

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

JEFFERSON ENDERLE

Avaliação da toxicidade e atividade biológica de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde com extrato da planta *Plectranthus neochilus* no modelo animal *Drosophila melanogaster*

**Uruguiana
2022**

Jefferson Enderle

Avaliação da toxicidade e atividade biológica de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde com extrato da planta *Plectranthus neochilus* no modelo animal *Drosophila melanogaster*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Elton Luís Gasparotto Denardin

Coorientador: Me. Murilo Ricardo Sigal Carriço

**Uruguaiiana
2022**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

Enderle, Jefferson

Avaliação da toxicidade e atividade biológica de nanopartículas de prata obtidas por
síntese verde com extrato da planta *Plectranthus neochilus* no modelo animal

Drosophila melanogaster / Jefferson Enderle.

38 p.

E56a

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)-- Universidade Federal do Pampa,
FARMÁCIA, 2022.

"Orientação: Elton Luís Gasparotto Denardin".

1. AgNP. 2. Síntese verde. 3. Modelo animal alternativo. 4. toxicidade. 5. Estresse
oxidativo. I. Título.

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal do Pampa

JEFFERSON ENDERLE

Avaliação da toxicidade e atividade biológica de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde com extrato da planta *Plectranthus neochilus* no modelo animal *Drosophila melanogaster*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em 2022.

Banca examinadora:



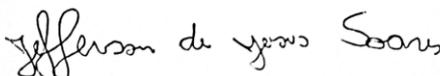
Prof. Dr. Elton Luís Gasparotto Denardin
Orientador
(UNIPAMPA)



Me. Murilo Ricardo Sigal Carriço
Co-orientador
(UNIPAMPA)



Prof. Dr. Robson Luiz Puntel
(UNIPAMPA)



Dr. Jefferson de Jesus Soares
(UNIPAMPA)

“Ao verme que primeiro roeu as frias carnes do meu cadáver, dedico estas memórias póstumas”

Trecho do livro ‘Memórias póstumas de Brás Cubas’ de Machado de Assis

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe, que lutou e esteve ao meu lado com todo apoio e carinho, a todo momento, e sob qualquer intempérie, e te ofereço meu amor eterno.

À Universidade Federal do Pampa, pelo espaço físico e pelo ensino de qualidade que me proporcionou, assim como aos professores que colaboraram direta ou indiretamente para a minha formação acadêmica.

A meu orientador Prof. Dr. Elton Denardin, por toda sua atenção e compreensão e pelos ensinamentos ao longo desta jornada acadêmica.

A meu co-orientador e amigo Murilo, por toda ajuda, amizade e parceria.

A meus amigos e colegas, que estiveram ao meu lado e me deram apoio durante todo esse tempo, a Marina Diaz, Matheus da Silva e Maria Paz, Maria Fattini e Jean de Carli, Gustavo Arns, Bruna Brondani, Augusto Dotta, Mateus Gayer, Caroline Lacerda, e a todos que fizeram parte do percurso.

A minha banca de examinadores Prof. Dr. Robson Luiz Puntel e Dr. Jefferson de Jesus Soares, pelas contribuições e toda a consideração que tiveram comigo, muito obrigado.

Resumo

As nanopartículas de prata (AgNP) são nanomateriais promissores, mas sua possível toxicidade ainda é motivo para estudo. Rotas de síntese verde foram desenvolvidas para contornar o uso do reagente tóxico borohidreto de sódio com o emprego de outro agente redutor, como os compostos fenólicos de plantas. A planta *Plectranthus neochilus* possui altos níveis de polifenóis, e plantas da mesma família já foram empregadas na síntese de AgNP, evidenciando o potencial desta planta. Com isso, o objetivo deste trabalho foi sintetizar e avaliar a atividade biológica de AgNP sintetizadas com extrato da *Plectranthus neochilus*. As AgNP foram obtidas por síntese verde usando extrato da planta *Plectranthus neochilus*. Formulações em concentrações de 0,50 a 0,10 ppm foram administradas por três dias no modelo animal *Drosophila melanogaster*, e avaliado: a mortalidade e geotaxia negativa; proteínas totais, capacidade redutora do ferro (FRAP), níveis de espécies reativas oxidantes (ERO); e atividades das enzimas catalase (CAT), glutationa s-transferase (GST) e acetilcolinesterase (AChE), da cabeça e corpo. A exposição às AgNP não gerou mortalidade. A capacidade de escalada aumentou pela exposição às AgNP, que pode ser causado pela diminuição da atividade da AChE na cabeça, que aumentaria a quantidade de acetilcolina na fenda sináptica e com isso o estímulo excitatório e comportamental. A disponibilidade de agentes redutores avaliada pelo FRAP e os níveis de ERO se mostraram diminuídos, principalmente para as amostras da cabeça dos grupos tratados com as AgNP. Isso pode ser atribuído à capacidade catalítica das AgNP, que ao acelerar a reação de neutralização das ERO levam a diminuição das espécies oxidantes, mas também dos agentes redutores disponíveis. A atividade da CAT nas cabeças também foi diminuída, e pode estar relacionada a diminuição de substrato, o peróxido de hidrogênio, levando a uma resposta de regulação negativa. A atividade da GST na cabeça diminuiu pela exposição às as AgNP, e este resultado vai de encontro a outros achados sobre a exposição a nanopartículas de prata, as quais causam uma diminuição da expressão de RNA mensageiro para a produção desta enzima, e consequentemente sua atividade. Os níveis de proteínas totais se mantiveram inalterados para as amostras do corpo, mas se mostraram aumentados nas cabeças no grupo tratado com a formulação de AgNP 0,50 ppm, podendo ser causados por uma resposta imune de mobilização de células e proteínas frente ao desbalanço redox. Com isso concluímos que as AgNP não geraram mortalidade no modelo animal. A exposição às AgNP diminuiu a atividade da enzima AChE levando a maior excitabilidade e aumento da atividade locomotora. As AgNP diminuíram as taxas de espécies reativas oxidantes, mas também na disponibilidade de espécies redutoras no organismo, sugerindo uma atividade catalítica sob as reações de neutralização das ERO. Também diminuindo a atividade de enzimas relacionadas ao mecanismo antioxidante e detox do organismo como a CAT, e GST. Os resultados mais expressivos foram na cabeça dos grupos expostos as AgNP, e por mais que tenha apresentado resposta de diminuição dos agentes pró-oxidantes, a diminuição das barreiras antioxidantes naturais do organismo é motivo de atenção.

Palavras-chave: 1. AgNP; 2. Síntese verde; 3. Modelo Animal Alternativo; 4. Toxicidade; 5. Estresse oxidativo.

Abstract

Silver nanoparticles (AgNP) are promising nanomaterials, but its potential toxicity is still to be fully known. Green synthesis routes were developed to circumvent the use of the toxic sodium borohydride reagent with the use of another reducing agent, such as phenolic compounds from plants. *Plectranthus neochilus* has high levels of polyphenols, and plants of the same family have already been used in the synthesis of AgNP, evidencing its potential. Thus, the objective of this work was to and evaluate the biological activity of AgNP synthesized with *Plectranthus neochilus* extract. AgNP were obtained by green synthesis using extract from the plant *Plectranthus neochilus*. Formulations at concentrations of 0.50 to 0.10 ppm were administered for three days in the animal model *Drosophila melanogaster*, then evaluated mortality and negative geotaxis; total proteins, iron reducing capacity (FRAP), levels of oxidizing reactive species (ROS); and activities of catalase enzymes (CAT), glutathione s-transferase (GST) and acetylcholinesterase (AChE), from head and body. Exposure to AgNP did not generate mortality. The climbing ability increased by exposure to AgNP, which can be caused by decreased AChE activity in the head, which would increase the amount of acetylcholine in the synaptic cleft and thereby the excitatory and behavioral stimulus. The availability of reducing agents evaluated by FRAP and the levels of ROS are shown to be decreased, mainly for the head samples of the groups treated with AgNP. This can be attributed to the catalytic capacity of the AgNP, which by accelerating the neutralization reaction of oxidizing species, but also of the available reducing agents. Head CAT activity has also been decreased, and may be related to substrate decrease, hydrogen peroxide, leading to a negative regulation response. The activity of GST in the head decreases by exposure to the AgNP, and this result is in response to other findings about exposure to silver nanoparticles, which cause a decrease in the expression of messenger RNA to produce this enzyme, and consequently its activity. Total protein levels remained unchanged for body samples but were increased in the heads in the group exposed to AgNP 0.50 ppm and may be caused by an immune response of mobilization of cells and proteins in the face of redox imbalance. Thus, we concluded that the AgNP did not generate mortality in the animal model. Exposure to AgNP decreases AChE activity leading to greater excitability and increased locomotor activity. AgNP decreased rates of oxidizing reactive species, but also the availability of reducing species in the organism, suggesting a catalytic activity under the neutralization reactions of ROS. Also decreasing the activity of enzymes related to the antioxidant and detox mechanism such as CAT, and GST. The most expressive results were in the head of the groups exposed to AgNP, and although it presented a decrease of pro-oxidant agents, the reduction of the body's natural antioxidant barriers is a point for further investigation.

Keywords: 1. AgNP; Green synthesis; 3. Alternative animal model; 4. Toxicity; 6. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Espectro de absorvância da mistura de reação das AgNP..... pág. 26
- Figura 2. Curva da sobrevivência da *Drosophila melanogaster* expostas por 3 dias a diferentes concentrações da formulação de AgNP..... pág. 27
- Figura 3. Moscas expostas a diferentes formulações de AgNP. Níveis de proteínas por corpo e por cabeça; Ensaio do FRAP, representado em microgramas equivalentes de ácido ascórbico por miligrama de proteína do corpo e cabeça; Espécies reativas oxidantes em unidades de fluorescência por miligrama de proteína do corpo e cabeça..... pág. 28
- Figura 4. Atividade da GST em variação de absorvância em 1 minuto por miligrama de proteína do corpo e cabeça das moscas do ensaio de exposição as AgNP; (C) Atividade da catalase em variação de absorvância em um minuto de cinética por miligrama de proteína de cabeça..... pág. 29
- Figura 5. Atividade da enzima Acetilcolinesterase nas amostras do corpo (A) e cabeça (B) em variação de absorvância por miligrama de proteína. Geotaxia negativa (C) em tempo de escalada até a marca de 14 cm..... pág. 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da dieta administrada para cada grupo no ensaio de exposição da *Drosophila melanogaster* as AgNP pág. 21

LISTA DE ABREVIATURAS

AgNP - Nanopartículas de Prata

FRAP - Potencial redutor do íon ferro (III)

ERO - Espécies Reativas Oxidantes

CAT – Enzima Catalase

GST – Enzima Glutathiona S-Transferase

AChE – Enzima Acetilcolinesterase

DA – Doença de Alzheimer

DLS – Técnica de espalhamento de luz dinâmico

DCF - 2',7'-,,-dichlorofluoresceína

DCF-DA - diacetato de 2',7'-,,-dichlorofluoresceína

TPTZ - Tripiridiltriazina

DTNB - Ácido 5',5' -ditthiobis-2-nitrobenzóico

CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

SUMÁRIO

1. INTRODUCTION	13
2. OBJETIVOS GERAIS	15
3. JUSTIFICATIVA	13
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
5. MATERIAIS E MÉTODOS	21
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
7. CONCLUSÃO.....	32
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	33
9. REFERENCIAS	34
10. APÊNDICE	34

1. INTRODUÇÃO

O estudo das nanopartículas de prata (AgNP) ganha cada vez mais espaço na pesquisa, e aplicações na área biomédica são cada vez mais exploradas devido a suas características químicas, físicas como sua morfologia cristalográfica, área e carga superficiais. Os primeiros estudos atentando a este tipo de aplicação das AgNP dizem respeito a seu potencial antimicrobiano, e a partir daí, chamou a atenção de pesquisadores para aprofundar o seu estudo, e buscar novas possíveis aplicações para este nanomaterial tão promissor em diversas áreas, como na indústria têxtil, na indústria alimentícia, no tratamento de feridas e queimaduras (KALANTARI et al., 2020), câncer (HUY et al., 2020) e de doenças neurodegenerativas (NAZEM; MANSOORI, 2008).

Ao mesmo tempo que se busca novas aplicações, também é importante aperfeiçoar seus métodos de obtenção, buscando rotas mais seguras, com menor produção de resíduos tóxicos tanto para segurança do uso como para minimizar seu impacto ambiental. O uso das chamadas rotas de síntese verde é interessante uma vez que substitui o agente redutor mais comum, o Boro-hidreto de sódio, por reagentes mais seguros e ambientalmente amigáveis. (HUQ et al., 2022).

A *Plecthrantus neochilus* é uma planta herbácea rasteira, conhecida popularmente como “Boldo”, “Boldo-gambá”, “Boldinho” ou “boldo da folha miúda”, e vastamente utilizada na medicina popular para tratar problemas de má digestão e insuficiência hepática (RAMBORGER et al. 2020). Possui confirmado potencial antioxidante, relacionado principalmente com a presença de polifenóis como os ácidos fenólicos e flavonoides (JE; BELMARES R; CN, 2013). Com isso em mente, o extrato do Boldo apresenta grande potencial na síntese das nanopartículas de prata, por sua capacidade redutora.

O modelo animal *Drosophila melanogaster* vem sendo amplamente utilizado para estudos bioquímicos e toxicológicos, devido a seu baixo custo de manutenção, curto ciclo de vida, rápida reprodução e por ter seu genoma já muito bem mapeado e descrito na literatura, proporcionando agilidade, praticidade e reprodutibilidade Inter-laboratorial. Isso propicia a avaliação da toxicidade de novos compostos, e permite o estudo da capacidade locomotora, do perfil redox, da atividade de enzimas envolvidas no processo de estresse oxidativo, na metabolização de xenobióticos, ou neurotransmissores (HOSAMANI; MURALIDHARA, 2013; ONG et al., 2015).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é avaliar se as nanopartículas de prata sintetizadas com extrato da planta *Plecthrantus neochilus* apresentam toxicidade frente ao modelo experimental *Drosophila melanogaster* e avaliar sua atividade no perfil locomotor, bioquímico e enzimático neste organismo.

2. OBJETIVOS GERAIS

Verificar se a exposição as formulações de AgNP sintetizadas com extrato de *Plectranthus neochilus* testadas geram toxicidade no modelo animal, e quais são suas influências sobre parâmetros comportamentais, bioquímicos e enzimáticos na *Drosophila melanogaster*.

2.1 Objetivo específico.

Avaliar se ocorre mortalidade nos grupos expostos às formulações de AgNP em comparação ao controle;

Verificar a capacidade locomotora das moscas frente à exposição as AgNP;

Avaliar os níveis de espécies reativas oxidantes e potencial de redução nas amostras das moscas expostas as AgNP;

Determinar a atividade enzimática das enzimas CAT, GST e AChE nas moscas frente a exposição as AgNP.

3. JUSTIFICATIVA

As nanopartículas de prata vêm demonstrando grande potencial na área biomédica, e ao mesmo tempo que se estuda novos métodos de obtenção mais seguros e possíveis aplicações para este nano material, os estudos a respeito de sua toxicidade também se mostram necessários.

Seu método de síntese tradicional faz uso do reagentes mais tóxicos como borohidreto de sódio (NaBH_4) e os métodos de síntese verde buscam solucionar ou minimizar este efeito, com o uso de um agente redutor menos tóxico, como os compostos fenólicos presentes em plantas. Em função disso, a planta *Plectranthus neochilus*, por possuir altos níveis destes compostos, e outras espécies da mesma família já terem sido utilizadas para a síntese de AgNP, se mostra uma alternativa em potencial ao convencional NaBH_4 , e os efeitos de sua exposição ao organismo devem ser avaliados.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Nanopartículas de Prata

Nano é um termo usado com qualquer unidade de medida, significando um bilionésimo dessa unidade, por exemplo, um nanômetro equivale a um bilionésimo de um metro (um nanômetro é igual a $1/1.000.000.000$ m) ou aproximadamente a distância ocupada por cerca de 5 a 10 átomos (MATTOSO; DURÁN; MORAIS, 2006). A organização internacional de padronizações define nanopartículas como um nano objeto com todas as três dimensões na escala nanométrica (BOVERHOF et al., 2015). Os materiais nanoparticulados vêm sendo estudados desde o desenvolvimento da microscopia eletrônica, ainda na década de 80, e a possibilidade de visualizá-los a nível atômico abriu portas para seu estudo (OTRANTO, G.; GOLDMAN, A. 2012).

O estudo das nanopartículas de prata (AgNP) ganha cada vez mais espaço na pesquisa, e aplicações na área biomédica são cada vez mais exploradas devido a suas características químicas e físicas como sua morfologia cristalográfica, assim como área e carga superficiais. Os primeiros achados a respeito da aplicação das AgNP estão atrelados a seu potencial antimicrobiano, e a partir daí chamou a atenção de pesquisadores para aprofundar seu estudo e buscar novas possíveis aplicações para este nanomaterial tão promissor, como no tratamento de feridas e queimaduras (KALANTARI et al., 2020), de doenças proliferativas como câncer (HUY et al., 2020), e de doenças neurodegenerativas (NAZEM; MANSOORI, 2008).

4.2 Síntese Verde

Ao mesmo tempo que se busca novas aplicações para as AgNP, também é importante aperfeiçoar seus métodos de obtenção, buscando rotas mais seguras, com menor produção de resíduos tóxicos tanto para segurança do uso como para minimizar seu impacto ambiental. O uso das chamadas rotas de síntese verde é interessante uma vez que substitui o agente redutor mais comum, o Boro-hidreto de sódio, por reagentes mais seguros e ambientalmente amigáveis, como é o caso de extratos de plantas que possuam capacidade redutora satisfatória para transformar a prata iônica em prata metálica no tamanho nano. (HUQ et al., 2022).

Algumas espécies da família *Plectranthus* já demonstraram capacidade de redução e obtenção de nanopartículas de prata (AJITHA; ASHOK KUMAR REDDY; SREEDHARA REDDY, 2014; ZHENG et al., 2016; AMINA et al., 2018), e sua atividade antimicrobiana e catalítica. Mas não foram encontrados testes com a *Plectranthus neochilus*, que por seu teor de compostos fenólicos demonstra pleno potencial para produção de AgNP, e sua atividade no organismo deve ser avaliada.

4.3 *Plectranthus neochilus*

Plectranthus neochilus é uma planta popularmente conhecida como "Boldo", "Boldo gambá" ou "Boldinho", é uma planta herbácea amplamente utilizada na medicina tradicional como chá para tratamento de indigestão. É usado no tratamento de infecções de pele, doenças respiratórias, insuficiência hepática, potencial antibacteriano, antiesquistossomótico e inseticida. [Caixeta et al. 2011; Baldin et al 2013; Crevelin et al. 2015). Ramborger e colaboradores (2020) mostraram os diferentes usos desta planta através de estudos e fins ornamentais, além dos compostos identificados em diferentes tipos de extração de *P. neochilus*.

O chá (ou infusão), é uma das bebidas medicinais mais consumidas e tradicionais do mundo (Rodrigues et al. 2015) além de ser uma das bebidas mais antigas já registradas na literatura. Segundo Nishiyama et al. (2010), o potencial medicinal dos chás se deve às propriedades funcionais dos compostos bioativos presentes nas plantas. Esses compostos, por sua vez, são resultantes do metabolismo secundário dos vegetais e são responsáveis pelo seu sistema de defesa e sua adaptação ao meio ambiente. Nesse sentido, despertam grande interesse, não só pelas atividades biológicas desempenhadas pelas plantas em resposta a estímulos ambientais, mas também pela imensa atividade farmacológica que possuem, com destaque para os compostos fenólicos que desencadeiam o potencial antioxidante de diversos chás (Pereira e Cardoso. 2012).

Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxila, incluindo grupos funcionais (Rocha et al. 2011). Esses compostos incluem fenóis glicosilados simples e outros, ácidos fenol-carboxílicos, derivados de ácido benzóico e cinâmico, cumarinas e isocumarinas, ligninas, flavonóides (flavonas, antocianinas e catequinas) e quinonas (Stangarlin et al. 2011). No grande grupo de compostos fenólicos, flavonóides e ácidos fenólicos são os mais

proeminentes e são considerados os antioxidantes mais comuns de fontes naturais (Broinizi et al. 2007). De acordo com Morais et al (2009) esses compostos são capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, ou espécies reativas, conhecidas como radicais livres.

Esses radicais livres, ou espécies reativas, são originários de processos biológicos que ocorrem naturalmente em organismos (animais e plantas), como a respiração celular, e envolve várias organelas (Soares, 2002). Eles têm funções biológicas como fagocitose e apoptose celular (Hirata, 2004). Por outro lado, segundo Silva (2014), sua produção de forma exagerada pode causar diversos danos ao organismo. Esse desequilíbrio em sua produção pode levar a diversas disfunções biológicas como hipertensão, câncer, diabetes e doenças neurodegenerativas. Uma forma de diminuir a produção de espécies reativas nos organismos é através do consumo de antioxidantes naturais e isso pode ser feito através do consumo de chá (Morais et al. 2009) o que já foi associado a uma menor incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (Dröge, 2002).

Em contrapartida, as altas concentrações necessárias para que os extratos ou infusões de *P. neochilus* exerçam efeito são muito altas (RAMBORGER et al., 2017; RIJO et al., 2014; VIANA, 2011). Desta forma, ao mesmo tempo que exerce efeito antioxidante in vitro, pode proporcionar toxicidade aos organismos que o ingerirem (RAMBORGER et al., 2021). Uma estratégia para contornar este fator, é o uso de nanopartículas verdes, uma vez que exercem sua atividade antioxidante em concentrações muito menores (BEDLOVIČOVÁ et al., 2020). A nanotecnologia tem ganhado importância no cenário atual, caminhando em sentido semelhante ao uso de produtos naturais.

4.4 *Drosophila melanogaster*

O modelo animal *Drosophila melanogaster* vem sendo amplamente utilizado para estudos bioquímicos e toxicológicos, devido a seu baixo custo de manutenção, curto ciclo de vida, rápida reprodução e por ter seu genoma já muito bem mapeado e descrito na literatura, proporcionando agilidade, praticidade e proporcionando fácil reprodutibilidade e troca de ideias inter-laboratoriais na pesquisa.

Isso propicia a avaliação da toxicidade de novos compostos, e permite o estudo da capacidade locomotora, do perfil redox, da atividade de enzimas envolvidas no processo de estresse oxidativo, na metabolização de xenobióticos, ou de neurotransmissores (HOSAMANI; MURALIDHARA, 2013; ONG et al., 2015).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Obtenção do material vegetal

A planta (*P. neochilus*) FOI coletada nas dependências da Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brasil (-29.830897, -57100322), identificada e registrada pelo herbário da universidade. O nome da planta foi verificado e confirmado em “The Plant List” do site (<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-158340>). Para as análises foram utilizadas as folhas coletadas entre julho e agosto de 2022, para posterior secagem em estufa a 50 °C seguida. Após seca, a massa das folhas de *P. neochilus* foram moídas em moinho de facas e armazenadas a temperatura ambiente (± 22 C) privado de luz, até a preparação dos extratos.

5.2 Síntese de nanopartículas de prata a partir de extratos de *P. neochilus*.

Os extratos de *P. neochilus* foram preparados utilizando 3,5 g de material foliar seca em 100 mL de solução hidroalcoólica, utilizando como solvente de extração uma proporção 25:75 (etanol: água), em agitação constante durante 16 horas. Em seguida, os extratos foram filtrados a vácuo e utilizados imediatamente para a síntese das nanopartículas.

As AgNPs foram sintetizadas em Erlenmeyer de 250 mL através da mistura de 10 mL de extrato com 40 mL de água e gotejamento lento de 50 mL de nitrato de prata 1 mM em agitação constante, em seguida estocada a 55 °C em agitação constante de 150 RPM por 48 horas, todo o processo foi realizado como irradiação de diodos emissores de luz (LED) na cor roxa, pelo fato de menores comprimentos de onda da luz propiciam a produção de AgNP (DARROUDI et al., 2011). Para a confirmação da formação das AgNP o espectro UV-Vis das formulações foi analisado verificando o perfil de absorção na banda característica das AgNP entre 400 e 500 nm, e o tamanho de partícula hidrodinâmico e valor de poli-dispersão da formulação foram obtidos por espalhamento dinâmico de luz (DLS) (n = 3). A mistura de reação obtida foi utilizada para os tratamentos posteriores, e estocadas por no máximo 2 dias.

5.3 Estoque, criação e reprodução da *Drosophila melanogaster*.

A *Drosophila melanogaster* do tipo selvagem foram obtidas do National Species Stock Center, Bowling Green, OH, EUA. As moscas foram criadas em meio padrão de farinha de milho com grânulos de levedura como fonte de proteína em temperatura e umidade constantes

($22 \pm 1^\circ\text{C}$; 60% de umidade relativa, respectivamente) e sob um ciclo de 12 horas escuro/12 horas claro.

5.4 Curva de sobrevivência das AgNP

Para determinar a taxa de sobrevivência, 20 moscas adultas de 1 a 4 dias de idade foram transferidas para tubos adaptados para o método da dieta líquida contínua segundo SOARES et al. (2017), e ficaram sob dieta padrão (1% sacarose + 1% leite em pó) por um dia de adaptação. A partir de então, foram expostas por 3 dias a 9 diferentes concentrações da formulação obtida de AgNPs (0,50; 0,45; 0,40; 0,35; 0,30; 0,25; 0,20; 0,15; 0,10 ppm) misturadas à dieta padrão e avaliadas pela contagem do número de moscas mortas diariamente até o final do período experimental ($n = 3$). Ao final dos tratamentos, o número de moscas mortas foi registrado, expresso em porcentagem e comparados ao do grupo controle.

5.5 Exposição às AgNP

Para obter moscas para os ensaios de: Geotaxia negativa; Proteínas Totais; Atividade enzimática da GST, AChE e CAT; E para os ensaios de redução do íon ferro (FRAP) e de espécies reativas oxidantes (ERO). 20 moscas adultas de 1 a 4 dias de idade foram transferidas para tubos adaptados para a dieta líquida contínua, e ficaram sob dieta padrão (1% sacarose + 1% leite em pó) por um dia de adaptação.

CN	AgNP 0,50 ppm	AgNP 0,10 ppm
1% Sacarose	1% Sacarose	1% Sacarose
1% Leite em pó	1% Leite em pó	1% Leite em pó
	AgNP 0,50 ppm	AgNP 0,10 ppm

Tabela 1. Composição da dieta administrada para cada grupo no ensaio de exposição da *Drosophila melanogaster* as AgNP.

Os testes foram realizados de acordo com os seguintes grupos: Controle, AgNP 0,50 ppm, AgNP 0,10 ppm ($n = 7$), conforme composição da dieta na tabela 1, com exposição

durante 3 dias. Ao final dos tratamentos, o número de moscas mortas foi registrado, e parte das moscas vivas foram usadas para o ensaio de geotaxia, e parte congeladas e armazenadas a -70°C por até dois dias para os ensaios bioquímicos.

5.6 Geotaxia Negativa

A capacidade locomotora das moscas foi determinada usando o teste comportamental de geotaxia negativa descrito por GARGANO e colaboradores (2005) com modificações. Dez moscas por replicata são submetidas a crio-estesia e transferidas para tubos de ensaio (14 cm de altura, 2 cm de diâmetro) e tapados com esponja. Após dez minutos para recuperação das moscas, os tubos são batidos para que todos os indivíduos fossem para o fundo do tubo, e então marcou-se o tempo que as moscas levaram para alcançar a marca de 14 cm. O procedimento é repetido 3 vezes, e os resultados são expressos como a média das repetições para cada replicata ($n = 3$).

5.7 Preparo dos homogeneizados

A região da cabeça foi separada do corpo das moscas do ensaio de exposição às AgNP, mantendo as moscas sobre placa de gelo, com o uso de um bisturi cirúrgico. Posteriormente, 20 cabeças e corpos foram contados e homogeneizados separadamente em microtubos com 200 μL de tampão fosfato (TFK) 50 mmol/L (pH 7,5), o homogeneizado foi centrifugado a $3000 \times g$ por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi diluído 5 vezes para as amostras da cabeça e 10 vezes para as amostras do corpo, e utilizados para os ensaios bioquímicos e enzimáticos [Proteínas Totais, ERO, FRAP, GST e AChE] (HOSAMANI; MURALIDHARA, 2013).

5.8 Determinação de proteínas totais

Os teores de proteínas foram determinados por método fotométrico descrito por BRADFORD (1976), que utiliza o azul de Comassie como corante das proteínas e a resposta das amostras são comparadas com as da curva de albumina.

5.9 Determinação de Espécies Reativas Oxidantes (ERO)

Os níveis de ERO foram determinados pela oxidação do diacetato de 2',7', -dichlorofluoresceína (DCF-DA). 20 μL de amostra foram transferidos para placa de micro poços, e misturados com 170 μL de tampão fosfato (pH 7,4) e 10 μL do reagente DCF-DA 1

mM. Os resultados dos valores de emissão da fluorescência gerada pelo DCF formado pela oxidação do DCF-DA foram monitorados por 1 hora com comprimentos de onda de excitação de 485 nm e de emissão em 530 nm. Resultados foram adquiridos, e comparados com os do grupo controle (n = 6).

5.10 Determinação do potencial de redução do íon ferro III (FRAP)

A capacidade das amostras em reduzir o complexo tripiridiltriazina (TPTZ) -Fe(III) foi medida de acordo com BENZIE E SZETO (1999). Foi misturado 20 µL de amostra e 180 µL da solução reagente e incubadas por 15 min a 37°C. As absorbâncias foram medidas a 593 nm, e comparadas com as obtidas a partir da curva de ácido ascórbico, e os resultados foram expressos em µg equivalente de ácido ascórbico por mililitro por miligrama de proteína (n = 6).

5.11 Determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da enzima foi verificada segundo PARK et al. (2012), no qual 10 µL de amostra foi pego e adicionado 100 µL de mistura reacional contendo tampão fosfato 0,25 M (pH 8,0) e 5 M de ácido 5',5' -ditthiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), 70 µL de água destilada e 20 µL de acetilcolina 8 mM. A cinética reacional foi conduzida por 2 minutos as absorbâncias foram medidas em 412 nm e a atividade da enzima representada por variação de absorbância por miligrama de proteína. (n = 3).

5.12 Determinação da atividade da enzima glutathiona s-transferase (GST)

O experimento foi conduzido conforme HABIG (1981), usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A mistura reacional foi composta de 20 µL de amostra em tampão TFK (pH 7,4), 1 mM GSH e 1 mM CDNB. A reação foi monitorada pela absorbância a 340 nm por 3 minutos com 15 segundos de intervalo a temperatura ambiente (~25°C). A atividade da enzima foi expressa em variação de absorbância por miligrama de proteína (n = 3).

5.13 Determinação da atividade da enzima catalase (CAT)

Foi misturado 10 μL da amostra com 180 μL de tampão fosfato (pH 7) e 10 μL de peróxido de hidrogênio padronizado para iniciar a reação. Então a cinética ocorreu por dois minutos, e ao final as absorbâncias foram lidas em 240nm para verificar a taxa de reação (n = 6).

5.14 Análise estatística

Para todos os ensaios, os valores obtidos em cada grupo foram comparados usando ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Comparações Múltiplas de Tukey. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ (*). Os resultados *in vivo* e *ex vivo* foram expressos como \pm S.E.M. Para realizar a análise estatística e construção dos gráficos foi utilizado o GraphPad Prism 5.0.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A síntese das AgNP com o extrato hidroalcolico de *plectranthus neochilus* foi confirmada pela absorvância do espectro UV-VIS da mistura de reação na faixa característica das nanopartículas de prata entre 400 e 500 nm (Figura 1), sendo a concentração de prata na mistura de reação igual a 0,5 ppm. Seu tamanho de partícula médio é de $86,83 \pm 0,58$ nm caracterizando o produto obtido em nanopartículas propriamente ditas, e valor de poli dispersão de $0,1900 \pm 0,0058$, demonstrando homogeneidade satisfatória ($0,1 > 0,5$), obtidos pela técnica de DLS. Este valor vai de encontro a diversos outros estudos que avaliam a atividade biológicas das AgNP nos coloca no caminho para compreensão de sua influência sob os organismos vivos.

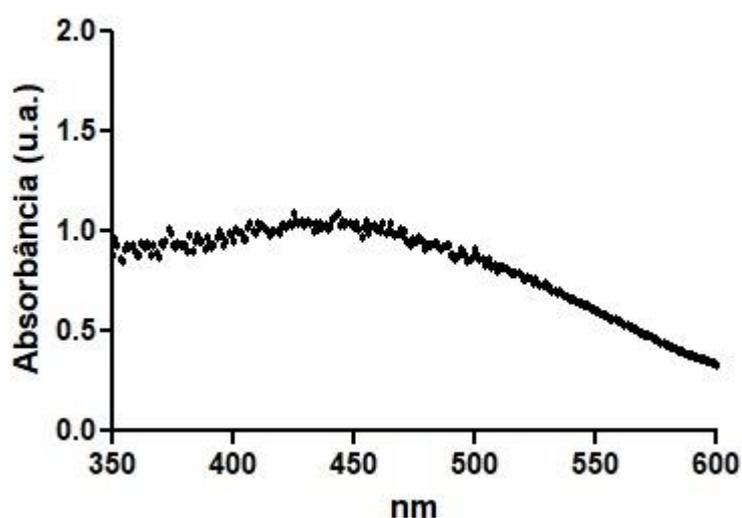


Figura 1. Espectro de absorvância da mistura de reação das AgNP.

Na curva de sobrevivência na *Drosophila melanogaster*, nenhuma dos grupos alimentados com AgNP apresentou sobrevivência diferente estatisticamente com relação ao grupo controle após os 3 dias. Isso demonstra que, a exposição às diferentes concentrações da formulação não gerou mortalidade, sendo um ponto em favor da não toxicidade das AgNP nessas condições.

Vale relembrar a ideia de janela terapêutica, que é a faixa segura de exposição de um organismo a um composto, mas em quantidade suficiente para apresentar atividade

biológica. O que pode ser o caso das AgNP, que não geraram mortalidade, mas causaram alterações bioquímicas e comportamentais como veremos a seguir.

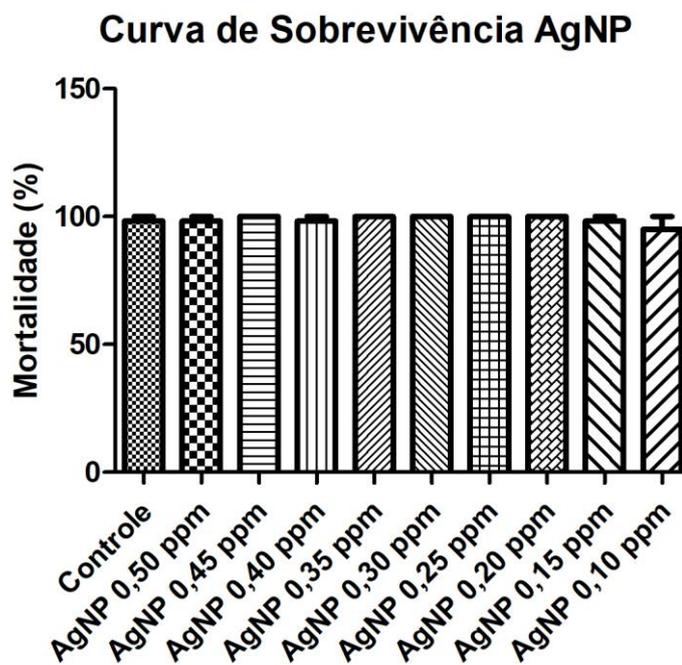


Figura 2. Curva da sobrevivência da *Drosophila melanogaster* expostas por 3 dias a diferentes concentrações da formulação de AgNP.

Os níveis de proteínas totais (Figura 3) obtido para as amostras do corpo das moscas nos grupos alimentados com AgNP não apresentaram diferença em relação ao grupo controle, enquanto para as amostras da cabeça, o grupo exposto à formulação na concentração de 0,50 ppm teve o teor de proteínas aumentado, com o perfil do gráfico sugerindo um comportamento dose-dependente. Este aumento pode estar relacionado com respostas imunológicas e expressão de proteínas “heat shock”, induzidas em resposta ao desbalanço redox do organismo, no qual a mobilização de células de defesa e a maior expressão de proteínas aumentariam as taxas proteicas no tecido (MORROW; TANGUAY, 2003).

Para as amostras do corpo das moscas, no ensaio de redução do íon ferro (FRAP), o qual ajuda a avaliar os níveis e disponibilidade das defesas antioxidantes atuantes no organismo, os grupos alimentados com a formulação de AgNP 0,10 ppm apresentaram potencial de redução significativamente reduzido enquanto os grupos da concentração de 0,50 ppm não apresentam diferença com o grupo controle (Figura 3). Ao mesmo tempo, a avaliação das espécies reativas oxidantes (ERO) seguiu a mesma tendência, se apresentando

aumentadas nos grupos expostos à formulação de AgNP 0,10 ppm, mas não apresentou alteração no grupo da formulação de AgNP 0,50 ppm. Podendo ser resultado de aumento nas interações entre as próprias nanopartículas da formulação que concentrações maiores de AgNP podem apresentar, reduzindo suas interações com as moléculas e componentes do organismo e com isso sua atividade biológica (ZHOU et al., 2012).

Para as amostras da cabeça das moscas, os grupos de ambas as concentrações da formulação de AgNP apresentaram reduzido potencial redutor frente ao ensaio de FRAP igualmente, e taxas de espécies reativas oxidantes diminuídas. Isso aponta para uma atividade das AgNP sob os níveis redox mais expressiva para a cabeça das moscas, sugerindo uma maior tendência de ação nessa região.

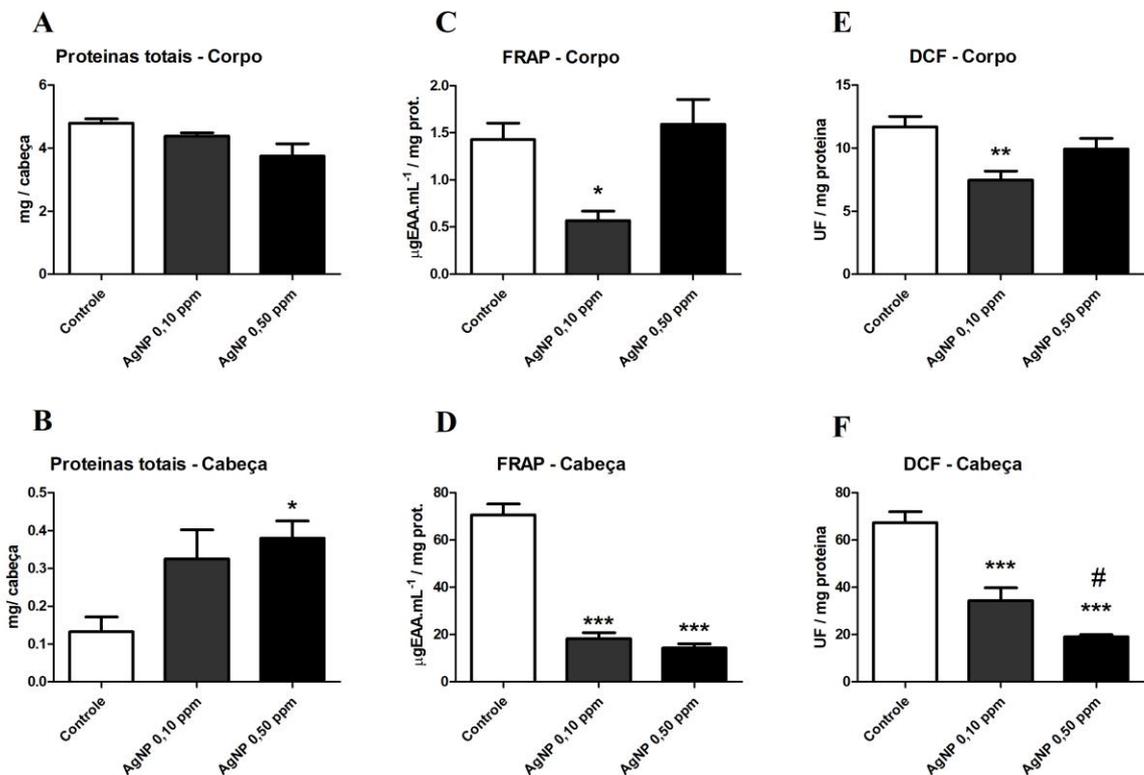


Figura 3. Níveis de proteínas por corpo (A) e por cabeça (B); Ensaio do FRAP, representado em microgramas equivalentes de ácido ascórbico por miligrama de proteína do: (C) Corpo e (D) Cabeça; Espécies reativas oxidantes em unidades de fluorescência por miligrama de proteína do: (E) Corpo e (F) Cabeça. (*, ** e *** são diferenças estatisticamente relevantes ao grupo controle com valores de p igual ou menor: a 0,05; 0,01 e 0,001, respectivamente, e # é diferença entre os grupos de diferentes concentrações de AgNP, $p < 0,05$).

A redução concomitante das defesas antioxidantes e da taxa de espécies reativas oxidantes pode ser explicada pela atividade catalítica das AgNP, que estariam acelerando as reações de neutralização destas espécies oxidantes, reduzindo seus níveis ao mesmo tempo que reduzindo os níveis de espécies redutoras do organismo. Assim como a própria capacidade antioxidante das AgNP pode estar desempenhando atividade sob as ERO.

Além disso, a atividade da CAT também é diminuída na cabeça nas moscas tratadas com AgNP na concentração de 0,50 ppm (Figura 4). A enzima catalase é responsável por decompor o H_2O_2 , uma espécie reativa de oxigênio capaz de causar dano oxidativo e celular ao organismo, transformando-o em oxigênio e água, e a diminuição da concentração de seu substrato poderia estar regulando negativamente a necessidade desta enzima e com isso sua expressão e atividade.

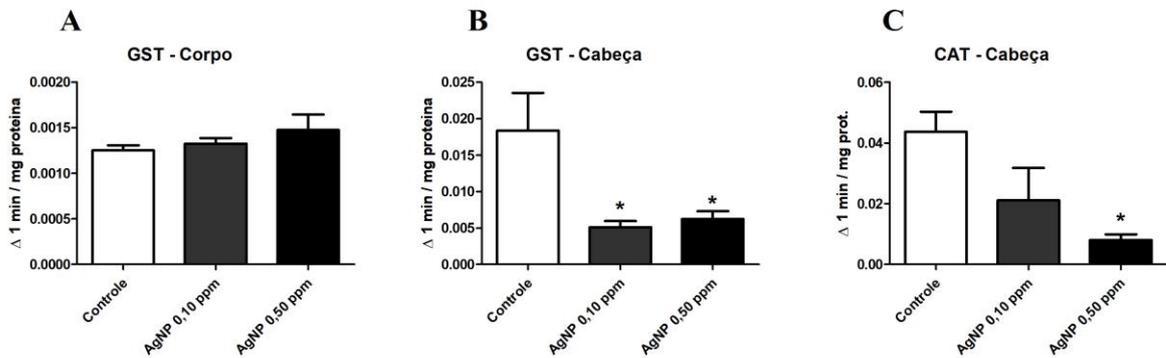


Figura 4. Atividade da GST em variação de absorvância em 1 minuto por miligrama de proteína do corpo (A) e cabeça (B); (C) Atividade da catalase em variação de absorvância em um minuto de cinética por miligrama de proteína. (* = diferença estatisticamente relevante ao grupo controle com valor de $p < 0,05$).

Os níveis de GST (Figura 4) se mostraram não alterados para as amostras do corpo em nenhum dos grupos enquanto para as da cabeça, se encontraram diminuídos para os grupos expostos às AgNP para ambas as concentrações de 0,50 e 0,10 ppm. A diminuição da atividade da GST observada vai de encontro ao artigo de NAIR e CHOI (2011) que demonstra que, em modelo animal *Chironomus riparius*, a exposição a AgNP por 72 horas diminui significativamente a expressão de mRNA de diversas variantes da GST com mais de 40% de similaridade com as da *Drosophila melanogaster*, consequentemente diminuindo sua

produção e a atividade. Este comportamento pode estar atrelado ao equilíbrio da homeostase redox, uma vez que a GST está envolvida além da metabolização de xenobióticos, também atuam na conjugação de produtos da peroxidação lipídica, gerados especialmente em períodos de estresse oxidativo (LEAVER; GEORGE, 1998).

Foi evidenciado que a exposição às AgNP causa uma redução na geotaxia negativa em *Drosophila melanogaster*, e por mais que não se conheça o exato mecanismo de impedimento da habilidade de escalada gerado, esse comportamento da mosca está atrelado ao sistema nervoso, e é sensível a fatores como o estresse oxidativo (SINGH et al., 2021). Outros estudos com este modelo evidenciaram taxas de geotaxia negativa inversamente proporcionais à concentração de AgNP na dieta, sugerindo uma atividade inibidora deste comportamento ou danos no sistema locomotor da mosca (SILVER KEY et al., 2011).

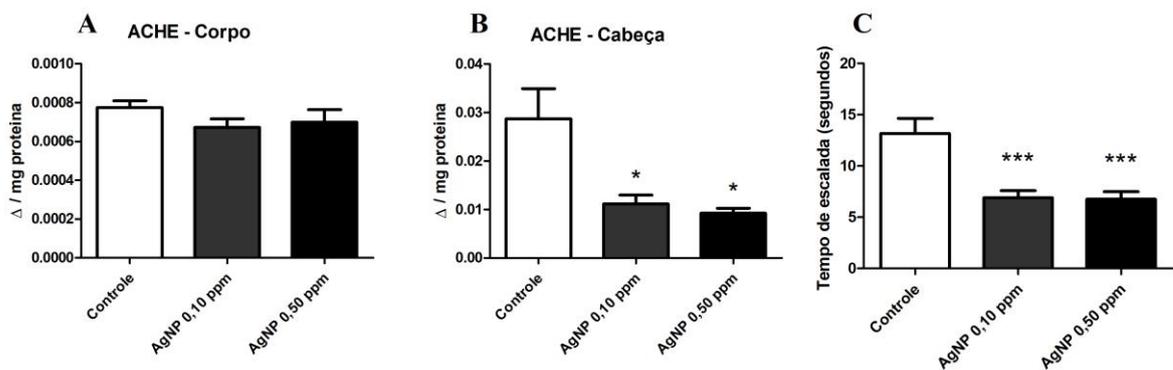


Figura 5. Atividade da enzima Acetilcolinesterase nas amostras do corpo (A) e cabeça (B) em variação de absorbância por miligrama de proteína. Geotaxia negativa (C) em tempo de escalada até a marca de 14 cm.

Ao contrário destes resultados, para as moscas expostas às AgNP obtidas com extrato de *P. neochilus* foi evidenciado um aumento na taxa de geotaxia negativa com a diminuição do tempo em que as moscas demoram para se locomover até a altura da marca, e ao mesmo tempo uma diminuição da atividade da enzima acetilcolinesterase nas amostras da cabeça. Segundo IORJIM et al. (2020), a inibição desta enzima atrasa o metabolismo da acetilcolina, prolongando a exposição de células pós-sinápticas a este neurotransmissor gerando uma resposta excitatória, diretamente relacionada a este comportamento locomotor da mosca, mas sob aumento excessivo desta estimulação, acontece uma resposta regulatória de bloqueio desta atividade nervosa, levando a um decréscimo da atividade locomotora.

Inibidores da AChE já são utilizados no tratamento de doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer (DA), mas estes compostos disponíveis não são tão eficazes e apresentam certa toxicidade (MARUCCI et al., 2021). As AgNP poderiam então ser um substituto em potencial, e sua atividade sobre o sistema colinérgico deve ser avaliada mais profundamente, visando elucidar um possível mecanismo de ação para explorá-lo.

7. CONCLUSÃO

Concluimos que as formulações de AgNP obtidas, sintetizadas por rota de síntese verde usando extrato da planta *Plectranthus neochilus*, não geraram mortalidade no modelo animal exposto *Drosophila melanogaster*.

A exposição às AgNP diminui a atividade da enzima AChE, o que aumenta a excitação neuronal central no organismo, gerando um perfil estimulante e aumentando a atividade locomotora das moscas, abrindo caminho para o estudo de sua atividade a nível neuronal.

As AgNP geraram uma diminuição nas taxas de espécies reativas oxidantes, mas também na disponibilidade de espécies redutoras no organismo, sugerindo uma atividade catalítica sob as reações de neutralização das ERO. Também diminuindo a atividade de enzimas relacionadas ao mecanismo antioxidante e detoxificante do organismo como a CAT, e GST.

Os resultados mais expressivos foram justamente na cabeça dos grupos expostos as AgNP, demonstrando uma atividade mais expressiva sob essa região. E por mais que a administração das AgNP tenha gerado uma resposta de diminuição dos agentes pró-oxidantes no organismo testado, a diminuição das barreiras antioxidantes naturais do organismo é motivo de atenção, e requer avaliação mais aprofundada.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

As AgNP demonstraram considerável atividade biológica em baixas concentrações e tempo de exposição, característica interessante uma vez que substâncias que exerçam sua atividade em doses mais baixas são interessantes de pontos de vistas tanto toxicológico quanto tecnológico.

Seria interessante avaliar o efeito de exposições mais prolongadas das AgNP na *Drosophila melanogaster* para observar seu perfil de exposição crônica e efeito sobre a longevidade, uma vez que esta está correlacionada ao dano oxidativo até mesmo natural do organismo. Assim como sua exposição em concentrações mais altas, até a obtenção de um valor de IC₅₀ propriamente dito e saber a quantidade necessária para gerar mortalidade e compará-la a outras AgNP.

O mecanismo de inibição enzimática das AgNP ainda está por ser totalmente compreendido, e a determinação da expressão da enzima e de sua atividade, assim como imagens de microscopia eletrônica de transmissão acoplado a técnicas de análise elementar (como a difração de raio-x), para ver se as AgNP se aderem na parede da célula ou se entram, por onde se dispersam, e que efeito sua distribuição pode causar.

A atividade das AgNP de inibição da enzima AChE pode ser mais explorada, e relacionada com seu efeito comportamental, avaliando sua ação a nível neuronal, uma vez que esse efeito demonstra potencial no estudo de disfunções neurológicas e doenças neurodegenerativas.

Por fim, a capacidade oxirredutora e catalítica das AgNP fazem delas um material muito particular, e essas características propõe seu potencial, e devem sempre ser levadas em consideração. É então importante o estudo do comportamento físico-químico das AgNP em interação com as moléculas biológicas, e a que efeitos isso pode estar atrelado.

9. REFERENCIAS

- AJITHA, B.; ASHOK KUMAR REDDY, Y.; SREEDHARA REDDY, P. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Plectranthus amboinicus* leaf extract and its antimicrobial activity. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 128, p. 257–262, 2014.
- AMINA, M. et al. Sequential injection-chemiluminescence evaluation of stigmasterol glucoside and luteolin via green synthesis of silver nanoparticles using biomass of *plectranthus asirensis*. **Green chemistry letters and reviews**, v. 11, n. 4, p. 523–533, 2018.
- BALDIN, E. L. L. et al. Plant-derived essential oils affecting settlement and oviposition of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B on tomato. **Journal of pest science**, v. 86, n. 2, p. 301–308, 2013.
- BEDLOVIČOVÁ, Z. et al. A brief overview on antioxidant activity determination of silver nanoparticles. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 14, p. 3191, 2020.
- BENZIE, I. F.; SZETO, Y. T. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 47, n. 2, p. 633–636, 1999.
- BOVERHOF, D. R. et al. Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. **Regulatory toxicology and pharmacology: RTP**, v. 73, n. 1, p. 137–150, 2015.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BROINIZI, B.; REGINA, P. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L). In: **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. [s.l: s.n.].
- CAIXETA, S. C. et al. Chemical composition and in vitro schistosomicidal activity of the essential oil of *Plectranthus neochilus* grown in Southeast Brazil. **Chemistry & biodiversity**, v. 8, n. 11, p. 2149–2157, 2011.
- CREVELIN, E. J. et al. Antimicrobial activity of the essential oil of *Plectranthus neochilus* against cariogenic bacteria. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, v. 2015, p. 102317, 2015.
- CUTTER, C. A., & CUTTER, R. A. Cutter-Sanborn three-figure author table (Swanson-Swift revision, 1969. Cutter's Online version, 2022). Campinas, SP: Cutter's Online, 2022.
- DARROUDI, M. et al. Fabrication and characterization of gelatin stabilized silver nanoparticles under UV-light. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 9, p. 6346–6356, 2011.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 47–95, 2002.

GARGANO, J. W. et al. Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. **Experimental gerontology**, v. 40, n. 5, p. 386–395, 2005.

HABIG, W. H. Jakoby Assays for differentiation of glutathione S-transferases. **Methods Enzymol**, v. 77, p. 398–405, 1981.

HIRATA, L. L. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta Farmacêutica Banaerence**, p. 418–424, 2004.

HOSAMANI, R.; MURALIDHARA. Acute exposure of *Drosophila melanogaster* to paraquat causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction: Acute paraquat-induced oxidative stress in *Drosophila*. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 83, n. 1, p. 25–40, 2013.

HUY, T. Q. et al. Recent advances of silver nanoparticles in cancer diagnosis and treatment. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 20, n. 11, p. 1276–1287, 2020.

HUQ, M. A. et al. Green synthesis and potential antibacterial applications of bioactive silver nanoparticles: A review. **Polymers**, v. 14, n. 4, p. 742, 2022.

IORJIIM, W. M. et al. EFVb-HAART Increases Mortality, Locomotor Deficits and Reduces Reproductive Capacity in *Drosophila melanogaster*. **Journal of advances in biology & biotechnology**, p. 26–38, 2020.

JE, W.-P.; BELMARES R, R.-H. R.; CN, A. Separation conditions and evaluation of antioxidant properties of “boldo” (*Peumus boldus*) extracts. **J. Med. Plants Res**, v. 15, p. 911–917, 2013.

KALANTARI, K. et al. Wound dressings functionalized with silver nanoparticles: promises and pitfalls. **Nanoscale**, v. 12, n. 4, p. 2268–2291, 2020.

LEAVER, M. J.; GEORGE, S. G. A piscine glutathione S-transferase which efficiently conjugates the end-products of lipid peroxidation. **Marine environmental research**, v. 46, n. 1–5, p. 71–74, 1998.

LEIN SOLUÇÕES TECNOLÓGICAS. Cutter's Online, c2022. Registrador automático de código autoral para sistemas de informação. Disponível em: <<https://cuttersonline.com.br/registrador-gratuito>>. Acesso em: 18 ago. 2022.

MARUCCI, G. et al. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, v. 190, n. 108352, p. 108352, 2021.

MATTOSO, L. H. C.; DURÁN, N.; MORAIS, P. C. Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. São Paulo: Artliber, 2006.

MORAIS, S. M. DE et al. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista brasileira de farmacognosia: orgao oficial da Sociedade Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1b, p. 315–320, 2009.

MORROW, G.; TANGUAY, R. M. Heat shock proteins and aging in *Drosophila melanogaster*. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 14, n. 5, p. 291–299, 2003.

NAIR, P. M. G.; CHOI, J. Identification, characterization and expression profiles of *Chironomus riparius* glutathione S-transferase (GST) genes in response to cadmium and silver nanoparticles exposure. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 101, n. 3–4, p. 550–560, 2011.

NAZEM, A.; MANSOORI, G. A. Nanotechnology solutions for Alzheimer's disease: advances in research tools, diagnostic methods and therapeutic agents. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, v. 13, n. 2, p. 199–223, 2008.

NISHIYAMA, M. F. et al. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. **Food Science and Technology**, v. 30, p. 191–196, 2010.

OLALEKAN ABOLAJI, A. et al. Involvement of oxidative stress in 4-vinylcyclohexene-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Free radical biology & medicine**, v. 71, p. 99–108, 2014.

ONG, C. et al. *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. **Nanotoxicology**, v. 9, n. 3, p. 396–403, 2015.

OTRANTO, G.; GOLDMAN, A. Nanotecnologia. São Paulo: USP, 2012.

PARK, J. H. et al. Neuroprotective properties of phytochemicals against paraquat-induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 104, n. 2, p. 118–125, 2012.

PEREIRA, R. J.; DAS GRAÇAS CARDOSO, M. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012.

RAMBORGER, B. P. et al. The phytoremediation potential of *Plectranthus neochilus* on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and the role of antioxidant capacity in herbicide tolerance. **Chemosphere**, v. 188, p. 231–240, 2017.

RAMBORGER, B. P. et al. A review of anatomical, physiological, biological characteristics and uses of *Plectranthus neochilus*. **Ciência e Natura**, v. 42, p. e12, 2020.

RAMBORGER, B. P. et al. Toxicological parameters of aqueous residue after using *Plectranthus neochilus* for 2,4-D phytoremediation. **Chemosphere**, v. 270, n. 128638, p. 128638, 2021.

RIJO, P. et al. Antimicrobial plant extracts encapsulated into polymeric beads for potential application on the skin. **Polymers**, v. 6, n. 2, p. 479–490, 2014.

ROCHA, W. S. et al. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista brasileira de fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1215–1221, 2011.

RODRIGUES, V. D. C. **Compostos bioativos de chás: comparação das infusões a quente e a frio**. [s.l.: s.n.].

SHARMA, A. et al. Organochlorine pesticide, endosulfan induced cellular and organismal response in *Drosophila melanogaster*. **Journal of hazardous materials**, v. 221–222, p. 275–287, 2012.

SILVA; L. S. *Mentha viridis* (L). L. e *Mentha Pulegium* L.: Caracterização química, atividade antibacteriana, antioxidante, fosfolipásica, hemolítica e genotóxica dos óleos essenciais. Lavras. 99 p. 2014. (Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Lavras)

SILVER KEY, S. C. et al. Impacts of silver nanoparticle ingestion on pigmentation and developmental progression in *Drosophila*. **Atlas journal of biology**, v. 1, n. 3, p. 52–61, 2011.

SINGH, A. et al. Combating silver nanoparticle-mediated toxicity in *Drosophila melanogaster* with curcumin. **Journal of applied toxicology: JAT**, v. 41, n. 8, p. 1188–1199, 2021.

SOARES, J. J. et al. Continuous liquid feeding: New method to study pesticides toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Analytical biochemistry**, v. 537, p. 60–62, 2017.

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. *Revista de nutrição*, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

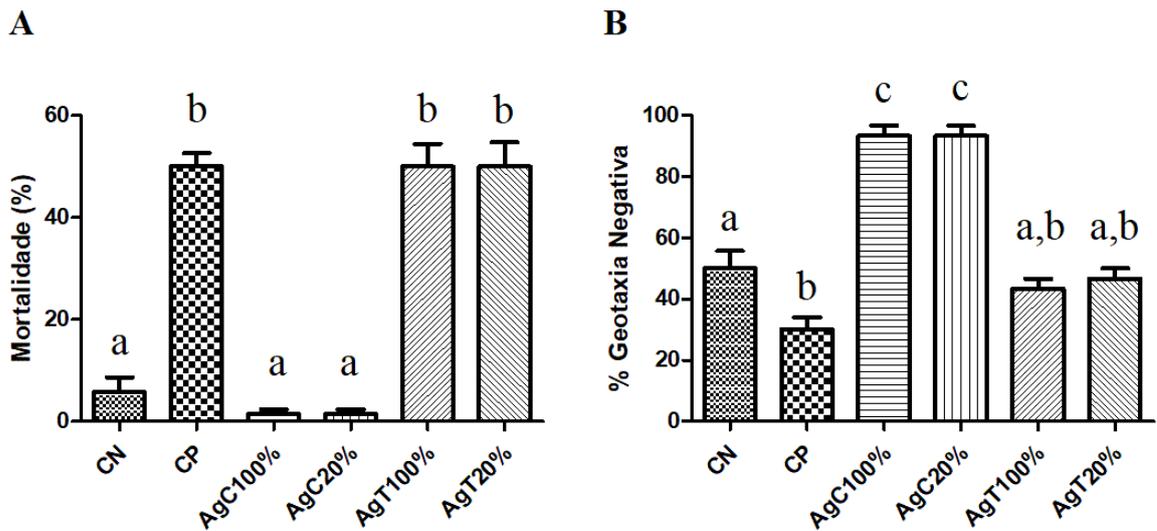
STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18–46, 2011.

VIANA, A. J. S. Estudo químico e de atividade biológica de *Plectranthus neochilus* Schltr. (Lamiaceae). 2011.

ZHENG, Y. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Plectranthus amboinicus* leaf extract and their catalytic activity towards methylene blue degradation. **Revista mexicana de ingeniería química**, v. 16, n. 1, p. 41–45, 2016.

ZHOU, Y. et al. Antibacterial activities of gold and silver nanoparticles against *Escherichia coli* and *Bacillus Calmette-Guérin*. **Journal of nanobiotechnology**, v. 10, n. 1, p. 19, 2012.

APÊNDICE



(A) Mortalidade dos grupos, com 20 moscas ($n = 7$), alimentados por 3 dias a: CN: Controle; CP: Paraquat; AgC100% e AgC20%: Apenas AgNP nas concentrações de 0,50 e 0,10 ppm, respectivamente; AgT1 e AgT2: Paraquat + AgNP 0,50 e 0,10 ppm. (B) Geotaxia negativa destes mesmos grupos. Resultados com letras diferentes em cada gráfico são diferentes estatisticamente, $p < 0,05$.