



KARINA APARECIDA DOS SANTOS CRUZ

**OTIMIZAÇÃO ESTATÍSTICA DA SÍNTESE VERDE DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA EMPREGANDO POLPA DE
AMORA COMO BIORREDUTOR**

**LAVRAS- MG
2022**

KARINA APARECIDA DOS SANTOS CRUZ

OTIMIZAÇÃO ESTATÍSTICA DA SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EMPREGANDO POLPA DE AMORA COMO BIORREDUTOR

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química/Bioquímica, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Dr. Juliano Elvis de Oliveira

Coorientadores

Prof. Dr. Caio Gomide Otoni

Prof(a). Dr(a). Elisângela Elena Nunes Carvalho

LAVRAS- MG
2022

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Cruz, Karina Aparecida dos Santos.

Otimização Estatística da Síntese Verde de Nanopartículas de Prata Empregando Polpa de Amora como Biorredutor/ Karina Aparecida dos Santos Cruz. - 2022.

42 p.: il.

Orientador(a): Juliano Elvis de Oliveira.

Coorientador(a): Caio Gomide Otoni.

Coorientador(a): Elisângela Elena Nunes Carvalho.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Síntese verde. 2. antioxidantes. 3. quimiometria. I. Oliveira, Juliano Elvis de. II. Otoni, Caio Gomide. III. Título.

KARINA APARECIDA DOS SANTOS CRUZ

OTIMIZAÇÃO ESTATÍSTICA DA SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EMPREGANDO POLPA DE AMORA COMO BIORREDUTOR

STATISTICAL OPTIMIZATION OF THE GREEN SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES USING BLACKBERRY PULP AS BIOREDUCTOR

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química/Bioquímica, para a obtenção do título de mestre.

Aprovada em 21 de março de 2022

Dr(a). Maria Alice Martins – EMBRAPA Instrumentação

Dr. Juliano Elvis de Oliveira – UFLA

Dr. Filippe Elias de Freitas Soares – UFLA

Prof. Dr. Juliano Elvis de Oliveira
Orientador

Prof. Dr. Caio Gomide Otoni
Prof(a). Dr(a). Elisângela Elena Nunes Carvalho
Coorientadores

LAVRAS- MG
2022

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado saúde e sabedoria para que eu realizasse este projeto.

Ao Professor Dr. Juliano Elvis de Oliveira pela orientação, paciência e confiança.

Aos Professores Dr. Caio Gomide Otoni e Elisângela Elena Nunes Carvalho pelas orientações e sugestões dadas durante a execução deste trabalho.

Aos colegas do LAMAB (ABI) pelos momentos e conhecimentos compartilhados.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Química e Departamento de Engenharia pela oportunidade concedida.

A todos os meus familiares e amigos pela força, carinho e confiança. Aos meus pais pelas orações.

Ao Euler pela paciência, apoio e companheirismo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Obrigada a todos!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcuta)

RESUMO

A preocupação com os problemas ambientais e aspectos toxicológicos da síntese convencional de nanopartículas de prata têm motivado o estudo de produtos naturais como agentes redutores alternativos que substituam compostos tradicionais como o borohidreto de sódio. Neste trabalho, a polpa de amora foi escolhida como agente biorredutor para avaliar as propriedades de nanopartículas de prata obtidas via síntese verde. A polpa de amora é rica em antocianinas e compostos fenólicos que podem atuar como redutores dos íons de prata no meio reacional. Além disso, a presença de açúcares e polissacarídeos na polpa de amora pode contribuir na estabilização das nanopartículas de prata produzidas. Devido a estes compostos presentes na polpa de amora foi possível a obtenção de nanopartículas de prata com ação antimicrobiana em um meio reacional sem a presença de redutores tóxicos como o borohidreto de sódio. Os resultados de otimização estatística apontam que a concentração de polpa de amora no meio reacional foi o fator de maior impacto no diâmetro das nanopartículas de prata. O aumento da concentração de agente biorredutor ocasionou em um aumento drástico no diâmetro médio das nanopartículas de prata. Também foi possível constatar que as nanopartículas de prata obtidas via síntese verde a 50°C, 4h e 9,7% de v/v de polpa de amora no meio reacional alcançaram os maiores halos de inibição para *Escherichea coli* K12 (Gram-negativo) e *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 (Gram-positiva).

Palavras-chave: síntese verde. antioxidantes. quimiometria.

ABSTRACT

The concern with environmental problems and toxicological aspects of the conventional synthesis of silver nanoparticles have motivated the study of natural products as alternative reducing agents that replace traditional compounds such as sodium borohydride. In this study, blackberry pulp was chosen as a bioreducing agent to evaluate the properties of silver nanoparticles obtained via green synthesis. The blackberry pulp is rich in anthocyanins and phenolic compounds that can act as reducers of silver ions. In addition, the presence of sugars and polysaccharides in the blackberry pulp can contribute to the stabilization of the silver nanoparticles produced. Due to these compounds present in the blackberry pulp, it was possible to obtain silver nanoparticles with antimicrobial action in a reaction medium without the presence of toxic reducers such as sodium borohydride. The results of statistical optimization indicate that the concentration of blackberry pulp in the reaction medium was the factor with the greatest impact on the diameter of silver nanoparticles. The increase in the concentration of bioreducing agent caused a drastic increase in the mean diameter of the silver nanoparticles. It was also possible to verify that the silver nanoparticles obtained via green synthesis at 50°C, 4h and 9.7% v/v of blackberry pulp in the reaction medium reached the highest inhibition halos for *Escherichia coli* K12 (Gram-negative) and *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 (Gram-positive).

Keywords: green synthesis. antioxidants. chemometrics.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	OBJETIVO GERAL	12
2.1	Objetivos Específicos	12
3	REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1	Síntese Verde de Nanopartículas Metálicas	13
3.2	Vantagens do Uso de Extratos Vegetais.....	15
3.3	Extratos Vegetais como Biorredutores	15
3.4	Nanopartículas de Prata.....	16
3.5	Síntese Verde de Nanopartículas Usando Compostos Bioativos Isolados	18
3.6	Metabólitos Secundários Responsáveis pela Síntese Verde	18
3.7	Fatores que Afetam a Síntese Verde de Nanopartículas Metálicas	21
3.8	Metodologia de Superfície de Resposta	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	Materiais	25
4.2	Determinação de Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante da Polpa de Amora	25
4.3	Síntese Verde das Nanopartículas de Prata	27
4.4	Análise do Diâmetro Hidrodinâmico e do Potencial Zeta das Nanopartículas.....	28
4.5	Avaliação da Atividade Antimicrobiana das Nanopartículas de Prata	28
5	RESULTADO E DISCUSSÃO	29
5.1	Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante da Polpa de Amora.....	29
5.2	Análise do Diâmetro Hidrodinâmico e do Potencial Zeta das AgNPs	30
5.3	Avaliação da Atividade Antimicrobiana das AgNPs	35
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
	REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

Constituída de 12 princípios a “Química verde” surgiu como uma solução sustentável para os diversos problemas ambientais. Já que estes são fundamentados em processos renováveis e ambientalmente amigáveis, cujo intuito é a redução ou eliminação total dos reagentes tóxicos os quais visa gerar um produto livre de resíduos perigosos (LOSTE et al., 2020).

A síntese de nanopartículas por meio da química verde tem atraindo vários estudos no campo da nanotecnologia, pois apresenta diversos benefícios no âmbito ambiental como: biocompatibilidade, atoxicidade e baixo custo. No entanto, existem outras formas de produzir as nanopartículas, que são os métodos físicos ou químicos, porém estes não são viáveis, pois demandam alto custo e insegurança ao ambiente (AMIRI; ESKANDARI; SALAVATI-NIASARI, 2019).

As nanopartículas verdes podem ser obtidas a partir de fontes vegetais tais como plantas, raízes e caules podendo ser originada, também, de outras fontes como os fungos, leveduras, bactérias dentre outros (NASROLLAHZADEH et al., 2020).

Entretanto, de todas as fontes disponíveis as plantas têm sido a mais usadas na síntese verde em especial a de nanopartículas metálicas (NASROLLAHZADEH et al., 2020). As plantas são constituídas por moléculas orgânicas como, por exemplo, fenóis, taninos, terpenóides, quininas e alcalóides. Sendo estas responsáveis pelo processo de redução e estabilização dos íons metálicos durante a síntese das nanopartículas (AMIRI; ESKANDARI; SALAVATI-NIASARI, 2019; SIDDIQUEE et al., 2020).

O uso de nanopartículas metálicas tem aumentado em vários campos como na produção de materiais eletrônicos, farmacêuticos, terapêuticos e alimentícios. Este avanço se deve as ações antibacterianas e antifúngicas dos íons metálicos (JEBRIL; JENANA; DRIDI, 2020; ZHANG; JIANG, 2019) .

Dentre os diversos metais empregados na síntese verde, a prata tem ganhado ênfase. Ela conquistou uma vasta área incluindo os cosméticos, medicamentos e embalagens de alimentos, por possuir uma excelente atividade antimicrobiana, antioxidante e antifúngica, fatores importantes na proteção, preservação e qualidade dos produtos (JEBRIL; JENANA; DRIDI, 2020; PAWLISZAK; MALINA; SOBCZAK-KUPIEC, 2019; ZHANG; JIANG, 2019).

Neste trabalho, a polpa de amora foi escolhida como agente biorredutor para avaliar as propriedades de nanopartículas de prata obtidas via síntese verde. A polpa de amora é rica em antocianinas e compostos fenólicos que podem atuar como redutores dos íons de prata no meio reacional (DEMIRBAS et al., 2017; MORAES et al., 2020). Além disso, a presença de açúcares e polissacarídeos na polpa de amora pode contribuir na estabilização das nanopartículas de prata produzidas (CONCÓRDIO-REIS et al., 2020; DOU et al., 2021; WU et al., 2021). Devido a estes compostos presentes na polpa de amora buscou-se obter nanopartículas de prata em um meio reacional sem a presença de redutores tóxicos como o borohidreto de sódio.

Neste contexto, este trabalho teve por objetivo investigar características do meio reacional (tempo, temperatura e concentração de biorredutor) no diâmetro médio, potencial zeta e ação antimicrobiana das nanopartículas de prata produzidas via síntese verde.

2 OBJETIVO GERAL

Otimizar as condições de síntese verde de nanopartículas de prata empregando polpa de amora como agente biorredutor.

2.1 Objetivos Específicos

- ✓ Investigar o efeito do tempo, da temperatura e da concentração de agente biorredutor no diâmetro médio das nanopartículas de prata;
- ✓ Investigar o efeito do tempo, da temperatura e da concentração do agente biorredutor no potencial zeta das nanopartículas de prata;
- ✓ Investigar a ação antimicrobiana de nanopartículas de prata empregando polpa de amora como biorredutor durante a síntese verde;
- ✓ Aplicar ferramentas de otimização estatística de processos para encontrar condições ótimas da síntese verde de nanopartículas de prata empregando polpa de amora como agente biorredutor.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Síntese Verde de Nanopartículas Metálicas

Nanopartículas metálicas podem ser produzidas tanto por processos convencionais quanto mecânicos (SEPEUR, 2008). Pesquisas atuais mostram o emprego de sistemas biológicos e microrganismos em rotas de síntese (FIGURA 1). Os métodos mecânicos usam vários tipos de moinhos, para reduzir o tamanho dos materiais metálicos e conseqüentemente gerando nanopartículas (MEYERS; MISHRA; BENSON, 2006). Já os métodos convencionais consistem na junção de átomos e moléculas (MUKHERJEE et al., 2001) para produção de nanopartículas metálicas. As principais restrições dos métodos convencionais estão associadas aos defeitos estruturais superficiais das nanopartículas, pois muitas características físicas estão diretamente relacionadas a estes efeitos (RAINIERI; OLASAGASTI; BARRANCO, 2018; THAKKAR; MHATRE; PARIKH, 2010).

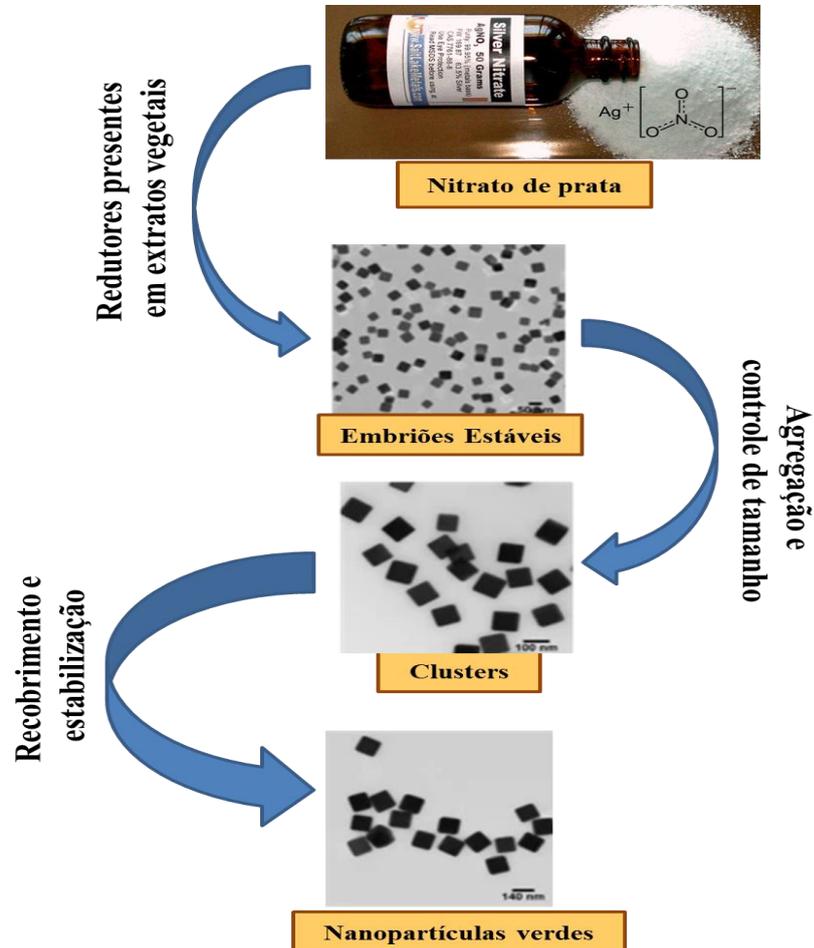
Figura 1 – Diferentes processos de Síntese de Nanopartículas.



Fonte: Do Autor (2022).

O possível mecanismo de síntese química de nanopartículas é mostrado na Figura 2.

Figura 2 – Mecanismo de Síntese de Nanopartículas usando extratos vegetais.



Fonte: Do Autor (2022).

O emprego de microrganismos em rotas de síntese de nanopartículas metálicas é amplamente explorado já que é uma alternativa ecologicamente correta. Porém sua principal limitação em rotas de síntese se deve ao elevado custo de cepas de microrganismos (SANGHI; VERMA, 2010). Neste sentido, a utilização de extratos vegetais em meios reacionais se torna uma alternativa interessante do ponto de vista ambiental e econômico para a produção em larga escala de nanopartículas metálicas.

3.2 Vantagens do Uso de Extratos Vegetais

O recente uso de extratos vegetais em meios reacionais de síntese de nanopartículas metálicas recebeu grande atenção entre os pesquisadores já que esta fonte é uma excelente alternativa aos reagentes tradicionalmente empregados. Extratos aquosos de plantas têm sido muito usados para a produção de nanopartículas metálicas. Em relação às rotas físicas e químicas convencionais, a síntese verde não necessita de condições específicas. Além disso, o mecanismo de redução dos íons metálicos usando extratos vegetais é mais rápido que alguns microrganismos utilizados por muitos pesquisadores (IRAVANI, 2011; KANNAN; MUKUNTHAN; BALAJI, 2011). Os subprodutos gerados durante a síntese verde de nanopartículas é ambientalmente adequado (DAHL; MADDUX; HUTCHISON, 2007). Alguns fitoconstituintes presentes nos extratos vegetais têm a capacidade de estabilizar as nanopartículas produzidas (DAHL; MADDUX; HUTCHISON, 2007; IRAVANI, 2011; KUMAR; YADAV, 2009). Portanto, a síntese de nanopartículas metálicas por meio de extratos vegetais apresenta inúmeras vantagens como: grande facilidade e disponibilidade, ausência de subprodutos tóxicos, alta eficiência na redução de íons metálicos, uso de água como solvente dispensam condições específicas como temperatura, pressão, produtos químicos nocivos e atuam como estabilizantes (CHAKRAVARTY et al., 2022).

3.3 Extratos Vegetais como Biorredutores

Extratos vegetais são considerados uma alternativa viável para síntese verde. Vale ressaltar que mais de 50% dos artigos publicados em síntese verde de nanopartículas metálicas correspondem a nanopartículas de prata devido à sua excelente ação antimicrobiana (DUTTA; CHATTOPADHYAY, 2019).

A síntese de nanopartículas de ouro e prata é um processo relativamente rápido, utilizando extratos de plantas como estabilizantes e redutores. De acordo com artigos científicos, o potencial de biorredução de extratos vegetais é mais eficiente para íons de prata do que para os íons de ouro (ARUNACHALAM, 2013). Polifenóis, açúcares, alcalóides, terpenóides, fenólicos ácidos e proteínas são alguns dos metabólitos vegetais que apresentam papel crucial durante a biorredução de íons metálicos.

Alguns parâmetros são de extrema importância durante a rota de síntese verde de nanopartículas metálicas empregando extratos vegetais. Dentre estes fatores podem ser citados

a concentração e natureza do extrato vegetal, concentração dos íons metálicos, pH, tempo e temperatura do meio reacional (DWIVEDI; GOPAL, 2010). Assim, para a síntese verde, o uso de extratos vegetais como biorredutores atende a todas as condições necessárias. Estudos recentes sobre condições de síntese verde de nanopartículas de prata se encontram na Tabela 1.

3.4 Nanopartículas de Prata

A síntese verde de nanopartículas de prata foi relatada em vários estudos que descreveram as nanopartículas obtidas a partir de extratos vegetais. Alguns exemplos são descritos na Tabela 1. Geralmente, a redução de íons de prata em solução aquosa produz prata coloidal, sendo que as partículas formadas apresentam diversos formatos e tamanhos. Existe grande interesse científico e tecnológico na prata coloidal já que ela exhibe diferentes propriedades como excelente condutividade, estabilidade química, atividade catalítica e atividade antibacteriana (WILEY et al., 2005). Inicialmente, os íons de prata formam complexos com os metabólitos secundários de plantas e conseqüentemente dão origem aos clusters metálicos em solução. Partículas de prata coloidal são produzidas a partir da aglomeração e crescimento dos íons de prata em clusters. Quando as partículas apresentam diâmetro inferior ao comprimento de onda da luz visível podem ser observadas mudanças colorimétricas na solução aquosa. As reações de biorredução dos íons metálicos geralmente ocorrem à temperatura ambiente. Uma das primeiras abordagens usando plantas foi com broto de alfafa, (GARDEA-TORRESDEY et al., 2003) para formação de nanopartículas de prata

Tabela 1 – Síntese vegetal de nanopartículas de prata.

Nome Popular (parte utilizada)	Nome Científico	Tamanho (nm)	Formato	Atividade biológica	Referências
Abacaxi (folhas)	<i>Ananas comosus</i>	12,4	Esférico	Antibacteriano	(ELIAS et al., 2014)
Amora	<i>Andean blackberry</i>	12-50	Esférico	Antioxidante	(KUMAR et al., 2017)
Caqui-do-mato	<i>Diospyros sylvatica</i>	10	Não reportado	Antimicrobiana	(PETHAKAMSETTY et al., 2016)
Figueira-doida (látex, folhas)	<i>Ficus Sycomorus</i>	20	Esférico / Elipsoidal	Antibacteriana	(SALEM et al., 2014)
Jamelão	<i>Syzygium cumini</i>	26,5	Não Reportado	Antimicrobiana	(LOGESWARI; SILAMBARASAN; ABRAHAM, 2015)
Jambo (folhas, casca)	<i>Syzygium jambos</i>	8,51	Esférico	Antimalárica, citotoxicidade	(DUTTA et al., 2017)

Fonte: Do Autor (2022).

3.5 Síntese Verde de Nanopartículas Usando Compostos Bioativos Isolados

A síntese verde de nanopartículas de prata empregando compostos bioativos isolados foi relatada por alguns estudos (KASTHURI; VEERAPANDIAN; RAJENDIRAN, 2009; RAJENDIRAN, 2009; ROY et al., 2010; TAMULY et al., 2014). Pedicelamida, um alcaloide isolado da folha de espécies *Piper*, foi usado para sintetizar nanopartículas de prata. O grupo hidroxil ($-OH$) dos alcaloides facilita a redução dos íons metálicos Ag^+ para Ag^0 , portanto, pode atuar como agente redutor, além de contribuir com a estabilização dos clusters metálicos recentemente produzidos no meio reacional (TAMULY et al., 2014). Nanopartículas de prata também foram sintetizadas por Rajendiran (2009) usando um flavonóide presente nas folhas de hena (*Lawsonia inermis*). Os grupos carbonila presentes nos alcaloides apresentam grande facilidade de interação com íons metálicos Ag^+ . Outro alcalóide isolado da folha de *Piper pedicelo*, foi usado para sintetizar nanopartículas de prata. Kasthuri, Veerapandian e Rjendiran (2009) observaram-se que o grupo metoxi ($-OCH_3$) de alguns compostos bioativos isolados também pode interagir com os íons metálicos de prata (RAJENDIRAN, 2009).

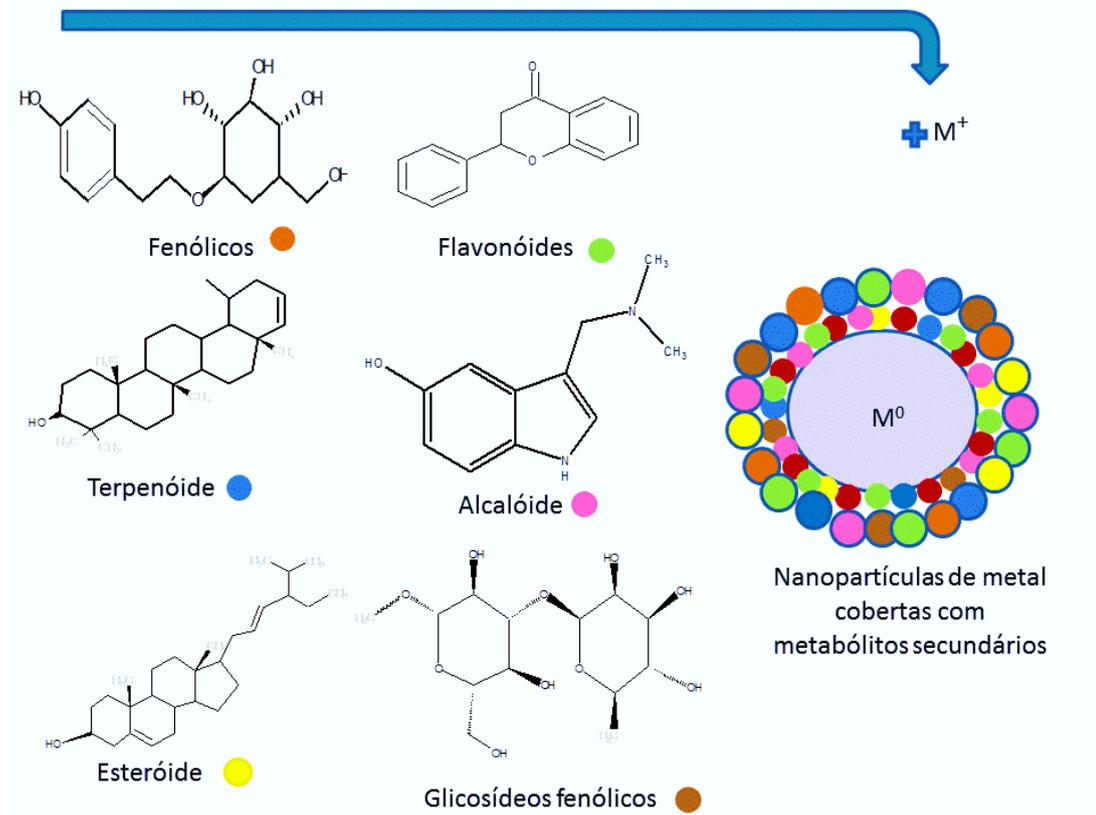
Hidroxi flavonóides isolados do extrato etanólico da própolis indiana, também agiram como redutores de íons metálicos durante a síntese verde de nanopartículas de prata (ROY et al., 2010). Uma distribuição de diâmetros mais homogênea pode ser obtida empregando esses flavonoides em meios reacionais. Assim, nota-se que os compostos bioativos isolados podem agir como biorredutores eficientes durante a síntese de nanopartículas metálicas, além de permitir a formação de partículas mais homogêneas.

3.6 Metabólitos Secundários Responsáveis pela Síntese Verde

Terpenóides, polifenóis, alcaloides e ácidos fenólicos são metabólitos vegetais secundários que desempenham um papel importante na redução de íons metálicos. A partir de estudos de espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear, é revelado que esses metabólitos contêm grupos funcionais como hidroxila, carbonila e amina que reagem com íons metálicos (SHANKAR; AHMAD; SASTRY, 2003). Eles também são capazes de atuar como agentes estabilizantes das nanopartículas de prata. Em estudos recentes é indicado que os metabólitos secundários não só reduzem os íons metálicos, mas também são adsorvidos na superfície das nanopartículas formadas. Eles evitam os processos de aglomeração e precipitação

das nanopartículas de prata (SAHOO et al., 2020). O provável papel dos metabólitos secundários na síntese nanopartículas é representado na Figura 3.

Figura 3 – Diagrama esquemático da contribuição dos metabólitos secundários na síntese verde de nanopartículas metálicas.



Fonte: Do Autor (2021).

Os flavonóides se dividem em diversas classes, como flavonóis, flavonas, isoflavonas, chalconas e antocianinas, que realizam papéis significativos na redução e quelação dos íons metálicos. Além disso, os flavonóides são compostos polifenólicos contendo distintos grupos funcionais capazes de contribuir com o mecanismo de formação das nanopartículas. Além disso, a capacidade de quelar íons metálicos com seus grupos carbonila é encontrada em alguns flavonóides. Por exemplo, a quercetina pode quelar três posições envolvendo carbonilas e hidroxilas nas posições C-3 e C-5 e o grupo catecol nas posições C-3' e C-4'. Estes grupos funcionais têm capacidade de quelar outros íons metálicos (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Cr^{3+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+}) mostrando assim a capacidade dos flavonóides de serem adsorvidos na superfície de uma nanopartícula durante os primeiros momentos de sua formação no meio reacional. Estes fatos elucidam a contribuição dos metabólitos secundários durante as etapas de nucleação dos clusters

metálicos e seu crescimento até a escala nanométrica (KASTHURI; VEERAPANDIAN; RAJENDIRAN, 2009).

Foi demonstrado por Panigrahi e colaboradores (2004) que os açúcares nos extratos vegetais exercem um papel crítico na formação de nanopartículas metálicas. A glicose pode agir como um agente redutor quando alguns de seus grupos químicos são convertidos de cetona para aldeído. Por outro lado, a capacidade de redução de dissacarídeos e polissacarídeos depende da capacidade do monossacarídeo de suportar uma configuração de cadeia aberta dentro de um oligômero. Por exemplo, lactose e maltose (dissacarídeos) têm características redutoras, pois pelo menos um deles pode fornecer uma configuração de cadeia aberta. Panigrahi e colaboradores (2004) relataram a contribuição da glicose durante a reação de síntese de nanopartículas metálicas com diferentes morfologias. Os estudos indicam que a glicose age como um agente redutor mais forte que a frutose, devido ao seu potencial antioxidante. Já a sacarose ainda é incapaz de reduzir o nitrato de prata em nanopartículas metálicas. Propõe-se que a porção aldeído do açúcar seja oxidada dando origem a um grupo carboxila através da adição nucleofílica de -OH, o que leva à redução de íons metálicos, formando nanopartículas. Shankar, Ahmad e Sastry (2003) sugeriram um mecanismo semelhante utilizando o extrato da videira *Magnolia* em reações de biorredução de íons de ouro.

Aminoácidos ou proteínas também exercem um papel importante na síntese de nanopartículas metálicas. Zayed, Elisa e Shabaka (2012) revelaram a partir da análise de espectros de infravermelho a presença de proteínas na superfície de nanopartículas metálicas obtidas via síntese verde. Eles podem agir como agentes eficazes de redução de íons metálicos na síntese de nanopartículas. Por exemplo, Maruyama, Fujimoto e Maekawa (2015) sintetizaram nanopartículas de ouro com diâmetros entre 4 e 7 nm empregando aminoácidos como agente estabilizante. Eles também exibem determinada capacidade de redução dos íons metálicos. Os aminoácidos cisteína, arginina, lisina e metionina são capazes de reduzir íons de prata (GRUEN, 1975). Tan, Lee e Wang (2010) estudaram 20 aminoácidos naturais para determinar sua capacidade de redução e eficiência quelante de íons metálicos e descobriram que o triptofano e histidina são os agentes quelantes mais fortes para os íons de ouro. Os grupos amina e carbonila dos ácidos também apresentaram boa eficiência de ligação aos íons metálicos.

Basicamente, o mecanismo de síntese de nanopartículas metálicas mediada por extratos vegetais envolve três etapas: (1) redução de íons metálicos e a formação dos núcleos metálicos reduzidos (clusters); (2) durante a fase de crescimento os íons metálicos se difundem do meio reacional para a superfície dos núcleos metálicos e (3) ocorrem processos de aglomeração dos núcleos metálicos. O processo esquemático da formação de nanopartículas é mostrado na Figura

2. Durante a fase de crescimento, as nanopartículas podem se organizar em diferentes formas, como nanoprismas, nanotubos, nano-hexaedros dentre outras (KIM et al., 2010; SI; MANDAL, 2007). A conformação mais favorável em termos energéticos é obtida pelas nanopartículas durante a última etapa do mecanismo de síntese, sendo que normalmente alguns metabólitos presentes no extrato vegetal serão adsorvidos na superfície metálica em uma concentração suficiente para agir como estabilizantes.

3.7 Fatores que Afetam a Síntese Verde de Nanopartículas Metálicas

A morfologia das nanopartículas (tamanho e forma) é o principal desafio enfrentado durante a síntese verde. Outros fatores como estabilidade cinética e distribuição homogênea do diâmetro das nanopartículas também devem ser levados em consideração. Existe um número relativamente grande de fatores que podem influenciar diretamente na síntese verde de nanopartículas metálicas. Dentre estes os principais fatores são o pH do extrato vegetal, a temperatura de síntese, o tempo de reação, a concentração do extrato vegetal e a concentração de íons metálicos no meio reacional.

De acordo com os estudos apresentados na literatura, o valor de pH dos extratos vegetais afeta a formação de nanopartículas metálicas (ARMENDARIZ et al., 2004; PEI et al., 2012; SATHISHKUMAR et al., 2009; SATHISHKUMAR; SNEHA; YUN, 2010; TIEMANN et al., 1999). Alterações do pH do meio reacional resultam em uma alteração da carga elétrica dos fitoconstituintes presentes nos extratos vegetais. Essas mudanças no pH do meio reacional acabam por impactar na reatividade das moléculas e sua capacidade de reduzir cátions metálicos. Extratos de diferentes fontes botânicas apresentam diferentes valores de pH e, portanto, diferentes estudos sobre seu impacto no formato e diâmetro das nanopartículas se fazem necessários. Em valores de pH mais ácidos (entre 2 e 4), observou-se que nanopartículas de maior diâmetro são formadas em comparação com valores de pH acima de 6,6. A produção de nanopartículas assistida pelo extrato de aveia-comum (*Avena sativa*) foi altamente dependente no valor de pH do meio reacional (ARMENDARIZ et al., 2004). Os autores obtiveram nanopartículas com diâmetro entre 25 e 85 nm em pH 2, enquanto que valores de pH entre 3 e 4 geraram nanopartículas metálicas de menor diâmetro. Eles também descobriram que nanopartículas metálicas podem se aglomerar dando origem a estruturas de maior diâmetro. Por outro lado, na faixa de pH entre 3 e 4 os grupos funcionais hidroxila e carbonila estavam disponíveis para interação com íons metálicos presentes no meio reacional. Pei e colaboradores (2012) sugeriram que o valor de pH do meio reacional tem

a capacidade de alterar as cargas elétricas dos fitoconstituintes presentes no extrato vegetal, as quais desempenham um papel importante na estabilidade e cinética de crescimento das nanopartículas metálicas. Sathishkumar e seus colaboradores (2009) também observaram o efeito do pH durante a síntese verde das nanopartículas de prata usando extrato da casca de caneleira-verdadeira (*Cinnamom zeylanicum*) a uma faixa de pH entre 1 e 11. Eles identificaram que, na maioria dos casos, o pH do meio reacional se torna mais ácido após a síntese verde das nanopartículas de prata. Sendo que nanopartículas de prata elipsoidais de grande diâmetro foram observadas em valores de pH mais baixos, enquanto nanopartículas esféricas e com grande distribuição de diâmetros em valores de pH mais alcalino. Os pesquisadores concluíram que a disponibilidade de vários grupos funcionais garante uma maior interação com os íons metálicos no meio reacional e conseqüentemente uma redução em seu diâmetro médio.

A temperatura é considerada um parâmetro de síntese importante durante a formação de nanopartículas metálicas em um meio reacional contendo extratos vegetais. Normalmente, o aumento da temperatura proporciona um aumento na taxa da reação química. Extratos de alfafa contribuíram para a síntese verde de nanopartículas de prata triangular somente em temperaturas acima de 30°C (LUKMAN et al., 2011). Além disso, a síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extrato de verbena (*Aloysia citrodora*) evidenciou que o aumento da temperatura do meio reacional também é acompanhado por um aumento na eficiência de redução dos íons metálicos (CRUZ et al., 2010). Lin e seus colaboradores (2010) sugeriram que a temperatura pode afetar na formação de nanopartículas metálicas obtidas a partir de um meio reacional contendo extrato de Cassia. Eles identificaram a síntese de nanofitas de prata em temperatura ambiente, enquanto nanopartículas de prata esféricas a uma temperatura acima de 60 °C. A partir deste experimento acredita-se que a interação dos fitoconstituintes com a superfície das nanopartículas é influenciada pela temperatura do meio reacional. Em algumas situações, temperaturas mais altas podem ajudar na etapa de nucleação, o que impacta na quantidade de núcleos estáveis formados.

A compreensão dos parâmetros cinéticos da reação de redução dos íons metálicos é fundamental para o estudo das reações de síntese verde das nanopartículas. Alguns trabalhos científicos como de Dwivedi e Gopal (2010) apontam um aumento acentuado das bandas de absorção na região do ultravioleta do meio reacional durante a síntese das nanopartículas. Esse aumento na banda de absorção pode ser associado a concentração das nanopartículas metálicas no meio reacional enquanto investigavam o efeito do extrato de *Chenopodium*. Eles mostraram que após a concentração das nanopartículas metálicas no meio reacional, sofreu um aumento entre o período de 15 minutos e 2 horas. Na síntese apoiada por extrato de frutas de Tansy (*Catinga-de-mulata*) Dubey e seus colaboradores (2010) evidenciaram a formação de nanopartículas de prata

após 10 minutos da reação. De maneira semelhante Ghoreishi e seus colaboradores (2011) também notaram a necessidade de um período de tempo de reação inicial para dar início a formação de nanopartículas de prata assistida por extrato de rosas de damasceno. Além disso, outros trabalhos científicos como de Veerasamy e colaboradores (2011) sugeriram que um período mínimo de síntese das nanopartículas é necessário para garantir de forma eficiente a etapa nucleação além da adsorção dos metabólitos vegetais na superfície das nanopartículas. Eles também descreveram que o tempo ideal necessário para a conclusão da reação para a síntese de nanopartículas de prata fosse de 60 minutos.

Os extratos vegetais têm a capacidade de produzir nanopartículas metálicas, sendo que a concentração e ação antioxidante do extrato são fatores chave para garantir a formação de nanopartículas metálicas. O extrato de frutos de *Piper wallichii* foi incorporado ao meio reacional durante a síntese de nanopartículas de ouro. Em outro estudo, o aumento da concentração do extrato vegetal da fruta Tansy (LIN et al., 2010) ocasionou na redução drástica do diâmetro médio de nanopartículas de prata e ouro (PRABHA; LAHTINEN; SILLANPÄÄ, 2010). Além disso, com o aumento da concentração do extrato de folhas de *Rosa rugosa* (PRABHA; LAHTINEN; SILLANPÄÄ, 2010), o diâmetro médio das nanopartículas de prata também foi reduzido. Em todos esses casos, o tamanho das nanopartículas de prata foi menor do que o das outras nanopartículas metálicas, indicando que o extrato vegetal influencia diretamente no tamanho das nanopartículas sintetizadas. Algumas investigações científicas indicam que nanopartículas de prata sintetizadas a partir de extratos vegetais são mais estáveis do que aquelas produzidas a partir de microrganismos, mesmo após vários meses (IRAVANI, 2011). Por exemplo, nanopartículas de prata sintetizadas a partir do extrato de folhas de vinca (*Catharanthus roseus*) mostraram que o espectro na região do ultravioleta não sofreu variações significativas mesmo após 4 meses, porém o mesmo foi alterado consideravelmente no caso das nanopartículas obtidas por bactérias (*Bacillus subtilis*) (KANNAN; MUKUNTHAN; BALAJI, 2011). Essa alteração no espectro das nanopartículas metálicas é um forte indício da aglomeração e precipitação das nanopartículas metálicas.

No geral, a elevada concentração de íons metálicos no meio reacional produz nanopartículas de prata de maior diâmetro. Partículas de prata com diâmetro na faixa de 50 a 100 nm foram produzidas em meios reacionais contendo íons prata em concentrações entre 10^{-2} e 10^{-4} M de extrato de folhas de tramazeira (*Sorbus aucuparia*) (PRABHA et al., 2010). Porém, nas mesmas condições reacionais, nanopartículas de ouro com diâmetro um pouco maior (50 a 150 nm) foram obtidas. Da mesma forma, o extrato de folhas de fedegosa (*Chenopodium album*) e uma concentração de 5mM de íons prata foram empregados para produzir partículas de prata com

diâmetro entre 40 e 90 nm (DWIVEDI; GOPAL, 2010). Por outro lado, nanopartículas de prata com menor diâmetro (entre 30 e 60 nm) foram observadas em meios reacionais contendo a mesma concentração de íons prata (5mM) de extrato das folhas de *Rosa rugosa* (PRABHA; LAHTINEN; SILLANPÄÄ, 2010). Assim, a tendência de aumento no diâmetro médio das nanopartículas metálicas foi observada com o aumento da concentração de íons metálicos em solução. Esses estudos científicos apontam que nanopartículas de prata com grande diâmetro são obtidas em meios reacionais contendo elevada concentração de íons metálicos.

De forma geral pode-se afirmar que a síntese verde de nanopartículas de prata empregando extratos vegetais apresenta grande vantagem se comparada a rotas convencionais (KUMAR; CHISTI; CHAND, 2013).

3.8 Metodologia de Superfície de Resposta

A metodologia de superfície de resposta (RSM) é uma ferramenta de métodos estatística e matemática muito útil para avaliar a influência de múltiplas variáveis nas variáveis de resposta simultaneamente, tendo como finalidade a obtenção de condições otimizadas de processo ou produtos (VENKATALAXMI; PADMAVATHI; AMARANATH, 2004). O RSM é uma técnica estatística que gera análises de resposta confiáveis e adequadas além de fornece um modelo matemático que se ajusta aos dados experimentais o qual pode ser usado para otimizar os processos. A utilização do planejamento experimental por meio da RSM torna os estudos mais práticos, confiáveis e econômicos devido aos menores números de experimentos e das melhores condições das sínteses (SHARIFI PAJAIE; TAGHIZADEH, 2015).

O RSM consiste em dois tipos de projetos : projeto composto central (CCD) e projeto Box-Behnken (BBD). A diferença entre os dois projetos é que o CCD utiliza três níveis para os fatores de estudo (-1, 0, +1), enquanto o BBD utiliza cinco níveis (- α , -1, 0, +1, + α) (MANOJKUMAR; MUTHUKUMARAN; SHARMILA, 2022). Além do projeto Box-Behnken possuir menos níveis em relação a composto central ele também possui uma outra vantagem a de apontar o local dos problemas dos limites experimentais o que evita a combinações desnecessárias de tratamentos (SHARIFI PAJAIE; TAGHIZADEH, 2015). Devido a estas vantagens vários autores têm utilizado o projeto Box-Behnken para otimização dos seus trabalhos (NATHIELY et al., 2018; SHARIFI PAJAIE; TAGHIZADEH, 2015).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os reagentes usados neste estudo foram:

- Polpa de amora adquirida no comércio local;
- Gelatina bovina da GELITA (tipo B, 180 bloom, 30mesh);
- Nitrato de Prata (P.A - ACS), Dinâmica Química contemporânea LTDA, (Indaiatuba/SP, Brasil);
- Folin- Ciocalteu Fenol solução 2M, Êxodo Científica, (Sumaré/SP, Brasil);
- Carbonato de sódio Anidro (P.A), Êxodo Científica, (Sumaré/SP, Brasil);
- Ácido gálico Anidro Puríssimo, Êxodo Científica, (Sumaré/SP, Brasil);
- β caroteno, Sigma-Aldrich;
- Ácido linoleico, Sigma-Aldrich;
- Clorofórmio (P. A - ACS), Sigma-Vetec ;
- Tween 40, Sigma-Aldrich;
- Molibdato de amônio, Chemco Indústria e Comércio Ltda, (Hortolândia/SP, Brasil);
- Ácido sulfúrico, Sigma-Aldrich;
- Fosfato de sódico monobásico Anidro (98% P.A), Neon Comercial, (Suzano/SP, Brasil);
- Ácido clorídrico (P.A - ACS), Êxodo Científica, (Sumaré/SP, Brasil);
- Hidróxido de sódio, Êxodo Científica, (Sumaré/SP, Brasil);
- Ágar tripticase de soja (TSA), Merck.
- Cloranfenicol, Sigma-Aldrich.

4.2 Determinação de Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante da Polpa de Amora

O preparo dos extratos foi realizado segundo a metodologia de Barros et al . (2020) com modificações. A extração foi feita através da homogeneização de 25 mL de polpa de amora com 50 mL de água destilada, durante 30 minutos em banho ultrassônico à temperatura ambiente, a qual foi misturada a cada 5 minutos. Logo após o extrato foi filtrado com papel de filtro de 14 μ m de porosidade e armazenado em frascos de vidro âmbar à -18 °C. Os extratos foram feitos em triplicadas.

Os compostos fenólicos foram determinados de acordo com o método adaptado de Folin-Ciocalteu (WATERHOUSE, 2002). Inicialmente foram colocados em tubos de ensaios 0,5 mL de extrato da polpa de amora que foram misturados com 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (10%) e 2 mL de solução de carbonato de sódio (4%). Em seguida, os tubos foram agitados à 200 RPM e mantidos em repouso, ao abrigo da luz. Após 2 horas, foram medidas as absorvâncias, a 750nm, em um espectrofotômetro (Varian Cary 50, EUA). Soluções aquosas de ácido gálico foram empregadas na construção da curva de calibração. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente (EAG) por 100 g de amostra.

O método β -caroteno/ácido linoleico foi realizado segundo a metodologia apresentada por Rufino et al. (2010) com modificações. Uma solução de β -caroteno e ácido linoléico foi preparada a partir da adição de 50 μ L de β -caroteno, 40 mg de ácido linoléico, 1 mL de clorofórmio e 500 mg de Tween. Em seguida a solução foi agitada e transferida para um rotaevaporador para evaporação total do clorofórmio. Posteriormente foi adicionado a esta solução, sob agitação constante, água destilada previamente saturada com oxigênio por 30 minutos e realizou o ajuste da absorvância entre 0,6 e 0,7 a 470 nm. A leitura da absorvância foi feita através de um espectrofotômetro. O ensaio foi realizado por meio da adição em tubos de ensaio de uma alíquota de 1,25 mL da solução reativa e 100 μ L de extrato, os quais foram medidas as absorvâncias no tempo zero a 470 nm. Logo após os tubos foram incubados em banho-maria a 40 °C, ao abrigo da luz, para reação de oxidação e a segunda leitura foi efetuada após 2 horas de incubação. As leituras foram feitas em triplicada.

A atividade antioxidante foi expressa pela percentagem de proteção contra a oxidação lipídica (equação 1).

$$\%proteção = 100 - \left(\frac{[(Absorbância_{inicial} - Absorbância_{final})]_{amostra} \times 100}{(Absorbância_{inicial} - Absorbância_{final})_{sistema}} \right) \quad (1)$$

A avaliação da atividade antioxidante pelo método do complexo do fosfomolibdênio foi determinada segundo a metodologia de Prieto, Pineda e Aguilar (1999). Uma alíquota de 100 μ L de extrato foram colocados a um tubo de ensaio contendo 900 μ L de água destilada e 3 mL da solução do complexo de fosfomolibdênio (molibdato de amônio 0,012 M, ácido sulfúrico 1,8 M e fosfato de sódico monobásico 0,084 M). Em seguida, os tubos foram tampados e incubado em banho-maria a 95°C por 90 minutos. Após o resfriamento, foi realizada a medida da absorvância a 695 nm em um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em grama de ácido ascórbico

por 100 g da amostra, fundamentados em uma curva de calibração com concentrações conhecidas de ácido ascórbico.

4.3 Síntese Verde das Nanopartículas de Prata

Para otimizar e avaliar as diferentes condições de síntese das Nanopartículas de Prata foram utilizados neste ensaio, o projeto Box-Behnken (BBD). Foram selecionadas três variáveis dependentes, sendo o volume da solução da polpa de amora/ AgNO_3 , tempo e temperatura as quais foram usadas para a otimização em três níveis diferentes, VIZ., baixo (-1), médio (0) e alto (+1), conforme mostrado na Tabela 2. Essas variáveis foram escolhidas através de testes preliminares e com base na literatura (OCSOY et al., 2017).

Tabela 2 – Planejamento Experimental com valores das variáveis dependentes usadas no projeto Box-Behnken.

Variáveis	Níveis		
	Baixo	Médio	Alto
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	50	70	90
Tempo (h)	1	2	4
Polpa/ AgNO_3 (mL/mL)	0/70	10/60	20/50

Fonte: Do autor (2022).

O preparo da solução de nitrato de prata foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Ocsoy et al. (2017) com modificações. A solução de nitrato de prata ocorreu por meio da dissolução de 0,016 g de gelatina em 65mL de água deionizada a 60°C sob agitação magnética. Em seguida a solução foi resfriada até 25°C e posteriormente foi adicionado 0,013 g de nitrato de prata. A gelatina possui a função de estabilizar a superfície das nanopartículas devido a sua capacidade de formação de uma barreira estérica (DARROUDI et al., 2011).

Após foi realizado a solução da polpa de amora por meio da diluição de 1 g da polpa em 10 mL de água deionizada. O preparo da solução da polpa de amora foi feito de acordo com a metodologia de Ocsoy et al. (2017) com modificações.

As sínteses das nanopartículas de prata ocorreram de acordo com as condições mostradas na Tabela 2. Inicialmente foram misturados diferentes volumes da solução de polpa de amora/nitrato de prata (0/70, 10/60 e 20/50 mL/mL) e após foram agitadas por 10 minutos. Em seguida as soluções foram transferidas para um reator hidrotermal, o qual foi ajustado a

temperatura e o tempo de cada ensaio. O tempo foi contado a partir do momento em que o equipamento hidrotermal atingiu a temperatura escolhida para as sínteses, conforme apresentado na Tabela 2. As nanopartículas formadas foram colocadas em recipientes escuros e armazenadas sob refrigeração para as demais análises.

4.4 Análise do Diâmetro Hidrodinâmico e do Potencial Zeta das Nanopartículas

O tamanho hidrodinâmico, o índice de polidispersividade (PDI) e o potencial Zeta das nanopartículas foram obtidos pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). O potencial zeta é responsável por fornecer a carga superficial das partículas, enquanto o índice de polidispersividade avalia se a distribuição de tamanhos das partículas são monodispersas ou polidispersas na amostra (BHATTACHARJEE, 2016).

As análises foram realizadas em um aparelho Zetasizer Nano ZS Malvern Instruments (modelo Zen 3600, Estados Unidos). As medidas do potencial Zeta em função do pH para as suspensões de nanopartículas 0,1 % foram feitas em um intervalo de 1,5 a 11. E os ajustes do pH foram feitos com soluções aquosas de HCl (1 mol. L⁻¹) e NaOH (1 mol.L⁻¹).

4.5 Avaliação da Atividade Antimicrobiana das Nanopartículas de Prata

O teste de sensibilidade das bactérias às nanopartículas de prata (AgNPs) foi realizada segundo a metodologia descrita por Soto et al. (2019) com modificações.

Foi usado neste teste o método de disco-difusão em ágar contra as bactérias *Escherichea coli* K12 (Gram-negativo), e *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 (Gram-positiva) as quais foram cultivadas a 37°C/24 h. Após o cultivo, a suspensão bacteriana foi centrifugada à 10.000 rpm por 5 minutos à 4 °C, ressuspendidas em solução salina 0,85% (p/v) e padronizadas na escala de McFarland á 0,5, equivalente a 108 UFC/mL. Em seguida os microrganismos padronizados foram espalhados por sementeira em ágar tripticase de soja (TSA). Logo após foram depositados, assepticamente, sob a superfície do ágar discos de papel filtro (6 mm) estéreis, e impregnados com 10 µl de AgNPs. Posteriormente as placas foram incubadas à 37±2 °C por 24 horas. O teste avaliou o halo de inibição, que foi expresso em milímetros (mm). As análises foram realizadas em triplicata. E controle foi feito através do antibiótico cloranfenicol 0,5 % (p/v).

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante da Polpa de Amora

Os Compostos fenólicos e a atividade antioxidante da polpa de amora são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Compostos fenólicos e atividade antioxidante (β -caroteno/ácido linoleico e complexo do fosfomolibdênio) da polpa de amora.

Extrato	Fenólicos totais (mg. EAG 100 g ⁻¹)	Atividade antioxidante	
		β -caroteno/ácido linoleico (% de proteção)	Complexo do fosfomolibdênio (%)
Polpa de amora	78,03 \pm 6,88	84,79 \pm 2,92	11,77 \pm 0,44

Fonte: Do autor (2022).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários presentes nas plantas e que têm sido muito citados por pesquisadores da área de nanopartículas metálicas. Segundo um estudo de nanopartículas de prata oriundas de *Morinda citrifolia*, os autores observaram que quantidade dos compostos fenólicos presentes nos extratos vegetais podem supostamente influenciar na redução e estabilização das partículas o que evita a sua aglomeração (BORDOLOI et al., 2020). Portanto, foram avaliados os compostos fenólicos totais da polpa de amora, tendo como resultado 78,03 mg. EAG por 100 gramas de amostra (TABELA 3). A presença destes compostos pode ser um bom indicativo para se usar a polpa de amora na síntese de nanopartículas.

Os antioxidantes são substâncias capazes de reduzir e inibir os radicais livres, prevenindo assim, as células de desenvolver doenças degenerativas causadas por espécies reativas de oxigênio (CHAKRABORTY et al., 2021). De acordo com Singh et al. (2018), os antioxidantes encontrados nos extratos vegetais podem contribuir de forma positiva na formação das nanopartículas metálicas, uma vez que, estas substâncias tem a capacidade de aderirem na superfície das partículas proporcionando assim uma ação antioxidante. Com base nessa informação foi avaliada a atividade antioxidante da polpa de amora através de dois métodos diferentes: β -caroteno/ácido linoleico e Complexo do fosfomolibdênio.

O método β -caroteno/ácido linoleico é fundamento em medidas espectrofotométricas de oxidação β -caroteno (descoloração) induzido pelos produtos gerados por meio da degradação oxidativa do ácido linoleico (RUFINO et al., 2010). Conforme apresentado na Tabela 3 o extrato

da polpa de amora teve como resultado 84,79% de proteção contra a oxidação do β -caroteno. Segundo Rufino et al. (2010), os valores acima de 70% em alimentos são classificados como alta atividade antioxidante, enquanto os valores entre 40 a 70 % intermediária e menor que 40 % baixa. Sendo assim a polpa de amora em estudo pode ser considerada com alto poder de proteção, já que obteve um valor superior a 70%.

O método do complexo de fosfomolibdênio se baseia na redução de molibdênio (VI) para molibdênio (V) formando como produto um complexo verde em pH ácido e que apresenta uma absorção máxima em 695nm. Esta redução só ocorre na presença de determinadas substâncias antioxidantes (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). A atividade antioxidante realizada através do método do complexo de fosfomolibdênio também apresentou valores significativos, sendo de 11,77%. Esse resultado comprova a existência de agentes antioxidantes na polpa de amora, pois foram capazes de promoverem a redução do composto do Molibdênio (+6).

5.2 Análise do Diâmetro Hidrodinâmico e do Potencial Zeta das AgNPs

O planejamento usado para a síntese de nanopartículas sugeriu um total de 15 experimentos, conforme mostrados na Tabela 4. O tamanho hidrodinâmico da partícula, índice de polidispersividade, potencial zeta e as análises antimicrobianas obtidas por meio dessas sínteses também são apresentadas nesta tabela.

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 4 é possível observar que o tamanho das nanopartículas sintetizadas variou de 37,8 a 478 nm enquanto o índice de polidispersividade (PDI) variou de 0,200 a 0,940. Segundo Abdelsalam et al. (2019) as partículas podem ser consideradas polidispersas quando exibem valores de PDI maiores que 0,5 ou monodispersas quando estes são inferiores a 0,5. Portanto, a maioria das partículas em estudo exibiram PDI maiores que 0,5 indicando a polidispersividade do sistema coloidal, ou seja, elas possuem tamanhos heterogêneos. Entretanto, houve exceções nos ensaios 5,7 e 9 já que estes tiveram valores de PDI inferiores a 0,5 comprovando assim a homogeneidade do tamanho das partículas em suspensão.

A estabilidade das suspensões coloidais das AgNPs foram analisadas por meio da carga de superfície através do potencial zeta. Conforme mostrado na Tabela 4 os valores do potencial zeta variaram de 5,16 a -17,4 mV. Geralmente resultados menores que 30 mV em módulo indicam instabilidade das AgNPs o que pode gerar conglomerados e descontrole do formato e tamanho finais das partículas (SHUKLA; MASIH; MEHATA, 2022).

Tabela 4 – Planejamento experimental Box-Behnken e valores da média seguidos pelo desvio padrão do tamanho hidrodinâmico, potencial zeta e atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata oriundas da polpa de amora.

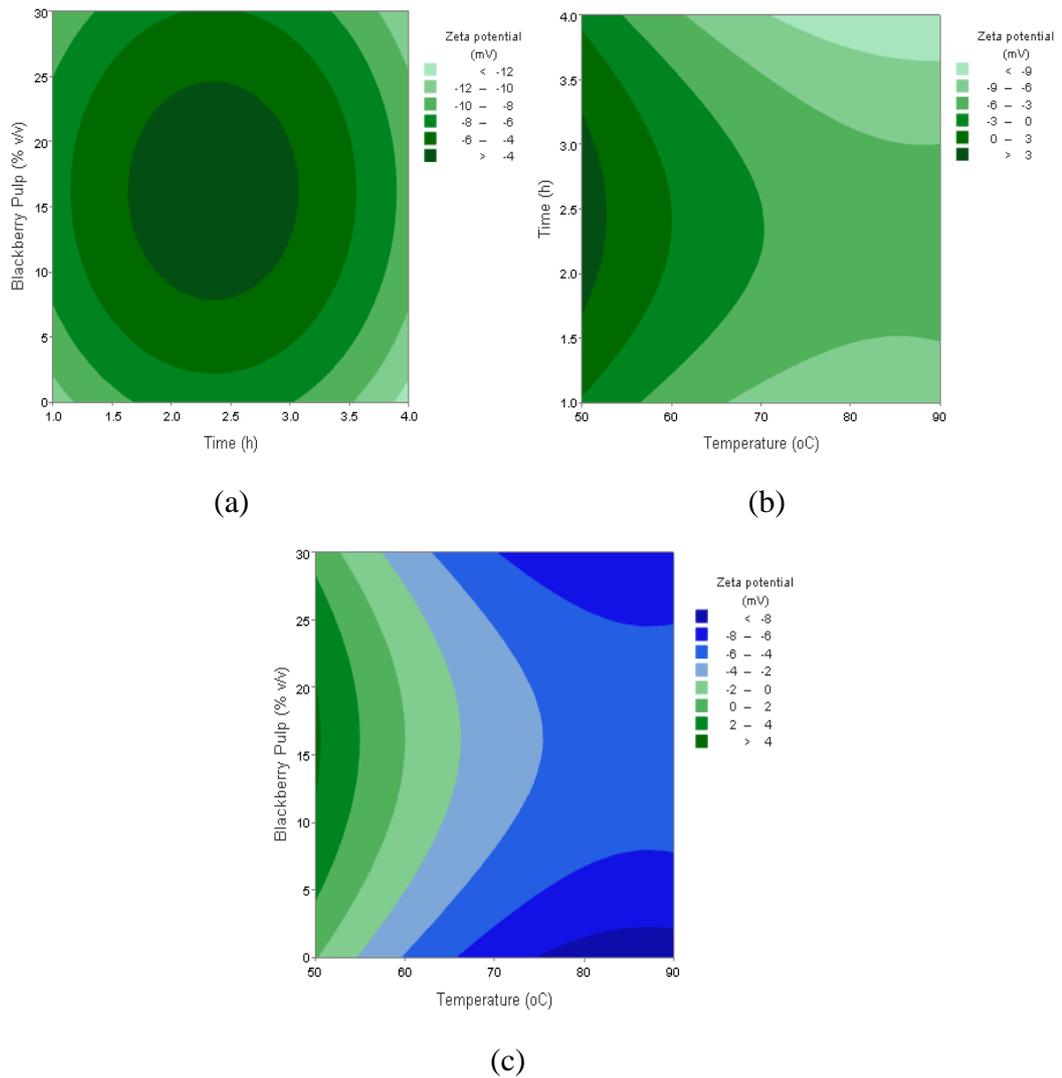
Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Solução Polpa/AgNO₃ (mL/mL)	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Halo de Inibição <i>E. Coli</i> (mm)	Halo de Inibição <i>L. monocytogenes</i> (mm)
1	50	1	10/60	62,6 ± 15,1	0,840 ± 0,140	5,16 ± 1,80	11,8 ± 1,30	8,84 ± 0,500
2	90	1	10/60	478 ± 15,0	0,930 ± 0,0800	-9,64 ± 0,600	11,3 ± 0,690	8,57 ± 0,650
3	50	4	10/60	269 ± 21,2	0,850 ± 0,0400	-0,740 ± 0,110	11,7 ± 0,720	9,65 ± 0,950
4	90	4	10/60	317 ± 185	0,460 ± 0,0200	-8,53 ± 0,400	10,6 ± 0,760	8,68 ± 0,310
5	50	2	0/70	259 ± 8,17	0,220 ± 0,0100	-1,31 ± 0,540	9,70 ± 0,780	9,16 ± 0,550
6	90	1	10/60	206 ± 89,8	0,860 ± 0,2500	-6,41 ± 0,200	10,9 ± 0,880	9,52 ± 0,720
7	50	2	0/70	302 ± 226	0,340 ± 0,0100	0,760 ± 0,490	11,7 ± 0,800	9,40 ± 0,500
8	70	4	0/70	96,8 ± 11,6	0,540 ± 0,0500	-8,26 ± 0,920	11,4 ± 0,580	9,89 ± 1,20
9	90	4	10/60	213 ± 11,2	0,200 ± 0,0300	-14,3 ± 1,50	10,5 ± 0,570	8,68 ± 0,720
10	70	4	0/70	299 ± 174	0,510 ± 0,0200	-17,4 ± 4,80	10,3 ± 1,00	9,09 ± 0,530
11	70	1	20/50	332 ± 196	0,620 ± 0,100	-11,1 ± 0,250	10,4 ± 1,10	8,97 ± 0,500
12	70	1	20/50	0,000 ± 0,000	0,770 ± 0,390	-8,41 ± 0,360	10,1 ± 0,770	8,75 ± 0,640
13	50	1	10/60	109 ± 53,5	0,940 ± 0,100	-5,75 ± 1,10	10,6 ± 0,960	9,11 ± 0,390
14	70	2	10/60	265 ± 18,8	0,550 ± 0,0700	-1,66 ± 0,350	10,1 ± 0,600	9,64 ± 0,540
15	70	2	10/60	37,9 ± 21,8	0,790 ± 0,360	-4,70 ± 0,310	10,4 ± 1,20	9,87 ± 0,690
Extrato puro							0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000

Legenda: Médias ± desvio padrão

Fonte: Do autor (2022)

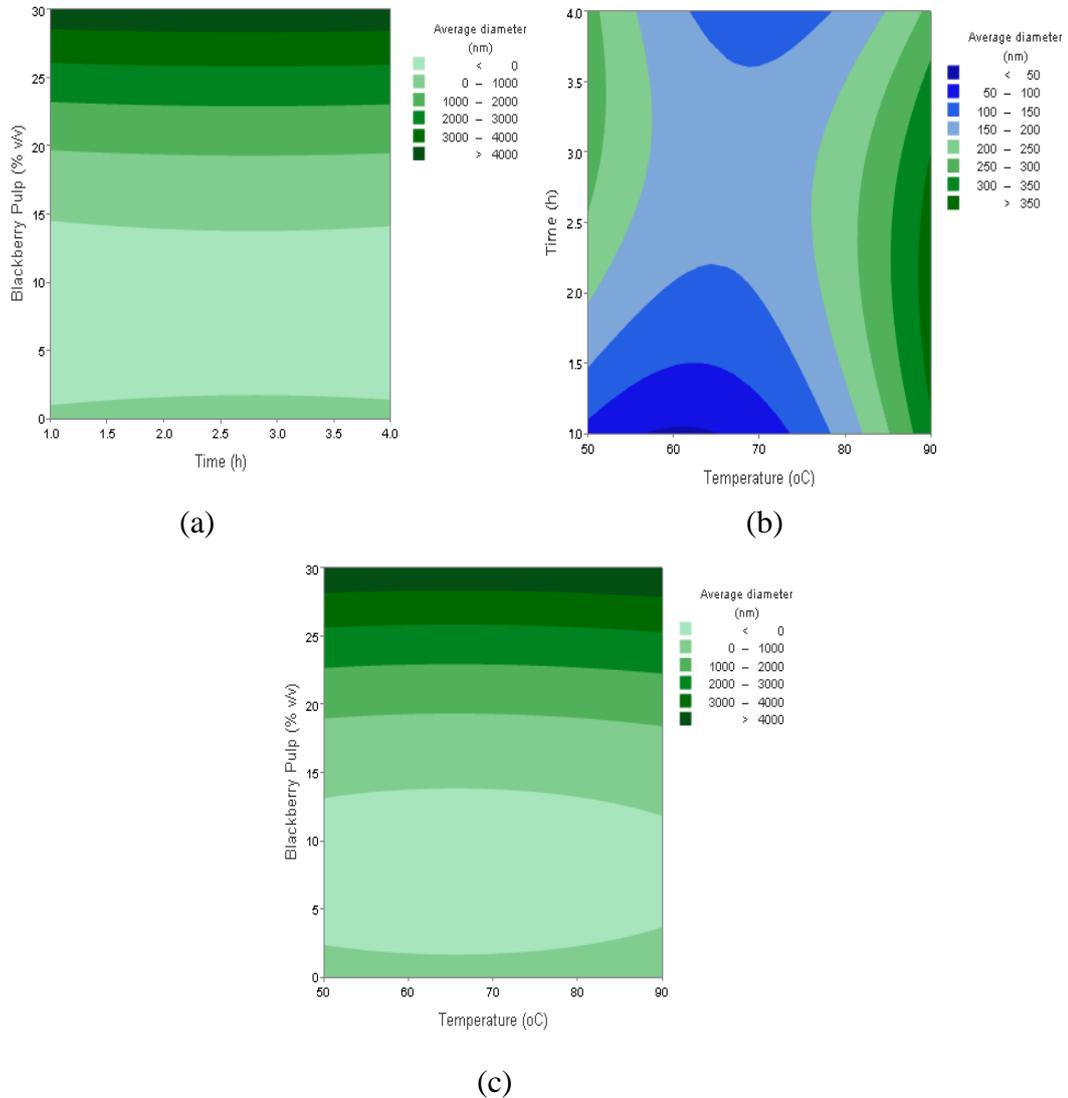
Para avaliar melhor a influência de cada variável dependente em relação às variáveis de resposta (potencial zeta e tamanho hidrodinâmico) foram plotados gráfico de contornos que estão ilustrados na Figura 4 e 5.

Figura 4 – Gráfico de contorno mostrando a influência das variáveis: (a) tempo e concentração da solução polpa/AgNO₃ (b) temperatura e tempo; (c) temperatura e concentração da solução polpa/AgNO₃ no potencial zeta das nanopartículas de prata.



Fonte: Do autor (2022).

Figura 5 – Gráfico de contorno mostrando a influência das variáveis: a) tempo e concentração da solução polpa/AgNO₃; (b) temperatura e tempo; (c) temperatura e concentração da solução polpa/AgNO₃ no tamanho das nanopartículas de prata.



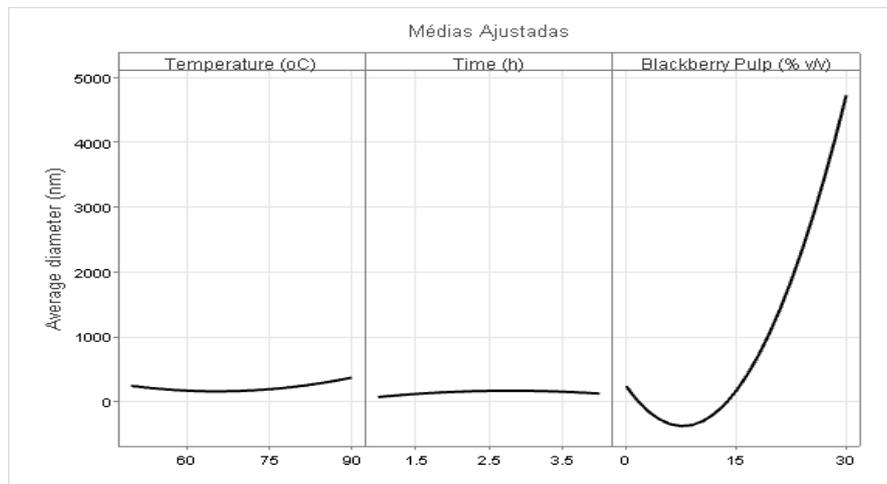
Fonte: Do autor (2022).

A curva de contorno do potencial zeta em função das variáveis tempo e concentração da solução polpa/AgNO₃ (Figura 4a) mostrou que ao aumentar o tempo e a concentração de polpa durante a síntese favoreceu o aumento do valor do potencial zeta. Porém esse fenômeno é visto até próximo da concentração de 20 % (mL /mL) da solução polpa/AgNO₃ e 3 horas de síntese, acima dessas condições o potencial zeta começa a decair de forma gradual chegando bem próximos dos valores iniciais, sendo estes inferiores a -12 mV. Analisando a Figura 5b e 5c é possível observar de modo geral que o potencial zeta teve uma tendência de redução com o aumento da temperatura em função do aumento tanto do tempo quanto da concentração da

solução polpa/AgNO₃. Sendo que o potencial zeta no primeiro caso alterou de >3 a < -9 mV e no segundo caso de >4 a < -8 mV.

A análise da Figura 5 mostrou a forte influência da concentração da solução polpa/AgNO₃ no tamanho das partículas. De acordo com gráficos de contorno (Figura 5a e c) o aumento da concentração da solução polpa/AgNO₃ acarretou no aumento exponencial do diâmetro das partículas. No entanto, as outras variáveis em estudo, tempo e temperatura, não tiveram os efeitos significativos no tamanho das nanopartículas, fato que pode ser justificado através do gráfico de efeitos principais (Figura 6).

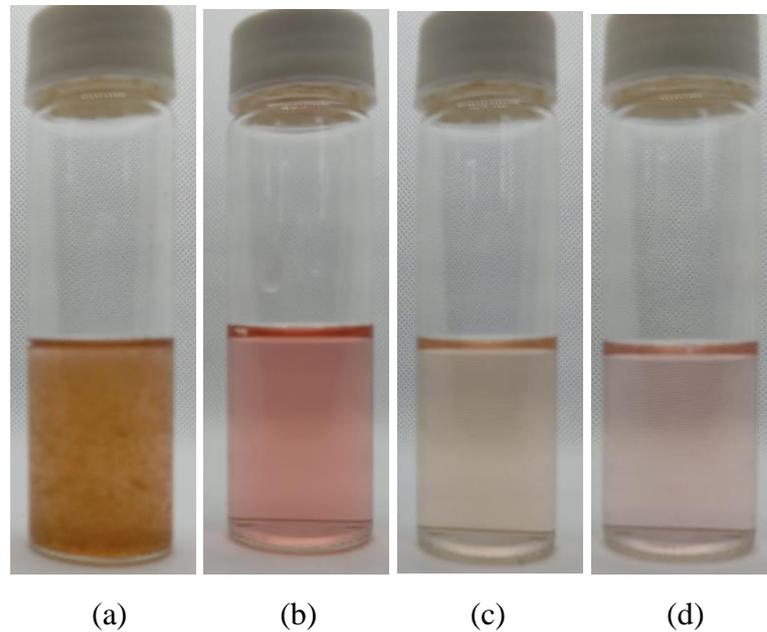
Figura 6 – Gráfico de efeitos principais para o diâmetro das nanopartículas de prata.



Fonte: Do autor (2022).

A Figura 7 ilustra a relação entre a coloração das nanopartículas e o tamanho das partículas. A cor amarela alaranjada é característica da prata coloidal e foi evidenciado na partícula de diâmetro maior (Figura 7-a), o que comprova a redução e formação prata na solução. No entanto, a coloração passa a ser menos intensa a medida em que o diâmetro da partícula diminui (Figura 7-b, c e d).

Figura 7– Imagens das AgNPs mostrando a diferença da coloração em relação ao tamanho da partícula: (a) 478nm; (b) 332nm; (c) 206nm e (d) 62,6nm.



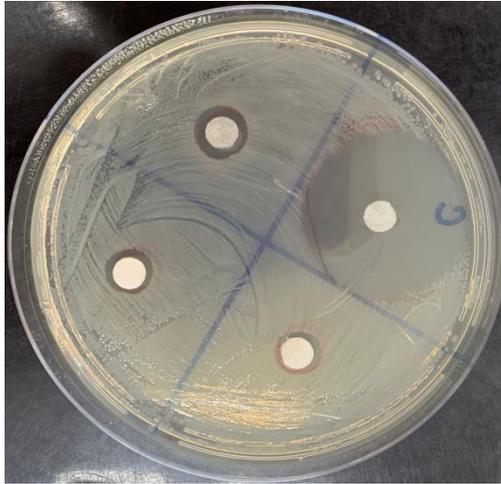
Fonte: Do autor (2022).

5.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana das AgNPs

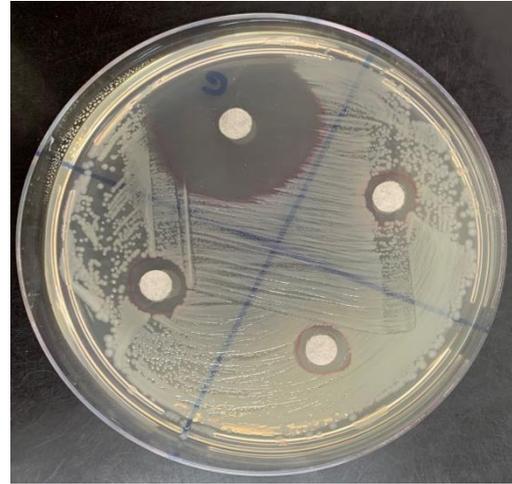
A atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata foi avaliada contra duas bactérias, a *Escherichia coli* K12 (Gram-negativo), e *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 (Gram-positiva). Na Tabela 4 estão apresentados os valores dos halos de inibição, o qual é possível verificar que todas as nanopartículas sintetizadas tiveram ação inibitória contra os dois tipos microrganismo estudados. No entanto o efeito inibitório das AgNPs foi maior contra a bactéria *E. coli*, no qual teve os halos de inibição variando entre 9,70 a 11,8 nm. Enquanto nas bactérias *L. monocytogenes* os halos variaram de 8,57 a 9,89nm. Esses resultados podem ser comprovados por meio da Figura 8, que ilustra o crescimento da zona de inibição durante o experimento do disco de difusão em ágar.

O mesmo teste antimicrobiano foi realizado para o extrato puro da polpa de amora e os dados obtidos na Tabela 4, indicaram que não houve ação antimicrobiana em nenhum tipo de bactéria. Isso indica que a ação antimicrobiana das AgNPs vem exclusivamente dos íons prata, que foram reduzidos e transformados em prata coloidal durante a síntese. Segundo Bordoloi et al. (2020) a prata coloidal tem forte ação antimicrobiana.

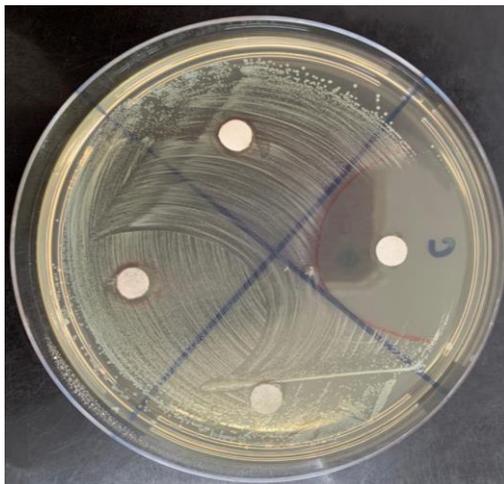
Figura 8 – Zona de crescimento de inibição das nanopartículas de prata contra duas bactérias e seus respectivos valores: (a) *Escherichea coli* K12 - 9,70nm; (b) *Escherichea coli* K12 - 11,8 nm; (c) *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 - 8,57 e (d) *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 - 9,89



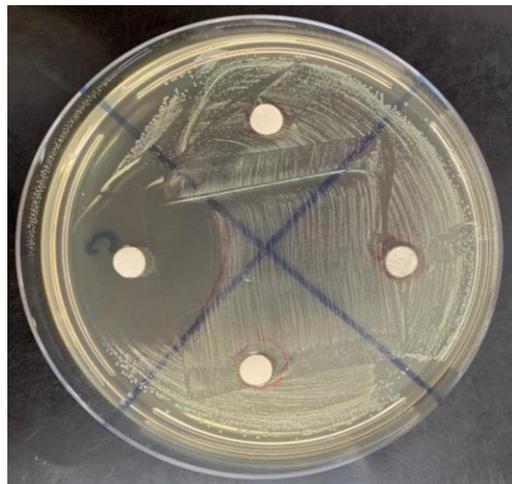
(a)



(b)



(c)

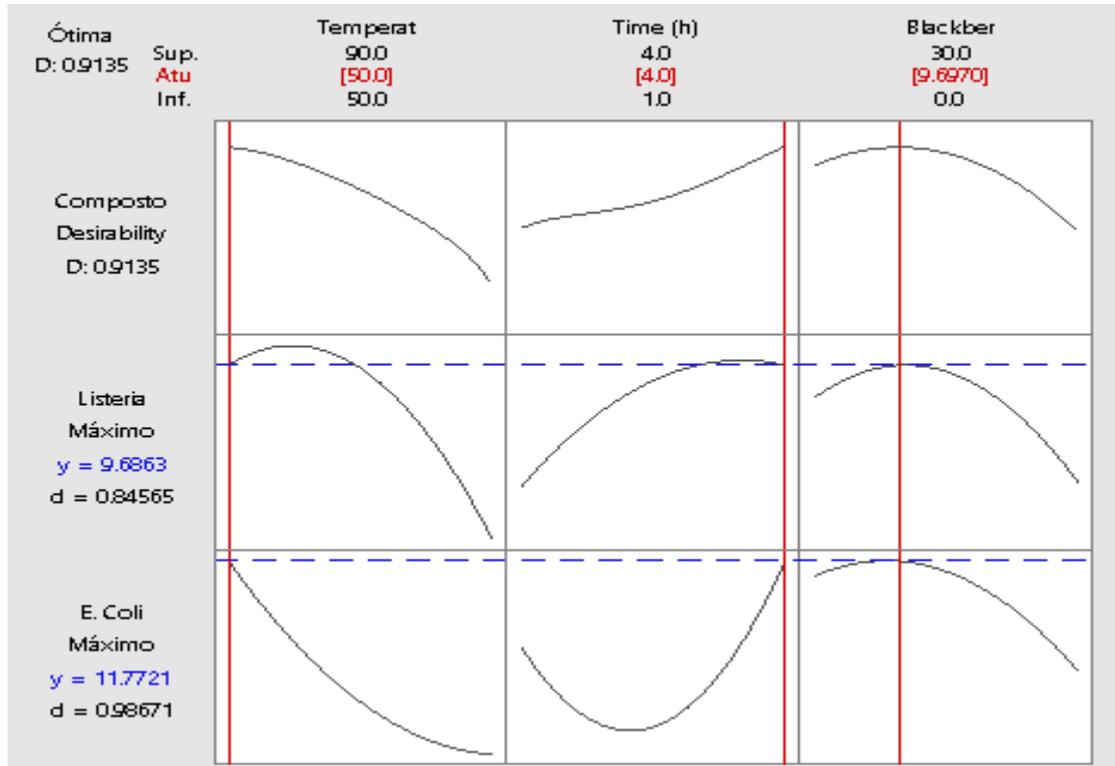


(d)

Fonte: Do autor (2022).

A Figura 9 mostra a otimização das variáveis dependentes que foi realizada com intuito de encontrar as condições apropriadas para se produzir nanopartículas mais eficientes aos patógenos em estudo, ou seja, que apresentem os maiores halos de inibição. O gráfico de otimização foi plotado no software Minitab que detecta a melhor combinação das variáveis produzindo assim uma resposta dentro da faixa desejada.

Figura 9 – Otimização das variáveis dependentes dentro da faixa desejada para a síntese das AgNPs com os maiores halos de inibição contra as bactérias: *Escherichea coli* K12 e *Listeria monocytogenes* ATCC 19117.



Fonte: Do autor (2022).

De acordo com a Figura 9, para obter as AgNPs com o máximo de inibição contra a bactéria *E. coli* a melhor combinação seria utilizar 9,7 % (mL/mL) de solução da Polpa/AgNO₃ no tempo de 4 horas de síntese à 50 °C, com a finalidade de ter uma partícula com tamanho de 11,8 nm. Em relação à bactéria *L. monocytogenes* as AgNPs sintetizadas nas mesmas teria um halo máximo de 9,69 nm. O que comprova mais uma vez que as AgNPs a base da polpa de amora tem alta eficiência antimicrobiana, porém sua ação se demonstrou maior a bactéria *E.coli*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A obtenção da AgNPS por meio da Química Verde foi possível devido a vários compostos presentes na polpa de amora como os açúcares, polissacarídeos, fenólicos e antioxidantes que possibilitaram a redução dos íons de prata e formação da prata coloidal sem o uso de redutores tóxicos.

A ação antioxidante da polpa de amora foi comprovada pelo método de oxidação do β -caroteno/ácido linoleico a qual apresentou um valor de 84,79% de proteção, indicando um alto poder antioxidante, uma vez que, em alimentos valores maiores que 70% recebem esta classificação.

Os dados obtidos através da otimização estatística mostraram que o fator que mais impactou no tamanho das nanopartículas de prata foi à concentração da solução de polpa de amora no meio reacional. O aumento da concentração do agente biorredutor acarretou em um aumento exponencial no diâmetro médio das nanopartículas de prata.

Também foi evidenciado a ação antimicrobiana das AgNPs contra as bactérias *E. coli* (Gram-negativo) e *L. monocytogenes* (Gram-positiva). No entanto as nanopartículas apresentaram maior eficiência contra a *E. coli* a qual exibiu uma zona de crescimento de inibição que variou de 9,70 a 11,80 nm. Enquanto que para as bactérias *L. monocytogenes* ATCC 19117 as zonas variaram de 8,57 a 9,89nm. Porém a otimização das condições da síntese verde, mostraram que é possível alcançar valores maiores de zonas de inibição para as duas bactérias ao mesmo tempo, sendo na temperatura de 50°C, 4h de síntese e utilizando 9,7% de v/v de polpa de amora no meio reacional. Esses dados demonstram que é possível obter nanopartículas com propriedades desejáveis desde que seja usada a otimização na aprimoração das condições de síntese.

REFERÊNCIAS

- ABDELSALAM, N. R. et al. Assessment of silver nanoparticles decorated starch and commercial zinc nanoparticles with respect to their genotoxicity on onion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 1008–1018, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.134>. Acesso em: 10 jan. 2021.
- AMIRI, M.; ESKANDARI, K.; SALAVATI-NIASARI, M. Magnetically retrievable ferrite nanoparticles in the catalysis application. v. 271, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.07.003>. Acesso em: 13 jan. 2021.
- ARMENDARIZ, V. et al. Size controlled gold nanoparticle formation by *Avena sativa* biomass : use of plants in nanobiotechnology. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 6, p. 377–382, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11051-004-0741-4>. Acesso em: 2 fev. 2021.
- ARUNACHALAM, K. D. Chrysopogon zizanioides aqueous extract mediated synthesis , characterization of crystalline silver and gold nanoparticles for biomedical applications. **International Journal of Nanomedicine**, p. 2375–2384, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S44076>. Acesso em: 10 jan. 2021.
- BARROS, H. E. A. et al. Nutritional Clustering of Cookies Developed with Cocoa Shell, Soy, and Green Banana Flours Using Exploratory Methods. **Food and Bioprocess Technology**, v. 13, n. 9, p. 1566–1578, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02495-w>. Acesso em 13 de jan. 2022.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>. Acesso em: 2 fev. 2021.
- BORDOLOI, M. et al. Plant Extracts Promoted Preparation of Silver and Gold Nanoparticles : A Systematic Review. **Nano - World Scientific**, v. 15, n. 2, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1142/S1793292020300017>. Acesso em: 15 jan. 2021.
- CHAKRABORTY, B. et al. Evaluation of antioxidant , antimicrobial and antiproliferative activity of silver nanoparticles derived from *Galphimia glauca* leaf extract. **Journal of King Saud University - Science**; v. 33, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101660>. Acesso em: 20 jan. 2022.
- CHAKRAVARTY, A. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using fruits extracts of *Syzygium cumini* and their bioactivity. **Chemical Physics Letters**, v. 795, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2022.139493>. Acesso em: 2 fev. 2022.
- CONCÓRDIO-REIS, P. et al. Silver nanocomposites based on the bacterial fucose-rich polysaccharide secreted by *Enterobacter A47* for wound dressing applications: Synthesis, characterization and in vitro bioactivity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 959–969, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.072>. Acesso em: 14 jan. 2021.

CRUZ, D. et al. Preparation and physicochemical characterization of Ag nanoparticles biosynthesized by *Lippia citriodora* (Lemon Verbena). **Colloids and Surfaces B : Biointerfaces**, v. 81, p. 67–73, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.06.025>. Acesso em: 15 jun. 2021.

DAHL, J. A.; MADDUX, B. L. S.; HUTCHISON, J. E. Toward Greener Nanosynthesis. **Chemical Reviews**, n. 541, p. 2228–2269, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr050943k>. Acesso em: 18 abr. 2021.

DARROUDI, M. et al. Green synthesis and characterization of gelatin-based and sugar-reduced silver nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, n. 1, p. 569–574, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IJN.S16867>. Acesso em 14 jan. 2022.

DEMIRBAS, A. et al. Anthocyanins-rich berry extracts directed formation of Ag NPs with the investigation of their antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of Molecular Liquids**, v. 248, p. 1044–1049, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.10.130>. Acesso em: 19 jun 2021

DUBEY, S.; LAHTINEN, M.; SILLANPÄÄ, M. Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1065–1071, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.03.024>. Acesso em: 1 dez. 2020.

DUTTA, P. P. et al. ScienceDirect Antimalarial silver and gold nanoparticles : Green synthesis , characterization and in vitro study. **ScienceDirect**, v. 91, p. 567–580, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.032>. Acesso em: 20 fev. 2021.

DUTTA, T.; CHATTOPADHYAY, A. P. Facile Green Synthesis of Silver Bionanocomposite with Size Dependent Antibacterial and Synergistic Effects : A Combined Experimental and Theoretical Studies. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, V.30, p. 1839–1851 September, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10904-019-01332-8>. Acesso em 29 abr. 2021

DWIVEDI, A. D.; GOPAL, K. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract. **Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 369, p. 27–33, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.07.020>. Acesso em 13 dez. 2020.

ELIAS, E. et al. Evaluation of antibacterial activities of silver nanoparticles green-synthesized using pineapple leaf (*Ananas comosus*). **Micron**, v. 57, p. 1–5, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2013.09.003>. Acesso em 29 nov. 2020.

GARDEA-TORRESDEY, J. L. et al. Alfalfa Sprouts : A Natural Source for the Synthesis of Silver Nanoparticles. **Langmuir**, n. 4, p. 1357–1361, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/la020835i>. Acesso em 24 jun. 2021.

GHOREISHI, S. M.; BEHPOUR, M.; KHAYATKASHANI, M. Green synthesis of silver and gold nanoparticles using *Rosa damascena* and its primary application in electrochemistry. **Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures**, v. 44, p. 97–104, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.physe.2011.07.008>. Acesso em 10 ago. 2021.

- GINER, B. et al. Assessing awareness of green chemistry as a tool for advancing sustainability. **Journal of Cleaner Production**, v. 256, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120392>. Acesso em 8 mai. 2021.
- GRUEN, L. C. Interaction of amino acids with silver(I) ions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure**, v. 386, n.1, p. 270–274, 1975. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(75\)90268-8](https://doi.org/10.1016/0005-2795(75)90268-8). Acesso em 10 nov. 2020.
- IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chemistry**, v. 13 p. 2638–2650, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/c1gc15386b>. Acesso em 26 jan. 2021.
- JEBRIL, S.; KHANFIR, R.; JENANA, B. Green synthesis of silver nanoparticles using Melia azedarach leaf extract and their antifungal activities : In vitro and in vivo. **Materials Chemistry and Physics**, v. 248, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2020.122898>. Acesso em 15 nov. 2020.
- KANNAN, N.; MUKUNTHAN, K. S.; BALAJI, S. A comparative study of morphology , reactivity and stability of synthesized silver nanoparticles using Bacillus subtilis and Catharanthus roseus (L .) G . Don. **Colloids and Surfaces B : Biointerfaces**, v. 86, n.2, p. 378–383, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.04.024>. Acesso em 22 out. 2020.
- KASTHURI, J.; VEERAPANDIAN, S.; RAJENDIRAN, N. Biological synthesis of silver and gold nanoparticles using apiin as reducing agent. **Colloids and Surfaces B : Biointerfaces**, v. 68, p. 55–60, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.09.021>. Acesso em 16 dez. 2020.
- KIM, J. et al. Peptide-mediated shape- and size-tunable synthesis of gold nanostructures. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 2681–2689, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2010.01.019>. Acesso em 18 ago. 2020.
- KUMAR, A.; CHISTI, Y.; CHAND, U. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 346–356, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>. Acesso em 28 jun. 2021.
- KUMAR, B. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using Andean blackberry fruit extract. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, p. 45–50, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.09.006>. Acesso em 28 mar. 2021.
- KUMAR, V.; YADAV, S. K. Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, p. 151–157, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jctb.2023>. Acesso em 5 nov. 2020.
- LIN, L. et al. Nature factory of silver nanowires : Plant-mediated synthesis using broth of Cassia fistula leaf. **Chemical Engineering Journal**, v. 162, p. 852–858, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2010.06.023>. Acesso em 22 out. 2020.

- LOGESWARI, P.; SILAMBARASAN, S.; ABRAHAM, J. Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 19, n.3, p. 311–317, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2012.04.007>. Acesso em 24 jun. 2021.
- LUKMAN, A. I. et al. Facile synthesis, stabilization, and anti-bacterial performance of discrete Ag nanoparticles using *Medicago sativa* seed exudates. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 353, p. 433–444, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2010.09.088>. Acesso em: 15 jan. 2021. Acesso em 22 out. 2020.
- MANOJKUMAR, N.; MUTHUKUMARAN, C.; SHARMILA, G. A comprehensive review on the application of response surface methodology for optimization of biodiesel production using different oil sources. **Journal of King Saud University - Engineering Sciences**, v. 34, p. 198–208, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jksues.2020.09.012>. Acesso em 25 jan.2022.
- MARUYAMA, T.; FUJIMOTO, Y.; MAEKAWA, T. Synthesis of gold nanoparticles using various amino acids. **Journal of Colloid and Interface Science Synthesis**, v. 447, p. 254–257, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2014.12.046>. Acesso em 5 jul. 2020.
- MEYERS, M. A.; MISHRA, A.; BENSON, D. J. Mechanical properties of nanocrystalline materials. **Progress in Materials Science**, v. 51, n. 4, p. 427–556, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2005.08.003>. Acesso em: 13 jan. 2021.
- MORAES, D. P. et al. Characterization of a new blackberry cultivar BRS Xingu: Chemical composition, phenolic compounds, and antioxidant capacity in vitro and in vivo. **Food Chemistry**, v. 322, p. 126783, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126783>. Acesso em: 18 mar 2021.
- MUKHERJEE, P. et al. Fungus-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Immobilization in the Mycelial Matrix: A Novel Biological Approach to Nanoparticle Synthesis. **Nano Letters**, v. 1, n. 10, p. 515–519, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/nl0155274>. Acesso em: 20 mar. 2021.
- NASROLLAHZADEH, M. et al. Pd-based nanoparticles: Plant-assisted biosynthesis, characterization, mechanism, stability, catalytic and antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 276, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2020.102103>. Acesso em 24 out. 2021.
- NATHIELY, F. et al. Box-Behnken design optimization of mucoadhesive chitosan-coated nanoemulsions for rosmarinic acid nasal delivery — In vitro studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 199, p. 572–582, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.054>. Acesso em 15 jul. 2021.
- OCSOY, I. et al. Green synthesis with incorporated hydrothermal approaches for silver nanoparticles formation and enhanced antimicrobial activity against bacterial and fungal pathogens. **Journal of Molecular Liquids journal**, v. 238, p. 263–269, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2017.05.012>. Acesso em 14 jan. 2022.

PANIGRAHI, S. et al. General method of synthesis for metal nanoparticles. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 6, p. 411–414, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11051-004-6575-2>. Acesso em 4 ago. 2021.

PAWLISZAK, P.; MALINA, D.; SOBCZAK-KUPIEC, A. Rhodiola rosea extract mediated green synthesis of silver nanoparticles supported by nanosilica carrier. **Materials Chemistry and Physics**, v. 234, p. 390–402, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.05.027>. Acesso em 16 dez. 2020.

PEI, P. et al. Potential of plant as a biological factory to synthesize gold and silver nanoparticles and their applications. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 11, p. 169–206, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11157-012-9278-7>. Acesso em 28 jun. 2021.

PETHAKAMSETTY, L. et al. Green synthesis, characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles using methanolic root extracts of *Diospyros sylvatica*. **ScienceDirect**, v. 55, p. 1–7, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jes.2016.04.027>. Acesso em 26 jan. 2021.

PRABHA, S. et al. Bioprospective of *Sorbus aucuparia* leaf extract in development of silver and gold nanocolloids. **Colloids and Surfaces B : Biointerfaces**, v. 80, p. 26–33, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.05.024>. Acesso em 16 abr. 2021.

PRABHA, S.; LAHTINEN, M.; SILLANPÄÄ, M. Green synthesis and characterizations of silver and gold nanoparticles using leaf extract of *Rosa rugosa*. **Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 364, p. 34–41, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.04.023>. Acesso em 5 jun. 2020.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337–341, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>. Acesso em 18 nov. 2021.

RAINIERI, S.; OLASAGASTI, M.; BARRANCO, A. Overview on the safety of commercial products containing metallic nanoparticles in the food sector. **Nutrición Hospitalaria**, v. 35, n. 2, p. 155–158, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.20960/nh.2143>. Acesso em 21 mai. 2020.

RAJENDIRAN, J. K. Æ. K. K. Æ. N. Phyllanthin-assisted biosynthesis of silver and gold nanoparticles : a novel biological approach. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 11, p. 1075–1085, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-008-9494-9>. Acesso em: 13 jan. 2021.

ROY, N. et al. Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles by Indian propolis and its constituents. **Colloids and Surfaces B : Biointerfaces**, v. 76, n. 10, p. 317–325, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.11.011>. Acesso em: 18 abr. 2020.

RUFINO, M. DO S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.037>. Acesso em: 10 dez. 2020.

SAHOO, R. K. et al. Clerodendrum viscosum Vent leaf extract supported nanosilver particles : Characterization , antiplasmodial and anticancer activity. **Chemical Physics Letters**, v. 738, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2019.136893>. Acesso em 24 jun. 2021.

SALEM, W. M. et al. Antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized from latex and leaf extract of Ficus sycomorus. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 228–234, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.030>. Acesso em 8 mai. 2021.

SANGHI, R.; VERMA, P. **Green Chemistry for Environmental Sustainability**. 1. ed. Jaipur: CRC Pres, 2019. 450 p.

SATHISHKUMAR, M. et al. Cinnamon zeylanicum bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity. **Colloids and Surfaces B : Biointerfaces**, v. 73, p. 332–338, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.06.005>. Acesso em 22 out. 2020.

SATHISHKUMAR, M.; SNEHA, K.; YUN, Y. Immobilization of silver nanoparticles synthesized using Curcuma longa tuber powder and extract on cotton cloth for bactericidal activity. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7958–7965, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.051>. Acesso em 21 mai. 2020.

SEPEUR, S. **Nanotechnology: Technical Basics and Applications**. Hannover: Vincentz Network, 2008. 168 p.

SHANKAR, S. S.; AHMAD, A.; SASTRY, M. Bioreduction of chloroaurate ions by geranium leaves and its endophytic fungus yields gold nanoparticles of different shapes. **Journal of Materials Chemistry**, v. 13, p. 1822–1826, 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/b303808b>. Acesso em 5 jun. 2020.

SHARIFI PAJAIE, H.; TAGHIZADEH, M. Optimization of nano-sized SAPO-34 synthesis in methanol-to-olefin reaction by response surface methodology. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 24, p. 59–70, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2014.09.009>. Acesso em 13 mar. 2021.

SHUKLA, S.; MASIH, A.; MEHATA, M. S. Catalytic activity of silver nanoparticles synthesized using Crinum asiaticum (Sudarshan) leaf extract. **Materials Today: Proceedings journal**, v. 56, p. 3714–3720, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.12.468>. Acesso em 2 fev. 2022.

SI, S.; MANDAL, T. K. Tryptophan-Based Peptides to Synthesize Gold and Silver Nanoparticles: A Mechanistic and Kinetic Study. **Chemistry-A European Journal**, v.13 p. 3160–3168, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/chem.200601492>. Acesso em 16 abr. 2021.

SIDDIQUEE, A. et al. Green synthesis of silver nanoparticles from Delonix regia leaf extracts : In-vitro cytotoxicity and interaction studies with bovine serum albumin. **Materials Chemistry and Physics**, v. 242, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.122493>. Acesso em 10 jan. 2022.

SINGH, H. et al. Role of green silver nanoparticles synthesized from *Symphytum officinale* leaf extract in protection against UVB-induced photoaging. **Journal of Nanostructure in Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 359–368, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40097-018-0281-6>. Acesso em 10 ago. 2021.

SOTO, K. M. et al. Fruit peels waste for the green synthesis of silver nanoparticles with antimicrobial activity against foodborne pathogens. **LWT - Food Science and Technology**, v. 103, p. 293–300, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.023>. Acesso em 5 jul. 2020.

TAMULY, C. et al. Biosynthesis of Ag nanoparticles using pedicellamide and its photocatalytic activity : An eco-friendly approach. **Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 132, p. 687–691, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2014.05.024>. Acesso em 4 ago. 2021.

TAN, Y. N.; LEE, J. Y.; WANG, D. I. C. Uncovering the Design Rules for Peptide Synthesis of Metal Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, v. 132, n.16, p. 5677–5686, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja907454f>. Acesso em 26 jan. 2021.

THAKKAR, K. N.; MHATRE, S. S.; PARIKH, R. Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 2, p. 257–262, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.07.002>. Acesso em 24 jun. 2021.

TIEMANN, K. J. et al. Gold nanoparticles obtained by bio-precipitation from gold (III) solutions. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 1 p. 397–404, 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1010008915465>. Acesso em 4 ago. 2021.

TOPUZ, F.; UYAR, T. Antioxidant, antibacterial and antifungal electrospun nanofibers for food packaging applications. **Food Research International**, v. 130, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108927>. Acesso em 16 dez. 2021.

VEERASAMY, R. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using mangosteen leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15 p. 113–120, 2011. Disponível em: Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.004>. Acesso em: 10 jan. 2021.

VENKATALAXMI, A.; PADMAVATHI, B. .; AMARANATH, T. A general solution of unsteady Stokes equations. **Fluid Dynamics Research**, v. 35, p. 229–236, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fluidyn.2004.06.001>. Acesso em: 12 abr. 2021.

WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. **Current protocols in food analytical chemistry**, v. 6, n. 1, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/0471142913.fai0101s06>. Acesso em 5 jun. 2020.

WILEY, B. et al. Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanostructures : The Case of Silver. **Chemistry-A European Journal**, v. 11, p. 454–463, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/chem.200400927>. Acesso em 26 jan. 2021.

WU, G. et al. Structure and main polyphenols in the haze of blackberry wine. **Lwt**, v. 149, p. 111821, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111821>. Acesso em 18 jan. 2022.

ZAYED, M. F.; EISA, W. H.; SHABAKA, A. A. Malva parviflora extract assisted green synthesis of silver nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 98, p. 423–428, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2012.08.072>. Acesso 10 jan. 2021.

ZHANG, W.; JIANG, W. Antioxidant and antibacterial chitosan film with tea polyphenols-mediated green synthesis silver nanoparticle via a novel one-pot method. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 155, p. 1252–1261, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/> <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.093>. Acesso em 2 dez. 2020.