

Ação cicatrizante da nanopartícula de prata com norbixina em queimaduras

Healing action of silver nanoparticle with norbixin on burns

Ezequielina Raquel Leal¹; Isnária Soares De Oliveira¹; Juscelino Lopes da Silva²; Augusto César Evelin Rodrigues³; Danniell Cabral Leão Ferreira⁴; Vicente Galber Freitas Viana⁵; Karinne Sousa de Araújo⁶; Mariana Chaves Santos⁷; Noélia Maria de Sousa Leal⁸; Antônio Luiz Martins Maia Filho⁹

¹ Acadêmica de Farmácia na Faculdade Integral Diferencial – FACID. Teresina, Piauí – Brasil.

² Doutorando em Ciências da Saúde na Universidade Federal do Piauí - UFPI. Teresina, Piauí – Brasil e Plantonista do Hospital Gentil Filho. Caxias, MA - Brasil.

³ Mestre em Saúde Pública e Professor Titular na Faculdade Integral Diferencial – FACID. Teresina, Piauí – Brasil.

⁴ Graduado em Medicina Veterinária e Laboratorista na Universidade Estadual do Piauí - UESPI. Teresina, Piauí – Brasil.

⁵ Doutor em Ciências e Professor de Química no Instituto Federal do Piauí - IFPI. Teresina, Piauí – Brasil.

⁶ Doutora em Biotecnologia, Professora titular e pesquisadora da Faculdade Integral Diferencial – FACID. Teresina, Piauí – Brasil.

⁷ Graduada em Química pelo Instituto Federal do Piauí – IFPI. Teresina, Piauí – Brasil.

⁸ Doutora em Odontologia e Professora de Anatomia da Faculdade Integral Diferencial - FACID. Teresina, Piauí – Brasil.

⁹ Doutor em Engenharia Biomédica e Professor Adjunto da Universidade Estadual do Piauí - UESPI. Teresina, Piauí – Brasil.

Endereço para Correspondência:

Ezequielina Raquel Leal
Rua Antônia Mirian Eduardo Pereira, 4855, Bairro Morada do Sol
64053-550 – Teresina – Piauí [Brasil]
ezeeraquel16@gmail.com

Resumo

Introdução: A queimadura é uma injúria que altera a integridade da pele, decorrente de traumas térmicos. Dentre os compostos não convencionais utilizados na cicatrização de feridas estão a norbixina e as preparações com prata. **Objetivo:** avaliar a ação cicatrizante da nanopartícula de prata associada à norbixina em queimaduras de *Mus musculus*. **Métodos:** Inicialmente, preparou-se uma solução nanop prata/norbixina e a partir desta obteve-se o gel teste. Posteriormente dividiu-se os animais em 3 grupos, sendo negativo (sem tratamento), positivo (sulfadiazina de prata) e teste (gel teste). Nestes animais houve a indução das queimaduras. No 7º e 14º dia realizou-se a eutanásia e os tecidos lesionados foram coletados para análise microscópica. **Resultado:** Verificou-se potencial vantagem do grupo teste em relação ao negativo e igualdade comparada ao positivo. **Conclusão:** A nanopartícula de prata associada à norbixina representa uma fonte alternativa para a cicatrização de queimaduras.

Descritores: Pele; Queimaduras; Cicatrização; Nanocompostos; *Bixa orellana*.

Abstract

Introduction: Burning is an injury that alters the integrity of the skin, due to thermal trauma. Among the non-conventional compounds used in wound healing are norbixin and silver preparations. **Objective:** to evaluate the cicatrizing action of silver nanoparticle associated with norbixin in *Mus musculus* burns. **Methods:** Initially, a nanop prata / norbixin solution was prepared and from this solution the test gel was obtained. Afterwards the animals were divided into 3 groups, being negative (without treatment), positive (silver sulfadiazine) and test (gel test). In these animals, there was the induction of burns. On the 7th and 14th day, euthanasia was performed and the injured tissues were collected for microscopic analysis. **Result:** There was a potential advantage of the test group in relation to negative and equality compared to positive. **Conclusion:** The silver nanoparticle associated with norbixin represents an alternative source for the healing of burns.

Keywords: Skin; Burns; Wound Healing; Nanocomposites; *Bixa orellana*.

Introdução

Alterações na pele íntegra desencadeiam uma sequência complexa de eventos biológicos dinâmicos que compreendem o processo de cicatrização, o qual objetiva reparar uma lesão. A cicatrização envolve quatro fases evolutivas, as quais são interdependentes e sobrepostas, que são: fase de agregação plaquetária ou homeostase, fase inflamatória ou inicial, fase proliferativa ou de fibroplasia e fase de remodelação ou maturação¹.

A queimadura é um exemplo de injúria que causa alterações dessa integridade da pele. É decorrente de traumas de origem térmica, causada por agentes externos diversos, como exposição a chamas, líquidos e superfícies quentes, frio, substâncias químicas, radiação, atrito ou fricção².

A disponibilidade de drogas que estimulam o processo de cicatrização de feridas ainda é limitada, mas o uso de compostos naturais e polímeros para reconstruir e/ou regenerar tecidos vem avançando. Assim, grandes matrizes de metabólitos bioativos são descritas como potenciais para aplicações dermatológicas³.

Dentre tratamentos não convencionais para feridas descritos na literatura encontra-se a norbixina e preparações com prata⁴.

A norbixina (C₂₄H₂₈O₄) é um carotenoide dicarboxílico hidrofílico encontrado em pequena quantidade no urucum, que possui ação antioxidante, podendo assim reagir com os radicais livres que são formados em decorrência de processos fisiológicos e patológicos e que promovem danos teciduais⁵. A prata e seus compostos possuem atividade antibacteriana e antifúngica e na sua forma nanoparticulada, esta ação é amplificada⁶.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a ação cicatrizante de um gel contendo Nanopartícula de Prata estabilizada com Norbixina em queimaduras induzidas na pele de camundongos *Mus musculus*. O experimento baseia-se nas propriedades antimicrobianas da Prata e antioxidantes da Norbixina, que irão promover um ambiente favorável para facilitar o processo de cicatrização.

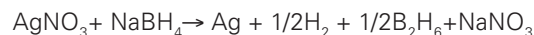
Materiais e métodos

Preparação da solução de Norbixina

Inicialmente 0,1 gramas de norbixina foram adicionadas a 200 mL de uma solução contendo 50 mL de álcool isopropílico em 150 mL de água. A mistura resultante foi deixada por 15 minutos num sistema de dissolução ultrassônico e em seguida filtrada. Ao líquido filtrado resultante foi adicionado água até completar 1000 mL de solução. Em seguida foi obtido o espectro eletrônico da solução de norbixina por espectroscopia infravermelho e UV-Vis.

Preparação de Nanopartículas de Prata estabilizadas em Norbixina

Para o preparo da solução de nanoprta, 25 mL de uma solução de nitrato de prata, (1,0 × 10⁻³ mol/L) foi adicionado gota a gota a 75 mL de uma solução de borohidreto de sódio, (2,0 × 10⁻³ mol/L) mantida sob agitação mecânica a uma temperatura de -5,0 °C. Obteve-se uma solução padrão de cor amarela. Em seguida esta solução foi adicionada a 37,5 mL de solução de norbixina preparada previamente, resultando numa mistura classificada de nanoprta/norbixina, da qual foi obtido o espectro eletrônico por espectroscopia infravermelho e UV-Vis. Antes do início dos experimentos, toda a vidraria utilizada foi devidamente lavada com a solução de potassa alcoólica, solução piranha e água destilada. Segundo a reação abaixo, a concentração final das nanopartículas de prata obtida neste trabalho é igual a 1,8 × 10⁻⁴ mol/L.



Obtenção do Gel Teste e da Sulfadiazina de prata

As formulações utilizadas no experimento foram obtidas através da farmácia de manipulação Galeno, localizada na cidade de Teresina, Piauí.

Para obtenção do gel teste utilizou-se a solução de nanoprata/norbixina preparada previamente e adicionou-a em base gelificada carbopol. E a sulfadiazina de prata, um medicamento já bastante utilizado em queimaduras, foi obtida seguindo o procedimento padrão para manipulação deste produto.

Procedimento Experimental

Para realização do experimento foram utilizados 30 camundongos da espécie *Mus musculus* com peso médio de 30g, provenientes do Biotério da Universidade Estadual do Piauí-UESPI, seguindo o Protocolo nº 079/14 (CEUA).

Os animais foram divididos em 3 grupos de 10, como sendo G1 (grupo teste), tratado com gel de nanoprata/norbixina; G2 (controle positivo) tratado com sulfadiazina de prata e G3 (controle negativo) sem tratamento. Cada grupo foi dividido em dois subgrupos de 5 animais, correspondendo à eutanásia a 7 dias e 14 dias, após o início do tratamento.

Foi utilizada anestesia dissociativa de xilazina e quetamina na proporção de 1:1, administrando-se 0,1mL/100g. Assim, cada camundongo recebeu 0,03 mL por via intramuscular, seguido de tricotomia da região dorsal e indução de queimadura com proveta contendo água quente.

Em seguida aplicou-se o gel de nanoprata/norbixina ao G1 e sulfadiazina de prata ao G2. Ao final da aplicação, todos os animais foram transferidos para suas gaiolas e levados ao Biotério, onde receberam dieta normal. A cada 3 dias o G1 e o G2 receberam aplicações tópicas do gel de NPAg associada à norbixina e sulfadiazina de prata, respectivamente.

No 7º dia Pós-Operatório (p.o), 5 animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia por dose letal de anestésico. Em seguida, as amostras do tecido lesionado foram retiradas e fixadas em solução de formalina a 10%. Este mesmo procedimento realizado para a eutanásia dos animais do 14º dia p.o.

Análise Morfométrica

O registro fotográfico digital das queimaduras dos animais dos grupos experimentais foi realizado utilizando câmera digital Sony Cyber-shot 14.1 megapixels acoplada a tripé. Este registro foi feito no pós-operatório e nos dias da eutanásia (7 e 14 dias p.o).

As imagens obtidas foram importadas para o *software* Image J® para cálculo da área da ferida de cada animal. Em seguida, foi calculado, por meio do programa Excel®, o índice de contração das feridas para cada grupo de animais de acordo com a fórmula: $100 \times (A_i - A_f)/A_i = M \pm DP$, onde A_i = área inicial da ferida; A_f = área da ferida no dia da coleta para biópsia. Os resultados obtidos foram expressos como médias \pm desvios-padrão ($M \pm SD$).

Os dados coletados foram submetidos ao tratamento estatístico utilizando o *software* GrandPadPrism, onde realizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Esse teste apresentou intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Análise Microscópica

Para realização da análise microscópica, retirou-se de cada animal, após a eutanásia, a peça tecidual contendo o processo cicatricial de queimadura e transferiu-a para recipientes onde foi fixada com Formol. Em seguida, as peças já identificadas passaram pelo processo laboratorial de rotina para inclusão em parafina. Após a obtenção dos blocos, foi realizada a construção das lâminas que foram submetidas posteriormente à coloração com hematoxilina-eosina.

Por fim, as lâminas coradas resultantes passaram pelo estudo histomorfológico sob microscopia de luz, onde foram observados os seguintes critérios: infiltrado inflamatório, formação de tecido de granulação, deposição de fibras colágenas (fibrose) e reepitelização do tecido lesado.

Resultados

Análise Espectrofotométrica em Infravermelho e Ultravioleta Visível (UV-Vis)

As Figuras 1 e 2 apresentam os espectros de absorção das soluções de norbixina e nanoprata/norbixina nas regiões do infravermelho e UV-Vis, respectivamente. Nestas figuras observam-se as bandas e os picos de absorção referentes às ligações químicas características dos compostos de estudo, indicando a presença destes nas amostras analisadas.

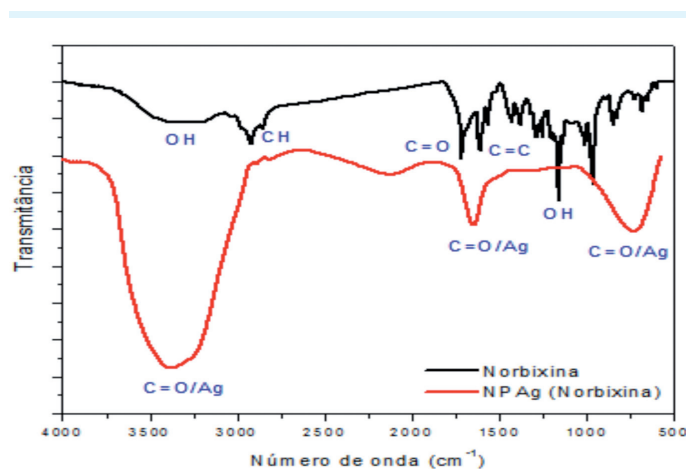


Figura 1: Espectro de absorção na região do Infravermelho referente às soluções de norbixina e nanoprata/norbixina

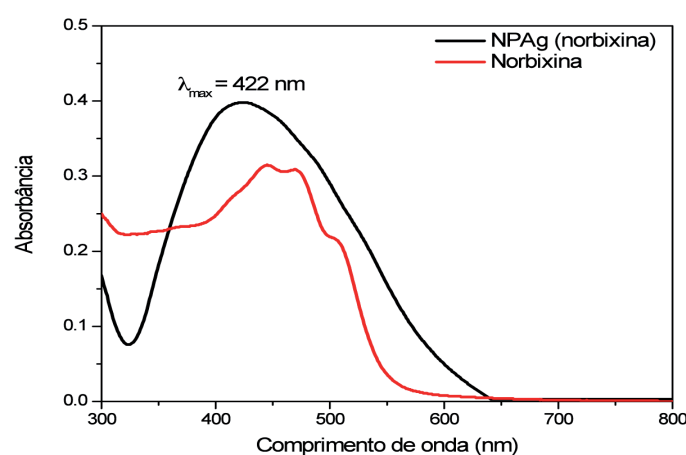


Figura 2: Espectro na região do Ultravioleta Visível (UV-Vis) referente às soluções de norbixina e nanoprata/norbixina

Análise Morfométrica

A partir do tratamento estatístico, foi obtido o percentual de regressão das queimaduras dos animais.

De acordo com o gráfico da Figura 3, pode-se observar que o percentual de regressão do grupo tratado com gel de nanoprata/norbixina foi maior que o controle negativo, porém menor que o controle positivo.

Na análise dos animais eutanasiados no 14º dia, como demonstrada na Figura 4, verifica-se semelhança com os do 7º dia, porém constata-se que a diferença de percentual entre o grupo tratado e o controle positivo é menor que a anteriormente representada.

Análise microscópica

Na análise microscópica dos grupos de animais que foram sacrificados no 7º dia p.i (pós-intervenção), como mostra a Figura 5, pode-se observar que todos apresentaram crosta fibrinosa, com infiltrado inflamatório ora intenso ora moderado e ausência de deposição de colágeno.

Os animais do grupo negativo não apresentaram tecido de granulação, enquanto que nos animais do grupo positivo e grupo teste, este tecido encontrou-se imaturo e maduro, respectivamente. Apenas um animal do grupo teste apresentou tecido de granulação imaturo.

Em todos os animais deste período a reepitelização foi ausente, porém em alguns animais foram observados sinais iniciais deste processo.

Nos animais sacrificados no 14º dia P.O, como mostra a Figura 6, observou-se que apenas camundongos do grupo negativo e positivo apresentaram crosta fibrinosa e nestes animais o infiltrado inflamatório variou de leve a moderado, sendo que apenas um camundongo do grupo positivo apresentou ausência deste processo. Ao observar o grupo teste, veri-

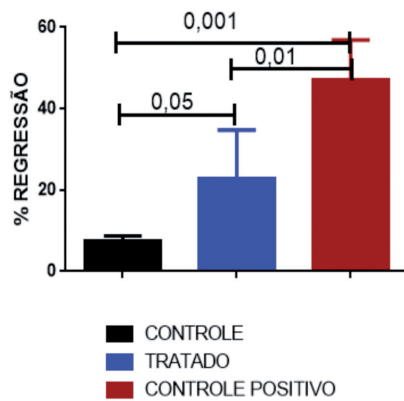


Figura 3: Percentual de Regressão dos Grupos Eutanasiados no 7º dia p.i

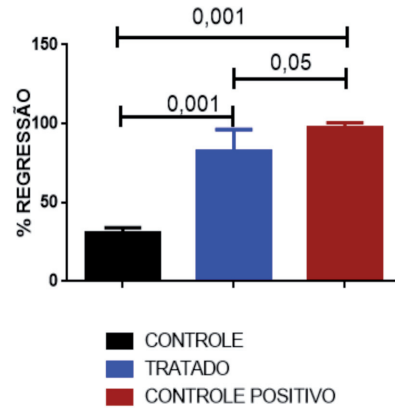


Figura 4: Percentual de Regressão dos Grupos Eutanasiados no 14º dia p.i

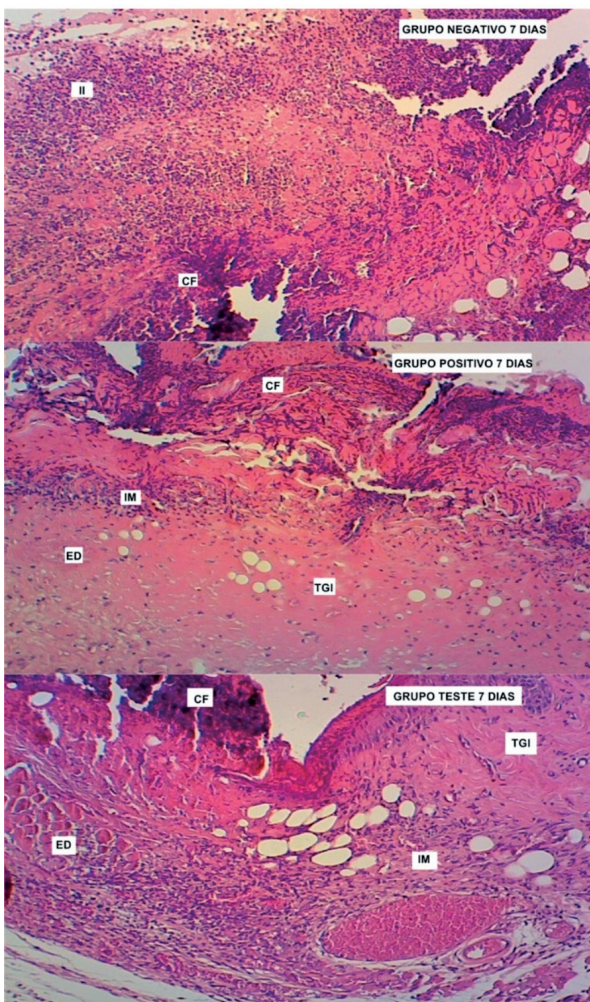


Figura 5: Representação Histológica Referente aos Animais do 7º dia p.i.
CF= Crosta Fibrinosa; II= Infiltrado Intenso; IM= Infiltrado Moderado; ED= Edema; TGI= Tecido de Granulação Imaturo

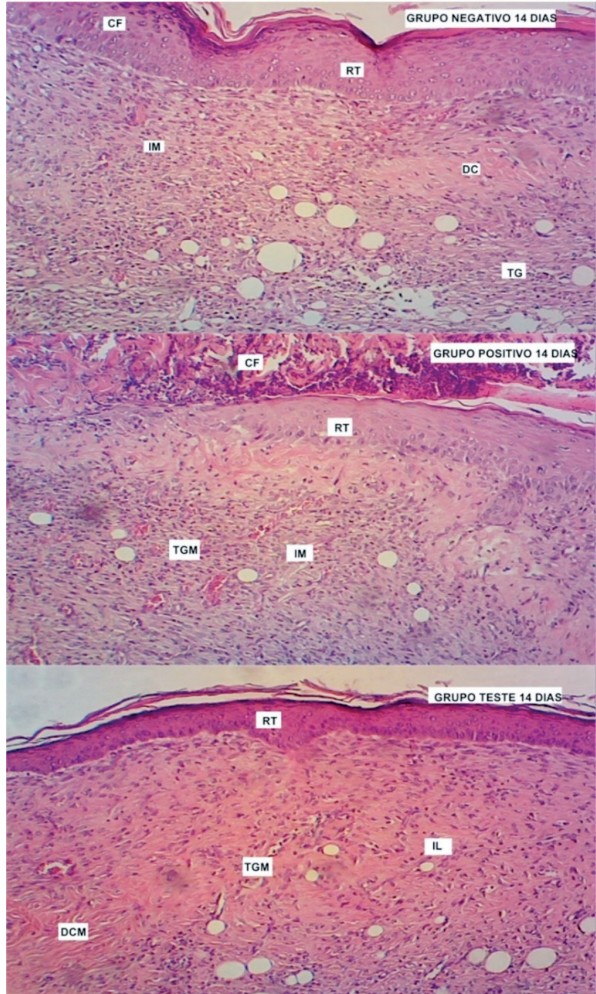


Figura 6: Representação Histológica Referente aos Animais do 14º dia p.i
RT= Reepitelização Total; CF= Crosta Fibrinosa; DC= Deposição de Colágeno; TGM= Tecido de Granulação Maduro IM= Infiltrado Moderado; ED= Edema; IL= Infiltrado Leve; DMC= Deposição Moderada de Colágeno.

ficou-se que o processo de inflamação estava ora leve ora ausente.

A deposição de colágeno variou em deposição inicial, intensa e moderada para cada grupo de animais. O tecido de granulação no grupo negativo apresentou-se maduro; já nos grupos positivo e teste, houve variação em maduro e imaturo. Além disso, dois animais, um do grupo positivo e outro do grupo teste, já não apresentavam tecido de granulação.

E por fim, todos os animais estavam com reepitelização total, alguns tiveram formação de anexos, outros não.

Discussão

Para detecção da presença dos compostos norbixina e nanop prata/norbixina nas soluções analisadas, utilizou-se métodos espectroscópicos, que se baseiam na detecção e análise de um feixe de radiação eletromagnética vinda de uma amostra que está sob investigação. São métodos que determinam a interação dos diferentes tipos de radiação com a matéria baseando-se na absorção ou emissão de radiação eletromagnética⁷. Pode-se citar como exemplo a espectroscopia na região do Infravermelho e na região do Ultravioleta Visível (UV-vis).

O espectro do Infravermelho se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências e vibrações específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula⁸. Enquanto que o espectro do UV-vis determina a absorção da luz numa amostra, no intervalo de comprimentos de onda, compreendido entre 200 a 800 nm. Assim, o pico de absorção pode ser correlacionado com o tipo de ligação que existe na espécie que está sendo estudada⁹.

Diante do exposto, os espectros obtidos a partir da análise espectrofotométrica por infravermelho e UV-vis da solução nanop prata/norbixina caracterizam a presença dos compostos de interesse do estudo, pois se mostraram concordes com os descritos na literatura^{10, 11}.

Para avaliar o processo de cicatrização, utilizou-se dois recursos, que foram o percentual de regressão e a análise microscópica.

O percentual de regressão representa o fenômeno de contração da ferida, descrito como o movimento centrípeto dos limites da ferida em direção ao centro, mediado pelos miofibroblastos e que se inicia cerca de 7 dias após a lesão. Um dos fatores que reduzem esse processo é a infecção, devido ao fato de constituir uma barreira que impede a reorganização espacial do tecido¹².

Portanto os resultados apresentados demonstram a relativa eficácia do gel de nanop prata/norbixina na contração das queimaduras tóxicas dos animais, atribuindo-se essa característica às funções antimicrobianas e antioxidantes desse gel.

A análise microscópica baseou-se na observação de achados histológicos enquadrados nos critérios citados na metodologia do presente estudo. Os aspectos mais frequentemente observados nas amostras foram destacados em cada grupo de animais, de acordo com os períodos de 7 e 14 dias do p.i.

Os resultados obtidos das observações microscópicas foram comparados entre os grupos analisados a fim de visualizar a evolução do processo de cicatrização após a queimadura na pele desses animais.

O controle microbiano através da sulfadiazina de prata aplicada topicamente às queimaduras dos animais do controle positivo e as nanopartículas de prata presentes no gel aplicado topicamente nos animais do grupo teste é importante para a otimização do processo de cicatrização, pois a contaminação bacteriana pode atuar como barreira física para o desenvolvimento ordenado de tecido de granulação e deposição de colágeno, ou podem exagerar a inflamação, afetando a resposta inflamatória¹³.

Além do efeito antimicrobiano promover benefícios à cicatrização, deve-se ressaltar outro aspecto também importante, que é a atividade antioxidante, pois o aumento na geração de EROs (Espécies Reativas do Oxigênio), superando a capacidade antioxidante tecidual, gera um

estresse oxidativo que causa danos teciduais e agrava o processo inflamatório, resultando em uma lesão de difícil cicatrização¹⁴. Assim, a utilização de compostos antioxidantes como a norbixina, vêm como outra vertente que otimiza o processo de cicatrização.

A sulfadiazina de prata, desde a sua descoberta, em 1968, tem grande importância no tratamento de queimaduras superficiais e profundas, atuando na prevenção e no controle do crescimento microbiano de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e gram-negativas (*Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella sp* e *Pseudomonas aeruginosa*) e fungos (*Candida albicans*), apresentando bons resultados na prevenção da sepse¹⁵. Este efeito antimicrobiano deve-se ao sinergismo da sulfadiazina, que pela sua semelhança estrutural com o ácido p-aminobenzóico (PABA), bloqueia a enzima bacteriana responsável pela incorporação de PABA, importante para a síntese do folato bacteriano, fator essencial ao crescimento celular¹⁶ e aos íons prata, que causam a precipitação de proteínas e age diretamente na membrana citoplasmática da célula bacteriana, exercendo ação bactericida imediata, e ação bacteriostática residual, pela liberação de pequenas quantidades de prata iônica¹⁷.

Estudos mostraram que não só os íons prata têm atividade antimicrobiana, mas uma alta atividade também é observada para as nanopartículas de prata, que são ativas contra diversos tipos de bactérias, incluindo cepas multirresistentes¹⁸.

A norbixina é um carotenóide que possui ação antioxidante, devido a sua estrutura formada por extensa cadeia de duplas ligações que proporciona variações de distribuição eletrônica que permitem a adição de radicais livres aos carbonos adjacentes às insaturações, característica que proporciona maior reatividade dessas moléculas frente a agentes oxidantes, sobretudo derivados oxigenados proporcionando relativa estabilidade¹⁹.

A cicatrização de feridas pode ser beneficiada quando os principais eventos que a possibilitam são estimulados, ou seja, nutrição,

proliferação celular e controle da inflamação e infecção. Assim, o uso tópico de Norbixina associada à Nanopartícula de Prata em queimaduras, permite o controle microbiano que combinado com a redução dos EROs, favorecem o desenvolvimento ordenado de tecido de granulação e deposição de colágeno, controle da inflamação e por fim, a cicatrização²⁰.

Conclusão

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que o gel teste de nanopartícula/norbixina apresenta indícios de eficácia no processo de cicatrização de queimaduras. Porém é necessário que o tempo de experimentação seja estendido, ao menos 21 dias, para que haja um melhor esclarecimento acerca da efetividade deste produto na cicatrização de feridas.

Outra proposta seria de aumentar a concentração dos princípios ativos nanopartícula de prata e norbixina na solução teste e em seguida repetir todo o experimento afim de verificar os resultados decorrentes desse aumento. Além disso é importante que sejam feitos testes de toxicidade para que em algum momento este produto se torne viável para uso humano e animal.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Faculdade Integral Diferencial pela concessão da bolsa de iniciação científica e à Universidade Estadual do Piauí pela disponibilização de suas instalações para a realização da pesquisa.

Referências

1. Pielez A, Biniás D, Sarna E, Bobinski R, Kawecki M, Glik J, et al. Active antioxidants in ex-vivo examination of burn wound healing by means of IR and Raman spectroscopies - Preliminary Comparative Research. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2017 fev; 173: 924-30.

2. Oliveira TS, Moreira KFA, Gonçalves TA. Assistência de enfermagem com pacientes queimados. *Revista Brasileira de Queimaduras* 2012 jan/fev/mar; 1 (1): 31-7.
3. Zouari R, Moalla-Rekik D, Sahnoun Z, Rebai T, Ellouze-Chaabounis S, Ghribi-Aydi D. Evaluation of dermal wound healing and in vitro antioxidant efficiency of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant. *Biomed. Pharmacother.* Jul 2016; 84: 878-891.
4. Malaquias TSM. Tratamentos não convencionais para feridas: revisão integrativa da literatura. *Revista Contexto & Saúde* Jul/dez 2015; 15 (29): 22-29.
5. Santos JAA, Souza MFAM, Silva ELV, Aguiar Júnior FCA. Avaliação Histomorfométrica do Efeito do Extrato Aquoso de Urucum (Norbixina) no Processo de Cicatrização de Feridas Cutâneas em Ratos. *Rev Bras PI Med* 2014; 16 (3): 637-43.
6. Souza GD, Rodrigues MA, Silva PP, Guerra W. Prata: Breve Histórico, Propriedades e Aplicações. *Educ quím* 2013 jan; 24 (1): 14-16.
7. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. Introdução à espectroscopia. 5. ed. São Paulo: Cengage Learning; 2016.
8. Hage DS, Carr JO. Química analítica e análise quantitativa. 1. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall; 2012.
9. Araújo EMP. Técnicas espectroscopias e quimométricas como ferramentas na confirmação da estrutura de substâncias isoladas de produtos naturais ou obtidos por síntese [Tese]. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2012.
10. Antunes FS, Dal'acqua N, Bergmann CP, Giovanela M. Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos. *Estudos Tecnológicos em Engenharia*, 2013 jan/jun; 9 (1): 20-6.
11. Albach B. Síntese do poli(etileno-co-álcool vinílico-g-norbixina) para aplicação em isoladores elétricos de redes elétricas compacta protegida [Dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2014.
12. Singh S, Young A, McNaught CE. The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford)* 2017 set; 35(9): 473-7.
13. Oliveira IVP, Dias RVC. Cicatrização de Feridas: Fases e Fatores de Influência. *Acta Veterinária Brasília* 2012; 6 (4): 267-71.
14. Pessoa AFM. A Administração Sistêmica e Tópica de Vitaminas Antioxidantes Acelera a Cicatrização de Feridas Cutâneas em Camundongos Diabéticos [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade Federal de São Paulo; 2014.
15. Ferreira FV, Paula LB. Sulfadiazina de Prata versus Medicamento Fitoterápico: Estudo Comparativo dos Efeitos no Tratamento de Queimaduras. *Revista Brasileira de Queimaduras* 2013 mai/jul; 12 (3): 132-9.
16. Deck DH, Winston L G. Sulfonamidas, trimetoprima e quinolonas. In: Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. *Farmacologia Básica e Clínica*. 12. ed. Porto Alegre: AMGH; 2014. p. 831-8.
17. Bressan E, Ferroni L, Gardin C, Rigo C, Stocchero M, Vindigni V, et al. Silver Nanoparticles and Mitochondrial Interaction. *Int J Dent* 2013; 2013:1-8.
18. Souza GD, Rodrigues MA, Silva PP, Guerra W. Prata: breve histórico, propriedades e aplicações. *Educ. Quím.* 2013 jan; 24 (1): 14-6.
19. Garcia CER, Bolognesi VJ, Dias JFG, Miguel OG, Costa CK. Carotenoides bixina e norbixina extraídos do Urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidante em produtos cárneos. *Ciência Rural* 2012 ago; 42 (8): 1510-7.
20. Costa AR, Araujo KS. Cicatrização de Queimaduras de Pele Tratadas Tópicamente com Chá de Camomila. *Revista FACID: Ciência & Vida* 2015 mai; 11 (1): 53-61.