

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E DE PRATA
UTILIZANDO PARTIÇÕES DA CASCA DE *ANNONA CRASSIFLORA*: EXPLORANDO
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES, ANTIGLICANTES E CITOTÓXICAS

Rafael de Castro Lemos

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

Uberlândia – MG
Março – 2026

Rafael de Castro Lemos

SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E DE PRATA
UTILIZANDO PARTIÇÕES DA CASCA DE *ANNONA CRASSIFLORA*: EXPLORANDO
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES, ANTIGLICANTES E CITOTÓXICAS

Orientador: Prof. Dr. Allisson Benatti Justino

Instituto de Biotecnologia

Projeto de Pesquisa apresentado como
requisito para a aprovação na disciplina
Trabalho de Conclusão de Curso I do
Curso de Biotecnologia - Bacharelado da
Universidade Federal de Uberlândia.

Área de concentração: Ciências da
Saúde e biotecnologia

Uberlândia - MG

Março - 2026

A ficha catalográfica contém as informações bibliográficas (autor, título, local de publicação, assuntos e outras) necessárias para identificação da obra.

A confecção da ficha catalográfica para teses e dissertações é feita de forma automatizada dentro do Portal do Aluno.

Acesse: [Tutorial para confecção da Ficha Catalográfica Online](#)

Acesse: www.portalestudante.ufu.br

Modelo:

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).	
C376 2019	Cavalcanti, Ricardo Francisco, 1991- Computação nas nuvens [recurso eletrônico] : uma nova abordagem de armazenamento / Ricardo Francisco Cavalcanti. - 2019. Orientador: José Machado de Oliveira. Coorientadora: Maria da Silva Souza. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciência da Computação. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Computação. I. Oliveira, José Machado de, 1971-, (Orient.). II. Souza, Maria da Silva, 1970-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciência da Computação. IV. Título. CDU: 681.3

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

Rafael de Castro Lemos

SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E DE PRATA
UTILIZANDO PARTIÇÕES DA CASCA DE *ANNONA CRASSIFLORA*: EXPLORANDO
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES, ANTIGLICANTES E CITOTÓXICAS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de
Uberlândia como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel em biotecnologia

Área de concentração: Ciências da
Saúde e biotecnologia

Uberlândia, 25 de março de 2026

Banca Examinadora:

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

M. Sc. Vinicius Prado Bittar, IBTEC, UFU

Prof. Dr. Allisson Benatti Justino, IBTEC, UFU

Prof.^a Dr.^a Renata Roland Teixeira, IBTEC, UFU

AGRADECIMENTOS

Gostaria de exprimir meus mais sinceros agradecimentos ao meu orientador, Prof. Dr. Allisson Benatti Justino, por provar que a amizade e o ensino são uma alma única que habita em dois corpos; sua paciência em me guiar e sua confiança em me permitir caminhar ao seu lado fizeram de você não apenas um mestre, mas um verdadeiro amigo nesta jornada científica no Instituto de Biotecnologia.

Aos meus pais e outros familiares, que foram "o chão de pedra" onde firmei meus pés e "o céu de estrelas" para onde direcionei meus sonhos; este trabalho é, acima de tudo, o fruto do amor e do sacrifício de vocês.

Aos meus amigos de graduação, por estarem ao meu lado durante todos esses anos na UFU; como escreveu Oscar Wilde, "estamos todos na sarjeta, mas alguns de nós estão olhando para as estrelas", e obrigado por olharem para o alto comigo.

Aos meus colegas de laboratório, com quem dividi o tempo e as incertezas da bancada; foi o tempo que dedicamos uns aos outros que tornou nossa convivência tão preciosa quanto os resultados alcançados durante nosso tempo unidos.

Aos mestres que me tutelaram durante a graduação, minha gratidão por acenderem em mim a luz do saber; como afirmou Victor Hugo, ensinar é um exercício de imortalidade, e levo comigo uma parte de cada um de vocês.

À Universidade Federal de Uberlândia, agradeço por me ensinar que o que eu não sei é o que me define, e por me dar as ferramentas para buscar o que me faltava; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), minha gratidão pela bolsa concedida, financiando esta busca pelo essencial através da biotecnologia.

E por fim, à memória de meus avós, Celina e Antônio, que foram as pessoas que "brilham com fogo tão vivo" em minha história; mesmo que agora sejam luz no horizonte, o calor do exemplo de vocês ainda aquece meu caminho e esta conquista.

RESUMO

A síntese verde de nanopartículas é uma moderna alternativa para tratamentos biomédicos de precisão de modo sustentável. Nesse cenário, os processos de oxidação e glicação não enzimática de proteínas constituem processos químicos associados à formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), contribuindo para alterações estruturais e funcionais decorrentes do estresse glicoxidativo. Este estudo teve como objetivo sintetizar nanopartículas de ouro (AuNPs) e prata (AgNPs) por via verde utilizando frações da casca de *Annona crassiflora* como agentes redutores e estabilizantes, caracterizá-las por espectroscopia UV-Vis, FTIR, DLS e potencial zeta, e comparar suas atividades antioxidante, antiglicante e perfil de viabilidade celular com as frações livres correspondentes. Nos ensaios antioxidantes (FRAP, DPPH e ORAC), a fração acetato de etila apresentou maior capacidade redutora quando comparada à fração diclorometano, comportamento redox parcialmente modulado após nanoformulação. No modelo BSA-frutose (~230 mM), a AuNP-EtAc promoveu maior redução da fluorescência global de AGEs (350/420 nm) em relação à fração livre correspondente, enquanto no modelo BSA-MGO (10 mM) observou-se menor magnitude de inibição para todas as amostras avaliadas. A redução da formação de AGEs foi acompanhada por diminuição do conteúdo de proteína carbonilada e maior preservação de grupos sulfidrila, destacando-se as AgNPs com redução na faixa de 70 a 80%. Nos ensaios de viabilidade celular, as AuNPs apresentaram menor impacto na viabilidade de macrófagos e fibroblastos quando comparadas às AgNPs nas condições testadas. Os resultados indicam que a nanoformulação pode modular a atividade antiglicante da fração rica em compostos fenólicos, particularmente em modelos dependentes de etapas oxidativas do processo glicativo.

Palavras-chave: *Annona crassiflora*; nanopartículas metálicas; glicação; AGEs; proantocianidinas; citotoxicidade.

ABSTRACT

Green nanoparticle synthesis is a modern alternative for sustainable precision biomedical treatments. In this context, the oxidation and non-enzymatic glycation processes of specific proteins, chemical processes associated with the formation of advanced glycation end products (AGEs), contribute to structural and functional alterations resulting from glycoxidative stress. This study aimed to synthesize gold (AuNPs) and silver (AgNPs) nanoparticles via a green pathway using fractions of the *Annona crassiflora* cascade as reducing and stabilizing agents, characterize them by UV-Vis spectroscopy, FTIR, DLS and zeta potential, and compare their antioxidant, antiglycation activities and cell prediction profile with the corresponding free fractions. In antioxidant assays (FRAP, DPPH and ORAC), the ethyl acetate fraction showed greater reducing capacity when compared to the dichloromethane fraction, a redox behavior partially modulated after nanoformulation. In the BSA–fructose model (~230 mM), AuNP–EtAc promoted a greater reduction in the overall fluorescence of AGEs (350/420 nm) compared to the corresponding free fraction, while in the BSA–MGO model (10 mM) a smaller magnitude of impact was observed for all samples evaluated. The reduction in AGE formation was accompanied by a reduction in carbonyl protein content and greater preservation of sulfhydryl groups, with AgNPs standing out with a reduction in the range of 70 to 80%. In cell prediction assays, AuNPs had less impact on macrophage and fibroblast predictions when compared to AgNPs under the tested conditions. The results indicate that the nanoformulation can modulate the antiglycation activity of the fraction rich in phenolic compounds, particularly in models dependent on oxidative steps of the glycation process.

Keywords: *Annona crassiflora*; metallic nanoparticles; glycation; AGEs; proanthocyanidins; cytotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Espectro UV-Visível de nanopartículas de prata conjugadas com fração acetato de etila (AgNP-EtAc), nanopartículas de prata conjugadas com fração diclorometano (AgNP-DM), fração isolada acetato de etila (EtAc) e fração isolada diclorometano (DM).39
- Figura 2.** Espectro UV-Visível de nanopartículas de ouro conjugadas com fração acetato de etila (AuNP-EtAc), nanopartículas de ouro conjugadas com fração diclorometano (AuNP-DM), fração isolada acetato de etila (EtAc) e fração isolada diclorometano (DM).39
- Figura 3.** Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) da nanopartícula de ouro conjugada com fração acetato de etila (AuNP-EtAc) e fração isolada acetato de etila (EtAc).42
- Figura 4.** Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) da nanopartícula de ouro conjugada com fração diclorometano (AuNP-DM) e fração isolada diclorometano (DM).43
- Figura 5.** Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) da nanopartícula de prata conjugada com fração diclorometano (AgNP-DM) e fração isolada diclorometano (DM).43
- Figura 6.** Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) da nanopartícula de prata conjugada com fração acetato de etila (AgNP-EtAc) e fração isolada acetato de etila (EtAc).44
- Figura 7.** Conteúdo de proteína carbonilada em albumina sérica bovina (BSA) após incubação com frutose (~230 mM) por 72 h a 37 °C na presença das frações vegetais e de suas respectivas nanoformulações de prata. A carbonilação proteica foi determinada após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) com leitura espectrofotométrica a 370 nm. Os resultados são expressos como nmol de carbonila por mg de proteína após normalização pelo conteúdo proteico. O controle glicado corresponde à BSA incubada apenas com o agente glicante sem tratamento. Valores representam média ± desvio padrão de duplicatas experimentais, sendo as diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA *one-way* seguida de pós-testes de Dunnett considerando: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ e ausência representando que não foi significativo).56
- Figura 8.** Conteúdo de proteína carbonilada em albumina sérica bovina (BSA) após incubação com metilglioxal (MGO, 10 mM) por 72 h a 37 °C na presença das frações vegetais e de suas respectivas nanoformulações de prata. A carbonilação proteica foi determinada após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) com leitura espectrofotométrica a 370 nm.

Os resultados são expressos como nmol de carbonila por mg de proteína após normalização pelo conteúdo proteico. O controle glicado corresponde à BSA incubada apenas com o agente glicante sem tratamento. Valores representam média $\pm$ desvio padrão de duplicatas experimentais, sendo as diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA *one-way* seguida de pós-testes de Dunnett considerando: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ e ausência representando que não foi significativo).....57

Figura 9. Conteúdo de proteína carbonilada em albumina sérica bovina (BSA) após incubação com frutose (~230 mM) por 72 h a 37 °C na presença das frações vegetais e de suas respectivas nanoformulações de ouro. A carbonilação proteica foi determinada após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) com leitura espectrofotométrica a 370 nm. Os resultados são expressos como nmol de carbonila por mg de proteína após normalização pelo conteúdo proteico. O controle glicado corresponde à BSA incubada apenas com o agente glicante sem tratamento. Valores representam média $\pm$ desvio padrão de duplicatas experimentais, sendo as diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA *one-way* seguida de pós-testes de Dunnett, considerando: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ e ausência representando que não foi significativo).....57

Figura 10. Conteúdo de proteína carbonilada em albumina sérica bovina (BSA) após incubação com metilglioxal (MGO, 10mM) por 72 h a 37 °C na presença das frações vegetais e de suas respectivas nanoformulações de ouro. A carbonilação proteica foi determinada após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) com leitura espectrofotométrica a 370 nm. Os resultados são expressos como nmol de carbonila por mg de proteína após normalização pelo conteúdo proteico. O controle glicado corresponde à BSA incubada apenas com o agente glicante sem tratamento. Valores representam média $\pm$ desvio padrão de duplicatas experimentais, sendo as diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA *one-way* seguida de pós-testes de Dunnett, considerando: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ e ausência representando que não foi significativo).58

Figura 11. Conteúdo de grupos sulfidrila (-SH) em albumina sérica bovina (BSA) após incubação com frutose (~230 mM) por 72 h a 37 °C na presença das frações vegetais e de suas respectivas nanoformulações de prata. A quantificação foi realizada utilizando o reagente 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) com leitura espectrofotométrica a 412 nm. Os resultados são expressos como nmol de TNB por mg de proteína. O controle glicado corresponde à BSA incubada apenas com o agente glicante sem tratamento. Valores representam média $\pm$ desvio padrão de duplicatas experimentais, sendo as diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA *one-way* seguida de pós-testes de Dunnett, considerando: (* $p <$

0,05; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ e ausência representando que não foi significativo).....61

Figura 12. Conteúdo de grupos sulfidrilas (–SH) em albumina sérica bovina (BSA) após incubação com metilglioxal (MGO, 10mM) por 72 h a 37 °C na presença das frações vegetais e de suas respectivas nanoformulações de prata. A quantificação foi realizada utilizando o reagente 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) com leitura espectrofotométrica a 412 nm. Os resultados são expressos como nmol de TNB por mg de proteína. O controle glicado corresponde à BSA incubada apenas com o agente glicante sem tratamento. Valores representam média $\pm$ desvio padrão de duplicatas experimentais, sendo as diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA *one-way* seguida de pós-testes de Dunnett, considerando: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ e ausência representando que não foi significativo).61

Figura 13. Conteúdo de grupos sulfidrilas (–SH) em albumina sérica bovina (BSA) após incubação com frutose (~230 mM) por 72 h a 37 °C na presença das frações vegetais e de suas respectivas nanoformulações de ouro. A quantificação foi realizada utilizando o reagente 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) com leitura espectrofotométrica a 412 nm. Os resultados são expressos como nmol de TNB por mg de proteína. O controle glicado corresponde à BSA incubada apenas com o agente glicante sem tratamento. Valores representam média $\pm$ desvio padrão de duplicatas experimentais, sendo as diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA *one-way* seguida de pós-testes de Dunnett, considerando: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ e ausência representando que não foi significativo).....62

Figura 14. Conteúdo de grupos sulfidrilas (–SH) em albumina sérica bovina (BSA) após incubação com metilglioxal (MGO, 10mM) por 72 h a 37 °C na presença das frações vegetais e de suas respectivas nanoformulações de ouro. A quantificação foi realizada utilizando o reagente 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) com leitura espectrofotométrica a 412 nm. Os resultados são expressos como nmol de TNB por mg de proteína. O controle glicado corresponde à BSA incubada apenas com o agente glicante sem tratamento. Valores representam média $\pm$ desvio padrão de duplicatas experimentais, sendo as diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA *one-way* seguida de pós-testes de Dunnett, considerando: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ e ausência representando que não foi significativo).63

Figura 15. Avaliação da viabilidade celular da linhagem de macrófagos murinos (RAW 264.7) expostos às frações da casca de *Annona crassiflora* e suas respectivas nanopartículas metálicas.

A viabilidade foi determinada pelo ensaio de redução do MTT após 24 h de tratamento nas concentrações de 31,25 a 500 µg/mL. Os resultados são expressos como porcentagem em relação ao controle não tratado (100% de viabilidade). Valores representam a média ± desvio padrão. Diferenças estatísticas em relação ao controle são indicadas por asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ e ns não foi significativo). O limiar de citotoxicidade adotado foi de $< 70\%$67

Figura 16. Avaliação da viabilidade celular da linhagem de fibroblastos murinos (NIH/3T3) expostos às frações da casca de *Annona crassiflora* e suas respectivas nanopartículas metálicas. A viabilidade foi determinada pelo ensaio de redução do MTT após 24 h de tratamento nas concentrações de 31,25 a 500 µg/mL. Os resultados são expressos como porcentagem em relação ao controle não tratado (100% de viabilidade). Valores representam a média ± desvio padrão. Diferenças estatísticas em relação ao controle são indicadas por asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ e ns não foi significativo). O limiar de citotoxicidade adotado foi de $< 70\%$68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros coloidais de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas de ouro e prata sintetizadas com frações de <i>Annona crassiflora</i>	40
Tabela 2. Capacidade antioxidante total das nanopartículas de prata e frações livres de <i>Annona crassiflora</i> determinada pelos métodos DPPH, ORAC e FRAP. Nota: DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; ORAC: Capacidade de absorção de radicais de oxigênio; FRAP: Poder antioxidante de redução do ferro. Os resultados são expressos em equivalentes de Trolox ($\mu\text{mol TE/g}$) ou percentual (%) de inibição. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa entre as amostras ($p < 0,05$) pelo teste de ANOVA <i>one-way</i> seguido do pós-teste de Tukey. Valores com letras iguais não apresentam diferença estatística entre si.....	45
Tabela 3. Capacidade antioxidante total das nanopartículas de ouro e frações livres de <i>Annona crassiflora</i> determinada pelos métodos DPPH, ORAC e FRAP. Nota: DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; ORAC: Capacidade de absorção de radicais de oxigênio; FRAP: Poder antioxidante de redução do ferro. Os resultados são expressos em equivalentes de Trolox ($\mu\text{mol TE/g}$) ou percentual (%) de inibição. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa entre as amostras ($p < 0,05$) pelo teste de ANOVA <i>one-way</i> seguido do pós-teste de Tukey. Valores com letras iguais não apresentam diferença estatística entre si.....	46
Tabela 4. Inibição (%) da formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) em albumina sérica bovina (BSA) incubada com frutose (~230 mM) ou metilglioxal (MGO, 10 mM) por 72 h a 37 °C, na presença das frações da casca de <i>Annona crassiflora</i> e de suas respectivas nanoformulações de ouro (AuNP–EtAc, AuNP–DM, EtAc e DM).	49
Tabela 5. Inibição (%) da formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) em albumina sérica bovina (BSA) incubada com frutose (~230 mM) ou metilglioxal (MGO, 10 mM) por 72 h a 37 °C, na presença das frações da casca de <i>Annona crassiflora</i> e de suas respectivas nanoformulações de prata (AgNP–EtAc, AgNP–DM, EtAc e DM).	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAPH: 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) diidrocloreto
- AGEs: Produtos Finais da Glicação Avançada (*Advanced Glycation End-products*)
- AgNPs: Nanopartículas de Prata
- AgNP-Ac: Nanopartículas de Prata conjugadas com fração acetato de etila
- AgNP-Dm: Nanopartículas de Prata conjugadas com fração diclorometano
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AuNPs: Nanopartículas de Ouro
- AuNP-Ac: Nanopartículas de Ouro conjugadas com fração acetato de etila
- AuNP-Dm: Nanopartículas de Ouro conjugadas com fração diclorometano
- BSA: Albumina de Soro Bovino (*Bovine Serum Albumin*)
- CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- DLS: Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering*)
- DM: Fração diclorometano
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DNPH: 2,4-dinitrofenil-hidrazina
- DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
- DTNB: Reagente de Ellman (5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico))
- EtAc: Fração Acetato de Etila
- FRAP: Poder Antioxidante de Redução do Ferro (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)
- FTIR: Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
- MGO: Metilglioxal
- MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
- ORAC: Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)
- PDI: Índice de Polidispersão
- SFB: Soro Fetal Bovino
- SPRL: Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada
- TCA: Ácido Tricloroacético
- TNB: Ânion 2-nitro-5-tiobenzoato
- TPTZ: 2,4,6-tri-(2-piridil)-s-triazina
- UV-Vis: Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Potencial bioativo de <i>Annona crassiflora</i>	17
1.2	Propriedades antioxidantes de <i>Annona crassiflora</i> e relevância biológica	18
1.3	Propriedade antiglicante de <i>Annona crassiflora</i> e relevância para AGEs.....	19
1.4	Viabilidade celular e citotoxicidade: fundamentos, interpretação e cuidados metodológicos	20
1.5	Propriedades e princípios físico-químicos das nanopartículas de ouro (AuNPs) ..	22
1.6	Propriedades e princípios físico-químicos das nanopartículas de prata (AgNPs) ..	24
2	OBJETIVOS	25
3	METODOLOGIA.....	26
3.1	Preparação do extrato da casca de <i>Annona Crassiflora</i>	26
3.2	Partição do extrato etanólico da casca do fruto de <i>Annona crassiflora</i>	27
3.3	Síntese verde de nanopartículas de ouro (AuNPs).....	28
3.4	Síntese verde de nanopartículas de prata (AgNPs)	28
3.5	Caracterização das Nanopartículas	29
	<i>Espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis)</i>	30
	<i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	30
	<i>Espalhamento dinâmico de luz, índice de polidispersão e potencial zeta</i>	31
3.6	Capacidade antioxidante.....	31
	<i>Avaliação da capacidade de redução do ferro (FRAP)</i>	31
	<i>Avaliação da capacidade de absorção de radicais livres de oxigênio (ORAC)</i>	32
	<i>Avaliação do sequestro do radical DPPH (DPPH)</i>	33
3.7	Ensaio de atividade antiglicante (formação de AGEs).....	34
3.7.1	<i>Determinação de proteína carbonilada</i>	35
3.7.2	<i>Determinação do conteúdo de sulfidrilas totais</i>	36
3.8	Avaliação da viabilidade celular (MTT).....	37
3.9	Análise Estatística	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1	Caracterização espectroscópica e coloidal das nanopartículas	38
4.2	Atividade antioxidante das frações e nanoformulações	45
4.3	Ensaio de glicação	48
4.3.1	<i>AGES (BSA-Fructose e BSA-MGO)</i>	48

<i>4.3.2 Proteína Carbonilada</i>	55
<i>4.3.3 Sulfidril</i>	60
4.4 Viabilidade celular	65
5 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia constitui uma área estratégica da ciência contemporânea, com impacto crescente nas ciências da saúde, na indústria farmacêutica e em diversas aplicações biotecnológicas. Nesse contexto, as nanopartículas metálicas, especialmente as de ouro (AuNPs) e prata (AgNPs), têm despertado amplo interesse científico devido às suas propriedades singulares em escala nanométrica, como comportamento óptico diferenciado, elevada área superficial e grande capacidade de funcionalização. Tais características conferem a esses nanomateriais aplicações relevantes em sistemas de liberação controlada de fármacos, terapias antineoplásicas, agentes antimicrobianos, antioxidantes e no desenvolvimento de biossensores (PASPARAKIS, 2022; AHMAD et al., 2024).

Apesar da eficácia dos métodos físico-químicos convencionais para a obtenção de nanopartículas metálicas, esses processos frequentemente empregam reagentes tóxicos e exigem condições severas de reação, o que limita sua aplicação em sistemas biológicos. Em resposta a essas limitações, a síntese verde surge como uma abordagem inovadora e sustentável, baseada no uso de compostos de origem natural como agentes redutores e estabilizantes. Extratos vegetais ricos em metabólitos secundários — como fenóis, flavonoides, alcaloides e terpenos — têm se mostrado eficientes na produção de nanopartículas mais biocompatíveis e ambientalmente seguras, além de possibilitar a obtenção de sistemas nanoestruturados com propriedades bioativas adicionais (BURLACU et al., 2019; MUJAHID et al., 2024).

Paralelamente ao avanço da nanotecnologia, observa-se crescente interesse na exploração racional da biodiversidade como fonte de compostos bioativos. O Cerrado brasileiro, reconhecido como um dos principais “hotspots” de biodiversidade do mundo, abriga espécies vegetais de elevado potencial biotecnológico ainda pouco exploradas. Entre essas espécies, destaca-se *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae), popularmente conhecida como araticum ou marolo, cuja composição fitoquímica tem sido amplamente investigada.

Estudos demonstram que diferentes partes de *A. crassiflora*, especialmente a casca do fruto, concentram compostos fenólicos, flavonoides, proantocianidinas e alcaloides, associados a atividades antioxidantes, antiglicantes, anti-inflamatórias e citotóxicas descritas em diferentes modelos experimentais (ROESLER et al., 2007; JUSTINO et al., 2016). Evidências recentes indicam ainda que compostos fenólicos e aminas bioativas presentes em *A. crassiflora* são capazes de exercer efeitos quimiopreventivos em modelos animais de carcinogênese colônica, correlacionando a atividade antioxidante da matriz vegetal com a redução de lesões pré-

neoplásicas e modulação de processos celulares associados ao estresse oxidativo (ÁVILA et al., 2024).

A partição líquido-líquido do extrato etanólico da casca do fruto de *A. crassiflora* permite o enriquecimento seletivo de diferentes classes de metabólitos secundários, sendo a fração acetato de etila descrita como enriquecida em fenólicos/proantocianidinas, enquanto a fração diclorometano é frequentemente associada a maior contribuição de alcaloides (JUSTINO et al., 2016; PEREIRA et al., 2017). Do ponto de vista biológico, essas frações têm demonstrado elevada capacidade de neutralização de radicais livres e significativa inibição da formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs), processos intimamente relacionados ao estresse oxidativo e à progressão de doenças metabólicas e inflamatórias (JUSTINO et al., 2016; JUSTINO et al., 2019).

Nesse cenário, a integração entre produtos naturais do Cerrado e a nanotecnologia representa uma estratégia promissora para potencializar a atividade biológica de compostos naturais. Estudos recentes em nanotecnologia verde demonstram que nanopartículas metálicas, como AuNPs e AgNPs sintetizadas por métodos sustentáveis, exibem amplo potencial terapêutico e aplicações biomédicas em sistemas biológicos, incluindo liberação de fármacos, terapia fototérmica, diagnóstico e aplicações antimicrobianas (AHMAD et al., 2024).

As AuNPs e AgNPs destacam-se ainda por apresentarem ressonância plasmônica de superfície (SPR), fenômeno óptico característico monitorável por espectroscopia UV-Vis, com bandas típicas entre 520–550 nm para AuNPs e 400–450 nm para AgNPs. A caracterização físico-química das nanopartículas metálicas é fundamental para compreender sua formação, estabilidade coloidal e interação com sistemas biológicos. Técnicas como a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier possibilita a identificação de grupos funcionais associados à superfície das nanopartículas. Adicionalmente, o espalhamento dinâmico de luz fornece informações sobre o diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta, parâmetros diretamente relacionados à estabilidade coloidal e ao comportamento biológico dos nanomateriais (LINK; EL-SAYED, 1999; BHATTACHARJEE, 2016; PASPARAKIS, 2022).

Dessa forma, o presente trabalho propõe a síntese verde de nanopartículas de ouro e prata utilizando as frações diclorometano e acetato de etila da casca do fruto de *Annona crassiflora* Mart., bem como a caracterização de suas propriedades físico-químicas e a avaliação de suas atividades antioxidante, antiglicante e de viabilidade celular. A abordagem adotada visa contribuir para o desenvolvimento de nanomateriais bioativos sustentáveis, ampliando o conhecimento acerca da aplicação biotecnológica de recursos vegetais do Cerrado brasileiro.

1.1 Potencial bioativo de *Annona crassiflora*

Annona crassiflora Mart., espécie nativa do Cerrado brasileiro pertencente à família Annonaceae, tem despertado crescente interesse científico devido ao seu elevado potencial bioativo associado à diversidade de metabólitos secundários presentes em diferentes partes do fruto, especialmente na casca. Estudos fitoquímicos demonstram que essa matriz vegetal é rica em compostos fenólicos, flavonoides, proantocianidinas, alcaloides aporfinicos e acetogeninas, classes químicas amplamente reconhecidas por suas atividades biológicas (ROESLER et al., 2007; JUSTINO et al., 2017).

A casca do fruto de *A. crassiflora* apresenta concentração significativamente superior de compostos fenólicos quando comparada à polpa, o que tem sido correlacionado com sua elevada capacidade antioxidante e com a modulação de processos celulares associados ao estresse oxidativo e inflamação (ROESLER et al., 2007; JUSTINO et al., 2017). Análises químicas detalhadas indicam que proantocianidinas do tipo B representam uma das principais subclasses fenólicas presentes nessa matriz, contribuindo de forma decisiva para sua bioatividade (JUSTINO et al., 2019).

Além dos compostos fenólicos, alcaloides aporfinicos isolados da casca do fruto, como a estefalagina, têm sido associados a atividades farmacológicas relevantes, incluindo efeitos citotóxicos seletivos, antinociceptivos e moduladores de canais iônicos, evidenciando o potencial multifuncional dessa espécie vegetal (PEREIRA et al., 2017; JUSTINO et al., 2020). Esses compostos apresentam estruturas químicas capazes de interagir com diferentes alvos biológicos, ampliando o espectro de aplicações biotecnológicas de *A. crassiflora*.

Estudos in vivo reforçam o potencial bioativo dessa espécie, demonstrando que frações enriquecidas em compostos fenólicos e aminas bioativas provenientes de *A. crassiflora* foram capazes de reduzir danos oxidativos, modular processos inflamatórios e exercer efeitos quimiopreventivos em modelos animais de doenças crônicas, incluindo carcinogênese colônica (JUSTINO et al., 2017; ÁVILA et al., 2024). Esses achados reforçam a relevância da exploração dessa espécie como fonte de compostos funcionais de interesse biotecnológico.

Dessa forma, o conjunto de evidências científicas disponíveis sustenta o elevado potencial bioativo de *Annona crassiflora*, especialmente da casca do fruto, justificando sua utilização como matéria-prima para o desenvolvimento de estratégias inovadoras, incluindo a síntese verde de nanopartículas metálicas funcionalizadas com compostos naturais bioativos.

1.2 Propriedades antioxidantes de *Annona crassiflora* e relevância biológica

A atividade antioxidante de produtos naturais está diretamente relacionada à capacidade de seus compostos bioativos em neutralizar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, prevenindo danos oxidativos a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. No caso de *Annona crassiflora*, diversos estudos demonstram que a casca do fruto apresenta elevada capacidade antioxidante, atribuída principalmente à alta concentração de compostos fenólicos e proantocianidinas presentes nessa matriz vegetal (ROESLER et al., 2007; JUSTINO et al., 2017).

Os compostos fenólicos exercem sua ação antioxidante por mecanismos complementares, incluindo a doação de elétrons ou átomos de hidrogênio para estabilização de radicais livres, a quelatação de íons metálicos de transição envolvidos em reações redox e a inibição de processos de oxidação em cadeia. Esses mecanismos são amplamente descritos na literatura e fundamentam a utilização de ensaios como DPPH, FRAP e ORAC para a avaliação do potencial antioxidante de extratos e frações vegetais (ANTOLOVICH et al., 2002; HUANG; OU; PRIOR, 2005).

No contexto específico de *A. crassiflora*, estudos demonstraram que frações obtidas da casca do fruto apresentam desempenho antioxidante superior ao de antioxidantes sintéticos em determinados modelos experimentais, evidenciando elevada eficiência na neutralização de radicais livres e na proteção contra a oxidação lipídica. Esse efeito tem sido associado à presença de proantocianidinas do tipo B, flavonoides e outros polifenóis com elevada capacidade redox (JUSTINO et al., 2017).

Além da ação antioxidante direta, evidências experimentais indicam que compostos fenólicos de *A. crassiflora* podem atuar de forma indireta, modulando vias celulares associadas à resposta antioxidante endógena. Estudos in vivo demonstraram que frações polifenólicas dessa espécie foram capazes de reduzir marcadores de estresse oxidativo e modular parâmetros bioquímicos relacionados à defesa antioxidante, sugerindo um efeito protetor sistêmico (JUSTINO et al., 2017; ÁVILA et al., 2024).

A relevância biológica da atividade antioxidante de *A. crassiflora* torna-se ainda mais evidente quando considerada sua relação com processos patológicos associados ao estresse oxidativo, como inflamação crônica, doenças metabólicas e carcinogênese. A redução de espécies reativas e de danos oxidativos pode contribuir para a prevenção da progressão dessas condições, justificando o interesse no desenvolvimento de estratégias biotecnológicas capazes

de preservar e potencializar a atividade antioxidante dessa matriz vegetal (THORPE; BAYNES, 1996; ELOSTA et al., 2012; JUSTINO et al., 2017)

Nesse contexto, a utilização de frações antioxidantes de *A. crassiflora* na síntese verde de nanopartículas metálicas representa uma abordagem promissora para ampliar a estabilidade e a eficácia biológica desses compostos. A associação entre compostos fenólicos e núcleos metálicos nanoestruturados pode favorecer a proteção dos antioxidantes contra degradação, além de potencializar seus efeitos por mecanismos sinérgicos, aspecto que será explorado nos capítulos subsequentes deste trabalho (IRAVANI, 2011; MUJAHID et al., 2024).

1.3 Propriedade antiglicante de *Annona crassiflora* e relevância para AGEs

A glicação não enzimática é um conjunto de reações entre grupos amino livres de proteínas (por exemplo, lisina e arginina) e espécies carbonílicas reativas derivadas do metabolismo de carboidratos, culminando na formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs). Esses produtos estão relacionados à alteração estrutural e funcional de proteínas, amplificação do estresse oxidativo e ativação de vias pró-inflamatórias, contribuindo para complicações metabólicas e associadas ao envelhecimento. (THORPE; BAYNES, 1996; ELOSTA et al., 2012; JUSTINO et al., 2017; DESAI; WU, 2007).

Entre os precursores mais relevantes para a formação de AGEs destaca-se o metilglioxal (MGO), um dicarbonil altamente reativo capaz de reagir rapidamente com resíduos de arginina e lisina, gerando adutos avançados e intermediários carbonílicos que aceleram o processo glicativo. Por isso, estratégias antiglicantes frequentemente buscam interferir na formação/reatividade de dicarbonílicos ou inibir a geração/estabilização de adutos avançados, especialmente em modelos *in vitro* (THORPE; BAYNES, 1996; DESAI; WU, 2007).

Dessa forma, a comparação entre BSA–frutose e BSA–MGO permite discriminar efeitos sobre etapas iniciais/tardias da reação de Maillard (modelo açúcar) versus efeitos sobre carbonilação reativa já estabelecida (modelo dicarbonílico), sustentando inferências mecanísticas sobre predominância de ação antioxidante/glico-oxidativa ou de sequestro direto de dicarbonílicos.

Nesse contexto, compostos fenólicos — particularmente proantocianidinas e flavonoides — têm recebido atenção por sua capacidade de atuar como sequestradores de espécies carbonílicas reativas (“carbonyl trapping”), reduzindo a disponibilidade de dicarbonílicos como MGO e, conseqüentemente, inibindo a formação de AGEs. Evidências experimentais indicam que proantocianidinas podem reagir com carbonílicos reativos e reduzir

marcadores de glicação, sustentando esse mecanismo como uma via relevante de ação antiglicante (PENG et al., 2008; HO; WANG, 2013).

Em se tratando da *Annona crassiflora*, há evidências diretas de atividade antiglicante associada à casca do fruto e suas frações. Em estudo do grupo da Universidade Federal de Uberlândia, a casca do araticum foi descrita como fonte de compostos com atividade inibitória de glicação, além de ações antioxidantes e efeitos sobre enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, reforçando a aplicabilidade biotecnológica dessa matriz vegetal em condições relacionadas ao estresse glicativo (JUSTINO et al., 2016).

Além disso, proantocianidinas do tipo B identificadas/associadas a frações da casca do fruto apresentaram capacidade de reduzir a glicação e danos oxidativos correlatos, reforçando a conexão entre estresse oxidativo e estresse glicativo e sustentando a hipótese de que compostos polifenólicos podem atuar simultaneamente como antioxidantes e antiglicantes, especialmente em modelos que monitoram AGEs fluorescentes e produtos carbonilados (JUSTINO et al., 2019; ELOSTA et al., 2012; Justino et al., 2017).

Como suporte mecanístico adicional (fora do sistema *A. crassiflora*, mas altamente aceito para justificar mecanismos), estudos com matrizes ricas em fenólicos demonstraram que a inibição de AGEs pode ocorrer por: (i) sequestro de dicarbonílicos, (ii) inibição de oxidação associada à glicação (glico-oxidação) e (iii) redução de intermediários reativos que amplificam o processo. Trabalhos com fitoquímicos de frutas demonstram esse padrão em modelos *in vitro* de glicação e reforçam que proantocianidinas/catequinas podem formar adutos com carbonílicos reativos, apoiando uma explicação mecanística robusta para os efeitos antiglicantes observados em extratos vegetais (WANG et al., 2011; PENG et al., 2008).

A utilização concomitante dos modelos BSA–frutose e BSA–MGO permite explorar diferentes etapas do processo glicativo. Enquanto o sistema BSA–frutose representa um modelo completo da reação de Maillard, incluindo formação de intermediários de Amadori e subsequente glico-oxidação, o sistema BSA–MGO avalia especificamente a capacidade das amostras em interagir com dicarbonílicos altamente reativos já formados. Assim, a comparação entre ambos os modelos possibilita inferências mecanísticas sobre o potencial antiglicante das frações e das nanoformulações, distinguindo efeitos predominantemente antioxidantes daqueles relacionados ao sequestro direto de carbonilas reativas.

1.4 Viabilidade celular e citotoxicidade: fundamentos, interpretação e cuidados metodológicos

A avaliação de viabilidade celular e citotoxicidade é uma etapa crítica na triagem de segurança biológica de extratos vegetais, frações e nanomateriais, pois permite estimar, em condições controladas, o impacto do tratamento sobre parâmetros como metabolismo celular, integridade de membrana e capacidade proliferativa. Ensaio baseado em sais tetrazólios, como o MTT, são amplamente empregados porque a redução do MTT a formazan depende da atividade metabólica de células viáveis, funcionando como um indicador indireto de vitalidade celular (MOSMANN, 1983).

Do ponto de vista regulatório e comparativo, recomendações consolidadas para ensaios *in vitro* de citotoxicidade — especialmente em materiais e sistemas com potencial aplicação biomédica — utilizam como referência critérios de redução de viabilidade em relação ao controle, sendo que, em diretrizes consolidadas para avaliação de materiais biomédicos, reduções superiores a aproximadamente 30% na viabilidade celular são frequentemente consideradas indicativas de citotoxicidade, devendo essa interpretação ser contextualizada conforme desenho experimental, linhagem celular e tempo de exposição de avaliação, embora a interpretação deva respeitar desenho experimental, linhagem celular, tempo de exposição e natureza do material testado (GRUBER; NICKEL, 2023).

Entretanto, ao trabalhar com nanopartículas metálicas (AuNPs e AgNPs) e com extratos vegetais ricos em metabólitos secundários, é essencial reconhecer que diferentes ensaios reportam “viabilidade” por vias distintas e podem sofrer interferência dependente da partícula e do sistema analítico. Assim, recomenda-se interpretar o MTT à luz de controles célula-free e, quando possível, corroborar achados com um ensaio ortogonal (por exemplo, liberação de LDH, NRU ou ATP), reduzindo risco de falsos positivos/negativos (KROLL et al., 2012; HOLDER et al., 2012; ANDRAOS et al., 2020).

No caso específico de nanopartículas metálicas, a literatura mostra que AuNPs tendem a apresentar perfis de biocompatibilidade que variam fortemente em função de tamanho, forma, agregação e química de superfície, e que esses parâmetros modulam captação celular, interação com proteínas do meio (corona proteica) e respostas de estresse celular (KUS-LIŚKIEWICZ; FICKERS; BEN TAHAR, 2021; SANI; CAO; CUI, 2021; CARNOVALE et al., 2019). Para nanopartículas metálicas, vários estudos indicam que as nanopartículas de prata (AgNPs) podem desencadear citotoxicidade em células e tecidos por meio de mecanismos envolvendo estresse oxidativo acentuado e lesão mitocondrial. Um estudo experimental demonstrou que AgNPs induziram dano mitocondrial, aumento de espécies reativas de oxigênio e consequente redução da viabilidade celular em linhagens humanas de células pulmonares e hepáticas,

evidenciando a importância desses mecanismos na resposta celular (XIN; WANG; FAN; CHE; WU; GUO; TONG, 2016).

A compreensão desses mecanismos é relevante no contexto da avaliação biológica de nanomateriais sintetizados por rotas verdes, uma vez que a funcionalização superficial e a composição associada às frações vegetais podem modular a intensidade desses efeitos e sua interação com as células (KUS-LIŚKIEWICZ; FICKERS; BEN TAHAR, 2021).

Um ponto metodológico especialmente relevante em estudos com nanopartículas é a possibilidade de interferência analítica nos ensaios colorimétricos/fluorimétricos (por absorção/espalhamento de luz, adsorção de corantes, catálise redox ou interação com componentes do meio). Isso pode produzir “falsos positivos” ou “falsos negativos” de viabilidade, exigindo controles apropriados (por exemplo: branco contendo nanopartícula + reagente sem células; controle de extrato colorido; leitura de referência; e, quando possível, validação cruzada com um segundo método) (PODGÓRSKI; WOJASÍŃSKI; CIACH, 2022; KROLL et al., 2012; HOLDER et al., 2012; ANDRAOS et al., 2020).

No contexto deste trabalho — que envolve frações diclorometano e acetato de etila de *Annona crassiflora* e sua aplicação na síntese verde/funcionalização de AuNPs e AgNPs — a etapa de viabilidade/citotoxicidade é particularmente importante por dois motivos: (i) frações vegetais podem conter compostos com atividade citotóxica seletiva (dependente de concentração e linhagem), e (ii) a nanoformulação pode modificar biodisponibilidade, captação celular e intensidade do efeito, exigindo que os resultados sejam interpretados à luz das propriedades físico-químicas e dos controles de interferência (KUS-LIŚKIEWICZ; FICKERS; BEN TAHAR, 2021; MUJAHID et al., 2024).

Nesta dissertação, a avaliação de viabilidade celular teve como objetivo investigar o impacto inicial das frações vegetais e das nanopartículas sintetizadas sobre linhagens celulares não tumorais, contribuindo para a caracterização preliminar de segurança biológica e perfil citotóxico *in vitro*.

1.5 Propriedades e princípios físico-químicos das nanopartículas de ouro (AuNPs)

As nanopartículas de ouro (AuNPs) destacam-se entre os nanomateriais metálicos devido à sua elevada estabilidade química, facilidade de funcionalização superficial e comportamento óptico singular em escala nanométrica. Diferentemente do ouro em estado macroscópico, as AuNPs exibem propriedades físico-químicas fortemente dependentes do

tamanho, forma e ambiente químico, o que amplia significativamente seu potencial de aplicação em sistemas biológicos e biotecnológicos (LINK; EL-SAYED, 1999; PASPARAKIS, 2022).

Um dos fenômenos mais característicos das AuNPs é a ressonância plasmônica de superfície (SPR), resultante da oscilação coletiva dos elétrons de condução quando excitados por radiação eletromagnética. Esse fenômeno confere às AuNPs bandas de absorção intensas na região do visível, tipicamente entre 520 e 550 nm para partículas aproximadamente esféricas, permitindo sua detecção e monitoramento por espectroscopia UV-Vis (LINK; EL-SAYED, 1999). Alterações no tamanho, forma ou estado de agregação das partículas promovem deslocamentos da banda plasmônica, tornando a SPR uma ferramenta sensível para avaliação da estabilidade coloidal.

Além do comportamento óptico, parâmetros como diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta são fundamentais para a caracterização físico-química das AuNPs, especialmente em sistemas destinados a aplicações biológicas. O diâmetro hidrodinâmico, obtido por espalhamento dinâmico de luz (DLS), reflete não apenas o núcleo metálico, mas também a camada de moléculas adsorvidas à superfície, enquanto o PDI fornece informações sobre a homogeneidade da suspensão coloidal (BHATTACHARJEE, 2016).

O potencial zeta, por sua vez, está relacionado à carga superficial das nanopartículas e constitui um importante indicador de estabilidade coloidal. Valores elevados em módulo (positivos ou negativos) indicam maior repulsão eletrostática entre partículas, reduzindo a tendência à agregação. Em AuNPs obtidas por síntese verde, compostos orgânicos provenientes de extratos ou frações vegetais permanecem adsorvidos à superfície, influenciando diretamente o potencial zeta e, conseqüentemente, a estabilidade e interação com sistemas biológicos (IRAVANI, 2011; BURLACU et al., 2019).

A química de superfície das AuNPs é um dos fatores mais relevantes para seu comportamento biológico. Compostos fenólicos, flavonoides e outros metabólitos secundários podem atuar como agentes estabilizantes naturais, promovendo funcionalização espontânea das partículas. Essa funcionalização influencia a formação da chamada corona biomolecular em meios biológicos, modulando a interação das AuNPs com proteínas, membranas celulares e receptores, além de impactar diretamente a biocompatibilidade e o perfil toxicológico do sistema (CARNOVALE et al., 2019; PASPARAKIS, 2022).

Diversos estudos indicam que AuNPs apresentam, de modo geral, menor citotoxicidade quando comparadas a outras nanopartículas metálicas, especialmente quando sintetizadas por rotas verdes e funcionalizadas com compostos naturais. Entretanto, a resposta biológica depende fortemente de parâmetros como tamanho, concentração, tempo de exposição e

natureza da superfície, reforçando a necessidade de caracterização físico-química detalhada antes da avaliação biológica (SANI; CAO; CUI, 2021; KUS-LIŚKIEWICZ; FICKERS; BEN TAHAR, 2021).

No contexto da conjugação com frações vegetais de *Annona crassiflora*, as propriedades físico-químicas das AuNPs tornam-se ainda mais relevantes, uma vez que a presença de compostos fenólicos e alcaloides adsorvidos à superfície pode conferir estabilidade coloidal adicional e potencializar atividades antioxidantes e antiglicantes. Dessa forma, a caracterização detalhada das AuNPs sintetizadas é essencial para compreender sua interação com sistemas biológicos e interpretar adequadamente os resultados obtidos nos ensaios subsequentes.

1.6 Propriedades e princípios físico-químicos das nanopartículas de prata (AgNPs)

As nanopartículas de prata (AgNPs) têm sido amplamente investigadas devido às suas propriedades físico-químicas singulares e ao seu pronunciado potencial biológico, particularmente em aplicações antimicrobianas, antioxidantes e citotóxicas. Diferentemente das nanopartículas de ouro, as AgNPs apresentam maior reatividade química, o que resulta em um comportamento biológico fortemente dependente de parâmetros como tamanho, forma, estado de agregação e química de superfície (ASHARANI et al., 2009; XIN et al., 2016).

Do ponto de vista óptico, as AgNPs apresentam ressonância plasmônica de superfície localizada (SPRL) caracterizada por bandas de absorção na região de 400 a 450 nm para partículas predominantemente esféricas. Assim como observado para AuNPs, deslocamentos ou alargamentos da banda plasmônica estão associados a variações no tamanho, agregação ou interação superficial das partículas, tornando a espectroscopia UV-Vis uma ferramenta essencial para o monitoramento da formação e estabilidade coloidal das AgNPs (LINK; EL-SAYED, 1999; MUJAHID et al., 2024).

A caracterização físico-química das AgNPs envolve ainda a determinação do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta, parâmetros fundamentais para a avaliação da estabilidade coloidal e da interação com meios biológicos. Em sistemas sintetizados por via verde, moléculas orgânicas provenientes de extratos vegetais permanecem adsorvidas à superfície das AgNPs, influenciando a carga superficial e contribuindo para a estabilização do sistema, ao mesmo tempo em que modulam sua reatividade biológica (IRAVANI, 2011; BURLACU et al., 2019).

Um aspecto distintivo das AgNPs é a liberação controlada de íons Ag^+ , considerada um dos principais mecanismos responsáveis por seus efeitos biológicos. A dissolução parcial da

prata metálica em ambientes aquosos ou biológicos pode induzir estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e alterações na integridade de membranas celulares. A intensidade desses efeitos está diretamente relacionada ao tamanho das partículas, concentração, tempo de exposição e funcionalização superficial (ASHARANI et al., 2009; XIN et al., 2016).

Estudos demonstram que AgNPs de menores dimensões apresentam maior área superficial e, conseqüentemente, maior taxa de liberação de íons Ag^+ , o que pode resultar em aumento da atividade biológica, mas também em maior potencial citotóxico. Nesse contexto, a funcionalização por compostos naturais durante a síntese verde pode desempenhar papel fundamental na modulação desses efeitos, reduzindo a liberação abrupta de íons e promovendo maior biocompatibilidade (KUS-LIŚKIEWICZ; FICKERS; BEN TAHAR, 2021; MUJAHID et al., 2024).

Comparativamente às AuNPs, as AgNPs apresentam maior potencial citotóxico, o que exige cautela na interpretação de ensaios de viabilidade celular. No entanto, quando adequadamente caracterizadas e funcionalizadas, especialmente por rotas verdes, as AgNPs podem apresentar um equilíbrio favorável entre atividade biológica e segurança, tornando-se candidatas promissoras para aplicações biotecnológicas controladas (SANI; CAO; CUI, 2021; PASPARAKIS, 2022).

No contexto do presente trabalho, a síntese verde de AgNPs utilizando frações diclorometano e acetato de etila da casca de *Annona crassiflora* pode resultar em nanopartículas funcionalizadas com compostos fenólicos e alcaloides, capazes de modular sua estabilidade coloidal, liberação iônica e interação celular. Dessa forma, a caracterização físico-química detalhada das AgNPs é essencial para compreender seus efeitos biológicos e estabelecer correlações entre propriedades estruturais e respostas observadas nos ensaios antioxidantes, antiglicantes e de viabilidade celular.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Sintetizar e caracterizar nanopartículas de ouro e de prata por meio de síntese verde utilizando partições da casca de *Annona crassiflora*, bem como avaliar suas propriedades antioxidantes, antiglicantes, perfil de viabilidade celular e citotoxicidade *in vitro*.

2.1 Objetivos Específicos

- Obter frações da casca de *Annona crassiflora* enriquecidas em compostos bioativos, com ênfase nas frações em acetato de etila e diclorometano.
- Sintetizar nanopartículas de ouro e de prata empregando os extratos vegetais, mais especificamente as frações acetato de etila e diclorometano, como agentes redutores e estabilizantes, explorando a capacidade dos metabólitos secundários em modular a formação dos nanomateriais.
- Caracterizar as propriedades físico-químicas das nanopartículas obtidas por técnicas espectroscópicas e coloidais (UV-Vis, FTIR, DLS e potencial zeta).
- Determinar a atividade antioxidante das nanopartículas e das frações orgânicas por meio de ensaios complementares (FRAP, DPPH e ORAC), a fim de verificar a capacidade de neutralização de radicais livres e o potencial de redução de espécies oxidantes.
- Investigar a atividade antiglicante em modelo *in vitro* baseado na formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs), empregando albumina bovina incubada, separadamente, com frutose e metilglioxal, com o objetivo de verificar a capacidade das nanopartículas e das frações orgânicas em inibir ou reduzir o processo de glicação.
- Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas e das frações vegetais em linhagens celulares de macrófagos e fibroblastos, por meio de ensaios de viabilidade celular por MTT, comparando a resposta celular frente aos nanomateriais sintetizados e às frações vegetais.

3 METODOLOGIA

3.1 Preparação do extrato da casca de *Annona Crassiflora*

A casca do fruto de *Annona crassiflora* Mart. foi utilizada como material vegetal para a obtenção dos extratos empregados no presente trabalho. O material vegetal foi adquirido da empresa Santos Flora Comércio de Ervas Ltda. (Mariporã, São Paulo, Brasil), devidamente registrada junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), garantindo a rastreabilidade e a qualidade da matéria-prima utilizada.

As cascas foram previamente secas à temperatura ambiente, protegidas da luz, e posteriormente pulverizadas até obtenção de um pó homogêneo. Para a obtenção do extrato etanólico, aproximadamente 200 g do material vegetal seco e pulverizado foram submetidos ao processo de maceração estática em etanol a 98% de pureza, na proporção de 1:5 (m/v), durante sete dias, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O sistema foi mantido em recipiente fechado, com agitação manual diária, a fim de favorecer a extração dos metabólitos secundários.

Ao término do período de maceração, a mistura foi filtrada utilizando papel de filtro, e o solvente orgânico foi removido sob pressão reduzida em evaporador rotativo (Buchi Rotavapor R-215, Suíça), à temperatura de 40 °C. O extrato concentrado obtido foi então submetido à liofilização (Liotop L101, Brasil), com o objetivo de remover completamente a água residual e garantir maior estabilidade do material. O procedimento de extração foi repetido até a obtenção de aproximadamente 30 g de extrato etanólico seco, o qual foi armazenado em recipiente hermeticamente fechado, protegido da luz e mantido sob refrigeração até o momento das análises subsequentes.

O método de extração adotado baseia-se em procedimentos clássicos amplamente empregados em estudos fitoquímicos para a obtenção de extratos vegetais ricos em metabólitos secundários, permitindo a extração eficiente de compostos fenólicos, flavonoides e outras classes bioativas de interesse biotecnológico (AZMIR et al., 2013).

3.2 Partição do extrato etanólico da casca do fruto de *Annona crassiflora*

Para o fracionamento do extrato etanólico e obtenção de frações enriquecidas em compostos bioativos, foi realizado o processo de partição líquido-líquido. Inicialmente, 20 g do extrato etanólico seco foram ressuspensos em uma solução hidrometanólica composta por metanol e água ultrapura (9:1, v/v), totalizando 200 mL de solução.

A mistura foi submetida ao particionamento sequencial com solventes orgânicos de polaridade crescente, visando a separação dos metabólitos de acordo com suas afinidades químicas. Para cada etapa de partição, foram utilizados 200 mL do solvente correspondente, seguindo a ordem: hexano, diclorometano e acetato de etila. Cada solvente foi adicionado à solução hidrometanólica, seguido de agitação vigorosa em funil de separação e posterior repouso até completa separação das fases.

Após a separação, as fases orgânicas correspondentes às frações diclorometano e acetato de etila foram coletadas individualmente. Os solventes foram removidos sob pressão reduzida em evaporador rotativo, à temperatura de 40 °C, resultando nas respectivas frações secas. As duas parcelas obtidas foram novamente submetidas à liofilização, a fim de remover qualquer água residual garantindo melhor As frações obtidas foram armazenadas em frascos âmbar, protegidas da luz e mantidas sob refrigeração até sua utilização nos ensaios de síntese verde de nanopartículas e nas avaliações biológicas.

O procedimento de partição líquido-líquido seguiu abordagens consagradas na literatura fitoquímica, as quais permitem a separação de compostos de acordo com a polaridade,

favorecendo o enriquecimento seletivo de classes químicas específicas em cada fração obtida (DAI; MUMPER, 2010).

3.3 Síntese verde de nanopartículas de ouro (AuNPs Ac e Dm)

A síntese das nanopartículas de ouro (AuNPs) foi realizada utilizando as frações diclorometano e acetato de etila da casca do fruto de *Annona crassiflora* como agentes redutores e estabilizantes, conforme abordagem típica de síntese verde mediada por extratos vegetais (IRAVANI, 2011; BHARADWAJ et al., 2021).

As frações foram previamente preparadas na concentração de 3 mg/mL. A fração diclorometano foi solubilizada em solução hidroalcoólica (água destilada:etanol 70:30 v/v), enquanto a fração acetato de etila foi solubilizada em água destilada.

Em frascos contendo 5 mL de água destilada aquecida a 50 °C sob agitação constante, adicionou-se 1 mL da solução da fração vegetal, obtendo concentração final de 0,5 mg/mL. A mistura foi mantida sob aquecimento por 20 minutos, ao abrigo da luz. O uso de aquecimento moderado favorece a cinética de redução de Au^{3+} por compostos fenólicos presentes em extratos vegetais, conforme descrito por Iravani, 2011.

O precursor metálico foi preparado dissolvendo-se 11 mg de KAuCl_4 em 250 μL de água destilada. Após o período inicial de incubação, foram adicionados 100 μL dessa solução à mistura reacional. A redução dos íons Au^{3+} e formação de AuNPs é evidenciada pela alteração de coloração característica associada à ressonância plasmônica de superfície localizada, fenômeno descrito por LINK e EL-SAYED (1999).

Após 30 minutos de reação, o pH foi ajustado para aproximadamente 7,0 com solução de KOH 3 M. O controle do pH é um fator crítico para nucleação e estabilidade coloidal das AuNPs sintetizadas por rota verde (IRAVANI, 2011). A reação foi mantida sob agitação constante a 50 °C por 2 horas, protegida da luz.

As suspensões foram centrifugadas a $15.000 \times g$ por 15 minutos a 12 °C, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspensionado em 1 mL de água destilada. O procedimento foi repetido uma segunda vez. A purificação por centrifugação é procedimento padrão para remoção de metabólitos não reagidos e estabilização coloidal (BHATTACHARJEE, 2016).

As AuNPs foram armazenadas a 4 °C, protegidas da luz.

3.4 Síntese verde de nanopartículas de prata (AgNPs)

A síntese das nanopartículas de prata (AgNPs) foi conduzida utilizando frações vegetais como agentes redutores e estabilizantes, estratégia amplamente descrita na literatura de síntese verde (IRAVANI, 2011; BURLACU et al., 2019).

A fração vegetal foi preparada na concentração de 20 mg/mL, dissolvendo-se 20 mg da fração liofilizada em 1 mL de solvente apropriado.

A solução de nitrato de prata foi preparada na concentração de 10 mM, dissolvendo-se 0,010 g de AgNO_3 em 6,66 mL de água ultrapura. Posteriormente, 1 mL dessa solução recebeu 8 μL de amônia 30%, formando o complexo $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$, estratégia descrita em protocolos de síntese controlada de AgNPs para modular a taxa de redução (BURLACU et al., 2019).

Para a reação, adicionou-se 1 mL da solução da fração vegetal e 8 mL de água ultrapura sob agitação a 50 °C. Após estabilização térmica, adicionou-se lentamente 1 mL da solução de AgNO_3 complexada.

O pH foi ajustado para faixa entre 9 e 10 com NaOH, gota a gota. A alcalinização do meio favorece a formação de Ag^0 e influencia o tamanho das partículas formadas, conforme relatado em síntese verde de AgNPs (IRAVANI, 2011).

A reação foi mantida por 4 horas a 50 °C, ao abrigo da luz. A formação das AgNPs foi evidenciada pela mudança de coloração para amarelo a marrom, indicativa da ressonância plasmônica de superfície localizada característica de AgNPs (LINK; EL-SAYED, 1999).

A suspensão foi centrifugada a $15.000 \times g$ por 15 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspensionado em água ultrapura. O processo foi repetido uma segunda vez, procedimento comumente empregado para purificação de nanopartículas metálicas (BHATTACHARJEE, 2016).

As AgNPs foram armazenadas a 4 °C em frasco âmbar.

3.5 Caracterização das Nanopartículas

As nanopartículas de ouro (AuNPs) e de prata (AgNPs) obtidas por síntese verde utilizando frações da casca de *Annona crassiflora* foram submetidas à caracterização físico-química com o objetivo de avaliar sua formação, propriedades ópticas e estabilidade coloidal. As análises incluíram espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e espalhamento dinâmico de luz (DLS) associado à determinação do potencial zeta, permitindo correlacionar as

propriedades das nanopartículas com os resultados obtidos nas avaliações biológicas subsequentes.

3.5.1 Espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis)

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), realizando a leitura em microplaca com fundo transparente UV contendo 0,2 mL por poço, sendo 0,1 mL para as nanopartículas de prata e 0,04 mL para as de ouro, recém sintetizadas, completando o volume com água destilada. A presença de bandas de ressonância de ressonância plasmônica de superfície localizada foi utilizada como indicativo da formação das nanopartículas metálicas.

Para as AuNPs, espera-se uma banda de SPR tipicamente na região entre 520 e 550 nm, enquanto para as AgNPs a banda característica ocorre, em geral, entre 400 e 450 nm. Alterações na posição do máximo de absorção e/ou no alargamento da banda podem indicar mudanças no tamanho aparente, grau de agregação e interação superficial com compostos orgânicos provenientes das frações vegetais (LINK; EL-SAYED, 1999; PASPARAKIS, 2022).

3.5.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

No ensaio de FT-IR, as amostras liofilizadas e o pó resultante utilizado para as análises na faixa dos comprimento de onda de 500 a 4000 cm^{-1} utilizando um espectrômetro Vertex 70 da BrukerOptics (Reinstetten, Alemanha).

A espectroscopia FTIR foi utilizada para identificar grupos funcionais presentes nas frações vegetais e associados às nanopartículas sintetizadas, contribuindo para a compreensão dos possíveis compostos envolvidos nos processos de redução e estabilização. As amostras foram analisadas em faixa espectral apropriada, permitindo a observação de bandas atribuíveis a grupos hidroxila, carbonila, aminas e outras funções químicas frequentemente presentes em compostos fenólicos e flavonoides.

A comparação entre os espectros das frações vegetais e das nanopartículas possibilitou inferir a participação de metabólitos secundários na funcionalização superficial das AuNPs e AgNPs, aspecto relevante para a estabilidade coloidal e para a interação com sistemas biológicos (IRAVANI, 2011; BURLACU et al., 2019).

3.5.3 Espalhamento dinâmico de luz, índice de polidispersão e potencial zeta

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, realizou-se uma solução 0,985 mL de água ultrapura e 0,015 mL das nanopartículas, completando 1 mL total.

O diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas foram determinados por espalhamento dinâmico de luz (DLS). Esses parâmetros permitiram avaliar a distribuição de tamanho das partículas em suspensão, bem como a homogeneidade do sistema.

O potencial zeta foi determinado como medida indireta da estabilidade coloidal, considerando que valores absolutos mais elevados podem estar associados a maior repulsão eletrostática entre partículas e, conseqüentemente, menor tendência à agregação. A presença de moléculas orgânicas adsorvidas à superfície das nanopartículas, oriundas das frações vegetais, pode modular a carga superficial e influenciar o comportamento coloidal do sistema (BHATTACHARJEE, 2016).

3.6 Capacidade antioxidante

3.6.1 Avaliação da capacidade de redução do ferro (FRAP)

A capacidade antioxidante total das frações vegetais da casca de *Annona crassiflora* e das nanopartículas de ouro (AuNPs) e de prata (AgNPs) sintetizadas foi avaliada pelo método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), o qual se baseia na habilidade de compostos antioxidantes em reduzir íons férricos (Fe^{3+}) a íons ferrosos (Fe^{2+}) em meio ácido. Esse método permite estimar o poder redutor das amostras e é amplamente utilizado na avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais e sistemas nanoestruturados (ANTOLOVICH et al., 2002; HUANG; OU; PRIOR, 2005).

No ensaio, a redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} foi detectada pela adição de 250 μL do reagente FRAP a uma mistura contendo 10 μL da amostra (frações vegetais, AuNPs ou AgNPs) e 25 μL de tampão, totalizando um volume final de reação adequado. O reagente FRAP foi preparado imediatamente antes do uso, sendo composto por 10 volumes de tampão acetato de sódio (300

mM, pH 3,6), 1 volume de solução de TPTZ (2,4,6-tri-(2-piridil)-s-triazina) e 1 volume de cloreto férrico (20 mM).

Durante a reação, o Fe^{2+} formado é quelado pelo TPTZ, resultando na formação de um complexo Fe^{2+} -TPTZ de coloração azul intensa, cuja intensidade é proporcional à capacidade redutora da amostra. A reação foi conduzida em microplaca e incubada por 6 minutos a 37 °C. Após o período de incubação, a absorbância foi determinada em 593 nm, utilizando espectrofotômetro.

Para garantir a precisão dos resultados, utilizou-se uma curva padrão com Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) nas concentrações de 2, 1 e 0,2 mM, um antioxidante análogo da vitamina E. Os resultados foram expressos em micromoles de Trolox por grama de amostra ($\mu\text{mol trolox eq/g}$).

3.6.2 Avaliação da capacidade de absorção de radicais livres de oxigênio (ORAC)

O ensaio ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) foi utilizado para quantificar a capacidade antioxidante das frações vegetais da casca de *Annona crassiflora* e das nanopartículas de ouro (AuNPs) e de prata (AgNPs) sintetizadas, com base no decaimento da fluorescência da fluoresceína ao longo do tempo. Esse decaimento ocorre devido à oxidação da sonda fluorescente pela ação de radicais peroxila, os quais são gerados termicamente a partir do reagente 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) diidrocloreto (AAPH) (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001).

No ensaio, o AAPH foi utilizado como gerador de radicais peroxila, preparado em tampão fosfato (75 mM, pH 7,4), enquanto a fluoresceína (0,085 mM), dissolvida no mesmo tampão, foi empregada como sonda fluorescente. A curva padrão foi construída utilizando Trolox nas concentrações de 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,625 μM , permitindo expressar os resultados em equivalentes de Trolox. As amostras (frações vegetais, AuNPs e AgNPs) foram previamente preparadas em concentração definida e analisadas em placa de 96 poços.

Para a execução do ensaio, foram adicionados em cada poço 150 μL da solução de fluoresceína e 25 μL das soluções padrão de Trolox ou 25 μL das amostras. Para o controle branco, foram utilizados 150 μL da solução de fluoresceína e tampão fosfato, sem adição de amostra ou padrão antioxidante. A reação foi iniciada pela adição de 30 μL da solução de AAPH (153 mM) em cada poço.

A leitura foi realizada em espectrofluorímetro/microleitor de fluorescência, com excitação a 485 nm e emissão a 528 nm, mantendo-se a placa a 37 °C durante 90 minutos. As

leituras de fluorescência foram registradas de forma cinética a cada 1 minuto e 30 segundos, totalizando 90 minutos de monitoramento. Os valores obtidos para o branco foram subtraídos das leituras correspondentes das amostras e do padrão.

A capacidade antioxidante foi determinada com base na área sob a curva (AUC) do decaimento da fluorescência ao longo do tempo, comparando-se os perfis das amostras com a curva padrão de Trolox e resultados expressos em micromoles de Trolox por grama de amostra ($\mu\text{mol trolox eq/g}$). O método ORAC é considerado biologicamente relevante, pois avalia a capacidade de neutralização de radicais peroxila, envolvidos em reações em cadeia associadas ao estresse oxidativo em sistemas biológicos (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001; HUANG; OU; PRIOR, 2005).

3.6.3 Avaliação do sequestro do radical DPPH (DPPH)

O ensaio do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) foi utilizado para avaliar a capacidade antioxidante das frações vegetais da casca de *Annona crassiflora* e das nanopartículas de ouro (AuNPs) e de prata (AgNPs) sintetizadas. O método baseia-se na capacidade de compostos antioxidantes em sequestrar o radical estável DPPH, reduzindo-o à sua forma não radicalar, o que resulta em alteração da coloração da solução de violeta intenso para amarelo. Esse processo ocorre principalmente por meio da doação de átomos de hidrogênio ou elétrons pelos antioxidantes presentes nas amostras (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; ANTOLOVICH et al., 2002).

No ensaio, foram adicionados 225 μL da solução de DPPH (0,06 mM) em cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 75 μL das amostras (frações vegetais, AuNPs ou AgNPs), totalizando um volume final de 300 μL por poço. O controle positivo foi realizado utilizando um antioxidante padrão apropriado, enquanto o controle negativo consistiu na substituição da amostra por solvente, mantendo as mesmas condições experimentais.

Após a adição dos reagentes, a placa foi incubada ao abrigo da luz por 30 minutos, a fim de permitir a completa reação entre o radical DPPH e os compostos antioxidantes presentes nas amostras. Finalizado o período de incubação, a absorbância foi determinada em 517 nm, utilizando espectrofotômetro adequado.

A atividade antioxidante foi expressa como percentual de inibição do radical DPPH, calculada pela comparação entre a absorbância das amostras e a do controle negativo. O ensaio

DPPH é amplamente empregado como método rápido e reprodutível para a triagem da atividade antioxidante de extratos vegetais e sistemas nanoestruturados funcionalizados.

O cálculo da atividade antioxidante das amostras foi realizado com base na seguinte equação matemática:

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

Em que o termo "X controle" indica a absorbância do DPPH diluído em metanol, "X amostra" refere-se à absorbância do sistema composto pelo DPPH e pela amostra e "X branco" corresponde à absorbância das amostras diluídas em metanol sem a presença do DPPH (metanol + amostras). O controle negativo foi representado pelo metanol (BORGES, 2022).

3.7 Ensaio de atividade antiglicante (formação de AGEs)

A formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs) foi induzida *in vitro* utilizando modelo baseado na incubação de albumina de soro bovino (BSA) com frutose ou metilglioxal (MGO), conforme protocolo já descrito em Justino et al. (2016, 2019, 2020). A glicação é um processo não enzimático decorrente da reação entre grupos carbonila de açúcares redutores ou dicarbonílicos reativos e grupos amina livres de proteínas, sendo classicamente descrita como reação de Maillard. Esse processo envolve a formação inicial de bases de Schiff, rearranjo para produtos de Amadori e posterior geração de estruturas irreversíveis denominadas AGEs, muitas das quais apresentam propriedades fluorescentes características (THORPE; BAYNES, 1996; NAGAI et al., 2014).

A BSA foi preparada na concentração de 50 mg/mL em tampão fosfato (PBS, pH 7,4). Para o modelo BSA–frutose, foi preparada solução de frutose 1,25 M em tampão fosfato, resultando concentração final aproximada de 230 mM no sistema reacional. Para o modelo BSA–MGO, o metilglioxal foi preparado inicialmente a 53,3 mM, resultando concentração final de 10 mM na reação. Os sistemas reacionais foram montados em microtubos de 2 mL. O controle sem glicação foi composto por 650 µL de tampão fosfato e 150 µL de BSA 50 mg/mL. O controle com glicação foi composto por 500 µL de tampão fosfato, 150 µL de BSA e 150 µL de frutose 1,25 M ou MGO 53,3 mM. Para os grupos tratamento, foram utilizados 400 µL de tampão fosfato, 150 µL de BSA, 150 µL de frutose ou MGO e 100 µL da amostra testada.

Os tubos foram incubados a 37 °C por 3 dias, ao abrigo da luz, condição que favorece a formação acelerada de AGEs fluorescentes sob condições fisiologicamente relevantes

(SADOWSKA-BARTOSZ et al., 2014). Após o período de incubação, foram adicionados 800 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 20% para precipitação proteica. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspensionado em 800 µL de tampão fosfato. A quantificação de AGEs fluorescentes foi realizada transferindo-se 250 µL das amostras para microplaca preta em duplicata. A fluorescência foi medida com excitação em 350 nm e emissão em 420 nm, comprimentos de onda compatíveis com fluoróforos típicos derivados da glicação avançada descritos na literatura (SADOWSKA-BARTOSZ et al., 2014). A porcentagem de inibição da formação de AGEs foi calculada comparando-se os valores de fluorescência dos tratamentos com o controle glicado do seguinte modo: [% Inibição = 100 – 100 * (agente – branco) / (controle – branco)].

Considerando a possibilidade de interferência óptica das frações e das nanopartículas em leituras fluorimétricas (absorção, espalhamento de luz e/ou autofluorescência), foram incluídos brancos específicos para cada condição (amostra + reagentes na ausência de BSA e/ou agente glicante, conforme aplicável), e os sinais de fundo foram subtraídos das leituras correspondentes, de modo a minimizar artefatos analíticos.

Adicionalmente, para avaliação de modificações oxidativas associadas ao processo de glicação, foram determinados os níveis de proteínas carboniladas pelo método da 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH), conforme descrito por Reznick e Packer (1994), e o conteúdo de grupos sulfidril totais utilizando o reagente de Ellman (DTNB), conforme metodologia clássica de Ellman (1959). Esses parâmetros complementares permitem avaliar dano oxidativo proteico decorrente da glicação e da ação de espécies reativas geradas durante o processo. O modelo BSA–frutose simula a reação completa de Maillard, enquanto o modelo BSA–MGO representa etapa intermediária da glicação avançada mediada por dicarbonílicos reativos, permitindo avaliação complementar do potencial antiglicante das amostras testadas.

3.7.1 Determinação de proteína carbonilada

A quantificação do conteúdo de proteínas carboniladas foi realizada com base na derivatização de grupos carbonila com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH), amplamente empregada para avaliação de dano oxidativo proteico (REZNICK; PACKER, 1994).

A formação de grupos carbonila (aldeídos e cetonas) em cadeias laterais de aminoácidos ocorre como consequência da oxidação de proteínas induzida por espécies reativas, sendo considerada marcador estável de dano oxidativo. Para a reação de derivatização, foram

adicionados 200 μL da amostra a 400 μL de DNPH 10 mM preparado em HCl 2,5 N. Para o branco correspondente, substituiu-se a solução de DNPH por 400 μL de HCl 2,5 N. As amostras foram incubadas por 1 hora, ao abrigo da luz, com homogeneização em vórtex a cada 15 minutos, permitindo adequada formação das hidrazonas derivadas dos grupos carbonila.

Após a etapa de derivatização, procedeu-se à precipitação proteica mediante adição de 600 μL de ácido tricloroacético (TCA) a 20%, seguida de incubação em gelo por 10 minutos e centrifugação a 9000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet resultante submetido a etapa de lavagem com 1 mL de solução etanol:acetato de etila (1:1 v/v), visando remover excesso de DNPH e interferentes. Após homogeneização por aproximadamente 20 segundos, as amostras foram novamente centrifugadas a 9000 g por 5 minutos. O procedimento de lavagem foi seguido de evaporação por cerca de 15 minutos para eliminação de solventes residuais.

O precipitado final foi ressuspensionado em 550 μL de guanidina 6 M preparada em HCl 2,5 N, sendo mantido por aproximadamente 40 minutos até completa solubilização. Quando necessário, realizou-se aquecimento brando em banho-maria a 37 °C por 5 minutos para favorecer dissolução completa. A leitura espectrofotométrica foi realizada em microplaca, registrando-se absorbância a 370 nm para quantificação das hidrazonas formadas e a 280 nm para determinação da concentração proteica total. Os resultados foram expressos como conteúdo de carbonila normalizado pela concentração de proteína.

3.7.2 Determinação do conteúdo de sulfidrilas totais

A determinação do conteúdo de grupos sulfidrilas livres foi realizada utilizando o reagente 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), amplamente empregada para quantificação de grupos tiol em proteínas. A oxidação de resíduos de cisteína resulta na diminuição de grupos –SH livres, sendo essa redução um marcador sensível de dano oxidativo proteico (ELLMAN, 1959).

Inicialmente, foram adicionados 15 μL da amostra a 250 μL de tampão PBS contendo EDTA 1 mM (pH 7,4) em microplaca de 96 poços. Para o branco, foram utilizados 265 μL do tampão PBS. Realizou-se leitura inicial a 412 nm (modo endpoint), a fim de registrar a absorbância basal.

Em seguida, adicionaram-se 10 μL de solução de DTNB 10 mM, preparada no dia da análise e mantida protegida da luz. As amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, permitindo a reação do DTNB com os grupos sulfidrilas livres e

formação do ânion 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB), composto de coloração amarela cuja absorbância máxima ocorre em 412 nm.

Após o período de incubação, foi realizada nova leitura a 412 nm (modo endpoint). A variação de absorbância foi utilizada para estimar o conteúdo de sulfidrila totais nas amostras analisadas. Resultados dados em expressos em nmol TNB / mg prot.

3.8 Avaliação da viabilidade celular (MTT)

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), conforme descrito por Mosmann (1983). Esse método baseia-se na capacidade de células metabolicamente ativas reduzirem o sal de tetrazólio a cristais insolúveis de formazan por ação de enzimas mitocondriais, sendo a quantidade de formazan formada proporcional ao número de células viáveis. As linhagens celulares NIH/3T3 (fibroblastos murinos, ATCC CRL-1658™) e RAW 264.7 (macrófagos murinos) foram cultivadas em frascos de 25 cm². As células NIH/3T3 foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado pelo calor. As células RAW 264.7 foram cultivadas em meio DMEM contendo 4 mM de L-glutamina, 4500 mg/L de glicose, suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10% de SFB. Ambas as linhagens foram mantidas em incubadora umidificada a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂.

Para o ensaio de viabilidade, as células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 3×10^4 células por poço, em volume final de 200 µL de meio completo, e incubadas por 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂ para adesão celular. Posteriormente, o meio foi substituído por meio contendo as nanopartículas (AuNPs ou AgNPs) nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5 ou 31,25 µg/mL, ou pelas frações diclorometano e acetato de etila nas mesmas concentrações. As nanopartículas foram inicialmente diluídas em água estéril na concentração estoque de 2 mg/mL, sendo as diluições subsequentes realizadas diretamente no meio de cultura. As frações vegetais foram previamente solubilizadas em DMSO, mantendo-se concentração final de 0,5% no meio de cultura.

Após 24 horas de tratamento, adicionou-se solução estéril de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura), seguida de incubação por 4 horas a 37 °C sob 5% de CO₂. Ao término desse período, os cristais de formazan formados foram solubilizados com solução contendo 10% de dodecil

sulfato de sódio (SDS) em 50% de N,N-dimetilformamida. A absorbância foi determinada a 570 nm em leitor de microplacas (Versa Max ELISA Microplate Reader, Molecular Devices).

Para avaliar possível interferência óptica das frações vegetais e das nanopartículas no ensaio colorimétrico, controles contendo apenas as amostras e o reagente MTT, na ausência de células, foram preparados e submetidos às mesmas condições experimentais. Esse procedimento permite conjecturar eventuais interações entre os nanomateriais e o reagente tetrazólio ou absorção espectral das amostras que possam interferir na leitura espectrofotométrica. Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular em relação ao grupo controle não tratado, considerado como 100% de viabilidade.

3.9 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para os ensaios antioxidantes (DPPH, FRAP e ORAC), as análises foram conduzidas com triplicata técnica. Para os ensaios de glicação (modelos BSA-frutose e BSA-MGO), proteína carbonilada e grupos sulfidril, as análises foram conduzidas em duplicata técnica. A viabilidade celular (MTT) foi realizada em múltiplos poços por condição. As comparações entre grupos foram realizadas por one-way ANOVA, seguidas dos pós-testes de Dunnett (comparação ao respectivo controle) ou Tukey (comparações múltiplas), adotando-se $p < 0,05$ como nível de significância. Considerando a ausência de replicação biológica independente, as inferências devem ser interpretadas como evidência exploratória baseada em replicação técnica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização espectroscópica e coloidal das nanopartículas

A formação das nanopartículas metálicas foi inicialmente monitorada por espectroscopia UV-Vis, técnica baseada na ressonância plasmônica de superfície localizada, cuja posição espectral depende do tamanho, morfologia, estado de agregação e ambiente dielétrico do nanomaterial (LINK; EL-SAYED, 1999; KELLY et al., 2003).

As frações vegetais isoladas (acetato de etila e diclorometano) apresentaram absorção predominante na região do ultravioleta (200–380 nm), associada a cromóforos orgânicos da matriz vegetal. Após a síntese, as AgNPs exibiram bandas plasmônicas bem definidas no visível, com máximos em 428 nm (AgNP–EtAc), com pico mais estreito e definido

possivelmente por formação de prata metálica, tamanhos monodispersos e baixa agregação, e 443 nm (AgNP–DM), sendo o deslocamento batocrômico observado para AgNP–DM compatível com maior tamanho efetivo e/ou maior polidispersidade do sistema. Para as AuNPs, foram identificados máximos locais em 539 nm (AuNP–EtAc) e 551 nm (AuNP–DM), também sugerindo diferenças no tamanho hidrodinâmico e no ambiente dielétrico superficial. Os espectros UV-Vis obtidos estão apresentados nas Figuras 1 e 2.

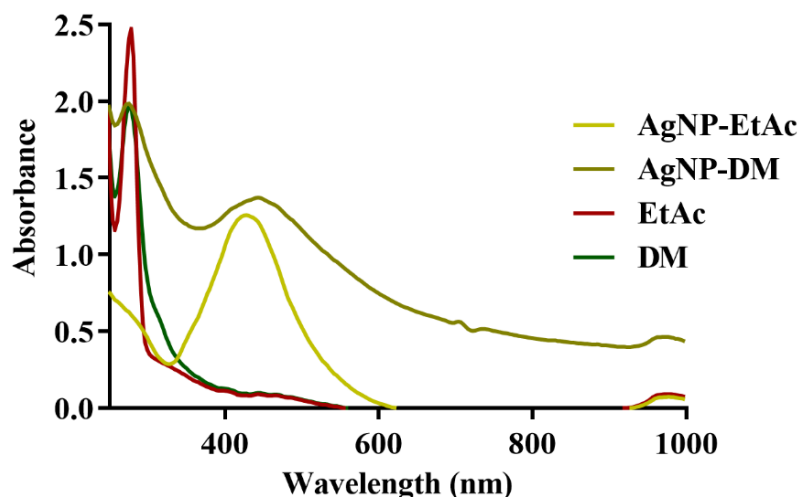


Figura 1. Espectro UV-Visível de nanopartículas de prata conjugadas com fração acetato de etila (AgNP-EtAc), nanopartículas de prata conjugadas com fração diclorometano (AgNP-DM), fração isolada acetato de etila (EtAc) e fração isolada diclorometano (DM).

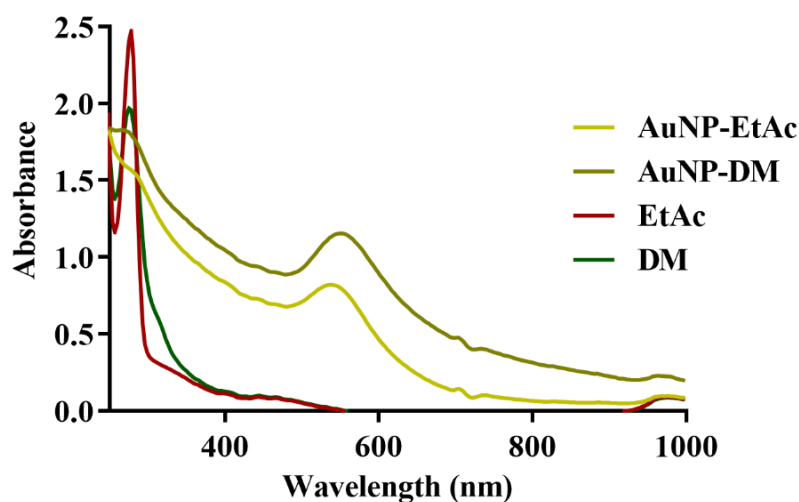


Figura 2. Espectro UV-Visível de nanopartículas de ouro conjugadas com fração acetato de etila (AuNP-EtAc), nanopartículas de ouro conjugadas com fração diclorometano (AuNP-DM), fração isolada acetato de etila (EtAc) e fração isolada diclorometano (DM).

A caracterização coloidal por espalhamento dinâmico de luz (DLS) revelou diâmetros hidrodinâmicos de $299,7 \pm 26,8$ nm (AuNP–EtAc) e $189,1 \pm 0,7$ nm (AuNP–DM), enquanto para as AgNPs observaram-se $48,4 \pm 0,7$ nm (AgNP–EtAc) e $361,2 \pm 66,2$ nm (AgNP–DM). Ressalta-se que o DLS fornece o diâmetro hidrodinâmico, que inclui núcleo metálico, camada de solvatação e eventuais agregados, devendo ser interpretado em conjunto com a análise espectral (BHATTACHARJEE, 2016).

Os valores de índice de polidispersão (11,7–23,6%) indicaram distribuição de tamanho mais homogênea para AgNP–EtAc e polidispersidade moderada para as demais formulações, perfil frequentemente observado em sistemas de síntese verde. Os parâmetros coloidais determinados estão descritos na Tabela 1.

O potencial zeta variou de $-38,1$ a $-46,2$ mV, indicando sistemas fortemente carregados negativamente e sugerindo estabilidade eletrostática adequada (CLOGSTON; PATRI, 2011). A coerência entre deslocamento plasmônico e aumento do diâmetro hidrodinâmico reforça a consistência físico-química do sistema sintetizado.

Considerando que parâmetros como tamanho hidrodinâmico, carga superficial e composição orgânica adsorvida influenciam diretamente a interação com biomoléculas, essas características físico-químicas podem contribuir para as diferenças observadas nos ensaios antioxidantes e antiglicantes subsequentes.

Tabela 1. Parâmetros coloidais de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas de ouro e prata sintetizadas com frações de *Annona crassiflora*.

Amostras	Diâmetro Hidrodinâmico	Índice de polidispersão	Transmitância	Potencial Zeta
AuNP-AC	299.7 ± 26.8 nm	23.1 ± 1.4 %	67,1%	-46.2 ± 0.9 mV
AuNP-DM	189.1 ± 0.7 nm	20.0 ± 1.4 %	72,4%	-40.5 ± 0.8 mV
AgNP-AC	48.4 ± 0.7 nm	11.7 ± 1.6 %	85,3%	-41.7 ± 0.5 mV
AgNP-DM	361.2 ± 66.2 nm	23.6 ± 6.5 %	67,75%	-38.1 ± 0.1 mV

Nota: AuNP-AC: Nanopartícula de ouro conjugada com fração acetato de etila; AuNP-DM: Nanopartícula de ouro conjugada com fração diclorometano; AgNP-Ac: Nanopartícula de prata conjugada com fração acetato de etila; AgNP-DM Nanopartícula de prata conjugada com fração diclorometano. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de replicatas técnicas triplas, sem aplicação de teste de comparação múltipla de médias para estes parâmetros.

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi empregada para identificar os principais grupos funcionais presentes nas frações da casca de *Annona*

crassiflora e investigar sua participação nos processos de biorredução e estabilização das nanopartículas metálicas. Os espectros obtidos para as frações livres e suas respectivas nanoformulações são apresentados nas Figuras 3, 4, 5 e 6.

Nos espectros observou-se uma banda larga e intensa na região de 3380–3310 cm^{-1} , característica de estiramentos vibracionais de grupos hidroxila (–OH). Essa região é tipicamente associada à presença de compostos fenólicos, flavonoides e outros metabólitos polares presentes em extratos vegetais. A elevada intensidade dessa banda sugere uma abundância desses grupos funcionais nas frações analisadas, o que é consistente com estudos fitoquímicos prévios que demonstram que a casca do fruto de *A. crassiflora* apresenta alto conteúdo de polifenóis com atividade antioxidante significativa (JUSTINO et al., 2020; KOMINO et al., 2023). Esses compostos fenólicos são amplamente reconhecidos como agentes redutores em processos de síntese verde de nanopartículas, atuando como doadores de elétrons capazes de converter íons metálicos em suas formas reduzidas.

Bandas adicionais foram observadas em 2924 cm^{-1} e 2853 cm^{-1} , atribuídas aos estiramentos assimétricos e simétricos das ligações C–H de cadeias alifáticas. Essas vibrações são frequentemente associadas à presença de estruturas hidrocarbonadas provenientes de metabólitos orgânicos presentes nos extratos vegetais, como lipídios, terpenos ou componentes estruturais de flavonoides. Embora esses grupos não participem diretamente da redução dos íons metálicos, sua presença pode contribuir para a estabilização estrutural da matriz orgânica adsorvida na superfície das nanopartículas.

Adicionalmente, observou-se uma banda na região de 2349 cm^{-1} , a qual é característica do estiramento assimétrico do dióxido de carbono (CO_2) atmosférico. Tal sinal é frequentemente identificado em espectros de FTIR devido à variação na concentração de gases no ambiente interno do equipamento durante a aquisição dos dados, não estando relacionado à composição química do extrato de *Annona crassiflora* ou das nanopartículas sintetizadas.

A presença de um pico em 1732 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento de grupos carbonila (C=O), frequentemente relacionados a ésteres, lactonas ou grupos carbonílicos presentes em compostos fenólicos complexos. Grupos carbonila podem atuar como sítios de coordenação com superfícies metálicas, favorecendo a adsorção de biomoléculas na interface partícula–solução.

Outra banda relevante foi observada na região de 1610–1605 cm^{-1} , atribuída ao estiramento de ligações C=C de anéis aromáticos (ANNAMALAI; NALLAMUTHU, 2016). Essa banda é característica de esqueletos aromáticos presentes em flavonoides e outros polifenóis, reforçando a presença de metabólitos fenólicos nas frações analisadas. A presença

desses sistemas aromáticos é particularmente relevante, pois esses compostos apresentam elevada capacidade redox e são frequentemente implicados nos mecanismos de redução e estabilização de nanopartículas metálicas obtidas por rotas verdes.

A comparação entre os espectros das frações livres e das nanoformulações revelou deslocamentos de frequência e alterações na intensidade de algumas bandas, principalmente nas regiões associadas aos grupos hidroxila e carbonila. Esses deslocamentos sugerem interações químicas entre os metabólitos presentes nas frações e a superfície das nanopartículas metálicas formadas. Esse fenômeno é característico da formação de uma camada orgânica de “capping”, na qual compostos bioativos do extrato vegetal permanecem adsorvidos à superfície das partículas após o processo de síntese.

Essa camada orgânica desempenha papel fundamental na estabilização coloidal das nanopartículas, prevenindo processos de agregação por meio de interações estéricas e eletrostáticas. Tal comportamento é consistente com os valores de potencial zeta observados neste estudo, indicando que os metabólitos secundários presentes nas frações de *A. crassiflora* atuam simultaneamente como agentes redutores e estabilizantes no processo de síntese verde das nanopartículas.

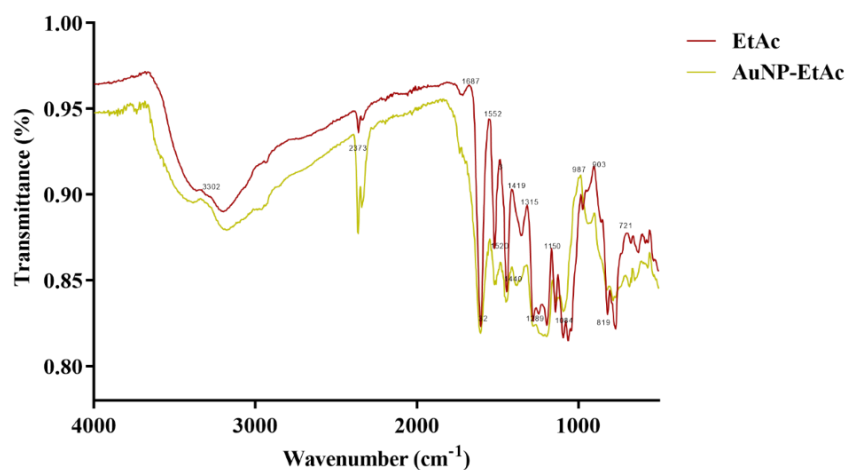


Figura 3. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) da nanopartícula de ouro conjugada com fração acetato de etila (AuNP-EtAc) e fração isolada acetato de etila (EtAc).

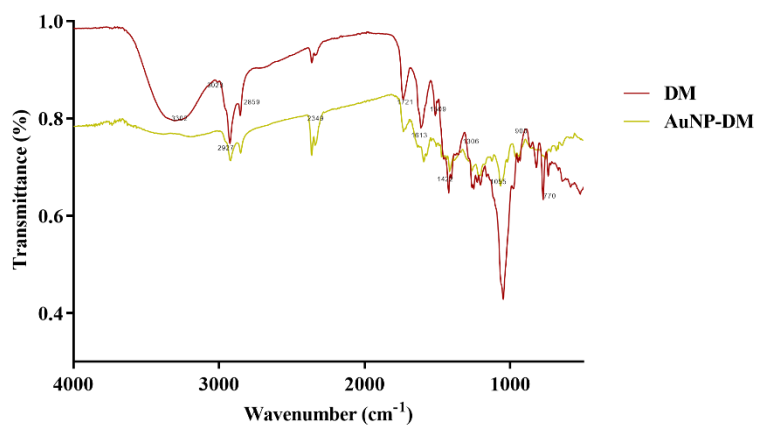


Figura 4. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) da nanopartícula de ouro conjugada com fração diclorometano (AuNP-DM) e fração isolada diclorometano (DM).

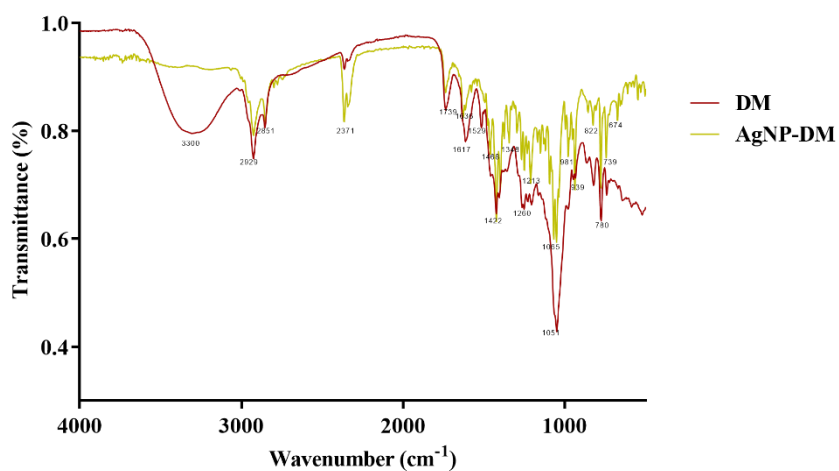


Figura 5. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) da nanopartícula de prata conjugada com fração diclorometano (AgNP-DM) e fração isolada diclorometano (DM).

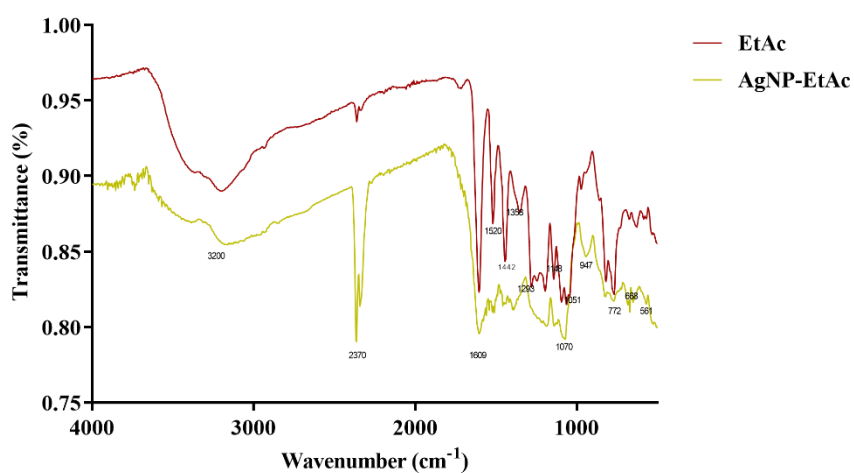


Figura 6. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) da nanopartícula de prata conjugada com fração acetato de etila (AgNP-EtAc) e fração isolada acetato de etila (EtAc).

4.2 Atividade antioxidante das frações e nanoformulações

Os resultados para os ensaios antioxidantes são discutidos, subsequentemente, conforme dados presentes nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Capacidade antioxidante total das nanopartículas de prata e frações livres de *Annona crassiflora* determinada pelos métodos DPPH, ORAC e FRAP.

Capacidade antioxidante total			
Samples	DPPH (% of activity) (250 µg/mL)	ORAC (µmol trolox eq/g)	FRAP (µmol trolox eq/g)
AgNP-EtAc	74.2 ± 6.1 ^a	71 ± 2 ^a	289 ± 16 ^a
AgNP-DM	41.0 ± 2.1 ^b	97 ± 15 ^b	186 ± 9 ^b
EtAc	94.2 ± 0.2	5923 ± 109	3635 ± 85
DM	93.2 ± 1.1	6086 ± 138	1364 ± 19

Nota: DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; ORAC: Capacidade de absorção de radicais de oxigênio; FRAP: Poder antioxidante de redução do ferro. Os resultados são expressos em equivalentes de Trolox (µmol TE/g) ou percentual (%) de inibição. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa entre as amostras ($p < 0,05$) pelo teste de ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. Valores com letras iguais não apresentam diferença estatística entre si.

Tabela 3. Capacidade antioxidante total das nanopartículas de ouro e frações livres de *Annona crassiflora* determinada pelos métodos DPPH, ORAC e FRAP.

Total antioxidant capacity			
Samples	DPPH (% of activity) (250 µg/mL)	ORAC (µmol trolox eq/g)	FRAP (µmol trolox eq/g)
AuNP-EtAc	56.2 ± 4.1 ^a	71 ± 2 ^a	291 ± 32 ^a
AuNP-DM	24.0 ± 13.7 ^b	97 ± 15 ^b	145 ± 13 ^b
EtAc	94.2 ± 0.2	5923 ± 109	3635 ± 85
DM	93.2 ± 1.1	6086 ± 138	1364 ± 19

Nota: DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; ORAC: Capacidade de absorção de radicais de oxigênio; FRAP: Poder antioxidante de redução do ferro. Os resultados são expressos em equivalentes de Trolox (µmol TE/g) ou percentual (%) de inibição. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa entre as amostras ($p < 0,05$) pelo teste de ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. Valores com letras iguais não apresentam diferença estatística entre si.

A atividade antioxidante das frações vegetais e de suas respectivas nanoformulações foi avaliada por meio dos ensaios DPPH, ORAC e FRAP, que exploram mecanismos distintos de neutralização de espécies reativas. O ensaio DPPH baseia-se predominantemente em transferência de elétron (SET), o ORAC reflete majoritariamente transferência de átomo de hidrogênio (HAT) frente a radicais peroxila, enquanto o FRAP estima a capacidade redutora frente ao sistema $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (SADOWSKA-BARTOSZ; BARTOSZ, 2014; ÁVILA et al., 2024).

As frações livres acetato de etila (EtAc) e diclorometano (DM) apresentaram elevada atividade antioxidante em todos os ensaios, com valores superiores a 93% no DPPH e acima de 5900 $\mu\text{mol TE/g}$ no ORAC. Esse perfil reflete o elevado conteúdo de compostos fenólicos previamente descritos para a casca de *Annona crassiflora*, especialmente proantocianidinas do tipo B (JUSTINO et al., 2019), cujas múltiplas hidroxilas aromáticas conferem alta capacidade redutora.

Após a nanoformulação, observou-se redução da atividade antioxidante detectável nos ensaios quando comparada às frações livres. Esse resultado sugere que parte dos metabólitos fenólicos envolvidos na redução dos sais metálicos durante a síntese verde permanece adsorvida à superfície das nanopartículas, reduzindo sua disponibilidade como agentes redutores livres (IRAVANI, 2011). Assim, a diminuição da atividade antioxidante global não indica perda funcional completa, mas redistribuição estrutural dos compostos bioativos na corona orgânica da nanopartícula.

No ensaio DPPH (250 $\mu\text{g/mL}$), as nanoformulações derivadas da fração EtAc para ambos metais, ouro e prata, apresentaram maior atividade em comparação às derivadas da fração DM. Esse resultado indica que compostos mais polares e estruturalmente ricos em hidroxilas aromáticas mantêm maior capacidade de transferência eletrônica mesmo após interação com a superfície metálica. A diferença observada entre EtAc e DM reforça que a composição fitoquímica da fração influencia diretamente o desempenho funcional da nanoestrutura.

No ensaio ORAC, observou-se comportamento distinto, com valores relativamente superiores para as nanoformulações derivadas da fração DM. Considerando que o ORAC avalia neutralização de radicais peroxila em sistema cinético, esse padrão sugere que componentes menos polares presentes na fração DM podem manter atividade em mecanismos dependentes de transferência de hidrogênio, ainda que apresentem menor capacidade redutora direta no DPPH e FRAP.

No ensaio FRAP, as formulações associadas à fração EtAc apresentaram maior potencial redutor em comparação às derivadas da fração DM, resultado coerente com maior densidade de grupos fenólicos redutores preservados na superfície das nanopartículas.

A análise conjunta dos três ensaios demonstra que a nanoformulação altera quantitativamente a capacidade antioxidante total, porém não elimina a funcionalidade redox dos compostos adsorvidos. Além disso, evidencia que o perfil antioxidante das nanoformulações é dependente do mecanismo avaliado, o que tem implicações diretas na interpretação dos ensaios de glicação subsequentes, especialmente naqueles dependentes de modulação oxidativa.

4.3 Ensaios de glicação

A estreita relação entre estresse oxidativo e glicação proteica faz com que compostos com atividade antioxidante frequentemente apresentem também atividade antiglicante, uma vez que processos de glicoxidação contribuem significativamente para a formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs) (THORNALLEY, 2003; MONNIER, 2012).

Nesse contexto, a atividade antiglicante das frações da casca de *Annona crassiflora* e de suas respectivas nanoformulações foi avaliada em dois modelos complementares de glicação *in vitro*: BSA–frutose e BSA–metilglioxal (MGO).

4.3.1 AGES (BSA-Frutose e BSA-MGO)

Resultados do ensaio de glicação BSA-frutose e BSA-MGO estão apresentados nas tabelas 4 e 5 com interpretação a posteriori.

		Inibição (%)											
		AuNP-EtAc			AuNP-DM			EtAc			DM		
AGE product	Glycant	185	55	18.5	185	55	18.5	185	55	18.5	185	55	18.5
		μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL
Glycated-BSA (350/420)	Fructose	98.7 ± 1.2	81.2 ± 0.4	70.3 ± 1.5	81.8 ± 0.1	59.2 ± 1.6	31.9 ± 2.1	85.9 ± 2.2	100 ± 0.1	89.0 ± 0.1	77.5 ± 0.1	49.0 ± 0.1	59.4 ± 1.7
	MGO	-	-	-	-	-	-	29.5 ± 1.5	9.0 ± 1.4	1.5 ± 1.0	20.7 ± 1.8	-	-
Dityrosine (283/409)	Fructose	100.0 ± 0.1	100.0 ± 0.6	100.0 ± 1.0	91.7 ± 1.7	81.1 ± 3.3	79.2 ± 2.4	69.3 ± 2.3	93.3 ± 2.4	67.4 ± 1.6	-	-	-
	MGO	-	-	16.5 ± 0.9	9.5 ± 2.1	6.1 ± 0.7	-	43.9 ± 0.3	12.7 ± 0.7	-	-	-	-
N-formyl-quinurenine (325/434)	Fructose	100.0 ± 2.2	100.0 ± 0.1	76.4 ± 2.3	100.0 ± 1.3	82.6 ± 0.6	44.5 ± 2.4	100.0 ± 0.4	100 ± 1.8	100.0 ± 0.3	30.8 ± 2.8	37.5 ± 0.6	82.2 ± 6.7
	MGO	9.5 ± 2.9	-	-	-	-	-	23.5 ± 0.1	3.7 ± 0.4	-	8.3 ± 0.2	-	-
Quinurenine (365/480)	Fructose	100.0 ± 0.7	82.0 ± 1.1	48.1 ± 4.2	95.2 ± 5.8	69.1 ± 2.0	-	100.0 ± 4.6	100.0 ± 3.0	100.0 ± 5.1	66.1 ± 1.5	58.1 ± 3.3	66.5 ± 8.3

	MGO	36.1 ± 3.2	-	-	-	-	-	4.6 ± 1.2	-	-	-	-	-
Imidazolone (329/398)	Fructose	100 ± 0.4	80.5 ± 0.4	66.9 ± 0.9	86.7 ± 1.8	87.1 ± 0.1	58.4 ± 3.0	89.9 ± 2.7	97.8 ± 4.5	86.4 ± 2.7	-	-	38.9 ± 6.8
	MGO	2.0 ± 1.7	-	-	1.6 ± 3.3	-	-	29.7 ± 3.2	9.5 ± 2.3	-	-	-	-
Argpirimidine (320/385)	Fructose	100 ± 1.7	100.0 ± 1.9	66.7 ± 0.2	82.0 ± 2.1	62.0 ± 0.8	51.1 ± 1.7	71.3 ± 0.6	91.9 ± 0.7	82.4 ± 1.5	-	-	6.5 ± 4.8
	MGO	-	-	2.3 ± 0.7	4.5 ± 1.9	1.2 ± 0.8	-	34.4 ± 2.1	13.5 ± 0.4	1.1 ± 0.2	-	-	-
Vesperlisine (370/440)	Fructose	100.0 ± 8.1	79.3 ± 0.8	38.5 ± 8.7	100.0 ± 2.0	69.7 ± 6.3	-	100.0 ± 6.3	100.0 ± 1.1	100.0 ± 3.8	100.0 ± 0.3	70.3 ± 3.6	74.7 ± 10.7
	MGO	33.4 ± 4.8	-	-	-	-	-	7.6 ± 0.1	-	-	-	-	-
Pentosidine (335/385)	Fructose	100.0 ± 0.9	100.0 ± 0.6	51.2 ± 0.2	94.8 ± 1.8	69.5 ± 0.2	35.2 ± 2.2	100.0 ± 0.1	100.0 ± 1.1	94.8 ± 1.1	-	-	-
	MGO	-	-	-	-	-	-	30.1 ± 1.4	7.8 ± 3.6	-	9.8 ± 0.3	-	-

Nota: A formação de AGEs foi monitorada por fluorescência global (λ_{ex} 350 nm / λ_{em} 420 nm) e por bandas específicas associadas a marcadores estruturais da glicação e oxidação proteica, incluindo ditirosina (283/409 nm), N-formil-quinurenina (325/434 nm), quinurenina (365/480 nm), imidazolone (329/398 nm), argpirimidina (320/385 nm), vesperlisina (370/440 nm) e pentosidina (335/385 nm). As amostras foram avaliadas nas concentrações de 185, 55 e 18,5 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados são expressos como porcentagem de inibição em relação ao controle glicado (BSA + agente glicante, sem tratamento). Valores representam média $\pm$ desvio padrão de duplicatas experimentais.

		Inibição (%)											
		AgNP-EtAc			AgNP-DM			EtAc			DM		
AGE product	Glycant	185	55	18.5	185	55	18.5	185	55	18.5	185	55	18.5
		μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL
Glycated-BSA (350/420)	Fructose	81.2 ±	45.1 ±	33.9 ±	23.6 ±	39.7 ±	56.8 ±	85.9 ±	100 ±	89.0 ±	77.5 ±	49.0 ±	59.4 ±
		1.9	1.4	1.0	1.6	0.6	0.2	2.2	0.1	0.1	0.1	0.1	1.7
	MGO	6.4 ±	-	-	-	-	-	28.5 ±	9.0 ±	1.5 ±	20.7 ±	-	-
		1.9						1.5	1.4	1.0	1.8		
Dityrosine (283/409)	Fructose	100.0	92.5 ±	54.5 ±	-	-	77.5 ±	69.3 ±	93.3 ±	67.4 ±	-	-	-
		± 4.8	1.6	1.7			3.2	2.3	2.4	1.6			
	MGO	35.1 ±	14.7 ±	9.7 ±	-	-	-	43.9 ±	12.7 ±	-	-	-	-
		0.4	2.2	1.4				0.3	0.7				
N-formyl- quinurenine (325/434)	Fructose	100.0	52.0 ±	58.9 ±	20.1 ±	50.7 ±	-	100.0	100 ±	100.0	30.8 ±	37.5 ±	82.2 ±
		± 3.3	1.5	2.7	0.1	3.0		± 0.4	1.8	± 0.3	2.8	0.6	6.7
	MGO	17.1 ±	-	-	-	-	-	23.5 ±	3.7 ±	-	8.3 ±	-	-
		0.5						0.1	0.4		0.2		
Quinurenine (365/480)	Fructose	100.0	-	59.8 ±	7.1 ±	54.6 ±	-	100.0	100.0	100.0	66.1 ±	58.1 ±	66.5 ±
		± 0.7		2.0	6.8	1.6		± 4.6	± 3.0	± 5.1	1.5	3.3	8.3

	MGO	18.2 ± 1.7	-	-	-	-	-	4.6 ± 1.2	-	-	-	-	-
Imidazolone (329/398)	Fructose	87.1 ± 0.1	58.4 ± 3.0	48.3 ± 1.8	-	17.2 ± 2.9	29.7 ± 4.0	89.9 ± 2.7	97.8 ± 4.5	86.4 ± 2.7	-	-	38.9 ± 6.8
	MGO	15.5 ± 2.4	-	-	-	-	-	29.7 ± 3.2	9.5 ± 2.3	-	-	-	-
Argpirimidine (320/385)	Fructose	82.8 ± 2.9	59.3 ± 1.2	46.9 ± 1.8	-	-	41.3 ± 0.1	71.3 ± 0.6	91.9 ± 0.7	82.4 ± 1.5	-	-	6.5 ± 4.8
	MGO	15.0 ± 1.4	-	-	-	-	-	34.4 ± 2.1	13.5 ± 0.4	1.1 ± 0.2	-	-	-
Vesperlisine (370/440)	Fructose	100.0 ± 0.9	-	56.7 ± 1.5	23.5 ± 10.8	61.5 ± 11.2	-	100.0 ± 6.3	100.0 ± 1.1	100.0 ± 3.8	100.0 ± 0.3	70.3 ± 3.6	74.7 ± 10.7
	MGO	29.8 ± 0.1	-	-	-	-	-	7.6 ± 0.1	-	-	-	-	-
Pentosidine (335/385)	Fructose	92.1 ± 0.8	30.6 ± 9.8	53.4 ± 0.1	-	36.8 ± 2.2	-	100.0 ± 0.1	100.0 ± 1.1	94.8 ± 1.1	-	-	-
	MGO	5.4 ± 2.3	-	-	-	-	-	30.1 ± 1.4	7.8 ± 3.6	-	9.8 ± 0.3	-	-

Nota: A formação de AGEs foi monitorada por fluorescência global (λ_{ex} 350 nm / λ_{em} 420 nm) e por bandas específicas associadas a marcadores estruturais da glicação e oxidação proteica, incluindo ditirosina (283/409 nm), N-formil-quinurenina (325/434 nm), quinurenina (365/480 nm), imidazolone (329/398 nm), argpirimidina (320/385 nm), vesperlisina (370/440 nm) e pentosidina (335/385 nm). As amostras foram avaliadas nas concentrações de 185, 55 e 18,5 μ g/mL. Os resultados são expressos como porcentagem de inibição em relação ao controle glicado (BSA + agente glicante, sem tratamento). Valores representam média $\pm$ desvio padrão de duplicatas experimentais.

No sistema BSA–frutose, o controle glicado apresentou aumento expressivo da fluorescência, confirmando formação robusta de AGEs sob as condições experimentais estabelecidas. Todas as amostras testadas promoveram redução significativa da fluorescência em comparação ao controle.

A fração acetato de etila (EtAc) apresentou elevada inibição da fluorescência, comportamento coerente com a presença de proantocianidinas previamente descritas para a espécie (JUSTINO et al., 2019). Entre as nanoformulações, AuNP–EtAc apresentou o maior efeito inibitório, alcançando aproximadamente 98% na maior concentração testada, superando inclusive a fração livre correspondente em determinadas condições.

A análise das bandas específicas de fluorescência associadas a ditirosina (283/409 nm), N-formil-quinurenina (325/434 nm), quinurenina (365/480 nm) e pentosidina (335/385 nm) reforçou esse padrão de inibição. Esses marcadores estão relacionados a processos de glicoxidação, etapa da reação de Maillard caracterizada por participação de espécies reativas de oxigênio e intermediários oxidativos (SADOWSKA-BARTOSZ; BARTOSZ, 2014).

A redução consistente desses marcadores sugere que, no modelo frutose, o mecanismo predominante pode estar relacionado à modulação oxidativa da glicação, mais do que à simples interferência óptica na leitura de fluorescência. Esse comportamento é compatível com a atividade redutora observada nos ensaios antioxidantes, especialmente no FRAP e DPPH, indicando possível contribuição da modulação redox no ambiente proteico.

Observou-se ainda comportamento não monotônico em determinadas condições para AgNP–DM, nas quais concentrações intermediárias apresentaram maior inibição do que a concentração mais elevada. Esse padrão pode refletir reorganização superficial da corona orgânica ou interação diferencial com a proteína, fenômeno descrito em sistemas nanoestruturados onde a interação partícula–biomolécula depende da densidade e organização de grupos funcionais superficiais (BHATTACHARJEE, 2016).

De modo geral, o modelo frutose evidenciou ganho funcional mensurável para AuNP–EtAc, indicando que a nanoestrutura pode modular a atividade antiglicante da fração vegetal em um sistema dependente de etapas oxidativas.

No modelo BSA–MGO, o controle glicado também apresentou aumento significativo da fluorescência, confirmando formação de AGEs derivados de α -dicarbonílicos. Entretanto, a magnitude de inibição promovida pelas frações e nanoformulações foi substancialmente inferior à observada no sistema frutose.

O metilglioxal é um α -dicarbonílico altamente reativo que forma adutos diretamente com resíduos de arginina e lisina, gerando produtos como hidroimidazonas e argpirimidina, independentemente de etapas oxidativas intermediárias (THORNALLEY, 2003). Nesse contexto, a formação de AGEs ocorre predominantemente por reação direta com grupos nucleofílicos proteicos, reduzindo a influência de mecanismos antioxidantes clássicos.

A menor eficácia observada neste modelo sugere que as frações e nanoformulações apresentam capacidade limitada de interceptação direta do MGO, o qual possui capacidade glicante até 20.000 maior do que a glicose (VAŠKOVÁ *et al.* 2025), nas condições testadas. Ainda que tenha sido observada redução parcial da fluorescência em algumas bandas específicas, os níveis de inibição não se aproximaram daqueles observados no sistema frutose.

A marcante diferença na capacidade inibitória entre os modelos BSA–frutose e BSA–MGO sugere que a nanoformulação atua preferencialmente em etapas dependentes de oxidação. Enquanto no modelo frutose a AuNP–EtAc alcançou 98,7% de inibição, no modelo MGO a eficácia foi drasticamente reduzida para todas as amostras avaliadas. Mecanicamente, isso indica que os conjugados de *Annona crassiflora* agem como antioxidantes preventivos, inibindo a transição de produtos de Amadori para AGEs — processo denominado glicoxidação —, mas possuem baixa capacidade de sequestro direto (*trapping*) de dicarbonílicos reativos já formados, como o metilglioxal (THORNALLEY, 2003). Essa distinção é corroborada pela presença de proantocianidinas do tipo B na casca do fruto, as quais são reconhecidas por interromper vias oxidativas da glicação (JUSTINO *et al.*, 2019).

A comparação entre os sistemas frutose e MGO evidencia distinção mecanística clara. No modelo frutose, a progressão da reação de Maillard envolve etapas oxidativas que podem ser moduladas por compostos redutores, favorecendo maior inibição de AGEs. No modelo MGO, a reação é mais direta e menos dependente de oxidação secundária, o que limita a eficácia de compostos cuja ação principal envolve modulação redox.

Essa distinção sustenta a hipótese de que a atividade antiglicante das nanoformulações, particularmente AuNP–EtAc, está associada à interferência em vias oxidativas da glicação e não à neutralização direta de dicarbonílicos altamente reativos.

4.3.2 Proteína Carbonilada

A carbonilação proteica foi utilizada como marcador de dano oxidativo estrutural da BSA após incubação com frutose ou metilglioxal. A formação de grupos carbonila resulta da oxidação direta de cadeias laterais de resíduos como lisina, arginina, prolina e treonina, bem

como da reação secundária com produtos da glicação oxidativa, sendo considerada um marcador clássico e irreversível de dano proteico (REZNICK; PACKER, 1994). O teste foi utilizado como marcador de oxidação estrutural irreversível da BSA após incubação com frutose (~230 mM) ou metilglioxal (10 mM) por 72 h a 37 °C. Os resultados encontram-se apresentados nas figuras 7, 8, 9 e 10.

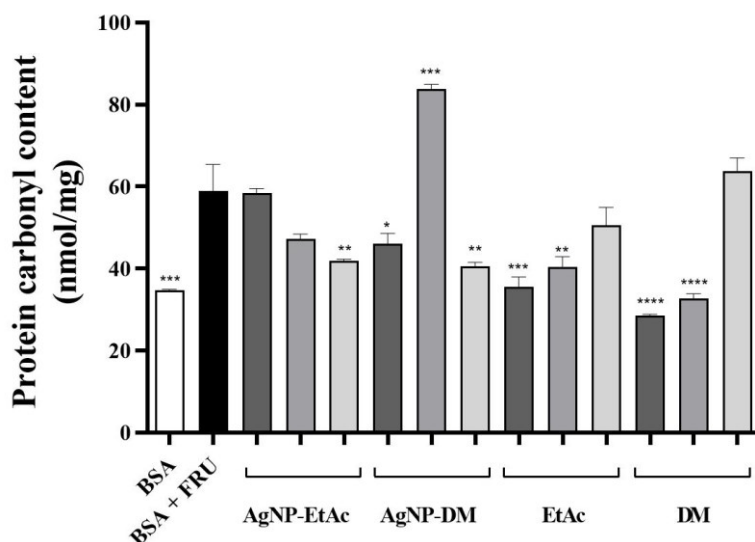


Figura 7. Conteúdo de proteína carbonilada em albumina sérica bovina (BSA) após incubação com frutose (~230 mM) por 72 h a 37 °C na presença das frações vegetais e de suas respectivas nanoformulações de prata. A carbonilação proteica foi determinada após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) com leitura espectrofotométrica a 370 nm. Os resultados são expressos como nmol de carbonila por mg de proteína após normalização pelo conteúdo proteico. O controle glicado corresponde à BSA incubada apenas com o agente glicante sem tratamento. Valores representam média $\pm$ desvio padrão de duplicatas experimentais, sendo as diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA *one-way* seguida de pós-testes de Dunnett considerando: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ e ausência representando que não foi significativo).

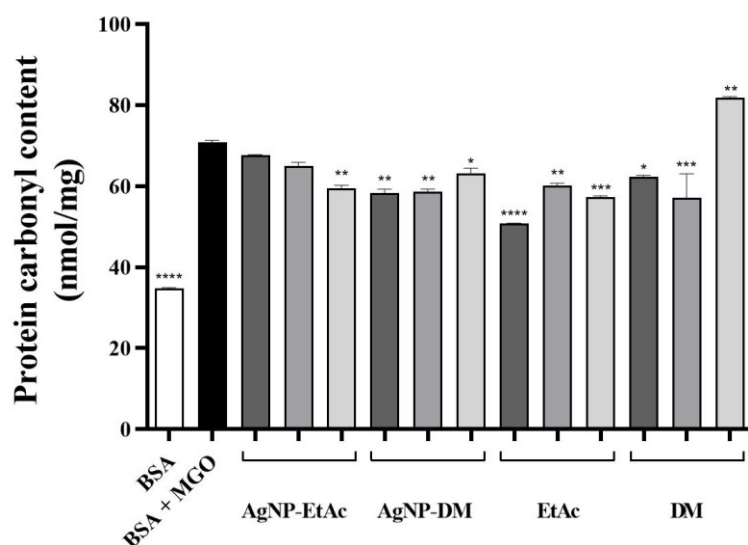


Figura 8. Conteúdo de proteína carbonilada em albumina sérica bovina (BSA) após incubação com metilglioxal (MGO, 10 mM) por 72 h a 37 °C na presença das frações vegetais e de suas respectivas nanoformulações de prata. A carbonilação proteica foi determinada após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) com leitura espectrofotométrica a 370 nm. Os resultados são expressos como nmol de carbonila por mg de proteína após normalização pelo conteúdo proteico. O controle glicado corresponde à BSA incubada apenas com o agente glicante sem tratamento. Valores representam média $\pm$ desvio padrão de duplicatas experimentais, sendo as diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA *one-way* seguida de pós-testes de Dunnett considerando: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ e ausência representando que não foi significativo).

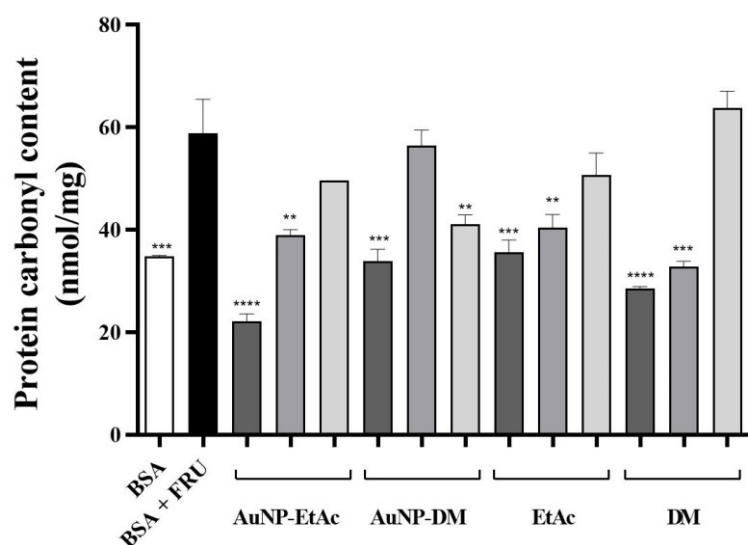


Figura 9. Conteúdo de proteína carbonilada em albumina sérica bovina (BSA) após incubação com frutose (~230 mM) por 72 h a 37 °C na presença das frações vegetais e de suas respectivas nanoformulações de ouro. A carbonilação proteica foi determinada após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) com leitura

espectrofotométrica a 370 nm. Os resultados são expressos como nmol de carbonila por mg de proteína após normalização pelo conteúdo proteico. O controle glicado corresponde à BSA incubada apenas com o agente glicante sem tratamento. Valores representam média $\pm$ desvio padrão de duplicatas experimentais, sendo as diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA *one-way* seguida de pós-testes de Dunnett, considerando: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ e ausência representando que não foi significativo).

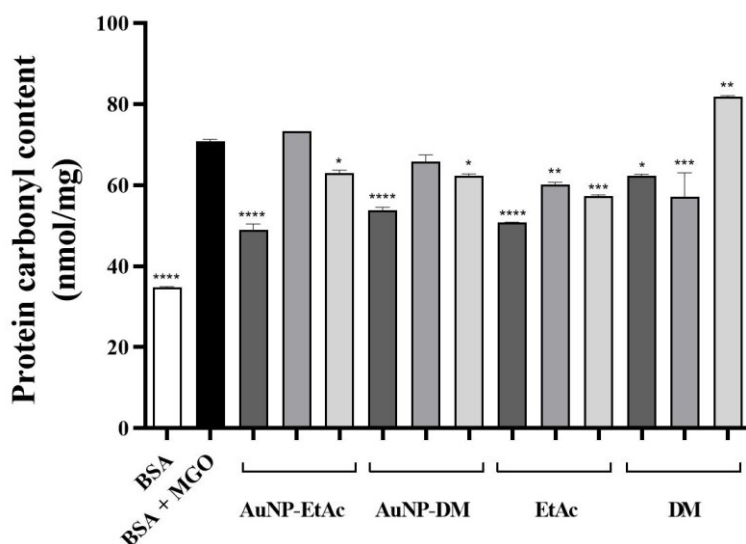


Figura 10. Conteúdo de proteína carbonilada em albumina sérica bovina (BSA) após incubação com metilglioxal (MGO, 10mM) por 72 h a 37 °C na presença das frações vegetais e de suas respectivas nanoformulações de ouro. A carbonilação proteica foi determinada após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) com leitura espectrofotométrica a 370 nm. Os resultados são expressos como nmol de carbonila por mg de proteína após normalização pelo conteúdo proteico. O controle glicado corresponde à BSA incubada apenas com o agente glicante sem tratamento. Valores representam média $\pm$ desvio padrão de duplicatas experimentais, sendo as diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA *one-way* seguida de pós-testes de Dunnett, considerando: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ e ausência representando que não foi significativo).

No modelo BSA–frutose, o controle glicado apresentou aumento significativo na formação de carbonilas, confirmando que a glicação dependente de açúcar promove não apenas formação de AGEs fluorescentes, mas também modificação oxidativa estrutural da proteína.

Entre as amostras tratadas, observou-se redução variável da carbonilação, com destaque para AuNP–EtAc, que apresentou o menor valor médio. Esse resultado está em concordância com a elevada inibição de AGEs fluorescentes observada no mesmo modelo, indicando que a modulação da fluorescência não representa apenas possível interferência óptica, mas reflete efetiva atenuação do dano estrutural.

A convergência entre redução de AGEs e diminuição de carbonilas sugere interferência na etapa de glicoxidação, na qual espécies reativas de oxigênio participam da progressão da reação de Maillard (SADOWSKA-BARTOSZ; BARTOSZ, 2014). Assim, a modulação observada pode estar relacionada à capacidade redutora residual das formulações derivadas da fração EtAc.

Por outro lado, AgNP–DM apresentou valor superior ao controle glicado, indicando possível intensificação do dano oxidativo sob determinadas condições. Esse comportamento pode estar associado a diferenças físico-químicas previamente descritas, como maior tamanho hidrodinâmico e maior polidispersidade, que podem influenciar a interação nanopartícula–proteína e o microambiente redox local (BHATTACHARJEE, 2016).

No sistema BSA–MGO, o controle glicado apresentou valores absolutos de carbonilação superiores aos observados no modelo frutose, evidenciando maior dano estrutural sob ação do α -dicarbonílico.

Todas as amostras tratadas apresentaram redução em relação ao controle glicado, porém a magnitude da diminuição foi menos pronunciada quando comparada ao sistema frutose. Esse padrão reforça a distinção mecanística previamente discutida: no modelo MGO, a formação de adutos ocorre predominantemente por reação direta do dicarbonílico com resíduos nucleofílicos proteicos, sendo menos dependente de etapas oxidativas intermediárias (THORNALLEY, 2003).

Assim, embora a modulação redox possa contribuir parcialmente para redução do dano oxidativo secundário, a neutralização direta do MGO parece limitada nas condições experimentais avaliadas.

A análise conjunta de AGEs fluorescentes e carbonilação demonstra coerência interna entre os marcadores. No modelo frutose, a redução de AGEs foi acompanhada por diminuição da carbonilação, indicando preservação estrutural efetiva. No modelo MGO, ambos os parâmetros apresentaram menor magnitude de modulação.

Essa convergência fortalece a interpretação de que o efeito observado não se restringe à leitura espectrofluorimétrica, mas reflete modulação estrutural mensurável da proteína.

No sistema BSA–MGO, o controle glicado apresentou valor médio de 70,38 nmol/mg, superior ao observado no modelo frutose, indicando que o MGO promove maior carbonilação absoluta sob as condições experimentais.

Todas as amostras tratadas apresentaram valores inferiores ao controle glicado. A fração EtAc livre apresentou o menor valor médio (55,97 nmol/mg), seguida por AgNP–DM (59,06

nmol/mg), AuNP–DM (60,01 nmol/mg), AuNP–EtAc (61,50 nmol/mg), AgNP–EtAc (63,94 nmol/mg) e fração DM (64,91 nmol/mg).

Entretanto, a magnitude da redução foi menos pronunciada quando comparada ao modelo frutose. Esse padrão reforça a interpretação mecanística previamente discutida: no sistema MGO, a formação de adutos ocorre predominantemente por reação direta do α -dicarbonílico com resíduos nucleofílicos, sendo menos dependente de etapas oxidativas intermediárias. Assim, a modulação redox exerce influência limitada nesse contexto.

A convergência entre redução de AGEs fluorescentes e diminuição de carbonilação no modelo frutose confere robustez interna aos achados. A carbonilação representa marcador estrutural independente da fluorescência global, reduzindo a probabilidade de interpretação baseada exclusivamente em artefato óptico.

Além disso, a discrepância observada entre os modelos frutose e MGO tanto para AGEs quanto para carbonilação reforça que o mecanismo de ação das frações e nanoformulações está mais associado à modulação da glicoxidação do que à neutralização direta de dicarbonílicos altamente reativos.

4.3.3 Sulfidrila

O conteúdo de grupos sulfidrila ($-SH$) foi determinado após incubação da BSA com frutose ou metilglioxal por 72 horas. A quantificação foi realizada utilizando o reagente 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), método clássico descrito por Ellman, no qual a formação do ânion TNB é monitorada espectrofotometricamente (ELLMAN, 1959).

Na albumina sérica, o principal grupo tiol livre está associado ao resíduo Cys34, altamente suscetível à oxidação sob condições de estresse oxidativo e glicativo. A oxidação desse resíduo pode ocorrer por ação de espécies reativas de oxigênio ou por reações secundárias associadas à glico-oxidação. Os resultados encontram-se apresentados nas Figuras 11, 12, 13 e 14.

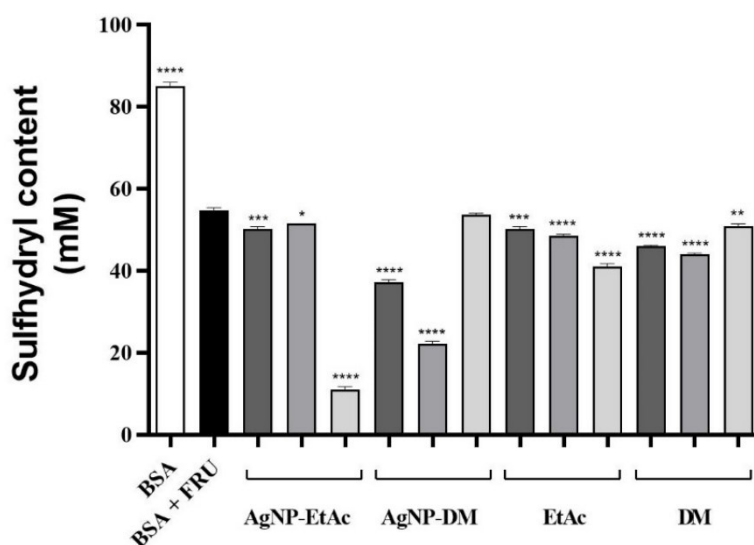


Figura 11. Conteúdo de grupos sulfidrilas (–SH) em albumina sérica bovina (BSA) após incubação com frutose (~230 mM) por 72 h a 37 °C na presença das frações vegetais e de suas respectivas nanoformulações de prata. A quantificação foi realizada utilizando o reagente 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) com leitura espectrofotométrica a 412 nm. Os resultados são expressos como nmol de TNB por mg de proteína. O controle glicado corresponde à BSA incubada apenas com o agente glicante sem tratamento. Valores representam média $\pm$ desvio padrão de duplicatas experimentais, sendo as diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA *one-way* seguida de pós-testes de Dunnett, considerando: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ e ausência representando que não foi significativo).

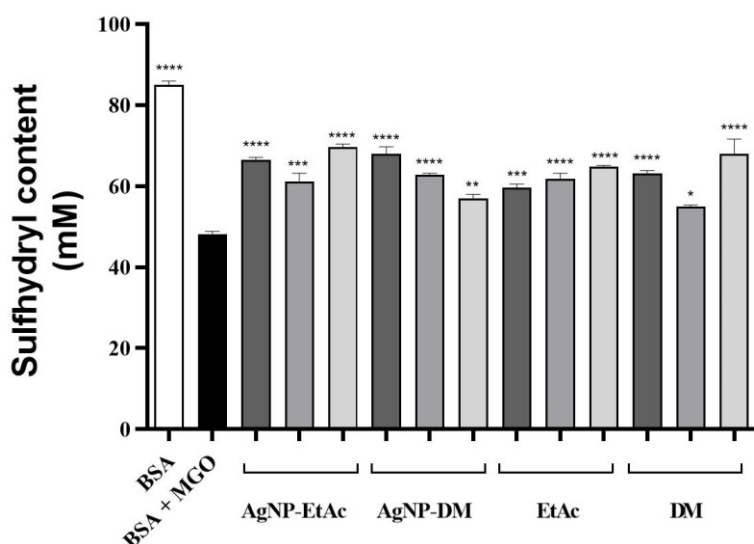


Figura 12. Conteúdo de grupos sulfidrilas (–SH) em albumina sérica bovina (BSA) após incubação com metilglioxal (MGO, 10mM) por 72 h a 37 °C na presença das frações vegetais e de suas respectivas nanoformulações de prata. A quantificação foi realizada utilizando o reagente 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) com leitura espectrofotométrica a 412 nm. Os resultados são expressos como nmol de TNB por mg de

proteína. O controle glicado corresponde à BSA incubada apenas com o agente glicante sem tratamento. Valores representam média $\pm$ desvio padrão de duplicatas experimentais, sendo as diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA *one-way* seguida de pós-testes de Dunnett, considerando: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ e ausência representando que não foi significativo).

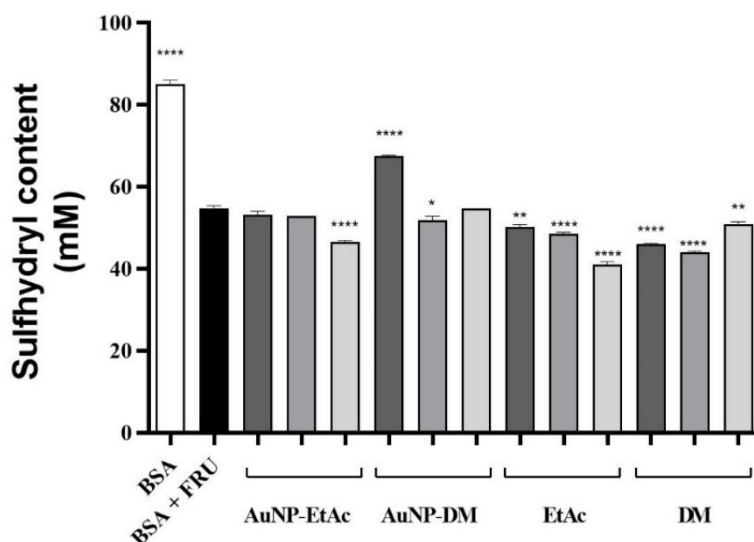


Figura 13. Conteúdo de grupos sulfidrilas ($-SH$) em albumina sérica bovina (BSA) após incubação com frutose (~ 230 mM) por 72 h a $37^\circ C$ na presença das frações vegetais e de suas respectivas nanoformulações de ouro. A quantificação foi realizada utilizando o reagente 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) com leitura espectrofotométrica a 412 nm. Os resultados são expressos como nmol de TNB por mg de proteína. O controle glicado corresponde à BSA incubada apenas com o agente glicante sem tratamento. Valores representam média $\pm$ desvio padrão de duplicatas experimentais, sendo as diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA *one-way* seguida de pós-testes de Dunnett, considerando: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ e ausência representando que não foi significativo).

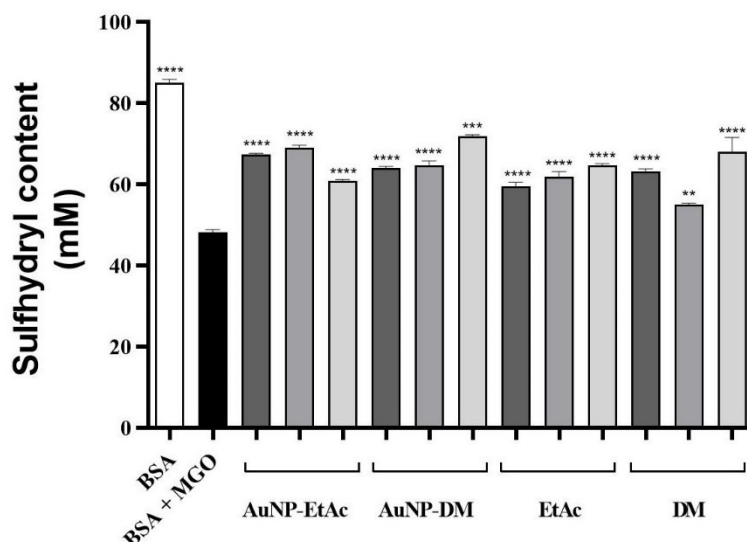


Figura 14. Conteúdo de grupos sulfidrilas (–SH) em albumina sérica bovina (BSA) após incubação com metilglioxal (MGO, 10mM) por 72 h a 37 °C na presença das frações vegetais e de suas respectivas nanoformulações de ouro. A quantificação foi realizada utilizando o reagente 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) com leitura espectrofotométrica a 412 nm. Os resultados são expressos como nmol de TNB por mg de proteína. O controle glicado corresponde à BSA incubada apenas com o agente glicante sem tratamento. Valores representam média $\pm$ desvio padrão de duplicatas experimentais, sendo as diferenças estatisticamente significativas determinadas por ANOVA *one-way* seguida de pós-testes de Dunnett, considerando: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ e ausência representando que não foi significativo).

No modelo BSA–frutose, o controle glicado apresentou redução significativa do conteúdo de sulfidrilas em comparação à BSA não glicada, confirmando consumo de grupos tiol durante o processo de glicação dependente de açúcar.

Entre as amostras tratadas, as nanoformulações de ouro apresentaram maior preservação relativa de –SH quando comparadas às formulações de prata. Esse padrão é coerente com a redução observada para AGEs e carbonilação no mesmo modelo, sugerindo modulação integrada do dano oxidativo. O desempenho superior das nanopartículas de ouro em relação às de prata, pode ser atribuído principalmente à sua maior estabilidade química e menor propensão à geração de espécies reativas de oxigênio. Diferentemente das AgNPs, que podem liberar íons Ag^+ e promover processos oxidativos adicionais, as AuNPs tendem a manter um ambiente redox mais estável, favorecendo a preservação da estrutura proteica e a atuação dos compostos fenólicos associados à sua superfície.

Além disso, nanopartículas de prata apresentam maior afinidade por grupos sulfidrilas, podendo interagir diretamente com resíduos de cisteína e reduzir a disponibilidade desses

grupos, enquanto as AuNPs promovem interações mais controladas com biomoléculas. Outro fator relevante é a organização da corona orgânica, que tende a ser mais estável em sistemas baseados em ouro, contribuindo para melhor desempenho funcional. Em conjunto, esses fatores sugerem que as AuNPs atuam de forma mais eficiente na modulação do ambiente glicoxidativo em comparação às AgNPs, favorecendo os efeitos antioxidantes e antiglicantes observados (NEL et al., 2009; MONOPOLI et al., 2012).

Considerando que a etapa tardia da reação de Maillard envolve participação de espécies reativas e formação de produtos oxidativos (SADOWSKA-BARTOSZ; BARTOSZ, 2014), a preservação parcial de grupos tiol pode refletir atenuação do ambiente pró-oxidante gerado durante a glicoxidação.

Os resultados obtidos para o conteúdo de grupos sulfidrila no sistema BSA–frutose indicaram valores semelhantes ou discretamente inferiores ao controle glicado nas amostras contendo nanopartículas, sugerindo preservação limitada desses grupos sob as condições avaliadas. Considerando que a glicação por frutose promove redução de tióis livres durante a glicoxidação proteica, esse achado pode refletir tanto a persistência de modificações oxidativas em resíduos de cisteína quanto uma possível redução na acessibilidade dos grupos –SH ao reagente DTNB, em função da interação da albumina com a superfície das nanopartículas e da reorganização conformacional associada à formação da corona proteica.

Assim, a ausência de aumento expressivo nos níveis de sulfidrila não necessariamente contradiz a inibição de AGEs observada no mesmo sistema, mas sugere que a proteção conferida pelas nanoformulações pode ter sido mais efetiva sobre etapas associadas à formação de produtos fluorescentes de glicação do que sobre a preservação detectável de grupos tiol livres (ADISAKWATTANA et al., 2012; MONOPOLI et al., 2011).

No sistema BSA–MGO, o controle glicado também apresentou redução de grupos sulfidrilas, indicando que o α -dicarbonílico pode contribuir para consumo indireto de grupos tiol, possivelmente por geração secundária de espécies reativas.

Entretanto, todas as amostras tratadas apresentaram valores superiores ao controle glicado, indicando preservação relativa do estado redox proteico. Esse resultado contrasta com a menor inibição de AGEs observada no modelo BSA–MGO e sugere que, embora a neutralização direta do metilglioxal seja limitada (THORNALLEY, 2003), pode haver modulação parcial do componente oxidativo associado ao sistema.

Essa dissociação entre fluorescência global de AGEs e preservação de sulfidrilas reforça a complexidade mecanística do modelo MGO, no qual coexistem reações diretas de adição nucleofílica e eventos oxidativos secundários.

4.4 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT após 24 h de exposição às frações livres e nanoformulações nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,62 $\mu\text{g/mL}$. Considerou-se o critério amplamente utilizado de redução de viabilidade superior a 30% em relação ao controle não tratado como indicativo de citotoxicidade *in vitro* (ISO 10993-5, 2009). Os resultados encontram-se apresentados nas Figuras 15 (macrófagos RAW 264.7) e 16 (fibroblastos NIH/3T3), com indicação de significância estatística conforme descrito na seção de análise estatística.

Nos macrófagos RAW 264.7, os resultados indicaram que, o comportamento não é sugestivo de uma resposta dose dependente, a fração acetato de etila e as nanoformulações mantiveram viabilidade celular superior ao limiar de 70% na maioria das concentrações avaliadas, não sendo, portanto, classificadas como citotóxicas sob essas condições experimentais.

Nos fibroblastos NIH/3T3, a fração acetato de etila promoveu redução significativa da viabilidade celular na maior concentração testada (500 $\mu\text{g/mL}$), enquanto nas demais concentrações os valores permaneceram acima do limite de 70%. A fração diclorometano apresentou citotoxicidade em concentrações intermediárias, seguida de recuperação da viabilidade em concentrações mais baixas.

Entre as nanoformulações, AuNP–EtAc apresentou viabilidade próxima ao limiar de citotoxicidade na maior concentração, enquanto AuNP–DM manteve viabilidade superior a 70% em todas as concentrações avaliadas, indicando melhor perfil de biocompatibilidade. Em contraste, AgNP–DM demonstrou citotoxicidade acentuada nas concentrações mais elevadas, comportamento compatível com a maior reatividade biológica frequentemente associada às nanopartículas de prata.

De modo geral, as nanoformulações de ouro apresentaram perfil mais favorável de biocompatibilidade quando comparadas às formulações contendo prata, o que pode ser atribuído à maior estabilidade química do ouro e à menor propensão à geração de espécies reativas de oxigênio e liberação de íons metálicos biologicamente ativos (XIN et al., 2016).

A interpretação dos resultados obtidos por ensaios colorimétricos, como o MTT, deve ser realizada com cautela em sistemas contendo nanopartículas, uma vez que esses materiais podem interagir diretamente com o reagente tetrazólio ou apresentar propriedades ópticas capazes de interferir na leitura espectrofotométrica. Esse tipo de interferência já foi amplamente

descrito na literatura de nanotoxicologia e pode levar à superestimação ou subestimação da viabilidade celular na ausência de controles apropriados (KROLL et al., 2009; KROLL et al., 2012; NEL et al., 2006). Além disso, características físico-químicas das nanopartículas, como tamanho, carga superficial e composição, influenciam significativamente sua interação com membranas celulares e, conseqüentemente, seu perfil citotóxico (FRÖHLICH, 2012).

De forma geral, os resultados indicam que determinadas formulações, especialmente AuNP–DM, apresentam uma janela preliminar de segurança *in vitro* nas condições avaliadas, enquanto formulações contendo prata exibem citotoxicidade dependente da concentração.

Esse comportamento pode ser explicado, ao menos em parte, pela interação das nanopartículas com componentes da membrana celular e biomoléculas intracelulares, bem como pela influência da corona orgânica formada pelos compostos fenólicos adsorvidos em sua superfície. No caso das nanoformulações contendo fração acetato de etila, a presença de compostos antioxidantes pode contribuir para a modulação do estresse oxidativo celular, favorecendo a manutenção da viabilidade.

Por outro lado, nanopartículas de prata são conhecidas por sua maior reatividade e capacidade de liberar íons Ag^+ , os quais podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio e promover disfunção mitocondrial, resultando em efeitos citotóxicos dependentes da concentração. Além disso, características físico-químicas como tamanho, carga superficial e organização da corona podem influenciar a internalização celular e a resposta biológica, contribuindo para os diferentes perfis observados entre as formulações avaliadas (NEL et al., 2009; FRÖHLICH, 2012).

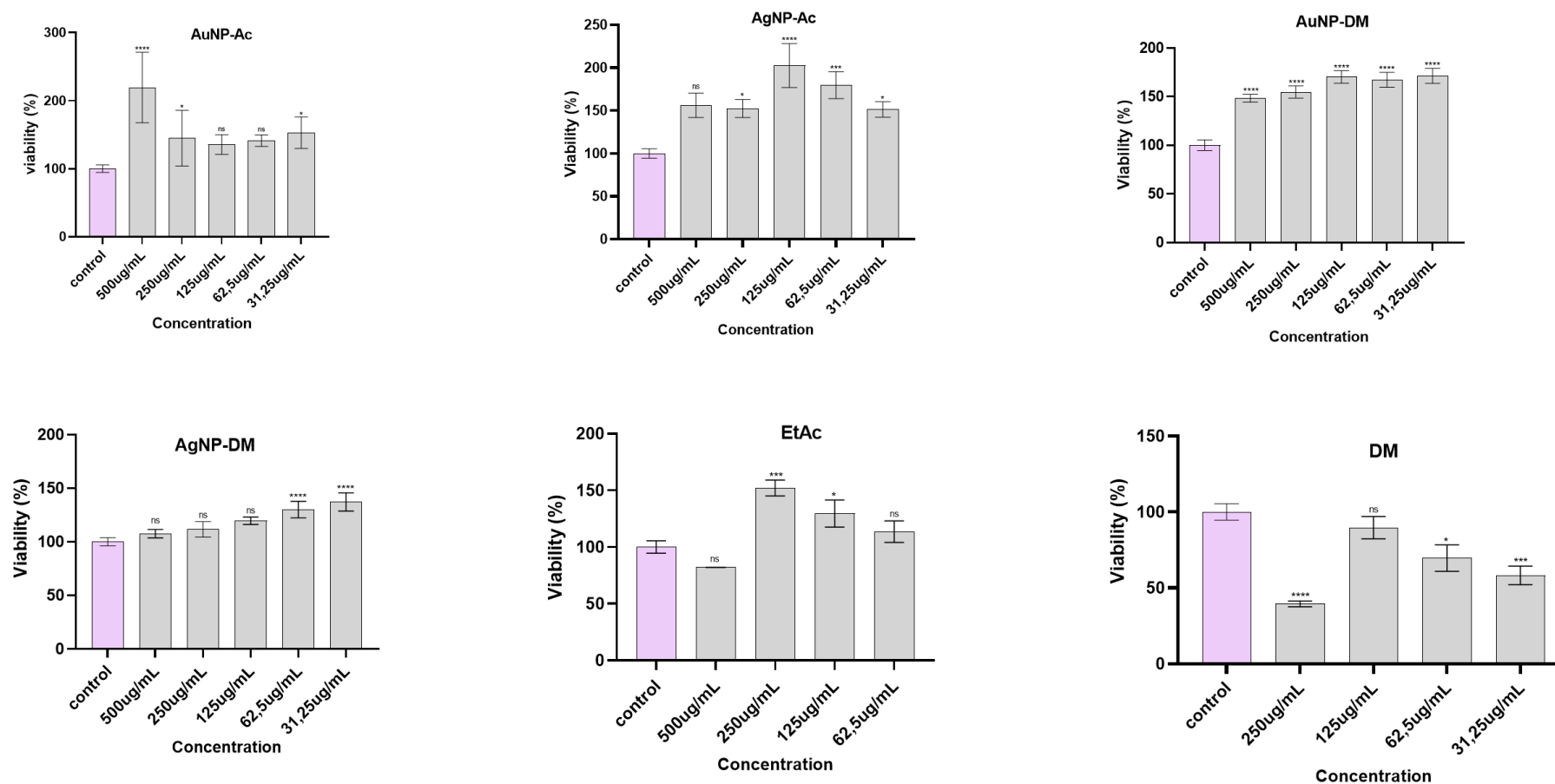


Figura 15. Avaliação da viabilidade celular da linhagem de macrófagos murinos (RAW 264.7) expostos às frações da casca de *Annona crassiflora* e suas respectivas nanopartículas metálicas. A viabilidade foi determinada pelo ensaio de redução do MTT após 24 h de tratamento nas concentrações de 31,25 a 500 µg/mL. Os resultados são expressos como porcentagem em relação ao controle não tratado (100% de viabilidade). Valores representam a média ± desvio padrão. Diferenças estatísticas em relação ao controle são indicadas por asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ e ns não foi significativo). O limiar de citotoxicidade adotado foi de $< 70\%$.

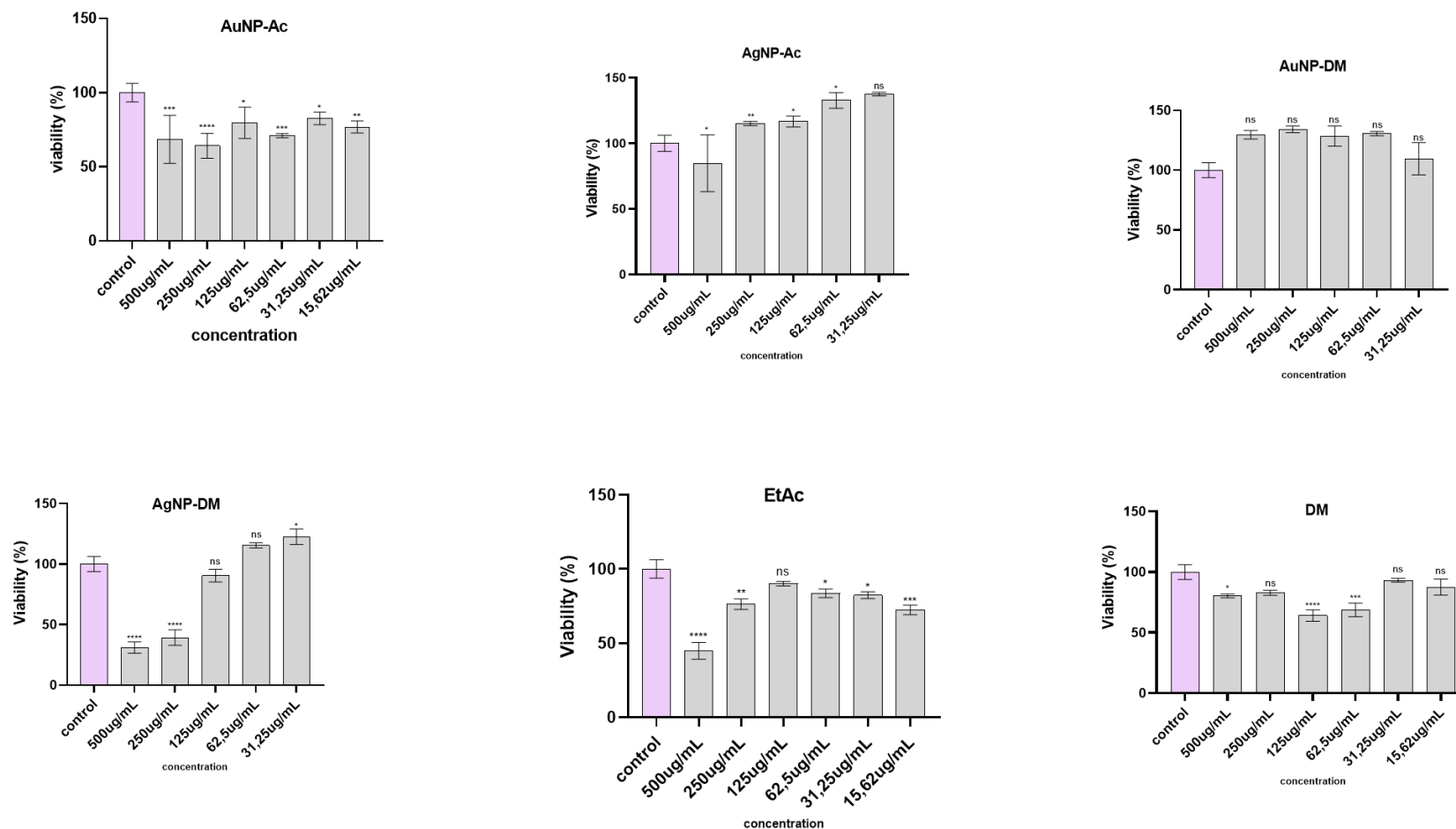


Figura 16. Avaliação da viabilidade celular da linhagem de fibroblastos murinos (NIH/3T3) expostos às frações da casca de *Annona crassiflora* e suas respectivas nanopartículas metálicas. A viabilidade foi determinada pelo ensaio de redução do MTT após 24 h de tratamento nas concentrações de 31,25 a 500 µg/mL. Os resultados são expressos como porcentagem em relação ao controle não tratado (100% de viabilidade). Valores representam a média ± desvio padrão. Diferenças estatísticas em relação ao controle são indicadas por asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ e ns não foi significativo). O limiar de citotoxicidade adotado foi de $< 70\%$.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo investigou a síntese verde de nanopartículas metálicas utilizando frações da casca de *Annona crassiflora* e avaliou suas propriedades antioxidantes, antiglicantes e efeitos sobre a viabilidade celular *in vitro*. A caracterização físico-química confirmou a formação de nanopartículas de ouro e prata estabilizadas por metabólitos vegetais, com diferenças relevantes entre as frações acetato de etila e diclorometano, evidenciando a influência da composição fitoquímica na formação e estabilidade coloidal das nanoformulações. Nos ensaios antioxidantes, as frações livres apresentaram maior atividade em comparação às nanoformulações, sugerindo que parte dos compostos fenólicos permaneceu adsorvida à superfície das nanopartículas durante a síntese. Ainda assim, algumas formulações mantiveram atividade antioxidante detectável, indicando preservação parcial da funcionalidade dos metabólitos na corona orgânica. Nos ensaios de glicação proteica, o modelo dependente de frutose foi mais responsivo às amostras avaliadas. Nesse sistema, a formulação AuNP–EtAc apresentou os resultados antiglicantes mais consistentes, com inibição da formação de AGEs fluorescentes, redução da carbonilação proteica e preservação relativa de grupos sulfidrilas. Já no modelo induzido por metilglioxal, todas as amostras apresentaram menor eficácia, sugerindo maior atuação sobre mecanismos oxidativos da glicação dependente de açúcares do que sobre α -dicarbonílicos altamente reativos. A avaliação da viabilidade celular demonstrou perfil dependente do tipo de nanopartícula, da fração vegetal e da concentração. De modo geral, nanoformulações de ouro apresentaram maior biocompatibilidade, enquanto formulações contendo prata mostraram maior citotoxicidade em concentrações elevadas. Em conjunto, os resultados indicam que a nanoestruturação pode modificar o perfil funcional dos metabólitos vegetais, influenciando suas propriedades antioxidantes e antiglicantes. Entre as formulações avaliadas, AuNP–EtAc apresentou o conjunto mais promissor de atividade antiglicante associado a um perfil favorável de viabilidade celular. Entretanto, devido ao caráter exploratório do estudo e às limitações metodológicas, os resultados devem ser considerados preliminares, sendo necessários estudos adicionais para melhor elucidação dos mecanismos envolvidos.

REFERÊNCIAS

1. ADISAKWATTANA, S. et al. Cinnamic acid and its derivatives inhibit fructose-mediated protein glycation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, n. 2, p. 1778–1789, 2012. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms13021778>.
2. AHMED, N. et al. Methylglyoxal-derived hydroimidazolone advanced glycation end-products of human lens proteins. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 44, p. 5287–5292, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1167/iovs.03-0573>.
3. AHMAD, S. et al. “Recent Advancements and Unexplored Biomedical Applications of Green Synthesized Ag and Au Nanoparticles: A Review.” *International journal of nanomedicine* vol. 19 3187-3215. 3 Apr. 2024, DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S453775>.
4. ANNAMALAI, J.; NALLAMUTHU, T. *Green synthesis of silver nanoparticles: characterization and determination of antibacterial potency*. *Applied Nanoscience*, [s.l.], v. 6, n. 2, p. 259–265, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13204-015-0426-6>.
5. ANDRAOS, C. et al. Interference: a much-neglected aspect in high-throughput screening of nanoparticles. *SLAS Discovery*, [s.l.], v. 25, n. 7, p. 753–771, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1177/1091581820938335>.
6. ANTOLOVICH, M. et al. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, [s.l.], v. 127, n. 1, p. 183–198, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1039/B009171P>.
7. ASHARANI, P. V. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*, [s.l.], v. 3, n. 2, p. 279–290, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1021/nn800596w>.
8. ÁVILA, P. F. et al. Annona crassiflora suppresses colonic carcinogenesis through its antioxidant effects, bioactive amines, and phenol content in rats. *Food Research International*, [s.l.], v. 175, p. 113666, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113666>.
9. AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, [s.l.], v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>.
10. Bharadwaj, Kaushik Kumar et al. “Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Plant Extracts as Beneficial Prospect for Cancer Theranostics.” *Molecules (Basel, Switzerland)* vol. 26,21 6389. 22 Oct. 2021, DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26216389>.

11. BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – what they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, [s.l.], v. 235, p. 337–351, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.
12. BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, [s.l.], v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
13. 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>.
14. BURLACU, E. et al. A review of bark-extract-mediated green synthesis of metallic nanoparticles and their applications. *Molecules*, [s.l.], v. 24, n. 23, p. 4354, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24234354>.
15. CAPUTO, F. et al. Measuring particle size distribution of nanoparticle enabled medicinal products, the joint view of EUNCL and NCI-NCL: A step by step approach combining orthogonal measurements with increasing complexity. *Journal of Controlled Release*, [s.l.], v. 299, p. 31–43, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.02.030>.
16. CARNOVALE, C. et al. Identifying trends in gold nanoparticle toxicity and uptake. *ACS Omega*, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 242–254, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03227>.
17. 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.
18. CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. Zeta potential measurement. In: MCNEIL, S. E. (ed.). *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*. Methods in Molecular Biology, [s.l.], v. 697, p. 63–70, 2011. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6.
19. COATES, J. (2006) Interpretation of Infrared Spectra, a Practical Approach. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. DOI: [10.1002/9780470027318.a5606](https://doi.org/10.1002/9780470027318.a5606).

20. DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, [s.l.], v. 15, n. 10, p. 7313–7352, 2010. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>.
21. DESAI, K.; WU, L. Methylglyoxal and advanced glycation endproducts: New therapeutic horizons? *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery*, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 89–99, 2007. DOI: <https://doi.org/10.2174/157489007780832498>.
22. ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, [s.l.], v. 82, p. 70–77, 1959. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).
23. ELOSTA, A. et al. Natural products as anti-glycation agents: possible therapeutic potential for diabetic complications. *Current Diabetes Reviews*, [s.l.], v. 8, n. 2, p. 92–108, 2012. DOI: <https://doi.org/10.2174/157339912799424528>.
24. FRÖHLICH, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, v. 7, p. 5577–5591, 2012. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S36111>.
25. GRUBER, S.; NICKEL, A. Toxic or not toxic? The specifications of the standard ISO 10993-5 are not explicit enough to yield comparable results in the cytotoxicity assessment of an identical medical device. *Frontiers in Medical Technology*, v. 5, p. 1195529, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmedt.2023.1195529>.
26. HO, C.-T.; WANG, M. Dietary phenolics as reactive carbonyl scavengers: Potential impact on human health. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, [s.l.], v. 3, n. 3, p. 139–141, 2013. DOI: <https://doi.org/10.4103/2225-4110.114892>.
27. HOLDER, A. L. et al. Particle-induced artifacts in the MTT and LDH viability assays. *Chemical Research in Toxicology*, [s.l.], v. 25, n. 9, p. 1885–1892, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1021/tx3001708>.
28. HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, [s.l.], v. 12, n. 2, p. 255-264, 2013. DOI: <https://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.19>.
29. HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [s.l.], v. 53, n. 6, p. 1841–1856, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf030723c>.
30. IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, [s.l.], v. 13, n. 10, p. 2638–2650, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1039/C1GC15386B>.

31. ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. Geneva: International Organization for Standardization, 2009.
32. JUSTINO, A. B. et al. Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with α -amylase, α -glucosidase and glycation inhibitory activities. *Bioorganic Chemistry*, [s.l.], v. 69, p. 167–182, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.11.001>.
33. JUSTINO, A. B. et al. Polyphenols from *Annona crassiflora* fruit peel: Antioxidant and antiglycation activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [s.l.], v. 65, p. 4428–4438, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01355>.
34. JUSTINO, A. B. et al. B-type procyanidins of *Annona crassiflora* fruit peel inhibited glycation, lipid peroxidation and protein-bound carbonyls. *Scientific Reports*, [s.l.], v. 9, p. 19183, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55779-3>.
35. JUSTINO, A. B. et al. Stephalagine, an aporphine alkaloid from *Annona crassiflora* fruit peel, induces antinociceptive effects by TRPA1 and TRPV1 channels modulation in mice. *Bioorganic Chemistry*, [s.l.], v. 96, p. 103562, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103562>.
36. KANG, H. et al. *Stabilization of Silver and Gold Nanoparticles: Preservation and Improvement of Plasmonic Functionalities*. *Chemical Reviews*, v. 119, n. 1, p. 664–699, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00341>.
37. KELLY, K. L. et al. The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp026731y>.
38. KOMINO, E. A. et al. *Annona crassiflora* Mart. fruit peel polyphenols preserve cardiac antioxidant defense and reduce oxidative damage in hyperlipidemic mice. **Foods**, v. 12, n. 11, 2023. <https://doi.org/10.3390/foods12112097>.
39. KROLL, A.; PILLUKAT, M. H.; HAHN, D.; SCHNEKENBURGER, J. Current *in vitro* methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 72, n. 2, p. 370–377, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.08.009>.
40. KROLL, A. et al. Interference of engineered nanoparticles with *in vitro* toxicity assays. *Archives of Toxicology*, [s.l.], v. 86, n. 7, p. 1123–1136, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0837-z>.
41. KUS-LIŚKIEWICZ, M.; FICKERS, P.; BEN TAHAR, I. Biocompatibility and cytotoxicity of gold and silver nanoparticles. *International Journal of Molecular*

- Sciences*, [s.l.], v. 22, n. 20, p. 10952, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms222010952>.
42. LINK, S.; EL-SAYED, M. A. Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, [s.l.], v. 103, n. 21, p. 4212–4217, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp984796o>.
 43. MCEWEN, J. M. et al. Synergistic sequence contributions bias glycation outcomes. *Nature Communications*, v. 12, 3316, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23625-8>.
 44. MONOPOLI, M. P. et al. Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to *in vitro* and *in vivo* biological impacts of nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, v. 133, n. 8, p. 2525–2534, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja107583h>.
 45. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *Journal of Immunological Methods*, [s.l.], v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
 46. MUJAHID, S. et al. Metallic nanoentities: Bioengineered silver and gold nanoparticles for biomedical applications. *Heliyon*, [s.l.], v. 10, p. e37481, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e37481>.
 47. NAGAI, R. et al. Detection of AGEs as markers for carbohydrate metabolism and protein denaturation. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 1-6, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3164/jcbtn.13-112>.
 48. NEL, A.; XIA, T.; MÄDLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, v. 311, n. 5761, p. 622–627, 2006. <https://doi.org/10.1126/science.1114397>.
 49. NEL, A. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature Materials*, v. 8, n. 7, p. 543–557, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmat2442>.
 50. OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [s.l.], v. 49, n. 10, p. 4619–4626, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf010586o>.
 51. PASPARAKIS, G. Gold and silver nanoparticles in biomedicine. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, [s.l.], v. 14, n. 4, p. e1817, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/wnan.1817>.
 52. PEREIRA, M. N. et al. Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart. *Industrial Crops and*

- Products, [s.l.], v. 97, p. 324–329, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.038>.
53. PENG, X. et al. Cinnamon bark proanthocyanidins as reactive carbonyl scavengers to prevent the formation of advanced glycation end-products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [s.l.], v. 56, p. 1907–1911, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf073065v>.
 54. PODGÓRSKI, R. K.; WOJASIŃSKI, M.; CIACH, T. Nanofibrous materials affect the reaction of cytotoxicity assays. *Scientific Reports*, [s.l.], v. 12, p. 1–13, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13002-w>.
 55. REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*, v. 233, p. 357–363, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33041-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33041-7).
 56. ROESLER, R.; CATHARINO, R. R.; MALTA, L. G.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, [s.l.], v. 104, n. 3, p. 1048–1054, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.017>.
 57. SANI, A.; CAO, C.; CUI, D. Toxicity of gold and silver nanoparticles: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, [s.l.], v. 26, p. 100991, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100991>.
 58. THORNALLEY, P. J. Glyoxalase I—Structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochemical Society Transactions*, v. 31, p. 1343–1348, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1042/BST0311343>.
 59. THORPE, S. R.; BAYNES, J. W. Role of the Maillard reaction in diabetes mellitus and diseases of aging. *Drugs & Aging*, v. 9, n. 2, p. 69–77, 1996. DOI: <https://doi.org/10.2165/00002512-199609020-00001>.
 60. VAŠKOVÁ, J.; KOVÁČOVÁ, G.; PUDELSKÝ, J.; PALENČÁR, D.; MIČKOVÁ, H. *Methylglyoxal Formation—Metabolic Routes and Consequences*. Antioxidants, Basel, v. 14, n. 2, p. 212, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox14020212>.
 61. WANG, W. et al. Phytochemicals from berries and grapes inhibited the formation of advanced glycation end-products by scavenging reactive carbonyls. *Food Research International*, [s.l.], v. 44, n. 9, p. 2666–2673, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.022>.
 62. XIN, Lili; WANG, Jianshu; FAN, Guoqiang; CHE, Bizhong; WU, Yanhu; GUO, Sifan; TONG, Jian. Oxidative stress and mitochondrial injury-mediated cytotoxicity induced

by silver nanoparticles in human A549 and HepG2 cells. *Environmental Toxicology*, v. 31, n. 12, p. 1691–1699, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/tox.22171>