in vitro* e *ex vivo*, bem como a sua capacidade hemolítica.

A síntese das nanopartículas (AuNPs-Ca) foi observada a partir da mudança de coloração de amarelo claro, característica da FAE-Ca, para roxo escuro (figura 2), que caracteriza a formação de nanopartículas de ouro (YEH *et al.*, 2012). Tal processo ocorre devido ao alto teor de compostos polifenólicos presentes na planta, os quais possuem grupos funcionais como hidroxila que atuam como doadores de elétrons, permitindo a interação com íons de ouro (Au^{3+}), que promovem uma redução em nanopartículas de ouro, além de atuarem como agentes estabilizadores (JUSTINO *et al.*, 2023; BHARADWAJ, *et al.*, 2021).

A banda de absorção localizada na faixa de 500 a 550 nm, observada na análise por espectroscopia UV-visível, é característica das nanopartículas de ouro, sendo atribuída à ressonância plasmônica de superfície, além de refletir a capacidade dessas nanopartículas em suprimir a fluorescência (YEH *et al.*, 2012). Dessa forma, o pico evidenciado na Figura 3 confirma a formação das AuNPs-Ca.

Após a síntese, torna-se essencial a caracterização das nanopartículas, a fim de compreender sua estrutura e assegurar sua adequação para aplicações futuras. Conforme apresentado na Tabela 1, os resultados obtidos por DLS indicam que as AuNPs-Ca apresentam tamanho superior ao intervalo convencionalmente atribuído às nanopartículas (1–100 nm) (SHARMA *et al.*, 2015). Contudo, apesar desse valor ligeiramente elevado, as nanopartículas ainda apresentam relevância científica, uma vez que nanopartículas maiores podem ser vantajosas, dado à sua menor reatividade (BHUYAN *et al.*, 2015).

Outrossim, com o objetivo de avaliar a homogeneidade da distribuição de tamanhos das nanopartículas, foi determinado o índice de polidispersão (PDI), que apresentou valor de 28,9%. De acordo com DANAIE *et al.* (2018), valores de PDI inferiores a 0,05 são característicos de sistemas altamente monodispersos, enquanto valores superiores a 0,7 indicam elevada heterogeneidade na distribuição de tamanhos. Nesse contexto, o valor obtido neste estudo sugere uma distribuição de tamanho heterogênea entre as partículas. Conforme JUSTINO *et al.* (2023), a discrepância no tamanho das nanopartículas pode estar relacionada à ação do composto isolado da planta utilizada no experimento, atuando como agente

estabilizante ao formar uma camada protetora sobre as partículas. Nesse contexto, é considerado que algo análogo possa ter ocorrido, dado a presença de compostos bioativos da FAE-Ca, a qual é rica em diferentes polifenóis com diversos agrupamentos orgânicos que possuem tamanhos distintos, o que pode ter influenciado na heterogeneidade do tamanho das partículas.

É relevante destacar que, para um conhecimento preciso da atividade das nanopartículas e, conseqüentemente, de sua aplicação, é imprescindível que estas apresentem estabilidade. Conforme descrito por RUTH *et al.* (2024), nanopartículas estáveis apresentam valores de potencial zeta inferiores a -30 mV ou superiores a +30 mV, em que há repulsão suficiente entre as partículas para evitar a agregação. O valor obtido para as AuNPs-Ca (Tabela 1) revela um valor próximo a zero, o que indica que a nanopartícula é instável e possui quase nenhuma carga elétrica efetiva na camada de cisalhamento. Como consequência, não há força eletrostática suficiente para manter as partículas afastadas umas das outras favorecendo assim a sua aglomeração.

Os resultados obtidos por meio da análise de FT-IR para a FAE-Ca não apresentaram diferenças significativas em relação aos dados previamente reportados por DAS *et al.* (2010) e RUTH *et al.* (2024). Por outro lado, as nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de *C. asiatica* (AuNPs-Ca) exibiram alterações espectrais relevantes, possivelmente atribuídas à utilização, neste estudo, de uma fração orgânica (acetato de etila) em contraste com o extrato etanólico bruto empregado pelos autores mencionados.

Picos de forte intensidade observados no extrato de *Centella asiatica* em torno de 1690 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} , bem como as bandas atribuídas ao estiramento C–N de aminas aromáticas, fenóis e aminas alifáticas, localizadas em aproximadamente 1290 , 1150 e 1050 cm^{-1} (RUTH *et al.*, 2024), apresentaram deslocamento e redução significativa na intensidade espectral após a formação das nanopartículas. Esses resultados indicam que os grupos hidroxila presentes nos compostos da fração vegetal podem estar envolvidos na funcionalização da superfície das AuNPs-Ca.

Outrossim, a presença residual dessas bandas, ainda que com baixa intensidade, nas AuNPs-Ca, constitui uma evidência de que componentes da fração orgânica foram efetivamente adicionadas na superfície das nanopartículas (JUSTINO *et al.*, 2024). Conforme ilustrado na Figura 4, o pico em 3.300 cm^{-1} , relacionado ao estiramento das ligações O–H

(PAVIA *et al.*, 2008), apresentou maior intensidade na FAE-Ca. Apesar da considerável redução desse sinal nas AuNPs-Ca, sua presença ainda foi observada. Segundo AZIZI *et al.*, esse tipo de vibração está associado à presença de taninos, ácidos graxos e flavonoides, substâncias amplamente reconhecidas por suas propriedades antioxidantes. Dessa forma, a manutenção, ainda que reduzida, dessas bandas características nas AuNPs-Ca sugere que compostos bioativos com potencial antioxidante permanecem ancorados à superfície das nanopartículas.

A capacidade antioxidante foi avaliada por meio de ensaios *in vitro*, utilizando os métodos FRAP, DPPH e ORAC. Os antioxidantes, por sua capacidade de neutralizar radicais livres, desempenham um papel fundamental na redução do estresse oxidativo, sendo, portanto, essenciais na prevenção e no tratamento de diversas patologias (Farhood *et al.*, 2024). A análise dos gráficos (figuras 5, 6 e 7) obtidos nos diferentes ensaios de atividade antioxidante, indicam que os níveis mais elevados foram registrados na fração acetato de etila (FAE-Ca), atingindo níveis semelhantes aos da quercetina, molécula com alto potencial antioxidante utilizada como controle positivo. Esses achados estão de acordo com o estudo de BORGES *et al.* (2024), no qual a FAE-Ca também demonstrou elevada atividade antioxidante, atribuída à sua expressiva concentração de polifenóis. Tal correlação é reforçada por RUTH *et al.* (2024), que destacam a associação entre o conteúdo de polifenóis e a atividade antioxidante em diversas espécies vegetais.

Em contraste, no ensaio FRAP (figura 5), as AuNPs-Ca apresentaram baixa atividade antioxidante, sugerindo uma capacidade limitada de reduzir íons férricos (Fe^{3+}) e, conseqüentemente, uma ineficiência na quelagem de metais de transição. De forma semelhante, embora os resultados obtidos no ensaio DPPH tenham sido superiores aos do FRAP, ainda indicaram uma capacidade reduzida de estabilizar espécies reativas, como o radical DPPH, o que talvez possa ser atribuído à presença de KAuCl_4 , haja vista que esse não obteve quase nenhum efeito antioxidante nos experimentos realizados.

A atividade catalítica das nanopartículas de ouro (AuNPs) é afetada por seu tamanho e pelas suas propriedades físico-químicas. De modo geral, partículas menores apresentam maior área superficial, o que favorece uma interação mais eficiente com espécies reativas, resultando em maior atividade catalítica. Assim, quando comparadas, AuNPs de maior tamanho tendem a exibir uma atividade antioxidante reduzida, conforme observado por SULIASIH *et al.* (2024). Nesse contexto, os baixos valores de atividade antioxidante obtidos

para as AuNPs-Ca nos ensaios realizados podem estar relacionados ao seu diâmetro relativamente elevado e ao fato de estarem aglomeradas. Outrossim, no que tange às propriedades físico-químicas das nanopartículas, o deslocamento das bandas atribuídas aos grupos de aminas aromáticas, fenóis e aminas alifáticas, apresentados no ensaio de FT-IR, também podem ser a causa da redução de tal potencial antioxidante.

Além disso, deve-se notar que, substâncias consideradas antioxidantes devem ser ativas em baixas concentrações, de modo que essa deve ser satisfatoriamente alta apenas para desativar a molécula-alvo. Frequentemente, antioxidantes fenólicos perdem sua atividade antioxidante em altas concentrações e agem como pró-oxidantes (BEDLOVICOVÁ *et al.*, 2025). Dado a alta concentração de compostos fenólicos na FAE-Ca, encontrado por BORGES *et al.*, 2024, e ao fato de as AuNPs-Ca estarem revestidas com a fração, tende-se pensar que a baixa capacidade antioxidante dos métodos FRAP e DPPH está atrelada a esses fatores, todavia, o resultado do método ORAC demonstrou capacidade de neutralizar o radical peroxil, um dos principais responsáveis pelo estresse oxidativo em sistemas biológicos. Tal achado está atribuído às AuNPs-Ca na maior concentração testada (3mg/mL).

Ademais, apesar de suas vantagens, as nanopartículas metálicas apresentam riscos quanto à toxicidade e são particularmente propensas a provocar estresse oxidativo (DARÉ e LAUTENSCHLAGER, 2025; SULIASIH *et al.*, 2024). A atividade hemolítica das AuNPs-Ca foi avaliada com o objetivo de conhecermos a sua toxicidade. Os resultados demonstram que as nanopartículas não apresentam capacidade hemolítica, o que demonstra que as amostras não são tóxicas para eritrócitos nas concentrações avaliadas.

Com o objetivo de aprofundar a compreensão das propriedades antioxidantes das amostras e reforçar os dados obtidos *in vitro*, avaliou-se sua capacidade antioxidante em condições *ex vivo*, por meio dos ensaios TBARS, ROS, GSH e grupos sulfidrila, realizando uma comparação de amostras na presença e ausência do indutor de estresse oxidativo, azobis.

Os resultados obtidos no ensaio de TBARS (Figura 9) demonstraram que a fração orgânica protegeu o tecido hepático da peroxidação lipídica, tanto na ausência quanto na presença de azobis. Esse resultado é caracterizado pela sua capacidade antioxidante, como já observado por BORGES *et al.* (2024). Nesse contexto, verificou-se que, na presença do azobis, o tecido apresentou discreto aumento nos níveis de peroxidação lipídica após o tratamento com as nanopartículas. Contudo, os resultados indicaram também que as

AuNPs-Ca exerceram efeito protetor sobre o tecido hepático. Tal resultado pode ser parcialmente atribuído à presença residual de KAuCl_4 , precursor utilizado na síntese verde, o qual, isoladamente, demonstrou induzir níveis elevados de peroxidação. Ainda assim, os dados obtidos indicam que as propriedades antioxidantes da fração acetato de etila foram preservadas após a funcionalização, e que as AuNPs-Ca mantêm eficácia na prevenção da peroxidação lipídica, mesmo sob condições de estresse oxidativo. Essa atividade protetora pode estar relacionada à capacidade das nanopartículas em neutralizar espécies reativas altamente agressivas, como os radicais hidroxila (OH).

Os resultados referentes à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Figura 10), revelam que o tecido, tanto na presença da FAE-Ca quanto na presença das AuNPs-Ca, apresentou baixos níveis de ROS na ausência do indutor de estresse oxidativo, azobis. Esses dados indicam que, mesmo em condições basais, as amostras são capazes de manter o equilíbrio redox intracelular, devido à atuação dos compostos antioxidantes constituintes da FAE-Ca, como descrito por BORGES *et al.* (2024). Tal efeito é comparável ao da quercetina, haja vista que os valores são similares aos obtidos para esse flavonoide nas mesmas condições, o que sugere que a FAE-Ca possui eficácia semelhante em prevenir a formação de ROS.

Na condição de estresse oxidativo, o tecido tratado com as nanopartículas apresentaram uma redução expressiva nos níveis de ROS, indicando uma capacidade antioxidante ampliada frente à indução exógena de espécies reativas. Esse resultado vai de acordo com os dados de caracterização físico-química obtidos, que demonstraram a presença de FAE-Ca aderida à superfície das nanopartículas, conferindo-lhes propriedades bioativas.

A ação das AuNPs-Ca de mitigar o estresse oxidativo pode ser atribuída à sinergia entre o núcleo metálico das nanopartículas e os compostos fenólicos e flavonoides da FAE-Ca. Estudos prévios demonstram que frações obtidas com acetato de etila, especialmente aquelas ricas em polifenóis, são capazes de atuar diretamente na neutralização de radicais livres (AISHWARYA *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2007). Portanto, os dados obtidos não apenas confirmam a atividade antioxidante da FAE-Ca, mas também evidenciam que sua associação com nanopartículas de ouro pode potencializar esse efeito.

De forma semelhante, os dados referentes aos níveis de glutathiona reduzida (GSH), apresentados na Figura 11, evidenciam o potencial antioxidante das amostras analisadas. Na

ausência de azobis, o tecido hepático contendo nanopartículas apresentou níveis significativamente elevados de GSH. Considerando que a glutathione é uma das principais moléculas antioxidantes endógenas, pois atua na neutralização direta de radicais livres e na regeneração de outros antioxidantes, como as vitaminas C e E (Lushchak, 2012), esse resultado indica que as AuNPs-Ca promovem ou mantêm o estado redox celular em equilíbrio.

Sob estresse oxidativo induzido pela presença de azobis, o tecido tratado com AuNPs-Ca também apresentou níveis elevados de GSH, indicando a eficácia das nanopartículas em proteger as células da depleção da glutathione, frequentemente observada em condições de estresse (LABARRERE; KASSAB, 2022). Esse achado sugere que a conjugação da FAE-Ca com as nanopartículas não apenas preserva, mas potencializa sua ação antioxidante, reforçando a hipótese de que a utilização de compostos fenólicos na síntese verde é promissora na redução de danos oxidativos induzidos por nanopartículas de ouro (JUSTINO *et al.*, 2023).

Somado a isso, os resultados obtidos do conteúdo de sulfidrilas (Figura 12) revelam que o tecido tratado tanto com a fração acetato de etila, quanto com as nanopartículas, apresentaram níveis expressivos de grupos sulfidrilas na ausência de azobis. Tal achado pode ser atribuído à presença de compostos bioativos previamente identificados na fração. Não obstante, mesmo após a exposição ao azobis, os níveis de grupos sulfidrilas permaneceram elevados em ambos os tratamentos, o que sugere que a funcionalização da fração às AuNPs-Ca não comprometeu sua bioatividade.

6 CONCLUSÃO

Diante do exposto, o presente estudo apresenta uma estratégia ambientalmente e economicamente viável para a biossíntese de nanopartículas de ouro. A síntese verde demonstrou ser um método eficaz, sustentável e promissor. A presença de compostos bioativos, como os flavonoides da FAE-Ca, foi fundamental para a formação das nanopartículas, atuando como agentes redutores, como demonstrado nas análises de UV-Vis e FT-IR. Apesar de as AuNPs-Ca apresentarem um tamanho ligeiramente superior ao padrão, como apresentado na análise de DLS, elas ainda apresentam importância científica, entretanto, com o potencial zeta próximo a zero, mais estudos devem ser realizados para melhorar a estabilidade em solução dessas partículas. Ademais, apesar das AuNPs-Ca apresentarem baixa atividade em alguns ensaios, como o FRAP e o DPPH, sua eficácia contra

a hemólise sugere que a abordagem de síntese verde, utilizando a *Centella asiatica*, pode mitigar os riscos de toxicidade associados às nanopartículas. Os ensaios biológicos *ex vivo* reforçaram a manutenção da atividade antioxidante da FAE-Ca após a funcionalização, evidenciando que as AuNPs-Ca demonstraram capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio, proteger contra a peroxidação lipídica e preservar os níveis de glutatona reduzida e grupos sulfidril. Assim, as AuNPs-Ca revelaram eficácia antioxidante significativa, conferindo proteção ao tecido hepático sob estresse oxidativo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADTANI, P. N. et al. Antifibrotic effect of *Centella asiatica* Linn and asiatic acid on arecoline-induced fibrosis in human buccal fibroblasts. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, v. 8, n. 2, p. e12208, 3 fev. 2016.
2. AISHWARYA, V.; SOLAIPRIYA, S.; SIVARAMAKRISHNAN, V. Role of ellagic acid for the prevention and treatment of liver diseases. *Phytotherapy Research*, v. 35, n. 6, p. 2925–2944, 25 dez. 2020. Doi: doi.org/10.1002/ptr.7001. Disponível em: *Phytotherapy Research | Medicinal Chemistry Journal | Wiley Online Library*
3. AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, v. 302, n. 2-3, p. 141–145, abr. 2001.
4. Arribas-López, E., Zand, N., Ojo, O., Snowden, M. J., & Kochhar, T. (2022). A Systematic Review of the Effect of *Centella asiatica* on Wound Healing. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 19, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijerph19063266>
5. AZIZI, S. et al. Effect of annealing temperature on antimicrobial and structural properties of bio-synthesized zinc oxide nanoparticles using flower extract of *Anchusa italica*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 161, p. 441–449, ago. 2016.
6. BEDLOVIČOVÁ, Z. et al. A Brief Overview on Antioxidant Activity Determination of Silver Nanoparticles. *Molecules*, v. 25, n. 14, p. 3191, 13 jul. 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25143191>. Disponível em: A Brief Overview on Antioxidant Activity Determination of Silver Nanoparticles
7. BHARADWAJ, K. K. et al. Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Plant Extracts as Beneficial Prospect for Cancer Theranostics. *Molecules*, v. 26, n. 21, p.

- 6389, 22 out. 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26216389>. Disponível em: Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Plant Extracts as Beneficial Prospect for Cancer Theranostics - PubMed
8. BORGES, A. L. S. Avaliação da capacidade antioxidante, antiglicante e de inibição enzimática in vitro e ex vivo do extrato etanólico de *Centella asiatica* e suas frações orgânicas. 2022. 61 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2022. DOI <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.8022>
 9. BORGES, A. L. S. et al. Exploring the Composition and Properties of *Centella asiatica* metabolites and Investigating Their Impact on BSA Glycation, LDL Oxidation and α -Amylase Inhibition. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 245, p. 116143–116143, 1 ago. 2024.
 10. BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
 11. BHUYAN, T. et al. Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles from *Azadirachta indica* for antibacterial and photocatalytic applications. *Materials Science in Semiconductor Processing*, v. 32, p. 55–61, 1 abr. 2015.
 12. Buranasudja, V., Rani, D., Malla, A., Kobtrakul, K., & Vimolmangkang, S. (2021). Insights into antioxidant activities and anti-skin-aging potential of callus extract from *Centella asiatica* (L.). *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92958-7>
 13. CHAGAS, Penélope Marques. Síntese verde de nanopartículas de zinco funcionalizadas com a fração orgânica acetato de etila das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek. 2023. 34 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2023.
 14. CHAVVA, S. et al. Epigallocatechin Gallate-Gold Nanoparticles Exhibit Superior Antitumor Activity Compared to Conventional Gold Nanoparticles: Potential Synergistic Interactions. *Nanomaterials*, v. 9, n. 3, p. 396, 8 mar. 2019.
 15. CHEN, C.-H. et al. The efficacy of protective effects of tannic acid, gallic acid, ellagic acid, and propyl gallate against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damages in IMR-90 cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 51, n. 8, p. 962–968, ago. 2007. DOI: doi.org/10.1002/mnfr.200600230. Disponível em: The

- efficacy of protective effects of tannic acid, gallic acid, ellagic acid, and propyl gallate against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damages in IMR-90 cells - Chen - 2007 - Molecular Nutrition & Food Research - Wiley Online Library
16. DANAIEI, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, v. 10, n. 2, p. 57, 18 maio 2018. DOI: 10.3390/pharmaceutics10020057. Disponível em: Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems - PMC
 17. DARÉ, R. G.; LAUTENSCHLAGER, S. Nanoparticles with Antioxidant Activity. *Antioxidants*, v. 14, n. 2, p. 221–221, 15 fev. 2025. <https://doi.org/10.3390/antiox14020221>. Disponível em: Nanoparticles with Antioxidant Activity
 18. DAS, R. K.; BORTHAKUR, B. B.; BORA, U. Green synthesis of gold nanoparticles using ethanolic leaf extract of *Centella asiatica*. *Materials Letters*, v. 64, n. 13, p. 1445–1447, jul. 2010.
 19. FARD, S. E.; TAFVIZI, F.; TORBATI, M. B. Silver nanoparticles biosynthesised using *Centella asiatica* leaf extract: apoptosis induction in MCF-7 breast cancer cell line. *IET Nanobiotechnology*, v. 12, n. 7, p. 994–1002, 1 out. 2018.
 20. FARHOOD, H. B et al. Nanoparticles and their role in oxidant-antioxidant systems. *Journal of Medicinal and Nanomaterials Chemistry*, v. 6, n. 4, p. 263–280, nov. 2024. DOI: 10.48309/JMNC.2024.4.2. . Disponível em: Nanoparticles and their role in oxidant-antioxidant systems
 21. FIGUEIRA, É. L. M. Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Anacardium Occidentale*, caracterização físicoquímica e morfológica. 2023. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, 2023.
 22. Hafiz, Z. Z., Mohd Amin, M. A., Johari James, R. M., Teh, L. K., Salleh, M. Z., & Adenan, M. I. (2020). Inhibitory Effects of Raw-Extract *Centella asiatica* (RECA) on Acetylcholinesterase, Inflammations, and Oxidative Stress Activities via in Vitro and in Vivo. *Molecules*, 25(4). <https://doi.org/10.3390/molecules25040892>
 23. Hashim, P., Sidek, H., Helan, M. H. M., Sabery, A., Palanisamy, U. D., & Ilham, M. (2011a). Triterpene composition and bioactivities of *centella asiatica*. *Molecules*, 16(2), 1310–1322. <https://doi.org/10.3390/molecules16021310>

24. Hashim, P., Sidek, H., Helan, M. H. M., Sabery, A., Palanisamy, U. D., & Ilham, M. (2011b). Triterpene composition and bioactivities of *Centella asiatica*. *Molecules*, 16(2), 1310–1322. <https://doi.org/10.3390/molecules16021310>
25. JUSTINO, A. B., et al. Curcumin-functionalized gold nanoparticles attenuate AAPH-induced acute cardiotoxicity via reduction of lipid peroxidation and modulation of antioxidant parameters in a chicken embryo model. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 646, p. 123486, 5 nov. 2023.
26. JUSTINO, A. B., et al. Epigallocatechin-3-Gallate-Synthesized Gold Nanoparticles Modulate Reactive Oxygen Species and Antioxidant Parameters in Brain and Heart Tissues Using a Chicken Embryo Model. *Materials Chemistry and Physics*, v. 322, p. 129557–129557, 1 ago. 2024.
27. JUSTINO, A. B. et al. Hepatoprotective Properties of a Polyphenol-Enriched Fraction from *Annona crassiflora* Mart. Fruit Peel against Diabetes-Induced Oxidative and Nitrosative Stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 65, n. 22, p. 4428–4438, 25 maio 2017.
28. Kabir, A. U., Samad, M. bin, Malrina D'costa, N., Akhter, F., Ahmed, A., & Hannan, J. (2014). Anti-hyperglycemic activity of *Centella asiatica* is partly mediated by carbohydrase inhibition and glucose-fiber binding. <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/14/31>
29. KHAN, I. et al. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 12, n. 7, maio 2017.
30. KONG, F.-Y. et al. Unique Roles of Gold Nanoparticles in Drug Delivery, Targeting and Imaging Applications. *Molecules*, v. 22, n. 9, p. 1445, 31 ago. 2017.
31. KONWAR, R.; AHMED, A. B. NANOPARTICLE: AN OVERVIEW OF PREPARATION, CHARACTERIZATION AND APPLICATION. *International Research Journal of Pharmacy*, v. 4, n. 4, p. 47–57, 21 nov. 2016.
32. KUMARI, S.; SARKAR, L. A Review on Nanoparticles: Structure, Classification, Synthesis & Applications. *JOURNAL OF SCIENTIFIC RESEARCH*, v. 65, n. 08, p. 42–46, 2021.
33. LABARRERE, C. A.; KASSAB, G. S. Glutathione: A Samsonian life-sustaining small molecule that protects against oxidative stress, ageing and damaging inflammation. *Frontiers in Nutrition*, v. 9, 1 nov. 2022. DOI: 10.3389/fnut.2022.1007816. Disponível em: Glutathione: uma pequena molécula

samsoniana que sustenta a vida e protege contra o estresse oxidativo, o envelhecimento e a inflamação prejudicial - PubMed.

34. LUSHCHAK, V. I. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *Journal of Amino Acids*, v. 2012, p. 1–26, 2012. DOI: 10.1155/2012/736837. Disponível em: Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions - PubMed
35. MEHANNA, E. T. et al. Effect of gold nanoparticles shape and dose on immunological, hematological, inflammatory, and antioxidants parameters in male rabbit. *Veterinary World*, p. 65–75, 19 jan. 2022. doi: 10.14202/vetworld.2022.65-75. Disponível em: Effect of gold nanoparticles shape and dose on immunological, hematological, inflammatory, and antioxidants parameters in male rabbit - PMC
36. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, [S.l.], v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
37. NASIR, M. N., Abdullah, J., Habsah, M., Ghani, R. I., & Rammes, G. (2012). Inhibitory effect of asiatic acid on acetylcholinesterase, excitatory post synaptic potential and locomotor activity. *Phytomedicine*, 19(3–4), 311–316. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.10.004>
38. ORHAN, I. E. *Centella asiatica*(L.) Urban: From Traditional Medicine to Modern Medicine with Neuroprotective Potential. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2012, p. 1–8, 2012.
39. PATRA, J. K. et al. Nano Based Drug Delivery systems: Recent Developments and Future Prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 16, n. 1, 19 set. 2018.
40. PITTELLA, F. et al. Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Centella asiatica* (L) Urb. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 10, n. 9, p. 3713–3721, 1 set. 2009.
41. RATHER, M. A., Thenmozhi, A. J., Manivasagam, T., Dhivya Bharathi, M., Essa, M. M., & Guillemin, G. J. (2018). Neuroprotective role of Asiatic acid in aluminium chloride induced rat model of Alzheimer's disease.
42. RAZALI, N. N. M.; NG, C. T.; FONG, L. Y. Cardiovascular Protective Effects of *Centella asiatica* and Its Triterpenes: A Review. *Planta Medica*, v. 85, n. 16, p. 1203–1215, 20 set. 2019.

43. ROCHA, W. S. et al. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, n. 4, p. 1215–1221, dez. 2011.
44. RUTH, F. et al. Gold Nanoparticle Synthesized from *Centella asiatica*: Emphasis on Optimization, Characterization, Antioxidant, Antiglycation, and Cytotoxicity Effect as an Anti-aging Cosmetic Ingredient. *BioNanoScience*, v. 15, n. 1, 3 dez. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12668-024-01713-5>
45. SILVA, F. C. O. et al. Bioactivities of plant-isolated Triterpenes: A brief review. *Revista Virtual de Química*, v. 12, n. 1, p. 234–247, 2020.
46. SHARMA, N. et al. Gold Nanoparticles synthesis, properties, and forthcoming applications: A review. *Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research*, v. 3, n. 02, 30 jun. 2015. DOI:10.30750/ijpbr.3.2.3. Disponível em: Gold Nanoparticles synthesis, properties, and forthcoming applications : A review | Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research
47. SINGH, V.; TIWARI, M.; TIWARI, V. Phytosynthesis of nanoparticles: concept, controversy and application. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, v. 7, n. 3, p. 213-222, 2017.
48. SOMMERFELD, S. et al. Physiological Changes in Chicken Embryos Inoculated with Drugs and Viruses Highlight the Need for More Standardization of this Animal Model. *Animals*, v. 12, n. 9, p. 1156–1156, 29 abr. 2022. DOI: 10.3390/ani12091156. Disponível em: Physiological Changes in Chicken Embryos Inoculated with Drugs and Viruses Highlight the Need for More Standardization of this Animal Model - PubMed
49. SULIASIH, B. A. et al. Synthesis and application of gold nanoparticles as antioxidants. *Pharmacia*, v. 71, p. 1–19, 23 maio 2024. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.71.e112322>. Disponível em: Synthesis and application of gold nanoparticles as antioxidants
50. Sun, B., Wu, L., Wu, Y., Zhang, C., Qin, L., Hayashi, M., Kudo, M., Gao, M., & Liu, T. (2020b). Therapeutic Potential of *Centella asiatica* and Its Triterpenes: A Review. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.568032>

51. Sun, B., Wu, L., Wu, Y., Zhang, C., Qin, L., Hayashi, M., Kudo, M., Gao, M., & Liu, T. (2020c). Therapeutic Potential of *Centella asiatica* and Its Triterpenes: A Review. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.568032>
52. Supkamonseni, N., Thinkratok, A., Meksuriyen, D., & Srisawat, R. (2014). Hypolipidemic and hypoglycemic effects of *Centella asiatica* (L.) extract in vitro and in vivo. In *Indian Journal of Experimental Biology* (Vol. 52).
53. VILELA, D. D. et al. Increased selenium concentration in the synthesis of CdSe magic-sized quantum dots affects how the brain responds to oxidative stress. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, [S.l.], v. 113, n. 3, p. 633–641, 2025. DOI: 10.1002/jbm.b.34988.
54. Wong, J. H., Barron, A. M., & Abdullah, J. M. (2021). Mitoprotective Effects of *Centella asiatica* (L.) Urb.: Anti-Inflammatory and Neuroprotective Opportunities in Neurodegenerative Disease. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.687935>
55. YEH, Yi-cheun et al. Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*, v. 4, n. 6, p. 1871–1880, 21 mar. 2012. DOI: 10.1039/c1nr11188d. Disponível em: Gold Nanoparticles: Preparation, Properties, and Applications in Bionanotechnology | Request PDF