



LETÍCIA ALVES DE CARVALHO

**SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA VIA
ROTA HIDROTÉRMICA UTILIZANDO BAGAÇO DE UVA
COMO BIORREDUTOR**

LAVRAS - MG

2023

LETÍCIA ALVES DE CARVALHO

**SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA VIA ROTA
HIDROTÉRMICA UTILIZANDO BAGAÇO DE UVA COMO BIORREDUTOR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de pós-graduação em Engenharia Ambiental, área de concentração em Saneamento Ambiental, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Maria Alice Martins

Orientadora

Prof. Dr. Juliano Elvis de Oliveira

Coorientador

LAVRAS - MG

2023

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

Carvalho, Letícia Alves de.

Síntese verde de nanopartículas de prata via rota hidrotérmica
utilizando bagaço de uva como biorredutor / Letícia Alves de
Carvalho. - 2023.

76 p. : il.

Orientador(a): Maria Alice Martins.

Coorientador(a): Juliano Elvis de Oliveira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Nanotecnologia. 2. Resíduo agroindustrial. 3. Atividade
antibacteriana. I. Martins, Maria Alice. II. Oliveira, Juliano Elvis
de. III. Título.

LETÍCIA ALVES DE CARVALHO

**SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA VIA ROTA
HIDROTÉRMICA UTILIZANDO BAGAÇO DE UVA COMO BIORREDUTOR
GREEN SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES VIA HYDROTHERMAL
ROUTE USING GRAPE POMACE AS BIOREDUCTOR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de pós-graduação em Engenharia Ambiental, área de concentração em Saneamento Ambiental, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 22 de junho de 2023.

Dra. Maria Alice Martins, UFLA.

Dr. Juliano Elvis de Oliveira, UFLA.

Dra. Elisângela Elena Nunes Carvalho, UFLA.

Dr. João Otávio Donizette Malafatti, UFSCar.

Profa. Dra. Maria Alice Martins
Orientadora

Prof. Dr. Juliano Elvis de Oliveira
Coorientador

**LAVRAS - MG
2023**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado o caminho quando decidi trilhar esses passos.

Aos meus pais, por serem a base da minha educação e apoiarem os meus planos, e aos meus irmãos por fazerem parte desse pilar.

Agradeço ao meu namorado, Raul Canestri, por incentivar o meu crescimento pessoal e profissional, além de me acompanhar nessa caminhada.

Agradeço imensamente aos meus professores, especialmente à Profa. Dra. Maria Alice Martins, por dedicar não somente o seu tempo em me orientar, mas também a sua amizade e atenção em ensinar.

Aos meus amigos, principalmente os acadêmicos, José Oliveira e Kianne Rodrigues, que mesmo na correria do dia-a-dia e na distância, nunca deixaram de se fazer presente, de dividir momentos e de me motivar.

À Lúcia Montagner por me ajudar nos períodos em São Carlos.

Agradeço ao Dr. João Malafatti, pela colaboração e por ser sempre solícito ao compartilhar os seus conhecimentos e experiências que foram cruciais nessa pesquisa.

Agradeço à Dra. Hanna Barros, por sua gentileza e prontidão para ajudar e transmitir informações sob o seu domínio.

À Karina Cruz pelo auxílio no início deste trabalho.

Agradeço ao Dr. Juliano Oliveira e à Dra. Elisângela Nunes por auxiliarem no planejamento do trabalho, disponibilizando equipamentos e viabilizando o uso dos laboratórios.

Agradeço aos membros da banca por disponibilizarem seu tempo e pela contribuição neste trabalho.

Agradeço à Embrapa Instrumentação pela disponibilidade de recursos e amparo tecnológico e aos seus colaboradores pelas instruções e apoio altamente qualificado.

Em especial, agradeço ao Prof. Dr. Magno Ramalho que gentilmente doou o bagaço do suco de uva para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço ao PPGEAMB e à UFLA, e todos que a envolvem, por proporcionar o ambiente de aprendizado e desenvolvimento tecnológico do qual tive a oportunidade de fazer parte.

“O importante não é ver o que ninguém nunca viu, mas sim, pensar o que ninguém nunca pensou sobre algo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

RESUMO

A síntese verde viabiliza o benefício mútuo do aproveitamento de resíduos agroindustriais e a produção de nanomateriais. A capacidade dos extratos vegetais de reduzir íons metálicos é atribuída aos seus biocompostos, e por isto têm sido utilizados neste tipo de síntese. O bagaço da uva é um subproduto derivado da produção do suco de uva, e devido a sua composição química tem sido subestimado ao ser descartado como resíduo. Neste estudo, as propriedades físico-químicas do bagaço proveniente do suco integral de uva (*Vitis labrusca*, L.) foram investigadas, e este foi utilizado como mediador na síntese hidrotermal de nanopartículas de prata (AgNPs). A composição centesimal, compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante do bagaço foram avaliados. As análises de caracterização foram realizadas para o extrato de bagaço *in natura* e seco. Os CFT variaram de 55,02 a 161,54 mg de equivalentes em ácido gálico (EAG) por 100 g de amostra para o resíduo *in natura* e seco. A atividade antioxidante, determinada pelo ensaio β -caroteno/ácido linoleico, é um fator-chave para esta aplicação e foi categorizada como alta (>80%). A termogravimetria mostrou que o resíduo de uva possui boa estabilidade térmica e ocorrência de fases de perda de massa relacionadas aos compostos voláteis da amostra. Na síntese hidrotermal das AgNPs, a performance na redução de 0,375 mM de AgNO_3 foi analisada por meio das modificações nas variáveis tempo, temperatura e concentração do extrato de bagaço de uva. As amostras foram caracterizadas química e estruturalmente por espectroscopia na região do ultravioleta visível (UV-vis), potencial Zeta, determinação do tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico (DLS), difração de raios X (DRX) e avaliação morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG). O potencial antibacteriano das nanopartículas foi determinado pelo teste de difusão em disco e pelo teste em microplaca, avaliando-se a influência das concentrações de extrato contra representantes Gram-positivas e Gram-negativas. Os resultados ótimos observados para a síntese foram a 100 °C, 1 h e concentração de extrato a 0,05 mg/L. Nesta condição, as AgNPs sintetizadas pelo método hidrotérmico exibiram tamanho médio de 37 nm, determinado por DLS, potencial Zeta de -20 mV e morfologia esférica monodispersa, observada pelo MEV-FEG. O espectro UV-vis das AgNPs exibiu um pico em 460 nm, condizente ao consumo da fonte de prata e à formação de prata metálica, além de exibir um pico a 280 nm na análise do extrato representativo do padrão típico de absorção das antocianinas e flavanoides. O DRX atribuiu a natureza cristalina das AgNPs ao detectar o padrão difratométrico com picos e arranjo geométrico fcc (face centrada cúbico) em conformidade com o metal. As AgNPs obtiveram êxito contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, com valor de Concentração Inibitória Mínima (MIC) de 12,5 e 50 μL , respectivamente, atribuindo validação à aplicação do resíduo de uva na redução de íons de prata (Ag^+ a Ag^0) em um protocolo fácil de etapa única sem gerar produtos químicos agressivos ou tóxicos. Assim, o resíduo de uva demonstrou potencial na síntese de AgNPs com boa estabilidade e atividade antimicrobiana satisfatória.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Resíduo agroindustrial. Atividade antibacteriana. Compostos bioativos. *Vitis labrusca* L.

ABSTRACT

Green synthesis enables the mutual benefit of using agro-industrial residues and nanomaterials production. The ability of plant extracts to reduce metal ions is attributed to their antioxidant activities, and for this reason they have been used in this type of synthesis. Grape pomace is a by-product derived from the grape juice production, and due to its chemical composition, it has been underestimated when discarded as waste. In this study, the physicochemical properties of the pomace from pure grape juice (*Vitis labrusca*, L.) were investigated, and it was used as mediator in the hydrothermal synthesis of silver nanoparticles (AgNPs). The pomace proximate composition, total phenolic compounds (TPC) and antioxidant activity were evaluated. The characterization analyses were carried out for fresh and dried pomace extract. The TPC ranged from 55.02 to 161.54 mg of gallic acid equivalents (GAE) per 100 g of sample for the fresh and dried residue. The antioxidant activity, determined by the β -carotene/linoleic acid assay, is a key factor for this application and was categorized as high (>80%). The thermogravimetry showed that the grape residue has good stability and the occurrence of mass loss phases related to the volatile compounds of the sample. In the AgNPs hydrothermal synthesis, the performance in the reduction of 0.375 mM AgNO₃ was analyzed through changes in the variables time, temperature and grape pomace extract concentration. The samples were chemically and structurally characterized by spectroscopy in the visible ultraviolet region (UV-vis), Zeta potential, particle size determination by Dynamic Light Scattering (DLS), X-ray diffraction (XRD) and morphological evaluation by Scanning Electron Microscopy with Field Emission Gun (SEM-FEG). The antibacterial potential of the nanoparticles was determined by the disk diffusion test and the microplate test, in order to evaluate the influence of extract concentrations against Gram-positive and Gram-negative representatives. The optimal results of the synthesis were observed at 100 °C, 1 h and extract concentration at 0.05 mg/L. In this condition, the AgNPs synthesized by the hydrothermal method exhibited a mean size of 37 nm, determined by DLS, Zeta potential of -20 mV and monodisperse spherical morphology, observed by SEM-FEG. The UV-vis spectrum of AgNPs exhibited a peak at 460 nm, consistent with the silver source consumption and the formation of metallic silver, in addition, it was exhibited a peak at 280 nm in the extract analysis, representing the typical pattern of anthocyanins and flavanoids absorption. XRD attributed the crystalline nature of AgNPs by detecting the diffractometric pattern with peaks and fcc (face centered cubic) geometric arrangement conforming to the metal identity. Antibacterial potential was successfully proved against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, with MIC value at 12.5 and 50 μ L, respectively, assigning validation to the grape pomace application in the reduction of silver ions (Ag⁺ to Ag⁰) in an easy single-step protocol avoiding harsh or toxic chemicals generation. Thus, the grape residue showed potential in the synthesis of AgNPs with good stability and satisfactory antimicrobial activity.

Keywords: Nanotechnology. Agro-industrial waste. Antibacterial activity. Bioactive compounds. *Vitis labrusca* L.

GRAPHICAL ABSTRACT

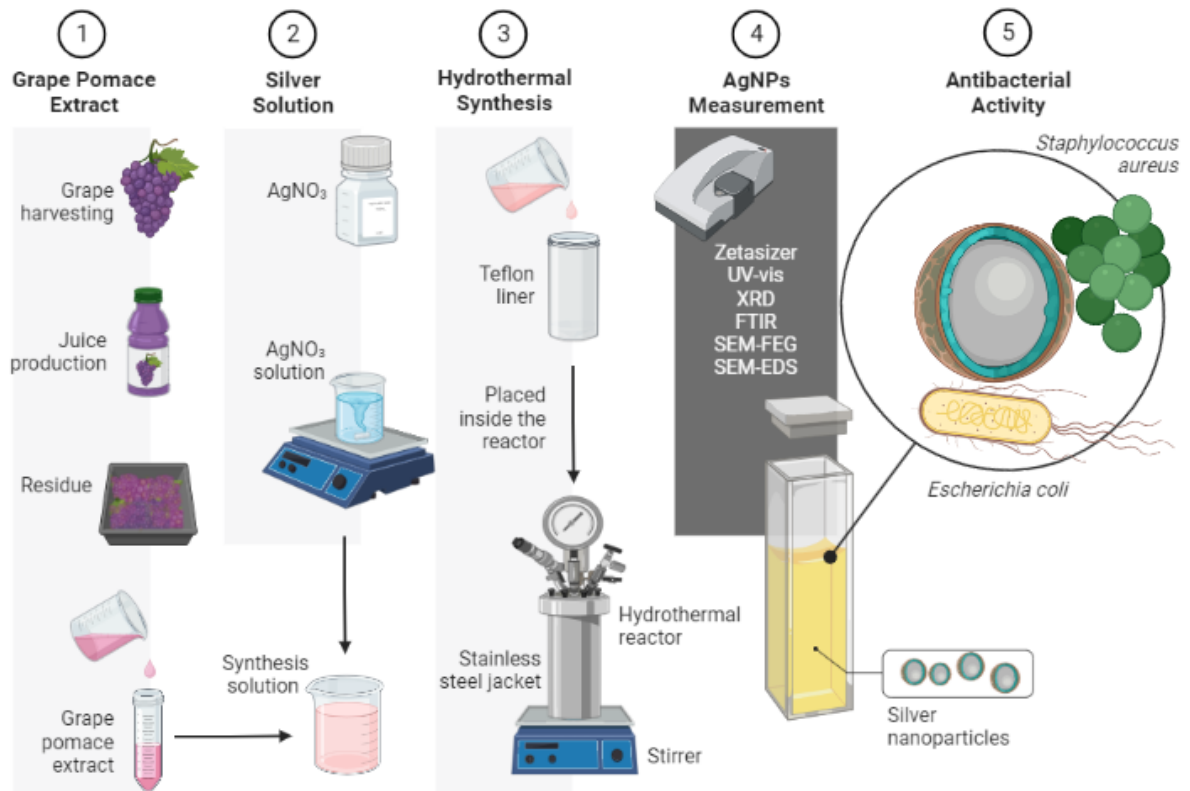


Imagem criada no BioRender.*

IMPACTOS SOCIAIS, TECNOLÓGICOS, ECONÔMICOS E CULTURAIS

O trabalho sobre a síntese verde de nanopartículas de prata (AgNPs) utilizando bagaço de uva como biorredutor teve impactos significativos em diversas esferas, sendo possível identificar potenciais benefícios sociais, tecnológicos, econômicos e culturais. Socialmente, o desenvolvimento de uma alternativa sustentável para a produção de nanopartículas com ação antimicrobiana responde à crescente demanda por métodos menos agressivos ao meio ambiente, contribuindo para a saúde pública ao oferecer um novo meio de combater bactérias resistentes. O trabalho mostra-se relevante para a tecnologia e produção ao propor um processo inovador que utiliza resíduos agroindustriais, promovendo a economia circular e ampliando a aplicabilidade de subprodutos agrícolas, o que pode beneficiar diretamente as indústrias de sucos e vinhos. Economicamente, a valorização do bagaço de uva, frequentemente descartado como resíduo, pode gerar novas fontes de renda para pequenos e grandes produtores, além de diminuir custos com o descarte inadequado e poluente. Culturalmente, a pesquisa destaca a importância da sustentabilidade e inovação na agroindústria, promovendo práticas que integram conhecimento tradicional com avanços científicos, o que pode inspirar outras iniciativas dentro e fora da comunidade acadêmica. A inserção de práticas verdes e a promoção de tecnologias mais limpas também se alinham aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU, especialmente ao ODS 3 (Saúde e Bem-Estar), ODS 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura), ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis) e ODS 13 (Ação contra a Mudança Global do Clima). Esses impactos reforçam o caráter extensionista do projeto, com potencial para beneficiar não apenas a comunidade acadêmica da UFLA, mas também a sociedade em geral, ao incentivar o uso responsável de recursos naturais e a inovação sustentável em processos industriais. Por se tratar de uma produção acadêmica, o projeto exemplifica a capacidade da universidade em gerar conhecimento aplicado e relevante para a sociedade e o meio ambiente, contribuindo para a construção de um futuro mais sustentável.

SOCIAL, TECHNOLOGICAL, ECONOMIC AND CULTURAL IMPACTS

The research on the green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using grape pomace as a bioreducer has significant impacts across various domains, with potential social, technological, economic, and cultural benefits. Socially, the development of a sustainable alternative for producing nanoparticles with antimicrobial action addresses the growing demand for less environmentally harmful methods, contributing to public health by offering a new way to combat resistant bacteria. The work is relevant to technology and production by proposing an innovative process that utilizes agro-industrial waste, promoting a circular economy and expanding the applicability of agricultural by-products, which could directly benefit the juice and wine industries. Economically, the valorization of grape pomace, often discarded as waste, could generate new income sources for both small and large producers, as well as reduce costs associated with inadequate and polluting disposal. Culturally, the research emphasizes the importance of sustainability and innovation in the agro-industry, promoting practices that integrate traditional knowledge with scientific advancements, which could inspire other initiatives both within and outside the academic community. The implementation of green practices and the promotion of cleaner technologies also align with the United Nations' Sustainable Development Goals (SDGs), particularly SDG 3 (Good Health and Well-being), SDG 9 (Industry, Innovation, and Infrastructure), SDG 12 (Responsible Consumption and Production), and SDG 13 (Climate Action). These impacts reinforce the extensionist nature of the project, with the potential to benefit not only the academic community at UFLA but also society at large by encouraging the responsible use of natural resources and sustainable innovation in industrial processes. As an academic production, the project exemplifies the university's ability to generate applied and relevant knowledge for society and the environment, contributing to the construction of a more sustainable future.

LISTA DE SIGLAS

AAE	Equivalente de ácido ascórbico
AgNP	Nanopartícula de prata
BU	Bagaço de uva
BU-IN	Bagaço de uva <i>in natura</i>
BU-S	Bagaço de uva seco
CFT	Compostos voláteis totais
DRX	Difração de Raios X
DTG	Primeira derivada da termogravimetria
EBU	Extrato do bagaço de uva
EBU-IN	Extrato do bagaço de uva <i>in natura</i>
EBU-S	Extrato do bagaço de uva seco
EC	<i>Escherichia coli</i> ou <i>E. Coli</i>
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho
GAE	Equivalentes em ácido gálico
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (<i>field emission gun</i>)
MNP	Nanopartícula metálica
NP	Nanopartícula
SA	<i>Staphylococcus aureus</i> ou <i>S. Aureus</i>
TEAC	Atividade antioxidante equivalente a TROLOX
TG	Termogravimetria
UV-vis	Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-visível)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação de materiais biológicos em diferentes escalas de tamanho, destacando aqueles em escala nanométrica (1 a 100 nm).	18
Figura 2 – Diferentes abordagens para a síntese de nanopartículas.	21
Figura 3 – Métodos de síntese verde de nanopartículas.	23
Figura 4 – Representação esquemática das etapas gerais da síntese verde de nanopartículas de prata usando extratos de bagaço de uva.....	29
Figura 5 – Procedimento experimental empregado na otimização da síntese e na caracterização das nanopartículas de prata (AgNPs) e do bagaço de uva Isabel (<i>Vitis labrusca</i> , L.) de suco integral de uva, cujo extrato foi utilizado na biossíntese das AgNPs.....	32
Figura 6 – Processo de produção do suco integral a partir do aquecimento da uva Isabel (<i>Vitis labrusca</i> , L.) e obtenção do bagaço.	33
Figura 7 – Processo de secagem em estufa a 60 °C e moagem do bagaço do suco integral da uva Isabel (<i>Vitis labrusca</i> , L.) para realização de análises de composição centesimal, compostos fenólicos e antioxidantes.....	34
Figura 8 – Soluções de extrato do bagaço de uva (EBU) e de nitrato de prata (AgNO ₃) para a síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) pelo método hidrotérmico.....	35
Figura 9 – Curvas TG e DTG do bagaço da uva analisada em atmosfera inerte, 10 °C/min, (A), imagem do bagaço de uva seco (B).	46
Figura 10 – Soluções de AgNPs sintetizadas via método hidrotérmico em diferentes tempos e temperaturas com extrato de bagaço de uva em diferentes concentrações.	49
Figura 11 – Espectros UV-vis das soluções de AgNPs sintetizados via método hidrotérmico com extrato do bagaço de uva como biorredutor.	49
Figura 12 – Difractogramas DRX das AgNPs sintetizadas com extrato do bagaço de uva.....	51
Figura 13 – Espectro FTIR das AgNPs sintetizadas em diferentes condições e do extrato do bagaço de suco de uva.....	53
Figura 14 – MEV-FEG para as amostras de AgNPs biossintetizadas com EBU.....	55
Figura 15 – Distribuição de tamanho das partículas do bagaço de uva e das AgNPs no dia da síntese e após período de armazenamento sob refrigeração.	59
Figura 16 – Teste de difusão de disco das soluções de AgNPs contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> . Sínteses realizadas com extrato de bagaço de suco de uva Isabel (<i>Vitis labrusca</i> , L.).	64
Figura 17 – Análise microbiológica das soluções de AgNPs mediadas por extrato de bagaço de	

suco de uva Isabel (*Vitis labrusca*, L.) nas concentrações de 0,05; 0,10 e 0,15 g/mL
contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Planejamento para a síntese hidrotérmica de AgNPs.	36
Tabela 2 – Médias seguidas de desvio padrão das determinações da composição centesimal, valor energético, compostos fenólicos, atividades antioxidantes (ABTS ^{*+} , β -caroteno/ácido linoleico e complexo fosfomolibdênio), em bagaço de uva <i>in natura</i> e seco.	43
Tabela 3 – Halo de proteção das AgNPs sintetizadas com EBU nas concentrações de 0,05; 0,10 e 0,15 g/mL contra bactérias <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> . Sínteses realizadas com extrato de bagaço de uva Isabel (<i>Vitis labrusca</i> , L.) oriundo de suco integral de uva.	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Métodos químicos e físicos de síntese de nanopartículas metálicas.	22
Quadro 2 – Comparação entre nanopartículas biogênicas e quimicamente sintetizadas.	24
Quadro 3 – Existência de halo de proteção das AgNPs sintetizadas com EBU contra bactérias <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> . Sínteses realizadas com extrato de bagaço de uva Isabel (<i>Vitis labrusca</i> , L.) oriundo de suco integral de uva.	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	17
2.1	<i>Objetivo Geral</i>	17
2.2	<i>Objetivos Específicos</i>	17
3	REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1	<i>Nanopartículas e rotas de síntese</i>	18
3.1.1	Nanopartículas metálicas	18
3.1.2	Nanopartícula de prata e ação antimicrobiana	19
3.1.3	Rotas de síntese de nanopartículas metálicas	20
3.1.4	Síntese verde de nanopartículas metálicas	22
3.1.5	Síntese verde de nanopartículas de prata	24
3.1.6	Parâmetros relacionados à síntese verde	25
3.1.7	Síntese verde via rota hidrotérmica	26
3.2	<i>Extratos vegetais na biorredução</i>	27
3.2.1	Extratos de frutas	27
3.2.2	Utilização da uva na biorredução	28
3.2.3	Uva Isabel (<i>Vitis labrusca</i> , L.)	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	<i>Sequência Metodológica</i>	31
4.2	<i>Materiais</i>	32
4.2.1	Amostragem do bagaço de uva in natura	33
4.2.2	Secagem de bagaço de uva e preparação de farinha	33
4.3	<i>Síntese verde hidrotérmica de AgNPs</i>	34
4.3.1	Preparação do extrato do bagaço in natura de suco integral de uva (EBU-IN)	35
4.3.2	Preparação da solução de AgNO ₃	36
4.3.3	AgNPs via rota hidrotérmica: delineamento experimental	36
4.3.4	Otimização da síntese	37
4.4	<i>Caracterização do resíduo de uva e das AgNPs</i>	37
4.4.1	Composição centesimal do resíduo de uva	37
4.4.2	Compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante do bagaço	38
4.4.3	Termogravimetria do bagaço de uva	39
4.4.4	UV-vis	39
4.4.5	Potencial Zeta e Dispersão de Luz Dinâmica (DLS)	40
4.4.6	Difração de raios X (DRX) do bagaço de uva e das AgNPs	40
4.4.7	Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	40
4.4.8	Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG)	40

4.5 Potencial antibacteriano das AgNPs	41
4.5.1 Teste de difusão em disco.....	41
4.5.2 Teste em microplaca.....	41
4.6 Estatísticas	41
4.6.1 Bagaço da uva.....	41
4.6.2 Caracterização das AgNPs e EBU.....	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Caracterização do bagaço da uva (BU)	42
5.1.1 Composição centesimal.....	42
5.1.2 Teor Total de Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante	44
5.1.3 Termogravimetria (TG/DTG)	45
5.2 Caracterização das Nanopartículas de Prata (AgNPs)	47
5.2.1 Análise visual e espectrometria UV-Vis.....	47
5.2.2 Difração de raios X (DRX).....	50
5.2.3 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	52
5.2.4 Microscopia eletrônica de varredura com Energia Dispersiva (MEV-FEG)	54
5.2.5 Potencial Zeta e Dispersão de Luz Dinâmica (DLS).....	57
5.3 Potencial antibacteriano das AgNPs	63
5.3.1 Teste de difusão em disco.....	63
5.3.2 Teste em microplaca.....	65
6 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é atualmente uma das áreas de maior interesse e desenvolvimento científico aplicada na resolução de problemas da escala macro à molecular (QIDWAI *et al.*, 2018). O aprofundamento das pesquisas no “universo nano” busca obter propriedades na nanoescala que diferem das encontradas nos materiais convencionais (CELE, 2020). Os nanomateriais integram produtos desenvolvidos com novas propriedades e funcionalidades e oferece versatilidade de uso por abranger diversas áreas da ciência. As possibilidades e expectativas de descobertas em torno de suas propriedades físico-químicas exclusivas e intrigantes são catalisadores desse processo de exploração da temática (WANG *et al.*, 2018). As propriedades dos nanomateriais que se destacam por diferirem do material homólogo na escala macro envolvem a relação área superficial-volume, tamanho médio e propriedades ópticas (BASTOS-ARRIETA *et al.*, 2018).

Os processos de descobertas vão além de métodos físicos e químicos. A nanotecnologia também se relaciona de forma harmônica com o meio ambiente, não só por ser promissora para a resolução e mitigação de problemas ambientais, mas também pela possibilidade de uso de materiais biológicos e renováveis em seus processos de síntese. A “nano revolução” envolve o papel desempenhado pelas plantas e outros materiais orgânicos na síntese biogênica de nanopartículas (NPs). Rotas biológicas, ou “verdes”, têm sido amplamente provadas como opções eficientes e menos prejudiciais na condução de métodos de síntese ambientalmente mais adequadas (síntese verde) do que os métodos tradicionais (HUSTON *et al.*, 2021; QIDWAI *et al.*, 2018).

As plantas, assim como as bactérias, leveduras, fungos e espécies de algas atuam como substratos na síntese verde. Além de visar maior sustentabilidade, segurança laboratorial e menor custo, a síntese com fontes biológicas é vantajosa por realizar não só a reação de redução, mas também estabilização, além de possível ação antimicrobiana (HUSTON *et al.*, 2021). Dentro dos processos desenvolvidos na síntese verde, os resíduos agrícolas e industriais de várias frutas vêm sendo estudados para a produção de NPs metálicas. A uva, por exemplo, ao ser utilizada na obtenção de vinhos e sucos, gera subprodutos ou resíduos como semente, casca e talo que podem ser utilizados na redução de metais (KRISHNASWAMY; VALI; ORSAT, 2014), possibilitando a execução de um procedimento com uso reduzido de reagentes e com aproveitamento de um resíduo agroindustrial (BASTOS-ARRIETA *et al.*, 2018).

A abundância de compostos fenólicos encontrados no suco de uva e em seus resíduos agroindustriais resumem-se, principalmente, nos flavanóis (catequinas e epicatequinas),

antocianinas, resveratrol, quercetina e kaempferol. A concentração desses compostos aumenta quando se utiliza a fruta inteira, não apenas a polpa. Na perspectiva comercial do suco de uva, esses benefícios destacados atraem mais consumidores (SILVA *et al.*, 2021), além disso, podem fomentar o uso do bagaço de uva gerado, agregando valor ao resíduo dessa cadeia produtiva.

Os sais de metais, como prata, ouro e cobre, são utilizados como precursores na obtenção de NPs. A síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) pode, além da utilização da síntese verde, ser realizada por processo hidrotermal, que consiste em um método químico de abordagem *bottom-up* numa etapa única com cinética rápida. Ademais, dispensa o uso de substâncias, como solventes, agentes redutores e estabilizadores, em doses de alta toxicidade. O processo hidrotermal é uma alternativa dentre os demais métodos físicos e químicos e possui aplicação promissora na síntese verde de NPs devido ao melhor controle de tamanho e das propriedades das partículas obtidas (DESAI; PRABHURAJESHWAR; CHANDRAKANTH, 2016). As AgNPs, por sua vez, são desejadas pelo seu potencial em agir contra microrganismos infecciosos e nocivos aos seres humanos, como bactérias, fungos e vírus, como por exemplo, o SARS-CoV-2 causador da COVID-19 (CDMF, 2020; RAMAKRISHNAN *et al.*, 2021; TREMILIOSI *et al.*, 2020; VALDEZ-SALAS *et al.*, 2021).

Além da exequibilidade e vantagem experimental, a inserção de resíduos agrícolas no contexto tecnológico é um tópico que merece enfoque no Brasil, dado que o país é um dos maiores produtores agrícolas mundiais (FAO, 2020). Em face ao contexto apresentado, o objetivo desse trabalho foi avaliar a viabilidade da utilização do resíduo do bagaço do suco integral de uva e do método hidrotermal para síntese das AgNPs visando avaliar, por fim, a sua ação antimicrobiana, propriedade de alto interesse para diversas finalidades. Almejou-se obter um processo econômico, ecologicamente viável e escalonável.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e otimizar uma metodologia para produção de nanopartículas de prata com ação antimicrobiana, através de síntese verde utilizando o processo hidrotermal e resíduos da agroindústria brasileira da uva.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar o efeito das condições de síntese usando como precursor o extrato de bagaço de uva Isabel (*Vitis labrusca* L.) no diâmetro médio e potencial Zeta das nanopartículas

de prata obtidas.

- Avaliar o efeito dos parâmetros, na síntese pelo método hidrotérmico, a partir da variação do tempo, da temperatura e da concentração de extrato do bagaço da uva nas características das nanopartículas.
- Relacionar as propriedades estruturais de estabilidade à dispersão e morfologia das nanopartículas produzidas com os diferentes parâmetros de síntese.
- Avaliar o efeito antimicrobiano das nanopartículas de prata em bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, e Gram-negativas, *Escherichia coli*.

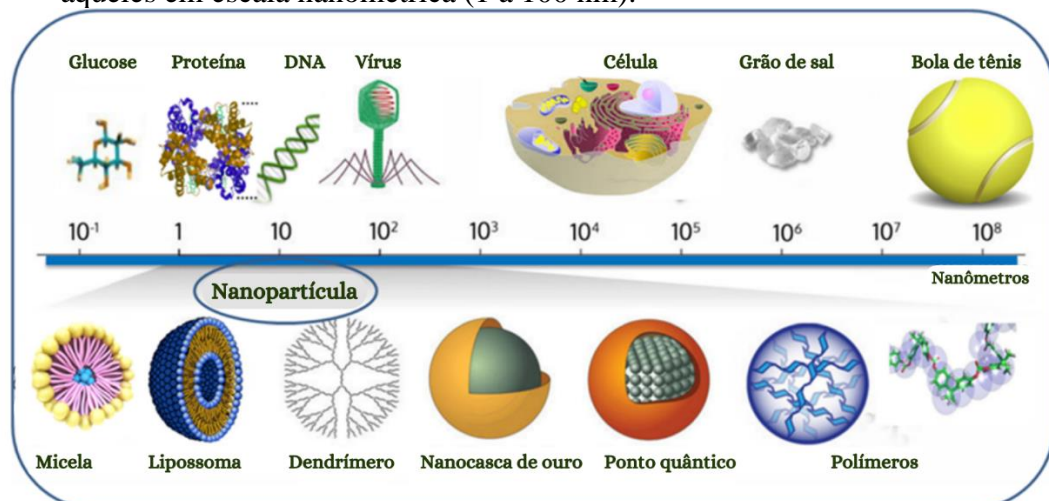
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Nanopartículas e rotas de síntese

3.1.1 Nanopartículas metálicas

O desenvolvimento de nanomateriais está aumentando devido ao alto desempenho e ampla aplicação nas mais variadas áreas (MIU; DINISCHIOTU, 2022). As nanopartículas (NPs) são materiais que possuem pelo menos uma de suas dimensões pertencentes à escala nanométrica, no intervalo de tamanho é de 1 a 100 nm, sendo 1 nm equivalente a $1e^{-9}$ m, ou seja, fração um bilhão de vezes inferior (NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE: NNI, 2021), conforme ilustrado na Figura 1. As classificações são baseadas em suas propriedades estruturais, formatos e tamanhos. Dentre algumas classificadas atualmente na escala nano, estão as NPs de carbono (fulerenos e nanotubos), NPs metálicas, NPs cerâmicas, NPs semicondutoras, NPs poliméricas e NPs lipídicas (KHAN; SAEED; KHAN, 2019).

Figura 1 – Representação de materiais biológicos em diferentes escalas de tamanho, destacando aqueles em escala nanométrica (1 a 100 nm).



Fonte: Adaptado de Samak *et al.* (2020).

A aplicação destes nanomateriais é um campo multidisciplinar que vem sendo explorado para solucionar problemas tecnológicos, científicos e industriais (NASROLLAHZADEH *et al.*, 2019). A revisão de Qidwai *et al.* (2018) relata que as NPs são adequadas para aplicações farmacêuticas, cosmeceúticas, industriais, biossensores, química clínica e aumento da resposta imunológica. A produção em escala industrial já abrange produtos de uso diário, eletrônicos, cosméticos, materiais para revestimento, embalagem de alimentos, revestimentos de superfícies, entre outros (MIU; DINISCHIOTU, 2022)

As NPs atuam de maneira diferente às macromoléculas, ampliando assim o campo de estudos e de possíveis aplicações funcionais e eficientes. As propriedades diferem devido à alta área de superfície em relação ao volume e possíveis efeitos quânticos obtidos na nanoescala (GUISBIERS; MEJÍA-ROSALES; LEONARD DEEPAK, 2012; KOKILA; RAMESH; GEETHA, 2015).

Embora o corpo científico esteja ainda desvendando a nanociência, o uso de nanopartículas, como as nanopartículas metálicas (MNPs), já integrava artefatos e tecnologias ancestrais, como o Cálice de Licurgo, do século IV a.C. (MELO *et al.*, 2012). As MNPs são estruturas obtidas por meio de metais puros (ouro, platina, prata, titânio, zinco, cério, ferro, tálio e outros) ou seus compostos (óxidos, hidróxidos, sulfetos, fosfatos, fluoretos e cloretos) (PIÑÓN-SEGUNDO; MENDOZA-MUÑOZ; QUINTANAR-GUERRERO, 2013).

Os metais podem ser sintetizados para que se liguem a grupos funcionais apropriados, como ligantes, anticorpos e drogas. Os usos finais das NPs metálicas abrangem seu potencial antioxidante, atividade antimicrobiana contra patógenos humanos, aplicação em produtos alimentícios, atividade anti-inflamatória em cosméticos, diagnóstico e terapia de câncer, detecção de DNA e marcação de células. Possuem também particularidades como ressonância de plasma de superfície e propriedades ópticas. Dentre outros metais, a prata e ouro são focos em diversas pesquisas devido à ação anticâncer e antimicrobiana (HARISH *et al.*, 2018; QIDWAI *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018).

3.1.2 Nanopartícula de prata e ação antimicrobiana

Historicamente, há cerca de 1200 anos, a prata é conhecida e aplicada na resolução de problemas causados por bactérias, fungos e vírus (ZHAO; STEVENS, 1998). Seus efeitos microbiocidas, que matam estes microrganismos, e microbiostáticas, que os inibem, passaram atualmente, a ser estudados na nanoescala, revalidando este potencial e servindo como alternativa aplicada na área médica e industrial (NASROLLAHI; POURSHAMSIAN;

MANSOURKIAEE, 2011).

Com o aumento de bactérias resistentes a antibióticos, as nanopátulas se emergem como uma opção contra os mecanismos de resistência devido ao seu tamanho, forma, funcionalização da superfície e material. A capacidade de permear, ligar e romper a membrana bacteriana pode levar ao vazamento de componentes citoplasmáticos, alteração de componentes intracelulares e até a morte das bactérias. Para as AgNPs, o íon Ag^+ livre age como agente ativo afetando a membrana o transporte de elétrons e o DNA (GUPTA *et al.*, 2019)

Não só os benefícios, mas também os riscos toxicológicos da prata são estudados desde o seu advento, principalmente dada a sua alta taxa de aplicação na saúde humana. Estudos da metade do século passado concluíram que a prata em baixas concentrações exibe alta eficácia bactericida e baixa toxicidade em células normais de mamíferos (BERGER *et al.*, 1976). Condizentemente, esta preocupação permaneceu no âmbito das nanopátulas de prata, estudos a respeito de sua toxicidade são conduzidos concomitantemente ao desenvolvimento de suas variadas aplicações. Cientistas levantam a preocupação quanto à concentração, meio e período de contato com as AgNPs em diferentes sistemas fisiológicos. Desta forma, as aplicações das AgNPs requerem estudos específicos.

A revisão realizada por Durán *et al.*, (2018), concluiu que as AgNPs possuem capacidade tóxica em função de diferentes variáveis e que o mecanismo ainda é incerto. Os efeitos dependem das condições, os testes *in vivo* com camundongos e humanos demonstraram baixa toxicidade. A exemplo, foi mencionado um estudo com 62 humanos que fizeram ingestão oral de AgNPs de 5-10 nm e 25-40 nm, com concentração estoque de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente e ingestão de 100 $\mu\text{g}/\text{dia}$ e 480 $\mu\text{g}/\text{dia}$, respectivamente, não houve alteração significativa no metabolismo humano, hematológica, na urina, observações físicas ou nas imagens de morfologia.

Estudos também abordam a toxicidade das AgNPs em outros ambientes, como para invertebrados de água doce (LEKAMGE *et al.*, 2018), e ratos (VAN DER ZANDE *et al.*, 2012). Entretanto, devido ao seu grande potencial e benefício bactericida, estudos e experimentos continuam progredindo e consideram as AgNPs como um dos mais relevantes nanomateriais, com boa relação custo-benefício, com propriedades singulares e capacidade de formar nanoestruturas (LEKAMGE *et al.*, 2018).

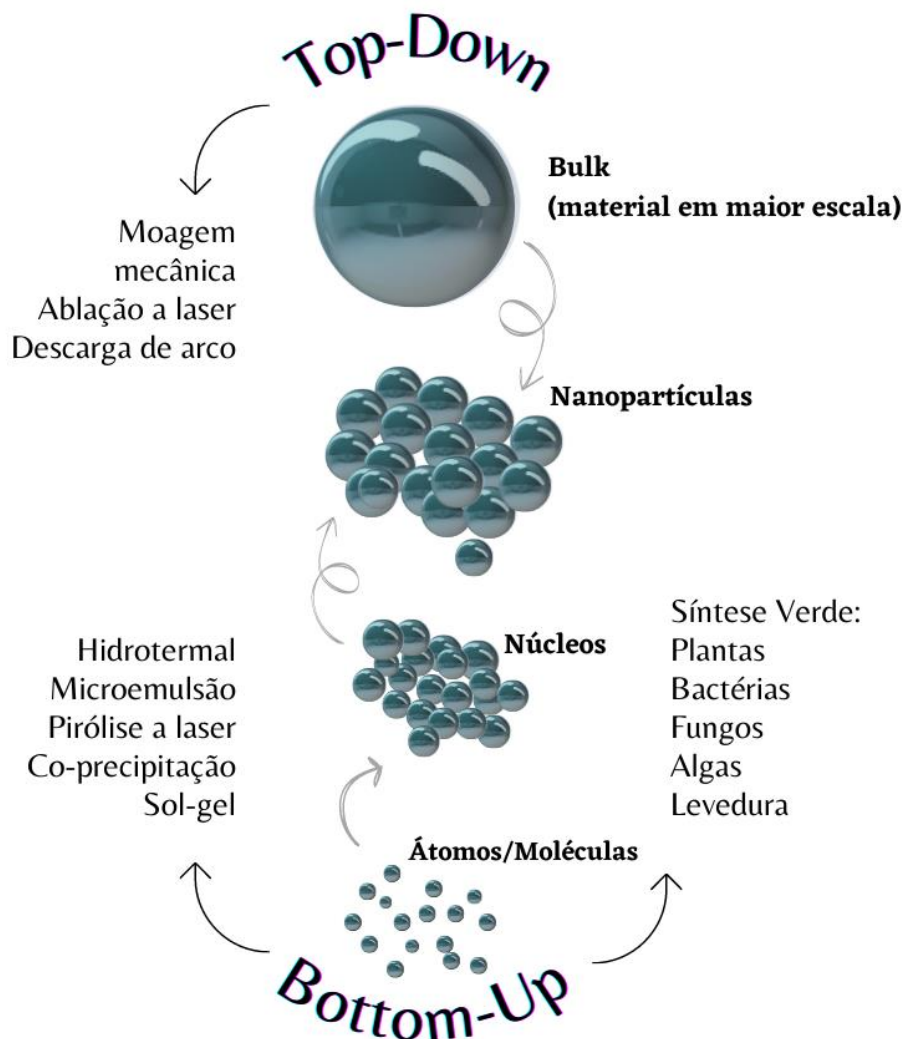
3.1.3 Rotas de síntese de nanopátulas metálicas

Existem diversas rotas para a obtenção de nanopátulas metálicas, no entanto, a grande

parte delas faz uso de solventes orgânicos tóxicos (tolueno, benzeno) que aumentam os riscos oriundos da exposição humana a esses componentes e geram muitos resíduos. A síntese biológica, também denominada biossíntese ou síntese verde, pode ser associada a diferentes métodos físicos e químicos e se destaca pelo uso de solventes ecológicos, redução de gastos e geração de resíduos, capacidade de escalonamento, e independem de condições termodinâmicas complexas (SAHNI; PANWAR; KAUR, 2015).

Os métodos de síntese possuem duas abordagens de realização: *top-down* e *bottom-up* (FIGURA 2). A abordagem *top-down* é feita por fresagem, litografia, moagem e têmpera repetida, não garantindo a estrutura e o tamanho das partículas obtidas (CELE, 2020). A *bottom-up*, por sua vez, resume-se na dispersão coloidal pelo método de síntese química úmida e beneficia-se pela construção progressiva da partícula a partir do átomo, molécula ou cluster, sendo a mais utilizada pelos cientistas (BISWAS *et al.*, 2011).

Figura 2 – Diferentes abordagens para a síntese de nanopartículas.



Fonte: Adaptado de Drummer; Madzimbamuto; Chowdhury (2021).

Diversas rotas de síntese de MNPs coloidais com diferentes precursores têm sido identificadas e estudadas. Estas rotas variam em métodos, solventes e parâmetros de processo, podendo ser aplicadas conforme objetivo e disponibilidade de recursos. Os fatores predominantes que diferem as rotas convencionais físicas e químicas da biossíntese são a demanda energética, a toxicidade das substâncias químicas utilizadas, conforme quantidade, e a geração de resíduos (RAI, 2013). O Quadro 1 apresenta os métodos mencionados por Cele (2020), em seu trabalho.

Quadro 1 – Métodos químicos e físicos de síntese de nanopartículas metálicas.

	Método	Parâmetros de processo
Métodos Químicos	Método do poliol	Usa líquido não aquoso (poliol) como solvente e agente redutor.
	Microemulsões	Amplamente utilizado para a produção de nanopartículas inorgânicas (YU <i>et al.</i> , 2010)
	Decomposição termal	O calor é necessário para quebrar as ligações químicas no composto em decomposição e a reação é endotérmica.
	Síntese eletroquímica	Síntese de compostos químicos em uma célula eletroquímica
Métodos Físicos	Plasma	O plasma é gerado por serpentinas de aquecimento de radiofrequência (RF).
	Deposição de vapor químico	Usado principalmente na fabricação de semicondutores para depositar filmes finos de diferentes materiais.
	Irradiação de microondas	Utilizado na síntese de materiais híbridos orgânicos, inorgânicos e inorgânicos-orgânicos.
	Método de laser pulsado	Síntese de AgNPs, em uma alta taxa de produção de 3 gm/min.
	Redução sonoquímica	Síntese de diferentes tipos de nanopartículas metálicas pela redução sonoquímica dos íons metálicos correspondentes.
	Radiação gama	Vantagem de ser reproduzível, controlar morfologia, produção monodispersa, fácil, barato e usa menos precursores de toxinas.

Fonte: Da autora (2023), adaptado de Cele (2020).

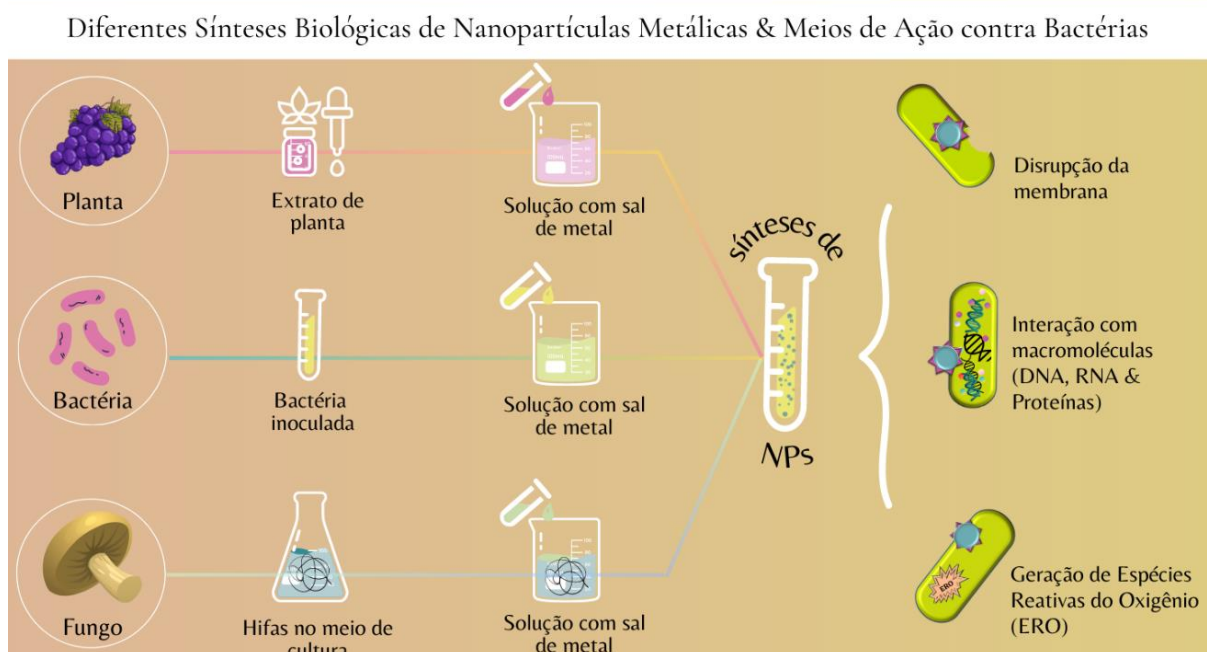
Além destes, outra opção é o método hidrotérmico, o qual pode ser associado à síntese verde, seja por meio do uso de extratos de plantas ou bactérias, fungos, cianobactérias e actinomicetos. Estes organismos podem ser utilizados como fontes de biomassa, extratos ou precursores em sínteses hidrotermais, permitindo a obtenção de materiais com propriedades específicas e funcionalidades desejadas. A seleção e o uso adequado desses organismos dependem do objetivo e características visadas. A relação da síntese verde com as nanopartículas metálicas, ressaltando as nanopartículas de prata, os parâmetros envolvidos no processo e, por fim, a junção do método hidrotérmico associado à síntese verde serão descritos de forma pormenorizada na sequência.

3.1.4 Síntese verde de nanopartículas metálicas

A obtenção de NPs por vias de síntese verde é particularmente almejada por facilitar as condições operacionais ao minimizar ou excluir a demanda por produtos químicos que hajam

como estabilizadores externos e agentes de cobertura. Estas características resultam em benefícios ecológicos, econômicos e com segurança biológica, fomentando os testes com as mais variadas plantas e microrganismos (DIKSHIT *et al.*, 2021). Para as NPs metálicas, a redução biogênica acontece de forma rápida, podendo ser realizada em temperatura e pressão ambientes, possibilitando ampliação do processo (NASROLLAHZADEH *et al.*, 2019). Desta forma, as sínteses verdes, ilustradas na Figura 3, podem sobressair positivamente no quesito custo, principalmente quando se faz uso de um resíduo, e oferecer controle e mitigação de toxicidade.

Figura 3 – Métodos de síntese verde de nanopartículas.



Fonte: Da autora (2023).

No caso de uso de microrganismos, usam-se os fungos, bactérias, algas, leveduras, actinomicetos e enzimas (QIDWAI *et al.*, 2018). Já para as plantas, estudos mostram a eficaz utilização de todas as suas partes, ampliando as possibilidades do beneficiamento vegetal e utilização de resíduos. Desta forma, sementes, frutos, folhas, caules, látex, biomassa seca, dentre outros substratos, podem ser aplicados em conjunto ou isolados na sintetização de nanopartículas. Os compostos bioativos associados à síntese, como polifenólicos, alcaloides, flavonoides e terpenos, também são eficazes quando aplicados como extratos isolados de plantas (RAI, 2013). O Quadro 2 apresenta as comparações entre a obtenção de NPs via método químico e biológico, destacando os benefícios da segunda opção.

Quadro 2 – Comparação entre nanopartículas biogênicas e sintetizadas de forma convencional.

Características	Método químico convencional	Método biológico
Custo/toxicidade	Caro, tóxico	Eficaz na redução de custos, não tóxico
Agente redutor	Dimetilformamida, etilenoglicol, hidrato de hidrazina, boro-hidreto de sódio, poliol, citrato de sódio e N, N-dimetilformamida	Biomoléculas incluem flavonas, fenólicos, terpenóides, alcalóides, proteínas, polissacarídeos, aminoácidos, enzimas, principalmente, nitrato reductase
Reagentes	Uso de estabilizador (surfactante) para evitar aglomeração	Não há necessidade de adicionar um agente estabilizador
Impacto ambiental	A poluição ambiental e o consumo de energia são desvantagens dos métodos de redução química	Síntese em condições ambientais e com maior nível de segurança, além de pouco ou nenhum uso de energia
Atividade antibacteriana	NPs com menor atividade contra bactérias patogênicas	Comparativamente, NPs com maior atividade contra bactérias patogênicas
Material	Maior garantia da composição dos reagentes	Não há garantia de que o material biológico terá a mesma composição
Disponibilidade dos recursos	Possibilidade de obter os reagentes de diferentes fontes e locais	Pode haver restrição sazonal do material biológico
Contaminação e vida útil, e armazenamento	Reagentes podem ser menos susceptíveis à contaminação biológica, apresentar maior vida útil e fácil armazenamento	Material biológico pode apresentar susceptibilidade à contaminação, menor vida útil e demanda por condições específicas de armazenamento como refrigeração
Reprodutibilidade	Mais fácil de encontrar os reagentes com as mesmas características	Características mais variáveis conforme condições de produção do material biológico

Fonte: Adaptado de Qidwai (2018).

3.1.5 Síntese verde de nanopartículas de prata

Nanopartículas de prata puras, de formato regular e bem dispersas podem ser sintetizadas por eletroirradiação e irradiação de microondas, redutores químicos, radiação e técnicas biológicas, sendo este último, o método que tem ganhado espaço no aspecto econômico e ecológico (WANG *et al.*, 2018). Ademais, os processos tradicionais exigem o uso de produtos químicos tóxicos, produzem subprodutos prejudiciais e exigem um alto consumo de energia, que dificultam a síntese em escala industrial a partir de metal e óxido de metal, impulsionando a busca pela solução desta problemática por meio do desenvolvimento da síntese verde (DRUMMER; MADZIMBAMUTO; CHOWDHURY, 2021).

As biomoléculas dos extratos de plantas e tecidos vegetais são utilizadas na redução de íons metálicos desde o início do século XX, todavia, a abordagem desta aplicação na obtenção de NPs é ainda recente. Vários metais são reduzidos para a nanoescala, sendo a prata (Ag) e o ouro (Au) os mais retratados por via de redução biogênica em razão do interesse de aplicações em diversas áreas. Ressalta-se o benefício da síntese verde na obtenção de NPs atóxicas para aplicações terapêuticas (NASROLLAHZADEH *et al.*, 2019). As rotas de síntese de AgNPs

envolvem três passos: redução da prata por agentes biorredutores, nucleação e estabilização (BASTOS-ARRIETA *et al.*, 2018). A eficiência destes passos ocorre em função da característica dos materiais utilizados e do ajuste dos parâmetros envolvidos na síntese.

3.1.6 Parâmetros relacionados à síntese verde

As AgNPs com diferentes tamanhos, formas e morfologias têm sido descobertas nos testes experimentais envolvendo as mais variadas opções de extratos de espécies vegetais. As características resultantes são dependentes das condições experimentais e da cinética de interação dos íons metálicos com os agentes redutores (SAHNI; PANWAR; KAUR, 2015).

As condições experimentais envolvem os fatores: temperatura de reação, tempo de incubação, valor de pH, concentração do precursor e do agente redutor. O estudo dos efeitos destas condições e resultados obtidos levam aos ajustes necessários para obter as NPs com as características desejadas. Embora os cientistas tenham concluído que o tamanho e a morfologia são responsáveis pelas propriedades das NPs, a forma de controlar precisamente esses fatores ainda não está bem estabelecida (DRUMMER; MADZIMBAMUTO; CHOWDHURY, 2021).

Conforme concluído na revisão de Drummer, Madzimbamuto e Chowdhury (2021), as variáveis temperatura de síntese e a taxa de formação de NPs são interdependentes, havendo relação diretamente proporcional em temperaturas estudadas (25 a 80 °C), quando a temperatura aumenta, a taxa de reação também aumenta. Ao mesmo tempo, este aumento na temperatura pode acarretar no estreitamento da faixa de distribuição de tamanho de partícula, desde que haja agente precursor suficiente. Todavia, a escassez de íons dos precursores pode acarretar no aumento da faixa de distribuição de tamanho das nanoestruturas.

O referido estudo também relatou que aumentar o tempo de reação consequentemente aumenta a concentração, o tamanho ou a aglomeração das NPs. Já o aumento do nível de pH acarreta em maior cristalinidade e pode induzir a formação de aglomerados, embora um valor de pH mais neutro costuma ser favorável para a solução de reação. Por fim, o diâmetro da partícula e a cristalinidade aumentam com um aumento na temperatura de calcinação (temperatura em que as NPs são despreendidas de suas substâncias voláteis).

Outros autores concluíram que é possível sintetizar AgNPs em uma ampla faixa de pH, todavia, o meio reacional além do uso de compostos para ajustar o pH irão alterar o tamanho, distribuição e estabilidade das partículas obtidas, sendo o pH elevado o que apresentou melhores resultados (GONTIJO *et al.*, 2020; MARCINIAK *et al.*, 2020). Embora este resultado corrobore com outros estudos, há de ser considerado a variedade de possibilidades disponibilizadas pela síntese verde e possíveis resultados divergentes encontrados por outros

autores, como Liu *et al.* (2014), ao fazer uso de solução redutora de pH ácido de fonte biológica.

Em outro estudo, o aumento na concentração do íon metálico de prata e ouro de 10^{-4} para 10^{-2} M ocasionou aumento do tamanho de partícula. O resultado da espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP) corroborou o obtido por UV-vis, indicando tendência decrescente na formação de partículas nanométricas em maior concentração de metal. Por outro lado, na concentração mais baixa do precursor, a taxa de formação de NPs de prata e ouro demandou tempos longos de reação, e, por conseguinte, gerando uma absorvância mais fraca (DUBEY *et al.*, 2010).

Assim, todas as variáveis devem ser levadas em consideração de forma conjugada para melhor delinear o procedimento escolhido e possibilitar o aproveitamento máximo do precursor e mediador empregado.

3.1.7 Síntese verde via rota hidrotérmica

O método hidrotérmico pode ser entendido como a síntese controlada de monocristais em função da solubilidade de minerais em água quente e alta pressão. Possui benefícios perante outros métodos e se destacam: a obtenção de óxidos, não óxidos ou partículas metálicas submicrométricas com forma controlada; nucleação e crescimento de cristais de boa qualidade; temperatura razoável, variando de 100 a 200 °C, e flexibilidade no uso de reagentes com certa impureza (PAN *et al.*, 2015).

A literatura apresenta constatações do benefício do método hidrotérmico no tamanho e morfologia dos nanomateriais, como os de prata, principalmente devido ao controle da temperatura, a qual afeta os processos de nucleação e velocidade de crescimento, desde o monômero de prata inicial, e os intermediários de Ag que contém facetas cristalográficas específicas em suas superfícies (LIU *et al.*, 2014). O pH também é levado em consideração nas sínteses verdes por rota hidrotérmica, já que pode interferir nas cargas elétricas das biomoléculas. Em geral, pH neutro ou tendendo à alcalinidade propicia melhor taxa de formação e distribuição homogênea (VANLALVENI *et al.*, 2021). Todavia, diferentes fontes botânicas possuem diferentes valores de pH, Liu *et al.* (2014) relataram que a prata coloidal poderia ser formada sob condição alcalina, mas que a condição ácida em via hidrotérmica garantiu maior estabilidade e AgNPs com cargas positivas, favorecendo a ligação com superfícies biológicas negativas, como célula ou bactéria.

A abordagem hidrotérmica tem obtido eficácia na síntese de nanopartículas metálicas e se destaca, entre sínteses de alta e baixa temperatura, pela geração de NPs de rendimento

consideravelmente alto e pelo controle do processo com obtenção de NPs com diâmetros numa faixa estreita. Resumidamente, esta abordagem se baseia numa reação com temperatura superior ou inferior ao ponto de ebulição do solvente principal para produção de fluidos supercríticos nos quais há a dissolução dos compostos (OCSOY *et al.*, 2017). Outro benefício é poder associá-la à síntese com extratos vegetais.

A temperatura e o tempo de reação são variáveis relevantes no processo de reação, além das concentrações adequadas do componente redutor e do precursor de prata na produção de AgNPs com diâmetros e formatos desejadas (YANG; PAN, 2012). Segundo estudos de Ocsoy *et al.* (2017), ao integrar a abordagem hidrotérmica e a síntese verde de AgNPs com repolho roxo, obteve-se um maior grau de estabilidade e retardamento do processo de agregação das nanopartículas. A reprodução de sínteses por meio do uso de extratos das mais diversas plantas visa não só NPs com características satisfatórias, mas também aprimorar o entendimento do papel realizado por esses mediadores vegetais.

3.2 Extratos vegetais na biorredução

Como sobredito, as NPs atraem atenção devido às suas distintas propriedades físico-químicas, magnéticas e optoeletrônicas, além de tamanho único, forma e distribuição. Concomitantemente ao aumento do uso de NPs, aumentou-se a necessidade de aplicar tratamentos mais eficazes com toxicidade controlada, promovendo o aperfeiçoamento da biotecnologia, precursora no domínio da nanotecnologia, associado ao uso de materiais renováveis e disponíveis (QIDWAI *et al.*, 2018).

3.2.1 Extratos de frutas

As plantas propiciam maior funcionalidade à reação, uma vez que disponibilizam biomoléculas funcionais eficientes na redução de íons metálicos, além de exercer proteção e estabilização das nanopartículas (RAI, 2013). Na síntese de AgNPs, a utilização de frutas como agente redutor e de cobertura ou capeamento (*capping* do inglês) é uma alternativa ecologicamente viável e econômica que almeja associar rapidez e facilidade. Diversos autores estudam os métodos e as aplicações de NPs sintetizadas por frutas e as diferenças entre suas propriedades e comparação da eficiência ainda são indefinidas. A exemplo, há estudos com abacaxi (AHMAD, 2012) e folha de abacaxi (EMEKA *et al.*, 2014), manga – antifúngico para *Candida* (SALATI; DOUDI; MADANI, 2018) maçã – antibacteriano (ALI *et al.*, 2016), açaí, banana – antibacteriano (NARAYANAMMA; RANI; RAJU, 2013; SANTANA; BACKX,

2017), morango – antibacteriano (UMOREN *et al.*, 2017), açaí (LIMA *et al.*, 2019). Outros produtos naturais como café, chá, vinho, aminoácidos simples, vitaminas e açúcares (NASROLLAHZADEH *et al.*, 2019), também têm sido estudados.

A facilidade da utilização de extratos de plantas sobressai à oferecida pela biorredução com microrganismos, uma vez que os extratos vegetais isentam da necessidade de isolamento, preparo e manutenção de cultura de células e de condições estéreis para serem utilizados (HE *et al.*, 2013; RAVICHANDRAN *et al.*, 2016). O uso de plantas viabiliza economicamente o processo ao transformar duas etapas em apenas uma, já que além de sintetizar, favorecem a estabilidade das NPs obtidas (AHMED *et al.*, 2016). Todos esses pontos minimizam os gastos com tempo e recursos, além de que as plantas utilizadas podem também ser derivadas de resíduos agroindustriais, tornando o processo ainda menos oneroso.

3.2.2 Utilização da uva na biorredução

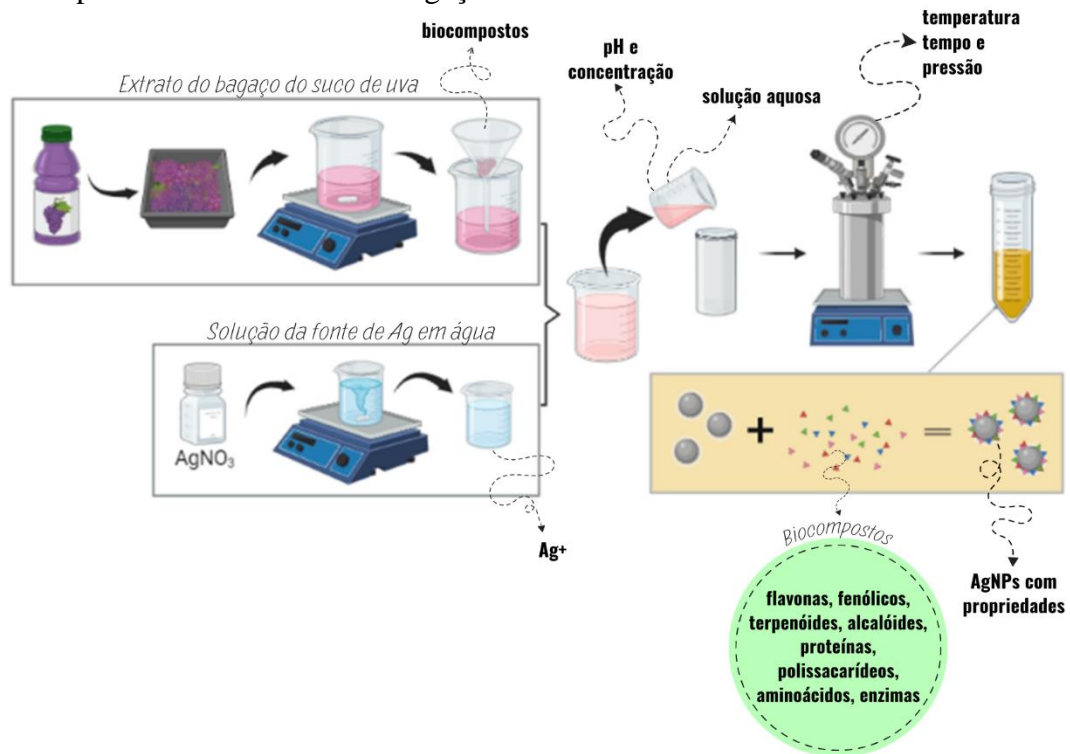
O bagaço de uva é fonte de compostos bioativos com potencial aplicado à produção de nanomateriais associado ao aproveitamento de um resíduo alimentar de alta taxa de geração (GONZÁLEZ-BALLESTEROS; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ; RODRÍGUEZ-ARGÜELLES, 2018). Bastos-Arrieta *et al.* (2018), realizaram a síntese verde de AgNPs usando extrato de resíduos de engaço (ou talo) de uva para a modificação de eletrodos. Os principais componentes desse subproduto são compostos polares solúveis em água quente com alto teor de taninos e outros compostos polifenólicos. Os polifenóis totais e açúcares redutores presentes no extrato foram eficientes como agentes redutores e estabilizadores na geração de AgNPs. As AgNPs com um diâmetro médio de $27,7 \pm 0,6$ nm foram selecionados e provaram sua adequação para fins de aplicação em sensores.

Recentemente, Saratale *et al.* (2020), exploraram o bagaço de uva, produto residual abundante e renovável da indústria vinícola, na síntese verde de AgNPs. As AgNPs biofabricadas apresentaram a vantagem adicional de incorporação de biomoléculas ativas como agente de cobertura, provando que são potentes captadores de radicais livres e agente antidiabético. Além disso, as AgNPs exibiram notável potencial antibacteriano e atividade sinérgica em combinação com antibióticos padrão contra patógenos bacterianos infecciosos humanos. Os detalhes do mecanismo antibacteriano foram investigados medindo a integridade da membrana e o vazamento de biomoléculas celulares. O resultado da pesquisa confirma o processo de fabricação de baixo custo usando o extrato do resíduo da uva, tornando-o um método mais econômico e ecologicamente correto, e também oferece preferências terapêuticas

alternativas com muitas vantagens, como aplicação biomédica segura e sem efeitos colaterais.

Outros estudos também têm avaliado o potencial antioxidante, antidiabético e a atividade antibacteriana contra patógenos humanos das AgNPs fabricadas com o resíduo da agroindústria da uva, além de outras aplicações em setores tecnológicos e de desenvolvimento de materiais. Até o momento, nenhum estudo foi encontrado utilizando o extrato do bagaço de uva, oriundo da produção de suco integral de uva, na obtenção de AgNPs por meio do método hidrotérmico. Este trabalho visa otimizar a síntese favorecendo o aproveitamento deste resíduo com uma metodologia mais rápida e facilmente replicável, além de avaliar o desempenho do uso do resíduo brasileiro da agroindústria da uva, como ilustrado na Figura 4.

Figura 4 – Representação esquemática das etapas gerais da síntese verde de nanopartículas de prata usando extratos de bagaço de uva.



Fonte: Da autora (2023). Imagem criada no BioRender e Canva.

3.2.3 Uva Isabel (*Vitis labrusca*, L.)

Apesar de sua variada sazonalidade, a uva é um produto altamente disponível em regiões com diversidade ambiental no Brasil, com dois a três ciclos vegetativos anuais produzindo da ordem de 1,7 milhão de toneladas por ano (EMBRAPA, 2017; IBGE, 2021). Seu comércio e consumo sempre estiveram presentes em todo o mundo onde a produção de uva e suco de uva atingem mais de 77 e 1 milhão de toneladas anuais, respectivamente (FAO, 2020).

A uva Isabel é a principal cultivar da variedade *Vitis labrusca* L. originária da América

do Norte, destacando-se qualitativamente por sua fertilidade, sabor frutado e rusticidade. Esta variedade fomenta a produção de vinhos tintos, sucos e produtos derivados, representando anualmente uma das uvas mais produzidas no Brasil, principalmente devido à sua boa resposta às diferentes condições climáticas e aceitabilidade do consumido (ARCANJO *et al.*, 2017; CASTILHOS *et al.*, 2017).

O suco de uva é descrito como um líquido altamente aromatizado e saboroso, derivado da uva não fermentado e não alcoólico, fonte de polifenóis como flavonoides, antocianinas, taninos proantocianidinas e nutrientes resveratrol (ISLAM; KABIR, 2019). Visando escolhas mais saudáveis, a preferência do público por produtos sem adição de açúcar, como o suco de uva puro, também conhecido como suco de uva 100%, é uma tendência crescente.

O suco de uva possui amplos efeitos anticancerígenos, anticarcinogênico, anti-inflamatórios, antienvhecimento e antioxidantes, benefícios associados à presença do resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno), que é um fenol natural e uma fitoalexina, caracterizados como substâncias antimicrobianas (ISLAM; KABIR, 2019). O extrato de semente de uva possui antioxidantes, também conhecidos como “eliminadores de radicais livres”, que interagem e neutralizam eficientemente os radicais livres para proteger as células dos danos oxidativos e defendem doenças degenerativas (RODRIGUES *et al.*, 2021). As vantagens dietéticas do consumo direto de frutas que apresentam compostos fitoquímicos com ação antioxidante, como a uva, estão cada vez mais descobertas. Inserir uva e outras frutas em experimentos de laboratório é o papel fundamental para explorar e estender essas fontes renováveis no desenvolvimento de tecnologia.

Além de todos os benefícios nutritivos para a saúde humana, o processamento da uva gera um grande volume de resíduo proveniente de sementes, cascas e engaços ricos em componentes. Por exemplo, o bagaço de uva de vinificação tem até 70% dos compostos fenólicos retidos das uvas (TELES *et al.*, 2018). Da mesma forma, o bagaço do suco de uva pode fornecer uma quantidade análoga desses compostos fenólicos e bioativos que podem ser posteriormente utilizados para o desenvolvimento científico e tecnológico sustentável, como a síntese verde de nanopartículas.

Diversos antioxidantes são encontrados na natureza e estudados para múltiplas aplicações. A uva é uma fonte natural de antioxidantes que podem ter a sua composição e quantidade variáveis em função da espécie, cultivar, estágio de maturação, além de condições do cultivo como localidade, sazonalidade e incidência de radiação solar. Dentre os biocompostos presentes na uva, destacam-se: os ácidos fenólicos, que se trata de uma gama mais ampla de fenólicos, e possuem exemplares na uva como os derivados de ácidos benzóico

(ácido p-hidroxibenzoico, ácido gálico, ácido vanílico) e de ácidos cinâmico (ácido siríngico, ácido trans-cinâmico, ácido cafeico, ácido clorogênico e ácido p-cumárico). Dentro dos ácidos fenólicos há uma classe específica denominada flavonoides (antocianinas, catequina, kaempferol, miricetina, quercetina, rutina e estilbeno (resveratrol)) usualmente detectados nas uvas. Além de uma larga variedade de taninos, um subgrupo dos flavonoides também presente na uva e que desempenha um papel nas características organolépticas ao conferir adstringência, cor e estabilidade aos sucos de uva e principalmente aos vinhos (ARCANJO *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2018).

Os biocompostos com propriedades funcionais e o alto poder de proteção antioxidante, como substâncias acima mencionadas, são funções promissoras para aplicação na síntese e desenvolvimento de nanomateriais como AgNPs na rota verde. Entender o material de origem e a disponibilidade destes compostos fenólicos e antioxidantes irá refinar a metodologia e aprofundar as pesquisas sobre a síntese verde, com frutas ou resíduos destas, na produção de nanopartículas em soluções estáveis e não aglomeradas.

Em suma, o diferencial deste trabalho é a associação do método hidrotérmico com o uso de bagaço uva derivado do processamento de suco integral com a síntese de prata, dado que não foi encontrado tal estudo na literatura. Além disso, o uso de resíduo agroindustrial visa contribuir com a economia circular e agragar valor ao produto concomitantemente à geração de benefícios no desenvolvimento de materiais.

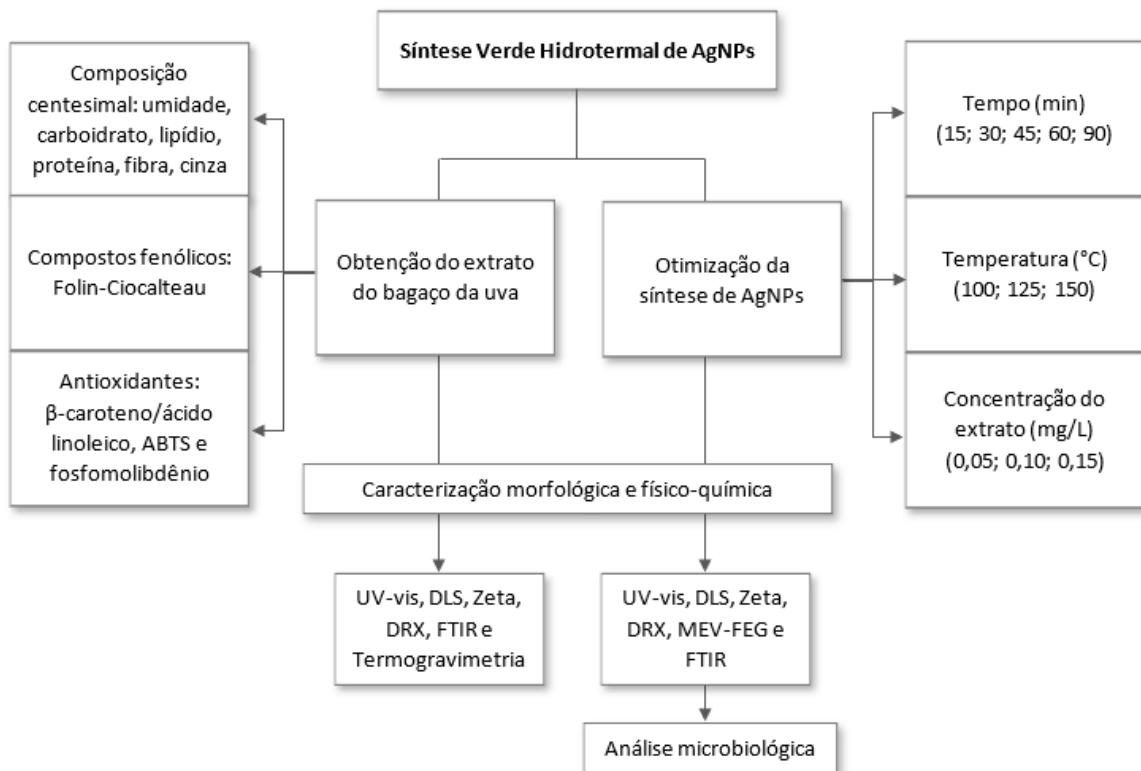
4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste tópico serão abordadas a obtenção do bagaço e a otimização da síntese das nanopartículas de prata, bem como as respectivas caracterizações químicas, estruturais, morfológicas, além da avaliação do potencial microbiológico das AgNPs.

4.1 Sequência Metodológica

O fluxograma da Figura 5 apresenta o procedimento experimental empregado neste trabalho. As alterações nos parâmetros da síntese de AgNPs foram realizadas de forma progressiva, embasadas nos ensaios realizados pelo UV-vis e potencial Zeta e nos resultados observados visualmente. O início dos ensaios de síntese de AgNPs foi embasado na condição ótima observada por González-Ballesteros, Rodríguez-González e Rodríguez-Argüelles (2018), seguido da alteração dos parâmetros tempo, temperatura e concentração do extrato do bagaço de uva.

Figura 5 – Procedimento experimental empregado na otimização da síntese e na caracterização das nanopartículas de prata (AgNPs) e do bagaço de uva Isabel (*Vitis labrusca*, L.) de suco integral de uva, cujo extrato foi utilizado na biossíntese das AgNPs.



Fonte: Da autora (2023).

4.2 Materiais

AgNO₃ comercial (Sigma-Aldrich) de grau analítico e água Milli-Q foram utilizados em todos os ensaios de sínteses, água destilada foi utilizada para os demais ensaios. O bagaço de uva (*Vitis labrusca* L.) da variedade Isabel (safra 2021) foi gentilmente cedido por um produtor de sucos do município de Lavras, sul de Minas Gerais, Sudeste do Brasil (21°14'50.8"S 44°59' 59,8"W), sendo que este foi armazenado em sacos plásticos a 4 °C até uso posterior no Laboratório de Pós-Colheita de Frutas e Vegetais do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (Lavras, MG).

Para a análise antimicrobiana, o meio agar *Luria – Bertani* (LB) foi utilizado como inóculo para as culturas bacterianas. As culturas puras de microrganismos representativos de bactérias foram: Gram-positivas (*Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC 25923 INCQS 15) e bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 INCQS 33). As cepas bacterianas foram mantidas em placas de ágar nutriente a 4 °C. Todos os produtos químicos eram de grau analítico, e foram usados sem purificação adicional nos ensaios. As vidrarias utilizadas foram limpas para completa remoção de sujidades.

4.2.1 Amostragem do bagaço de uva in natura

A produção de suco integral de uva abrange da pequena à grande escala. No presente estudo, foi obtido o bagaço a partir de um pequeno produtor residente no município de Lavras, MG. Para a produção do suco integral de uva, uma quantidade de uva correspondendo ao volume de aproximadamente 18 L é colocada na suqueira gerando em torno de 9 L de suco. A água existente nas paredes e base do equipamento é aquecida a 110 °C, promovendo o aquecimento da uva para a extração do suco. O processo, apresentado na Figura 6, leva em torno de 40 a 50 minutos, após o engarrafamento de todo o volume e resfriamento, o bagaço é retirado e descartado ou reaproveitado para outros fins, como a produção de geleias, farinha ou alimento para animais.

Figura 6 – Processo de produção do suco integral a partir do aquecimento da uva Isabel (*Vitis labrusca*, L.) e obtenção do bagaço.



Fonte: Da autora (2023).

4.2.2 Secagem de bagaço de uva e preparação de farinha

Teles *et al.* (2018) avaliaram diferentes temperaturas para secar bagaço de uva (BU) em um processo de secagem convectiva. A temperatura de 60 °C foi a que apresentou melhor retenção fenólica com maior capacidade antioxidante e menor teor de umidade. Este método foi adaptado para forno de circulação de ar (Solab, modelo SL-102), onde 200 g de bagaço de uva foram transferidos para uma placa de alumínio e secos a 60 °C até massa constante (aproximadamente 11 h) para posterior moagem em moinho de facas (Tecnal, modelo TE631/3). A moagem foi realizada de 15 em 15 segundos para não superaquecer o equipamento e a amostra foi uniformizada durante as pausas, o processo total levou em torno de 15 minutos até resultar na aparência de farinha. Esta amostra, denominada BU Seco, foi acondicionada em potes de vidro com tampa e envoltos em papel alumínio (FIGURA 7).

Figura 7 – Processo de secagem em estufa a 60 °C e moagem do bagaço do suco integral da uva Isabel (*Vitis labrusca*, L.) para realização de análises de composição centesimal, compostos fenólicos e antioxidantes.



Fonte: Da autora (2023).

Amostras do bagaço da uva *in natura* (BU-IN) e secas (BU-S) foram submetidas a análises químicas para determinação da composição centesimal, compostos fenólicos totais (TPC) e atividade antioxidante no laboratório de Pós-Colheita de Frutas e Hortaliças da UFPA, conforme metodologia descrita no item 4.4.

Ressalta-se que a primeira etapa da determinação da composição centesimal foi a determinação da umidade (item 4.4.1.1), após esta análise, as amostras tanto de BU-S quanto BU-IN foram submetidas à determinação de lipídios (item 4.4.1.2). A metodologia empregada sugere que amostras com grande granulometria sejam levemente trituradas para serem analisadas, já que requer poucas gramas (cerca de 3 g de amostra seca que é acondicionada em cartucho celulósico vedado com algodão). Assim, após determinação da umidade, a amostra de BU-IN passou por moagem em um multiprocessador de alimentos (Black+Decker, modelo HC31 120W), garantindo uma amostra um pouco mais uniforme mas que não possuía aspecto de farinha como a amostra BU-S.

A realização de análises de caracterização do resíduo seco é justificada pelos seguintes motivos: dispor dados úteis para comparação do resíduo em sua forma original (conforme coletado) e sua possível forma com maior vida útil em armazenamento ambiente (resíduo desidratado); possibilitar comercialização; além de prover dados que podem amparar etapas de pesquisas futuras, tanto sobre o resíduo alimentar/agrícola quanto no âmbito da aplicação (como obtenção de extrato do BU-S para síntese de nanopartículas).

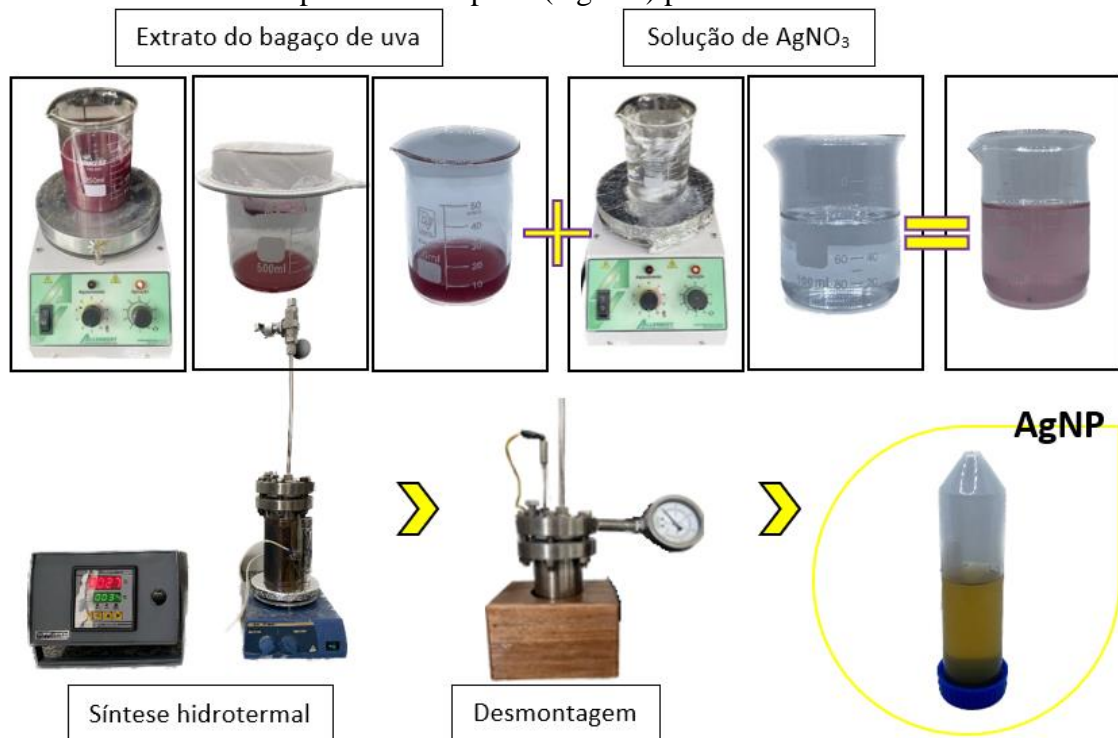
4.3 Síntese verde hidrotérmica de AgNPs

Apenas o bagaço *in natura* foi utilizado para a realização das sínteses das AgNPs, uma vez que a utilização do bagaço seco tornaria o processo mais oneroso e demorado. Além disso, o uso do bagaço *in natura* permitiu avaliar a eficácia do resíduo no seu formato menos concentrado como precursor, e também eliminar possíveis danos aos compostos fenólicos que

por serem termossensíveis poderiam sofrer degradação na etapa de secagem (DEMIRKOL; TARAKCI, 2018). Todavia, caso o interesse fosse prolongar a vida útil do resíduo, o processo de secagem seria mais adequado.

O intuito de secar o bagaço foi primeiramente para a realização das análises de caracterização, como a composição centesimal. A fim de melhor entender o efeito da umidade e concentração dos compostos, o bagaço seco também foi utilizado na análise de compostos fenólicos e antioxidantes, possibilitando a comparação do extrato seco versus o *in natura*. Por sua vez, o objetivo de utilizar o bagaço *in natura* e realizar a extração em água foi evitar a superestimação dos compostos que estariam disponíveis para a síntese da prata, uma vez que o extrato da uva feito para sintetizar as AgNPs seria realizado em água. As etapas realizadas nos ensaios estão demonstradas na Figura 8 e detalhadas nos itens subsequentes.

Figura 8 – Soluções de extrato do bagaço de uva (EBU) e de nitrato de prata (AgNO_3) para a síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) pelo método hidrotérmico.



Fonte: Da autora (2023).

4.3.1 Preparação do extrato do bagaço *in natura* de suco integral de uva (EBU-IN)

Para priorizar a obtenção de um método simples e sustentável, o bagaço não foi submetido a pré-tratamentos, como aquecimento ou moagem. Embora a temperatura atue na solubilidade dos bioquímicos, em temperatura mais elevada, esses bioquímicos passam a ser decompostos ou bioquímicos não reativos também podem ser extraídos (VANLALVENI *et al.*, 2021). Por esta razão, optou-se por realizar a extração apenas sob agitação, sem o uso de

temperatura.

A primeira concentração de extrato analisada de 0,10 g/mL foi baseada no trabalho de González-Ballesteros, Rodríguez-González e Rodríguez-Argüelles (2018), onde 10 g de bagaço de uva foram colocados em um béquer com 100 mL de água Milli-Q. A solução foi agitada em agitador magnético (modelo Allerbest) a 400 rpm por 10 minutos, filtrada em filtro de tecido sintético reutilizável (Injetemp N°102) e armazenada a 4 °C em tubo falcon envolto em papel alumínio. As outras concentrações foram preparadas em conformidade com este procedimento.

4.3.2 Preparação da solução de $AgNO_3$

Considerando a concentração de 0,375 mM, 0,0045 g de nitrato de prata foi solubilizado em um béquer com 70 mL de água à temperatura ambiente por 5 minutos sob agitação magnética (modelo Allerbest) a 100 rpm.

4.3.3 AgNPs via rota hidrotérmica: delineamento experimental

Todas as sínteses de $AgNO_3$ pela rota hidrotérmica foram realizadas na proporção de 1:9, onde foram adicionados 7,5 mL de EBU-IN com 67,5 mL de solução de $AgNO_3$ em um frasco de Teflon® com uma barra magnética dentro. Nenhum estabilizador foi utilizado para ajuste de pH. O frasco foi colocado dentro do suporte hidrotermal sob agitação magnética a 400 rpm. A razão de aquecimento foi ajustada para 3 °C por minuto, o tempo e a temperatura foram configurados da forma apresentada na Tabela 1. Após o tempo pré-determinado para cada experimento, aguardou-se em média 45 a 60 minutos para que o reator atingisse temperatura inferior a 90 °C para ser desparafusado e aberto. A solução obtida foi separada em duas partes e armazenada em tubos falcons envoltos em papel alumínio, metade foi refrigerada a 4 °C e a outra foi armazenada em temperatura ambiente, até próximas análises. A evolução da reação foi monitorada por espectroscopia UV-vis.

Tabela 1 – Planejamento para a síntese hidrotérmica de AgNPs.

Ensaio	$AgNO_3$ (mM)	Tempo (min) e Síntese (Sn)	Temperatura (°C)	EBU-IN/ H_2O (g/mL)
1 – t	0,375	15 (S1) / 30 (S2) / 45 (S3) / 60 (S4) / 90 (S5)	100	0,10
2 – T	0,375	60	100 (S4) / 125 (S6) / 150 (S7)	0,10
3 – EBU-IN	0,375	60	100	0,05 (S8) / 0,10 (S4) / 0,15 (S9)

Legenda: $AgNO_3$ – nitrato de prata; EBU-IN – extrato do bagaço *in natura* do suco de uva; AgNPs – nanopartículas de prata. Sn – número da síntese para identificação.

Fonte: Da autora (2023).

4.3.4 Otimização da síntese

4.3.4.1 Ensaio de variação de tempo

O efeito do tempo foi o primeiro a ser analisado. As condições variáveis foram: 15, 30, 45, 60 e 90 minutos. A temperatura de 100 °C e o EBU-IN de 0,10 g/mL foram mantidos constantes.

4.3.4.2 Ensaio de variação de temperatura

Depois de analisar o efeito do tempo, o tempo de 60 minutos foi escolhido com base nos resultados da espectroscopia UV-vis. Foram avaliadas sínteses para as temperaturas de 125 e 150 °C, juntamente com EBU-IN a 0,10 g/mL e duração de síntese de 60 minutos.

4.3.4.3 Ensaio de variação da concentração EBU-IN

A síntese foi realizada com as concentrações de EBU-IN de 0,05, 0,10 e 0,15 g/mL após fixar o tempo de 60 minutos e a temperatura em 100 °C.

4.4 Caracterização do resíduo de uva e das AgNPs

4.4.1 Composição centesimal do resíduo de uva

As análises foram realizadas em triplicata para os resíduos de uva (bagaços) *in natura* e seco. A composição centesimal foi determinada em termos de umidade, lipídios, proteína bruta, fibra bruta, cinzas e fração glicídica conforme descrito pela Associação dos Químicos Analíticos Oficiais (AOAC, 2012) e pelo Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2008). O conteúdo é expresso em porcentagem (ou gramas por 100 gramas).

4.4.1.1 Determinação da umidade

A umidade (método 934.06 AOAC) foi determinada pela técnica gravimétrica em estufa de circulação de ar (Solab, modelo SL-102) a 105 °C até massa constante.

4.4.1.2 Teor de gordura

O teor de gordura ou extrato etéreo (método 960.39 AOAC) foi determinado pelo método Soxhlet (Matoli, modelo 080M024) usando éter de petróleo como solvente a 75 °C sob refluxo por 2h.

4.4.1.3 Proteína bruta

A proteína foi determinada pela técnica analítica do Método Kjeldahl em equipamento de digestão (Tecnal, modelo TE-0364). Sulfato de cobre e sulfato de potássio foram usados como catalisadores de mineralização e ácido bórico como solução receptora para destilação de amônia. O fator de conversão de 5,75 foi utilizado para converter o nitrogênio em proteína (ANVISA, 2003).

4.4.1.4 Fibra bruta

A determinação da fibra bruta foi feita pelo método gravimétrico de Weende, que compreende apenas as frações de celulose insolúvel em ácido e lignina. Meio grama de amostra seca e desengordurada foi digerido em meio ácido e filtrado a vácuo em cadinho de fundo poroso, forrado com lã de vidro, posteriormente pesado até massa constante.

4.4.1.5 Cinzas (resíduo mineral fixo)

A fração de cinzas ou resíduo mineral fixo foi determinada, pelo método gravimétrico em relação à masa inicial, por incineração da amostra após todos ensaios (umidade, lipídios, proteínas, fibra) em forno do tipo Mufla a 550 °C.

4.4.1.6 Carboidrato total

Carboidratos totais ou fração glicídica foram calculados por diferença, subtraindo as porcentagens supracitadas do total de 100%.

4.4.2 *Compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante do bagaço*

4.4.2.1 Preparação de extratos

O método de Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto (1997) foi adaptado e empregado para preparar os extratos. Em triplicata, 4 g de amostras trituradas e 50 mL de água destilada foram colocados em tubos de centrífuga, agitados em vórtex por 1 min (Nova Ética, 109, Brasil) e deixados em repouso em ambiente escuro por meia hora. Em seguida, as amostras foram submetidas a um banho ultrassônico de homogeneização (Unique, UltraCleaner 1600A) por 30 min. Os sobrenadantes foram filtrados em papel Whatman nº 1 e armazenados em frascos de vidro âmbar a -18 °C.

4.4.2.2 Determinação dos compostos fenólicos totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT) foi determinado usando o método de Folin-Ciocalteu (WATERHOUSE, 2002) com adaptações. Em tubos de ensaio, alíquotas de 0,5 mL do extrato foram combinadas e agitadas com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 10 % e 2 mL de 4 g 100 mL⁻¹ de carbonato de sódio. A medição das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro (EZ Read 2000, Biochrom, USA) a 750 nm, após 2 h de repouso. Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico (GAE) 100 g⁻¹ de amostra.

4.4.2.3. Determinação da atividade antioxidante: ABTS^{*+}, β-caroteno/ácido linoleico, fosfomolibdênio

Os ensaios para determinar as atividades antioxidantes foram avaliados conforme Rufino *et al.* (2010). A capacidade antioxidante total pelo método do fosfomolibdênio é representada como gramas de equivalência de ácido ascórbico por 100 gramas de amostra (g EAA.100g⁻¹), β-caroteno/ácido linoléico foi expresso como porcentagem de inibição da oxidação (% de proteção), e o 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), metodologia ABTS^{*+}, foi apresentado como μmol Trolox g⁻¹ de amostra.

4.4.3 Termogravimetria do bagaço de uva

A estabilidade térmica do bagaço de uva seco foi avaliada por termogravimetria (TG/DTG). Os ensaios foram realizados em um equipamento da TA Instruments, modelo Q500. As condições dos ensaios foram: temperatura ambiente a 800 °C, com uma razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, massa aproximada de 10 mg e atmosfera inerte com fluxo de 40 mL min⁻¹ na balança e 60 mL min⁻¹ na amostra. A amostra foi submetida à desidratação por 24 h a 60 °C em estufa com circulação e renovação de ar Tecnal (modelo TE-394/2) e moída em um multiprocessador de alimentos (Black+Decker, modelo HC31 120W) antes de ser pesada para análise. Esta retirada de umidade serve para não mascarar as etapas de degradação dos demais compostos que serão analisados na curva obtida.

4.4.4 UV-vis

Os espectros eletrônicos na região do ultravioleta e do visível foram obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1601PC. As amostras foram analisadas em solução usando uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm.

4.4.5 Potencial Zeta e Dispersão de Luz Dinâmica (DLS)

O potencial Zeta, a distribuição de tamanho e o diâmetro médio, via espalhamento de luz dinâmico (DLS), foram obtidos a 25 °C em um Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). As soluções foram colocadas nas cubetas sem diluições com leituras realizadas em triplicata. Cubeta de poliestireno (modelo DTS1060) e células capilares (modelo DTS1060) foram usadas para medidas de tamanho de partícula e potencial Zeta, respectivamente. O tamanho médio e a estabilidade foram medidos no dia da síntese e após 51 dias (S1 e S3), 21 dias (S2, S8 e S9), 50 dias (S4), 49 dias (S5), 48 dias (S6 e S7) para as soluções de AgNPs mantidas refrigeradas.

4.4.6 Difração de raios X (DRX) do bagaço de uva e das AgNPs

A estrutura cristalográfica foi analisada por difração de raios X (XRD) em um difratômetro Shimadzu XRD 6000 usando fonte radioativa Cu K α ($\lambda=1,5488 \text{ \AA}$). Os ensaios foram realizados nas seguintes condições: temperatura ambiente, com ângulo 2θ variando 5 a 80°, com passos de 0,02° min⁻¹, corrente de 30 mA e voltagem de 30 kV.

4.4.7 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A adsorção superficial de grupos funcionais em nanopartículas influenciadas pela radiação na região do infravermelho foi detectada usando um espectrofotômetro da marca Bruker, modelo Vertex 70. O espectro foi obtido por refletância total atenuada (ATR) e escaneado com uma faixa espectral de 400 a 4000 cm⁻¹. A técnica foi utilizada para verificar a formação de ligações entre Ag-O, presença de grupos fosfatos e carbonatos, além de possíveis espécies adsorvidas na superfície dos materiais.

4.4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG)

A forma e distribuição de tamanhos das nanopartículas sintetizadas foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo. As imagens são obtidas por meio da detecção de elétrons quando o feixe atinge a amostra. O equipamento JEOL® modelo 6701F foi utilizado com um canhão de emissão operando com voltagens de extração de corrente de 10 kV. O programa de processamento de imagens *Image J* da *National Institutes of Health* foi utilizado para mensurar os diâmetros médios das AgNPs.

4.5 Potencial antibacteriano das AgNPs

As AgNPs biosintetizadas foram avaliadas quanto ao comportamento antibacteriano contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, representadas por *Escherichia coli* CBAM 0001 (*E. coli*) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (*S. Aureus*), respectivamente (OSTROSKY *et al.*, 2008).

4.5.1 Teste de difusão em disco

O teste de difusão em disco foi utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana conforme padronização estipulada pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS). Culturas bacterianas (10^8 UFC/ml) foram incubadas a 37 °C após inoculação em ágar Müller Hinton. Três poços foram feitos na superfície de ágar de cada placa e receberam 100 µL de AgNPs biosintetizadas. As placas após adição das soluções de AgNPs foram incubadas a 37 °C por 24 h antes de avaliar os halos de inibição. O halo de inibição foi medido com o auxílio de um paquímetro a partir da circunferência do disco até o crescimento de microorganismos (BARRY; THORNSBERRY, 1991; OSTROSKY *et al.*, 2008).

4.5.2 Teste em microplaca

Para o teste quantitativo, um ensaio de microplaca foi realizado de acordo com o método NCCLS (2003), usando o corante cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TCC) e o meio de cultura caldo Müller-Hinton. O meio de cultura (100 µL) com solução de AgNPs (100 µL) e o inóculo previamente diluído a 01×10^6 células/mL (10 µL) foram adicionados em todos os poços a serem testados. Após o período de incubação (24 h a 37 °C), os poços receberam 40 µL de TCC 0,1% e as placas foram incubadas (1 h a 37 °C) para identificação do crescimento bacteriano pela coloração rosa.

4.6 Estatísticas

4.6.1 Bagaço da uva

Para a composição centesimal, os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) de três valores, exceto para as análises de β -caroteno/ácido linoleico, fosfomolibdênio e Folin-Ciocalteu, nas quais foram feitas 9 repetições. Os dados foram testados para distribuição normal pelo teste Shapiro-Wilk e diferença significativa determinada pelo teste T de Student. As análises estatísticas foram realizadas usando o *software* Microsoft Excel® e o limite de significância estatística foi estabelecido em 5% ($P < 0,05$).

4.6.2 Caracterização das AgNPs e EBU

Os dados coletados nas leituras de caracterização foram trabalhados e plotados no *software* OriginLab®.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor elucidação do trabalho realizado, os resultados estão divididos entre a caracterização do bagaço de uva e a caracterização das soluções de AgNPs conforme análises realizadas ao longo do processo de otimização da síntese.

5.1 Caracterização do bagaço da uva (BU)

5.1.1 Composição centesimal

Os resultados das análises físico-químicas estão resumidos na Tabela 2. O teor de umidade apresentou maior diferença, diminuindo de $73,36 \% \pm 0,17$ para BU-IN para $18,82 \% \pm 0,10$ para o bagaço de uva seco (BU-S) ($p < 0,05$), conforme esperado em consequência do processo de secagem. No presente estudo, o processo de secagem também afetou significativamente os teores de gordura bruta, proteína e carboidrato entre as amostras ($p < 0,05$), enquanto fibra bruta e cinzas não tiveram diferença significativa ($p > 0,05$). Demirkol e Tarakci (2018) relataram menor teor de umidade, de $4,94 \% \pm 0,37$ e $3,33 \% \pm 0,10$ para o bagaço de uva Isabel seco a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72h e $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48h em estufa com circulação de ar, respectivamente.

O teor de umidade encontrado no presente estudo é próximo aos 25% obtidos para o bagaço de uva desidratado a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por Almeida *et al.* (2022). Embora fosse um subproduto da vinícola, os autores também mantiveram as cascas, polpa, sementes e caules da fruta na amostra. As características físico-químicas do bagaço de uva apresentam valores variados, dependendo da variedade do fruto e da produção, além de serem influenciadas pelas partes da fruta inseridas na análise. De forma geral, o bagaço de uva tem valor nutricional de baixo a médio, cerca de 14% de proteína, 26% a 70% de fibra, 4% a 11% de lipídios e teor de açúcar em torno de 4% a 9% no bagaço de vinho tinto (ILYAS *et al.*, 2021).

Storck *et al.* (2015) analisaram três granulometrias diversas de bagaço de uva desidratado da produção de suco, obtendo $17,3\% - 5,6\%$ de lipídeos, $8,2\% - 15,6\%$ de proteína, $21,3\% - 54,5\%$ de fibra bruta, $30,5\% - 45,8\%$ de carboidratos e $21,3\% - 54,5\%$ de cinzas. Além de fibras e carboidratos, os resultados das análises do presente estudo se alinham com as faixas de resultados obtidas por Storck *et al.* Os autores também compararam a composição química

de maçã, laranja e cereja de Barbados, e concluíram que os teores de lipídios, fibras e proteínas para o bagaço da uva foram ligeiramente superiores.

A ausência de diferença significativa observada nos dados de fibra bruta pode ser atribuída ao alto desvio padrão obtido para as duas amostragens realizadas em triplicata (BU-S e BU-IN). Uma das replicatas de cada amostra apresentou resultado que se destoava dos demais. Foi estabelecido um limite inferior e superior ao considerar valores que estejam além de 2 desvios padrão da média como potenciais outliers. Nesta análise, os dados em questão não se enquadraram como outliers. No contexto do estudo, justifica-se esta análise devido à alta variabilidade e à natureza dos dados, os quais foram obtidos por experimentação manual e erros inerentes ao processo metodológico e do operador podem afetar os resultados finais, por este motivo houve a realização de triplicatas desde as etapas iniciais.

Tabela 2 – Médias seguidas de desvio padrão das determinações da composição centesimal, valor energético, compostos fenólicos, atividades antioxidantes (ABTS^{*+}, β -caroteno/ácido linoleico e complexo fosfomolibdênio), em bagaço de uva *in natura* e seco.

	<i>In natura</i>	Seco
Umidade (%)	73,36 \pm 0,17 ^A	18,82 \pm 0,10 ^B
Extrato etéreo (lipídios) (%)	1,35 \pm 0,06 ^A	4,74 \pm 0,24 ^B
Proteína bruta (%)	1,71 \pm 1,29 ^A	10,43 \pm 0,68 ^B
Fibra bruta (%)	3,02 \pm 1,36 ^A	18,82 \pm 5,06 ^A
Carboidrato (%)	18,29 \pm 1,99 ^A	57,30 \pm 5,33 ^B
Cinzas (%)	2,26 \pm 0,33 ^A	2,05 \pm 0,10 ^A
Valor energético (kcal.100 g ⁻¹)	351,27	98,22
Fenólicos totais (mg EAG ¹ .100 g ⁻¹ amostra) ⁵	55,02 \pm 1,17 ^A	161,54 \pm 14,04 ^B
ABTS (mM trolox ³ .100 g ⁻¹ amostra) ⁵	201,01 \pm 15,88 ^A	628,64 \pm 26,04 ^B
β -caroteno/ácido linoleico (% proteção) ⁵	81,02 \pm 1,09 ^A	80,40 \pm 1,23 ^A
Fosfomolibdênio (g AAE ⁴ .100 g ⁻¹ amostra) ⁵	5,51 \pm 0,09 ^A	80,25 \pm 6,42 ^B

*n = 3 réplicas para todas as determinações. Letras maiúsculas diferentes (A/B) na mesma linha indicam diferenças significativas (p < 0,05). EAG = equivalente de ácido gálico. TEAC = atividade antioxidante equivalente a TROLOX (análogo hidrossolúvel da vitamina E comercializado pela Hoffman-LaRoche®). AAE = equivalente de ácido ascórbico.

Fonte: Da autora (2023).

As sementes desempenham um fator relevante na caracterização da composição do bagaço da uva, considerando que são mais ricas em fibras do que a casca da uva, sendo também mais representativas no bagaço de uva tinta do que nas variedades brancas, enquanto os açúcares têm teores maiores no bagaço de uva branca (HEUZÉ; TRAN, 2020; SPINEI; OROIAN, 2021). A fibra bruta avaliada variou de 3,02 % \pm 1,36 para BU-IN a 18,82 % \pm 5,06 para BU-S, valores inferiores em relação a outras variedades estudadas por Bender *et al.* (2016)

e Deng; Penner; Zhao (2011) onde apenas as cascas foram analisadas para quantificação da fibra alimentar.

As sementes de uva são bem conhecidas como produtos ricos em óleo (ILYAS *et al.*, 2021). Levando isto em consideração e analisando os resultados obtidos para os lipídios, ressalta-se que, conforme disposto na metodologia, o BU-IN passou por um leve processo de moagem após a determinação da umidade, dado que a granulometria precisava ser menor devido às análises subsequentes. Por sua vez, o BU-S havia sido seco e moído, para a obtenção da farinha, antes mesmo de ter sido submetido à determinação da umidade, assim, o BU-IN foi menos moído que o BU-S. Devido a essa diferença no processo, o BU-IN não possuía todas as suas sementes minuciosamente quebradas ou esmigalhadas, sendo o mesmo raciocínio atribuído às cascas. Portanto, inferiu-se que a análise do teor de lipídios do bagaço *in natura* resultou em uma quantificação menos precisa ou subestimada devido à forma física da amostra submetida aos ensaios, podendo explicar a diferença significativa nos resultados. Todavia, ressalva-se que os resultados são plausíveis, dispondo informações do material conforme forma e tamanho do bagaço analisado, o que é de interesse deste estudo no intuito de comparar a disponibilidade dos nutrientes e compostos na forma *in natura* e seca.

5.1.2 Teor Total de Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante

O conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante do BU *in natura* e seco são mostrados na Tabela 2. O conteúdo fenólico total do BU *in natura* e seco variou de $55,02 \pm 1,17$ (BU-IN) a $161,54 \pm 14,04$ (BU-S) mg GAE por 100 gramas de amostra. Três métodos diferentes foram aplicados para determinar a atividade antioxidante do BU, abrangendo mecanismos de ação para uma ampla gama de matrizes alimentares (BARROS *et al.*, 2020). Nos métodos ABTS e Fosfomolibdênio, o BU-S apresentou maior atividade antioxidante em relação ao BU-IN, o que pode estar associado à redução da concentração de água de 74,35 % devido ao processo de secagem. Isto porque na amostragem (quatro gramas) de BU-S há maior concentração de biocompostos, já a amostra do BU-IN apresenta grande parte de sua massa referente à água contida no bagaço.

Além de analisar o intervalo entre as duas amostragens, o método β -caroteno/ácido linoleico é capaz de categorizar o poder de proteção de cada material individualmente, pois os resultados são obtidos em porcentagem, o impacto da concentração aquosa é retirado da contagem. Existem três categorias: atividade antioxidante alta (> 70%), intermediária (40–70%) e baixa (< 40%) (RUFINO *et al.*, 2010). Considerando o descrito acima, observamos que ambos os extratos apresentam alta atividade antioxidante, pois foram obtidos valores de $81,02 \pm 1,09$

% e $80,40 \pm 1,23$ % para o bagaço de uva *in natura* e seco, respectivamente.

Comparando com os valores obtidos neste trabalho, Teles *et al.* (2018) encontraram maior teor de fenólicos para bagaço de uva Pinot Noir *in natura* na ordem de $2.820 \pm 240,0$ mg GAE.100 g⁻¹ (d.b.) e $165,05 \pm 15,20$ µmol Trolox.g⁻¹(d.b.) para capacidade antioxidante. No entanto, sua extração foi feita com duas soluções aquosas usando acetona e metanol, garantindo melhor eficiência de extração. Alonso, Revilla e Bourzeix (1991) também observaram que extrações etanol/água com maior teor de etanol são mais eficientes para extrair compostos de uva. Considerando apenas os teores fenólicos encontrados na casca da uva, Soares *et al.* (2008) obtiveram menor quantidade para uva fresca ($41,21 \pm 1,32$) comparada à uva seca ($219,56 \pm 6,10$ mg EAG.100 g⁻¹ de amostra).

Existe uma forte correlação entre o conteúdo fenólico e a capacidade antioxidante, mas nem todas as substâncias antioxidantes consistem em fenólicos, o que significa que outros compostos não fenólicos podem ser responsáveis pela capacidade quantificada (TELES *et al.*, 2018). A diferença entre os resultados obtidos para as amostras *in natura* e seca pode estar relacionada ao processo de secagem realizado, afetando assim a concentração dos antioxidantes nas amostras.

Ainda assim, conclui-se que mesmo após processamento térmico na obtenção do suco (100 °C) e no caso do BU-S, após desidratação (60 °C), foi constatada altos teores dos biocompostos quantificados pelos métodos selecionados, os quais poderiam ter sido reduzidos devido à sensibilidade ao calor. Em suma, os processos de secagem e moagem possibilitaram quantificar a consequente alteração do bagaço fresco em relação à farinha, reduzindo seu teor de umidade em 74% e apresentando diferença significativa em proteína, carboidratos e gordura bruta. Sendo que o menor teor de umidade do BU-S pode facilitar seu armazenamento para uso futuro durante a baixa temporada da uva, dispensando refrigeração. Essas análises respaldam o uso do bagaço da uva como uma fonte potencial de compostos bioativos para a síntese de nanopartículas.

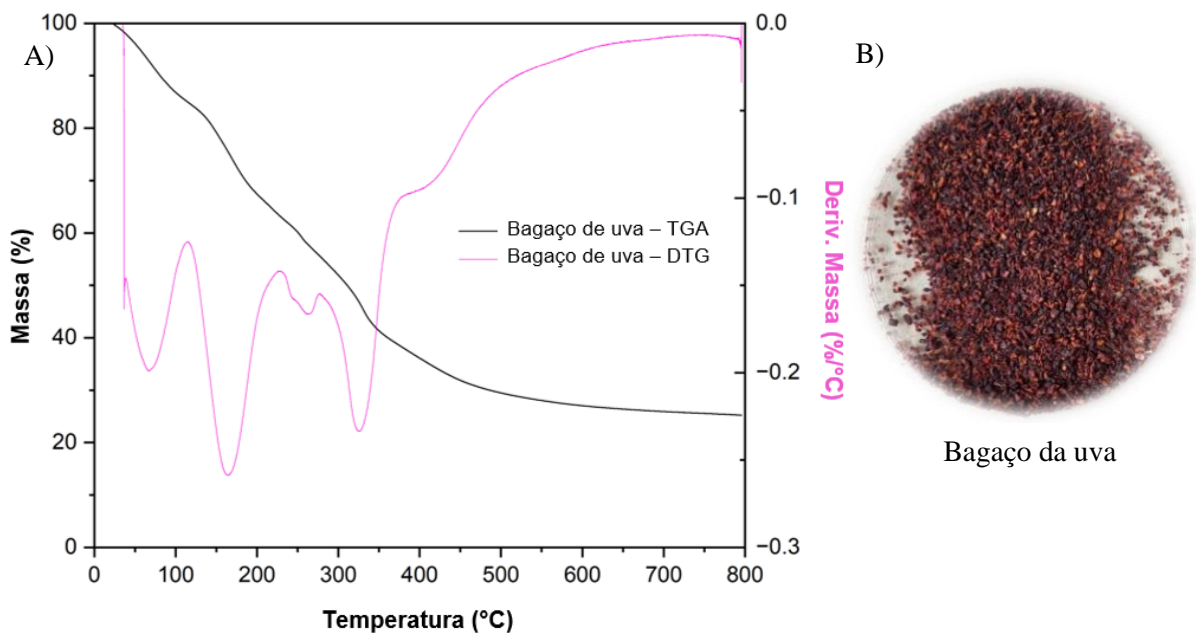
5.1.3 Termogravimetria (TG/DTG)

A termogravimetria permite a obtenção de informações relevantes sobre as transições de fases e determinação das propriedades térmicas de fibras vegetais, além de rastrear o perfil de degradação e permitir inferir o grau de estabilidade térmica da amostra. A curva termogravimétrica obtida possui eventos concomitantes sendo apresentada junto à curva de DTG (primeira derivada da curva de TG) para melhor visualização dos eventos descritos

(FIGURA 9).

Conforme estudos sobre a uva relatados na literatura (KHIARI; JEGUIRIM, 2018; SHARMA *et al.*, 2004; TARLEY & ARRUDA, 2004) a perda de massa ocorre progressivamente devido à evaporação de água e voláteis (80 a 200 °C), seguida da degradação da hemicelulose (entre 200 e 300 °C), celulose (entre 300 e 400 °C) e lignina.

Figura 9 – Curvas TG e DTG do bagaço da uva analisada em atmosfera inerte, 10 °C/min, (A), imagem do bagaço de uva (B).



Fonte: Da autora (2023).

Amostras de diferentes granulometrias e condições de análise apresentam resultados distintos em relação à estabilidade térmica. A exemplo, para o bagaço de uva de vinícola analisado por Farinella, Matos e Arruda (2007), o primeiro estágio, representando a evaporação da água e voláteis, ocorreu até cerca de 180 °C. Para o bagaço na presente análise, ocorreu desde o início da análise em 28 °C até cerca de 118 °C. Esta perda de massa foi condizente a aproximadamente 14% da massa total.

O segundo estágio é associado à zona de desvolatilização atribuída à degradação da hemicelulose e da celulose, bem como parte da lignina (ALMEIDA *et al.*, 2022; KHIARI; JEGUIRIM, 2018). As curvas TG/DTG do bagaço de uva apresentam este estágio na faixa de temperaturas de 118 a 550 °C, totalizando um decréscimo de 35% da massa. A degradação da hemicelulose é representada por um período de ombro de 226 a 279 °C e precede a degradação da celulose, que se trata de estruturas mais complexas degradadas em temperaturas superiores,

neste caso de 279 a 377 °C, cujo pico está em 316 °C. A degradação da lignina pode ser observada em uma queda mais branda nas temperaturas de 377 a 550 °C.

Enquanto os resíduos de cinzas são obtidos após 550 °C, entretanto, a lignina pode ser decomposta em uma ampla faixa de temperatura, desde a temperatura ambiente até 900 °C (WATERS *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2007). Assim, o terceiro estágio, marcado por uma leve taxa de perda de massa a partir de 550 °C, contempla as reações de pirólise e carbonização da lignina remanescente e obtenção dos resíduos ou cinzas.

As curvas de decomposição de diversas frutas e resíduos agrícolas se assemelham a esse padrão de três estágios. Gowman *et al.* (2019) compararam bagaço de uva com bagaço de maçã lavado e não lavado e constataram melhor estabilidade térmica para o resíduo da uva. Amostras cruas e extraídas de tomate podre, tomate verde, planta de tomate e bagaço de uva foram analisadas por Almeida *et al.* (2022) e curvas semelhantes foram obtidas. No entanto, observou-se uma curva menos acentuada de perda de massa para o bagaço de uva devido ao maior teor lignocelulósico apresentado por este resíduo. A uva é relatada como uma fruta de alta proporção de lignina, cuja quantidade varia de 18% a 55% (ILYAS *et al.*, 2021). Esta macromolécula amorfa possui elevada estabilidade térmica proporcionada pelas moléculas aromáticas estáveis, favorecendo assim a estabilidade dos resíduos de uva (BEDA *et al.*, 2020).

5.2 Caracterização das Nanopartículas de Prata (AgNPs)

5.2.1 Análise visual e espectrometria UV-Vis

O primeiro indicativo da produção de AgNPs é a mudança na coloração das soluções sintetizadas. A alteração característica da síntese da prata é a passagem da cor da solução para tons amarronzados, indício da presença da prata metálica em solução (IBRAHIM, 2015). A Figura 10 apresenta as sínteses obtidas, bem como os extratos utilizados nos ensaios de concentrações de extrato. A princípio, a cor clara observada nas sínteses de 125 e 150 °C, bem como os sobrenadantes de tamanhos visíveis a olho nu, como são indicativos da ineficácia da reação submetida a essas condições.

Segundo Vanlalveni *et al.* (2021), a absorção UV-vis em torno de 430 nm também é uma observação comum perceptível para detectar AgNPs. Existe uma correlação direta entre a quantidade de AgNPs formada e a concentração de AgNO₃ utilizada no meio reacional, limitada pelo tempo em que todo o sal de AgNO₃ é consumido. Os resultados da análise visual e de UV-vis foram usados para guiar o entedimento da síntese em estudo.

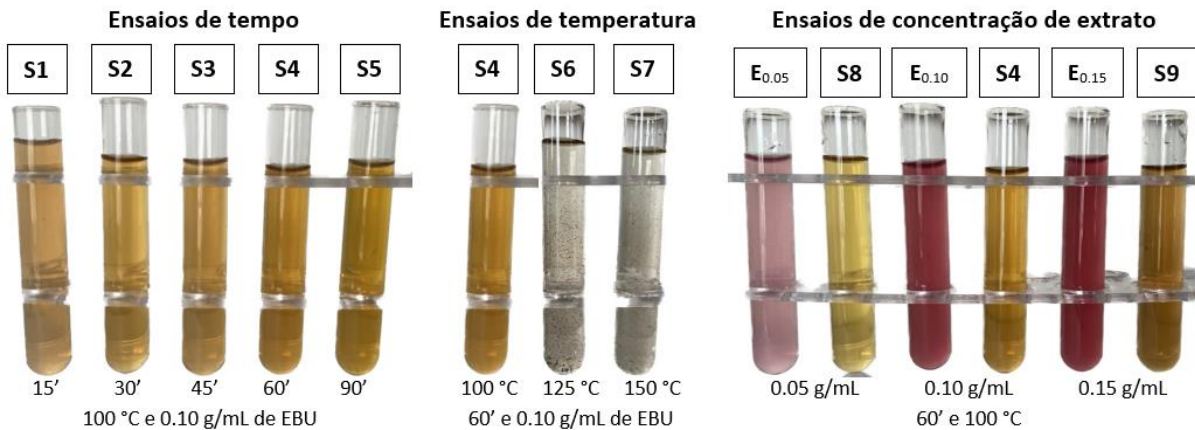
Os ensaios de variação de tempo na síntese apresentaram picos de absorção abrangendo a faixa de 420 a 458 nm, indicando a formação de AgNPs e o consumo da fonte de prata, AgNO_3 (FIGURA 11). O pico mais alto observado para a síntese de 90 minutos pode representar maior formação de AgNPs, o que será posteriormente avaliado nas análises subsequentes. As temperaturas de 125 e 150 °C não formaram AgNPs devido à ausência do pico alusivo à formação de prata metálica (Ag^0), como o observado a 100 °C. Esses resultados corroboram com outras sínteses verdes de metais nobres, reforçando a capacidade redutora dos extratos vegetais (GONZÁLEZ-BALLESTEROS; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ; RODRÍGUEZ-ARGÜELLES, 2018; IBRAHIM, 2015; SUDHA; JEYAKANTHAN; SRINIVASAN, 2017; ALAHMAD *et al.*, 2022).

O método hidrotérmico permite o controle das variáveis tempo e temperatura de reação (LIU *et al.*, 2014). Após finalizar a reação, a coloração da solução obtida permitiu inferir se houve ou não formação das AgNPs, hipótese validada ou descartada conforme leitura do UV-vis. A coloração clara das sínteses S6 (125 °C) e S7 (150 °C) foram as que mais se destoaram das demais e não apresentaram tons almejados. Este indicativo foi validado pelos espectros obtidos (FIGURA 11-B) devido à ausência do pico aproximadamente 430 nm. Dentre os ensaios de variação de tempo, também houve uma variação na coloração obtida, tendendo a escurecer a coloração com o aumento do tempo de reação. Todavia, a intensidade dos picos formados não foi diretamente proporcional ao quesito cor, observa-se que a síntese a 30 minutos foi a de menor intensidade obtida (FIGURA 11-A). Em adição, os tempos de 45, 90 e principalmente 15 minutos apresentaram um deslocamento no pico para em torno de 450 nm quando comparado aos demais.

A variação na concentração do extrato, por sua vez, afetou a coloração da reação desde o ponto inicial, já que a intensidade da cor da solução aquosa de extrato de uva variou de rosa claro para rosa escuro e afetou a solução final após síntese. Entretanto, todas resultaram em tons amarelados e curvas no UV-vis condizentes ao esperado para a formação das AgNPs.

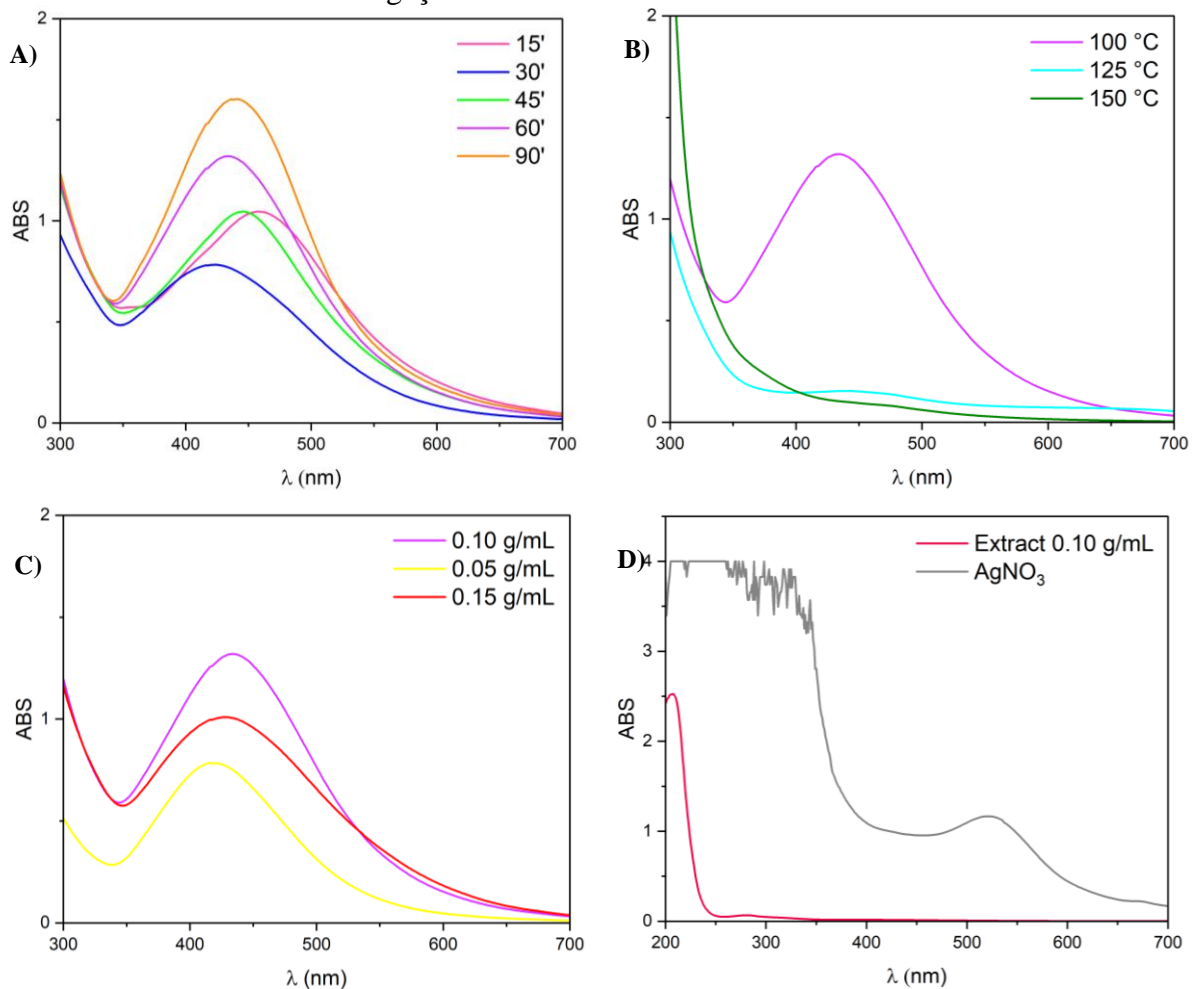
Além dos benefícios no controle da temperatura e do tempo, a pressão obtida no método hidrotérmico é um fator que favorece algumas reações redox que são inviabilizadas sob pressão atmosférica padrão (LIU *et al.*, 2014). Todas as sínteses foram realizadas em temperatura suficiente para a ebulição da água, sendo esta de 91 °C ao considerar a pressão atmosférica local de 690,7 mmHg. Assim, em todas as sínteses houve um leve aumento na pressão, variando de 2 a 3 bar (29 a 43 psi), medida por um manômetro acoplado ao reator.

Figura 10 – Soluções de AgNPs sintetizadas via método hidrotérmico em diferentes tempos e temperaturas com extrato de bagaço de uva em diferentes concentrações.



Fonte: Da autora (2023).

Figura 11 – Espectros UV-vis das soluções de AgNPs sintetizadas via método hidrotérmico com extrato do bagaço de uva como biorredutor.



Legenda: A) Diferentes ensaios de tempo de síntese de AgNPs a 100 °C e 0,10 g/mL de extrato. B) Diferentes ensaios de temperatura de síntese de AgNPs a 60 minutos e 0,10 g/mL EBU. C) Diferentes ensaios de concentrações de extrato de uva na síntese de AgNPs a 100 °C e 60 minutos. D) Espectro UV-vis do nitrato de prata (AgNO_3) utilizado como fonte de prata nas sínteses e do extrato do bagaço de uva na concentração de 0,10 g/mL.

Fonte: Da autora (2023).

Em paralelo aos parâmetros reacionais ajustados pelo método hidrotérmico está a influência do extrato utilizado como mediador. Neste contexto, o extrato também foi analisado para verificar se a faixa de absorção condizia aos compostos típicos da uva. A uva está listada entre as plantas mais ricas em grupos funcionais como antocianinas e flavanoides. O padrão típico de absorção das antocianinas e flavanoides no espectro UV-vis inside nas bandas de 260 a 280 nm (SAHA *et al.*, 2021) e 240 a 285 nm (MARKHAM; MABRY, 1975; SISA *et al.*, 2010). A Figura 11-D retrata o resultado do extrato de uva na concentração de 0,10 mg/L, nota-se um leve pico de absorção na faixa de 280 nm, condizente à presença de antocianinas e flavanoides. A presença desses compostos que são destacados pelo seu potencial antioxidante são associados ao seu papel de agente redutor da prata. No mesmo gráfico, tem-se a curva do AgNO₃ para apresentar o pico da prata em torno de 530 nm antes da reação de redução do metal.

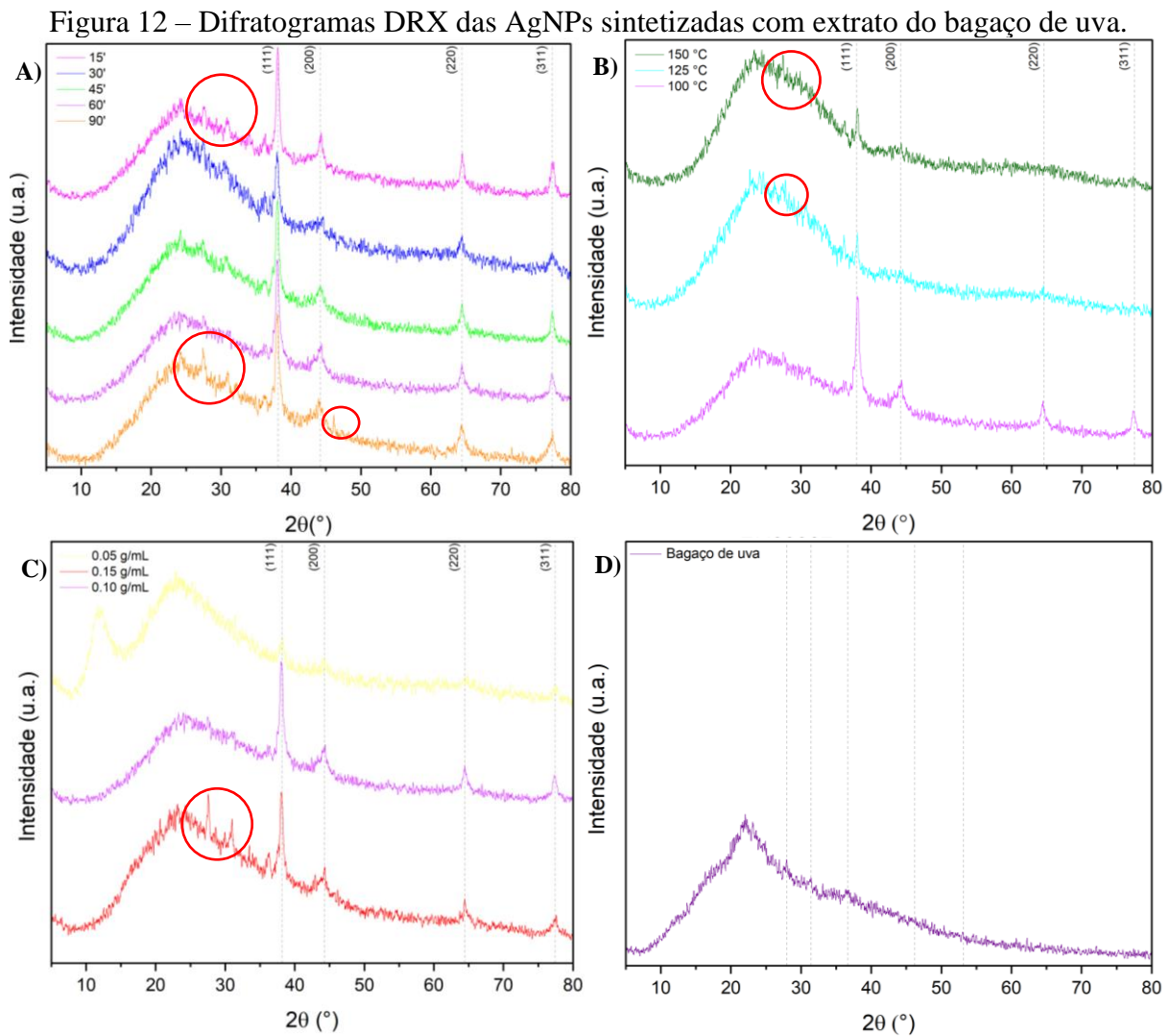
Após a síntese, também foi avaliado se houve variação no pH das soluções. O pH da solução do extrato de bagaço de uva era de 2,9 e quando misturada na solução de AgNO₃, a solução final apresentou valor de 3,0. Após a reação hidrotérmica, as soluções resultantes com as AgNPs apresentaram valores de pH na faixa de 3,0 a 3,4. Apesar da literatura relatar que pH neutro ou tendendo à alcalinidade é o mais adequado para formação de AgNPs (VANLALVENI *et al.*, 2021), os espectros obtidos no UV-vis constataram a obtenção das AgNPs através da redução da fonte de prata na presença do extrato do resíduo de uva em pH ácido.

5.2.2 Difração de raios X (DRX)

A análise por difração de raios X (DRX) visa a caracterização estrutural do produto obtido, uma vez que esta técnica caracteriza a rede cristalina tridimensional que representa o arranjo geométrico dos átomos, íons ou moléculas do sólido cristalino. Os picos de reflexão de Bragg foram detectados em 37,9°, 44,2°, 64,6° e 77,4° na faixa de 5 a 80°, associados aos índices de Miller de (111), (200), (220) e (311), respectivamente. As curvas representativas estão plotadas na Figura 12, organizadas por gráficos em função do tempo, temperatura e concentração do extrato nas sínteses. Os picos detectados indicam a presença de prata metálica (Ag⁰), enquanto o pico mais proeminente em 37,9° implica na prevalência da fase (111) nas nanopartículas de prata cristalina, confirmando o arranjo fcc (face centrada cúbica) encontrado na prata (SILVA *et al.*, 2017).

O padrão difratométrico gerado permite identificar as intensidades relativas dos picos difratados do metal alvo e também de qualquer material residual amorfo. Alguns picos pequenos foram observados entre 25° a 30° e a 46,10° para as sínteses obtidas em 90 minutos (S5), a síntese a 150 °C (S7) e a síntese com 0,15 g/mL de EBU (S9), também em 53,55° para

a síntese de 60 minutos com 0,10 g/mL de EBU (S4). Picos similares foram observados e relacionados a compostos orgânicos de extratos vegetais usados para reduzir e estabilizar íons de prata em nanopartículas (IBRAHIM, 2015; ROOPAN *et al.*, 2013). Durante a síntese, é possível que haja uma fase secundária que leva à formação de óxido de prata (Ag_2O), todavia, a técnica empregada não detectou picos adicionais além da prata, indicando a formação de uma fase pura.



Legenda: A) AgNPs em diferentes tempos de reação de 15, 30, 45, 60 e 90 minutos sintetizados a 100 °C com 0,10 g/mL de EBU. B) AgNPs em diferentes reações de temperatura de 100, 125 e 150 °C sintetizado em 60 minutos com 0,10 g/mL de EBU. C) AgNPs com diferentes concentrações de EBU de 0,05, 0,10 e 0,15 g/mL sintetizado a 60 minutos e 100 °C. D) Bagaço do suco integral de uva.

Fonte: Da autora (2023).

Baseado na análise do extrato, Figura 12-D, é possível afirmar que se trata de uma estrutura amorfa sem a presença de materiais metálicos. Assim, infere-se que não havia impurezas no bagaço, as quais poderiam ser oriundas do processo de produção do suco. Isenta-

se também a possibilidade de contaminantes que poderiam vir do processamento analítico, como influência de equipamento com ferrugem, sujidade no ambiente laboratorial, armazenamento e manuseio inadequado.

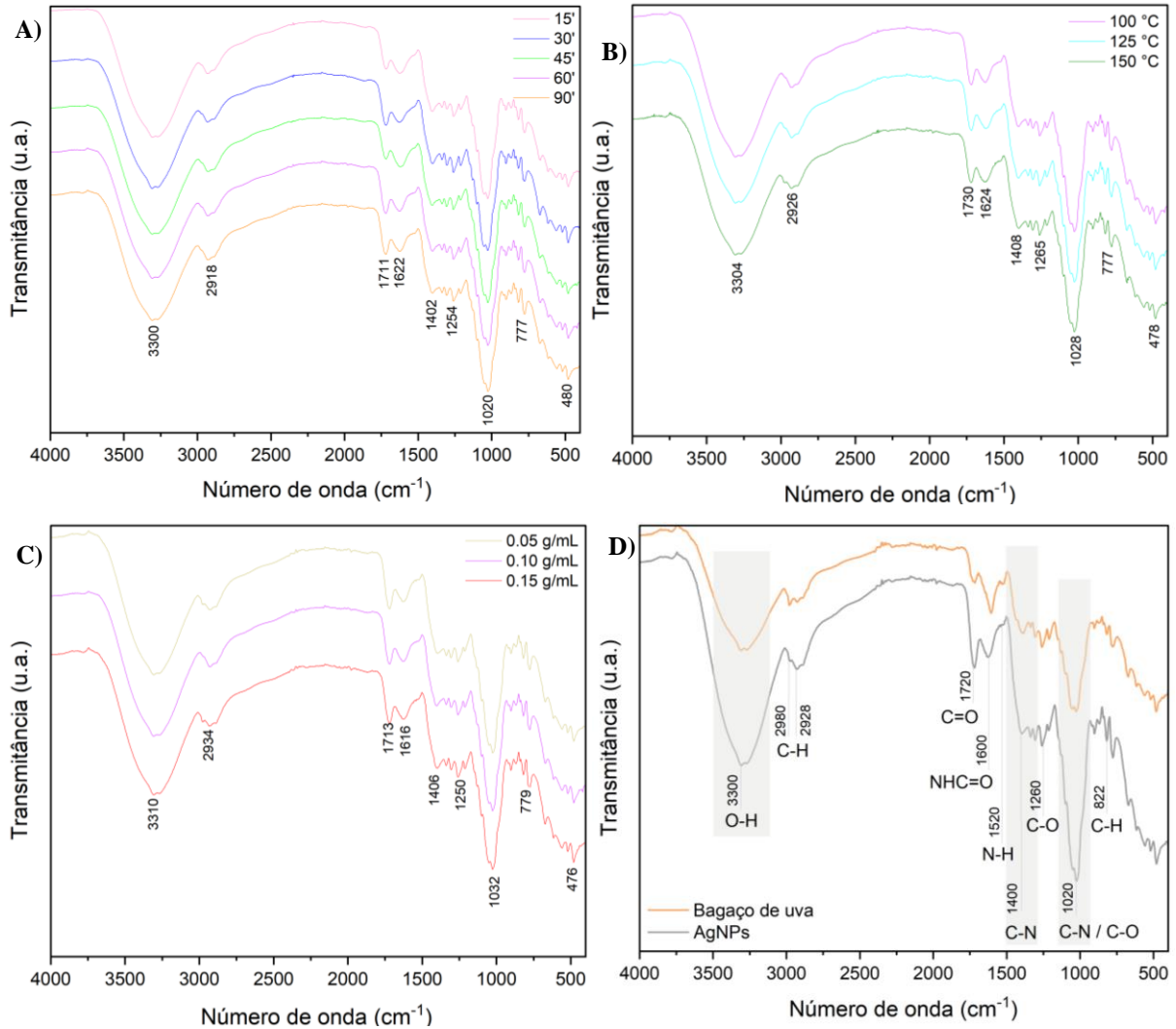
Nota-se que os picos relacionados aos compostos orgânicos estão mais proeminentes nos padrões difratométricos das soluções de AgNPs do que na curva do extrato. Estes picos que estavam mascarados no material amorfo podem ter sido evidenciados pela parte cristalina do bagaço presente nas soluções de AgNPs após síntese.

5.2.3 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A medição da vibração e rotação de moléculas pela análise FTIR fornece evidências da presença dos principais grupos funcionais nas AgNPs que podem ser relacionados às estruturas da fração solúvel da solução da síntese que podem estar envolvidos no processo reacional. Os espectros de FTIR das diferentes condições de síntese (FIGURA 13-A, B, C) permitem identificar os compostos do extrato de uva, corroborando com os picos apresentados no DRX. Devido à intensa banda de compostos orgânicos derivados do extrato, a identificação da prata é mascarada nesta análise, ressaltando a identificação de compostos orgânicos.

Os espectros obtidos referentes às sínteses das AgNPs mostram que, mesmo com as variadas condições empregadas nas reações, pequena diferença foi observada entre eles. Ao avaliar o espectro do bagaço da uva e compará-lo com a curva das AgNPs obtidas a 100 °C, 1 h e 0,05 g/mL de extrato, também tem-se um perfil muito semelhante, mas com frequências vibracionais em diferentes intensidades (FIGURA 13-D). A banda larga em 3300 cm^{-1} pode ser atribuída às vibrações de estiramento O-H, grupo hidroxila dos anéis aromáticos de compostos flavonoides altamente presentes na uva e atuantes na síntese (KHALIL *et al.*, 2014). Os picos em 2980 e 2928 cm^{-1} estão relacionados às vibrações simétricas e assimétricas de estiramento das ligações C-H nos grupos $-\text{CH}_2$ e CH_3 (PAVLOU *et al.*, 2016). Em 1720 cm^{-1} tem-se o alongamento carbonila C=O de grupos aldeído, cetona e ácido carboxílico e o pico em 1600 cm^{-1} pode ser atribuído ao estiramento em compostos carbonílicos que possuem o grupo NHC=O (amida I), indicativos das estruturas presentes nas uvas: terpenóides e flavonóides. Enquanto as vibrações de deformação N-H nas ligações amida II das proteínas são representadas pelo pico em 1520 cm^{-1} (GONZÁLEZ-BALLESTEROS; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ; RODRÍGUEZ-ARGÜELLES, 2018).

Figura 13 – Espectro FTIR das AgNPs sintetizadas em diferentes condições e do extrato do bagaço de suco de uva.



Legenda: A) AgNPs em diferentes tempos de reação de 15, 30, 45, 60 e 90 minutos sintetizados a 100 °C com 0,10 g/mL de EBU. B) AgNPs em diferentes reações de temperatura de 100, 125 e 150 °C sintetizado em 60 minutos com 0,10 g/mL de EBU. C) AgNPs com diferentes concentrações de EBU de 0,05, 0,10 e 0,15 g/mL sintetizado a 60 minutos e 100 °C. D) Bagaço do suco integral de uva e AgNPs sintetizada com 0,05 g/mL de extrato.

Fonte: Da autora (2023).

As vibrações de flexão C–N de anéis de aminas aromáticas relacionam-se ao pico em 1400 cm⁻¹ (KHALIL *et al.*, 2014). A pequena banda em 1260 cm⁻¹ representa o alongamento C–O, condizentes às amidas III das proteínas. Por fim, o pico em 1020 cm⁻¹ pode ser relacionado aos polissacarídeos ou vibração de estiramento C–N de aminas alifáticas ou C–O de álcoois/fenóis, indicando a existência de polifenóis (BASTOS-ARRIETA *et al.*, 2018; GONZÁLEZ-BALLESTEROS; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ; RODRÍGUEZ-ARGÜELLES, 2018; PUJOL *et al.*, 2013), os quais ficaram mais acentuados nas AgNPs obtidas pela utilização do bagaço da uva do que no próprio bagaço. Anéis aromáticos dos polifenóis e ácidos orgânicos

também são associados à banda próxima a 822 cm^{-1} , atribuída à vibração da ligação C-H desses compostos (PEREIRA *et al.*, 2023).

Ao comparar a frequência característica do modo vibracional do extrato com o das AgNPs formadas, é possível observar os desvios de luz nas bandas que representam os principais grupos funcionais na redução e o capeamento das nanopartículas. A alteração na intensidade da banda O-H permite inferir o envolvimento deste grupo funcional, assim como o deslocamento das bandas na região entre 1400 e 1020 cm^{-1} pode envolver a ligação do grupo (N-H) C=O de peptídeos cíclicos com as NPs, consequentemente atuando na função de estabilização. A síntese com o extrato do bagaço de uva faz uso de proteínas e metabólitos, como terpenoides com grupos funcionais de aminas, álcoois, cetonas, aldeídos e ácidos carboxílicos, relacionando os grupos funcionais CHO, C=O, COOH e O-H no processo de redução e estabilização (GONZÁLEZ-BALLESTEROS; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ; RODRÍGUEZ-ARGÜELLES, 2018).

A literatura indica que a redução iônica realizada pelos polifenóis acontece devido aos ácidos orgânicos e também aos grupos hidroxila, sendo a quantidade desses grupos relacionada à capacidade de reação das biomoléculas (MIU; DINISCHIOTU, 2022). Dentre estes, destacam-se os flavanoides e os ácidos cloflavanoides, que são como altamente responsáveis na redução e estabilização das AgNPs (PEREIRA *et al.*, 2023), assim como na redução para formação de outras nanopartículas como ouro e zinco (MARSLIN *et al.*, 2018).

Muitas biomoléculas têm sido associadas às propriedades redutoras e protetoras para formação das MNPs, incluindo: fenóis, polissacarídeos, flavonas, terpenóides, alcalóides, aminoácidos, proteínas, enzimas, compostos alcoólicos e outros (QIDWAI *et al.*, 2018). O resíduo de uva, além de antioxidantes, tem um nível notável de lignina, que consiste em uma classe de polímeros orgânicos complexos com elevada estabilidade térmica devido a moléculas aromáticas estáveis, consequentemente dando maior estabilidade ao bagaço de uva (ILYA *et al.* 2021; BEDA *et al.*, 2020). O material resultante pode, consequentemente, levar a uma estrutura de estabilidade chave para se obter as AgNPs.

5.2.4 Microscopia eletrônica de varredura com Energia Dispersiva (MEV-FEG)

A microscopia eletrônica de varredura possibilitou a visualização em diferentes ampliações das AgNPs obtidas a partir dos ensaios realizados. Na Figura 14, é possível observar que a variação da temperatura, tempo e concentração de extrato da uva ocasionou a alteração de diâmetros das partículas, mas a forma esférica foi prevalente, visível nas imagens

ampliadas. As constatações morfológicas corroboram as análises prévias, bem como a outros autores que sintetizaram AgNPs por via biológica ou síntese verde (IBRAHIM, 2015; SHANKAR *et al.*, 2017).

As AgNPs obtidas na temperatura de 100 °C por 60 minutos, independentemente da concentração do extrato (FIGURA 14-D, H, I), apresentaram diâmetro médio preferencial entre 12 – 114 nm, sendo 33 ± 13 nm o tamanho médio. A síntese obtida em 90 minutos (FIGURA 14-E) também apresentou diâmetros menores, variando de 11 – 160 nm e média de 35 ± 16 nm. Já as soluções obtidas em menores tempos (FIGURA 14-A, B, C) e maiores temperaturas (FIGURA 14-F, G) apresentaram partículas com diâmetro médio entre 12 – 144 nm e 26 – 240 nm, respectivamente, com menor homogeneidade na distribuição dos tamanhos e maior incidência de aglomeração. Estes valores dos diâmetros estão de acordo com os obtidos por DLS, considerando também que os diâmetros maiores medidos pelo DLS podem ser atribuídos às aglomerações observadas. As Figuras 14-B2, F2 e G2 ilustram as maiores aglomerações capturadas na escala micrométrica. Como sobredito, a inter-relação entre as variáveis altera as características e comportamento das partículas no meio, a síntese hidrotermal possibilitou o controle da temperatura e tempo de síntese em razão de controlar o tamanho das AgNPs.

Figura 14 – MEV-FEG para as amostras de AgNPs biossintetizadas com EBU (Continua).

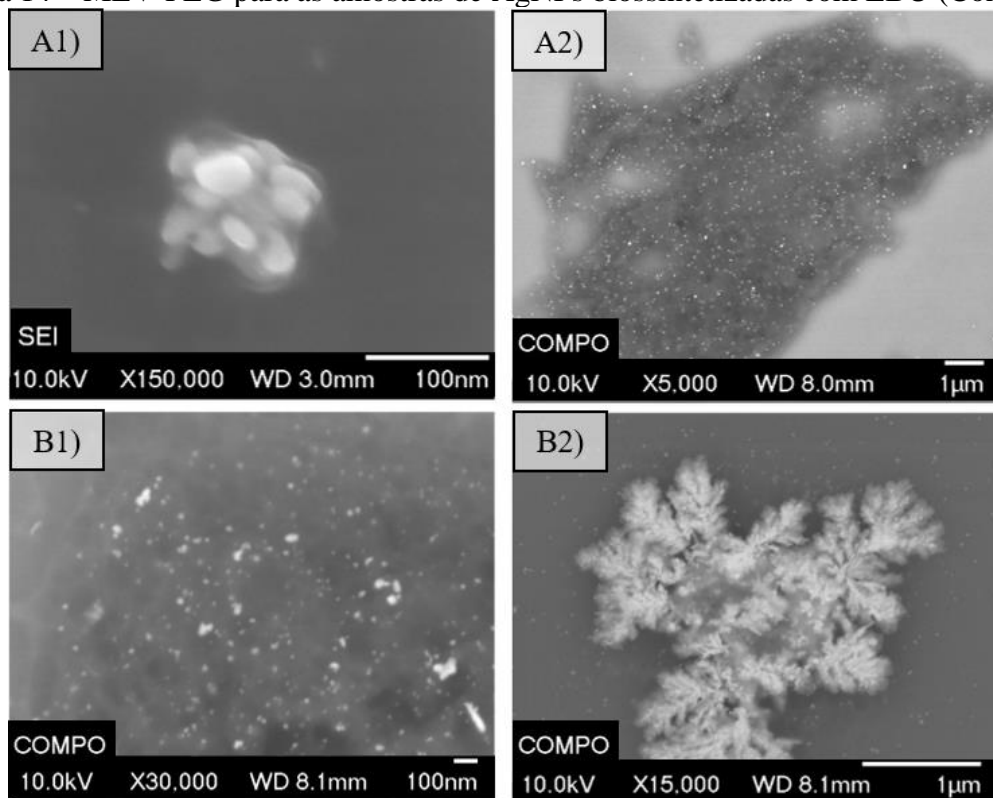


Figura 14 – MEV-FEG para as amostras de AgNPs biossintetizadas com EBU (Continua).

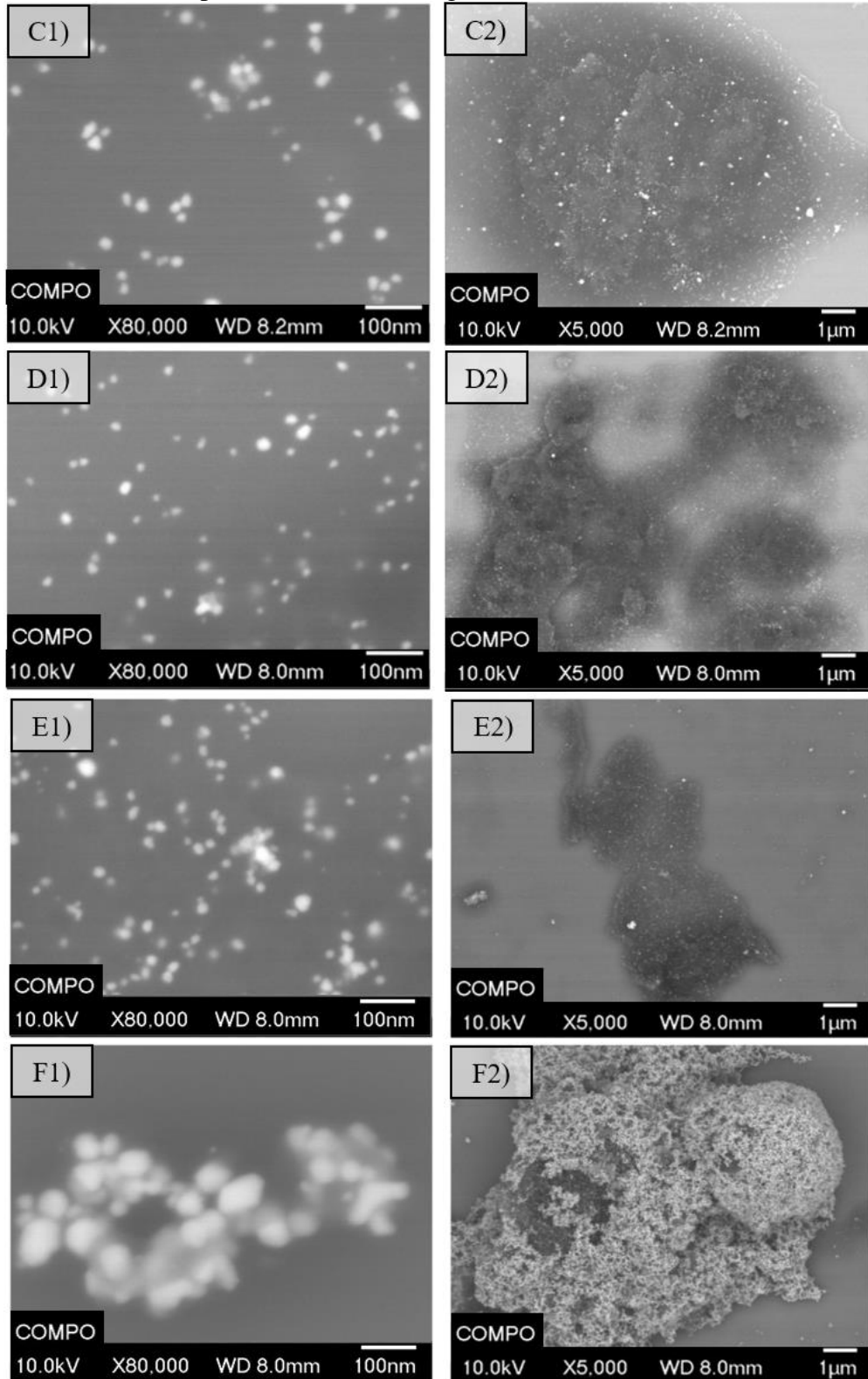
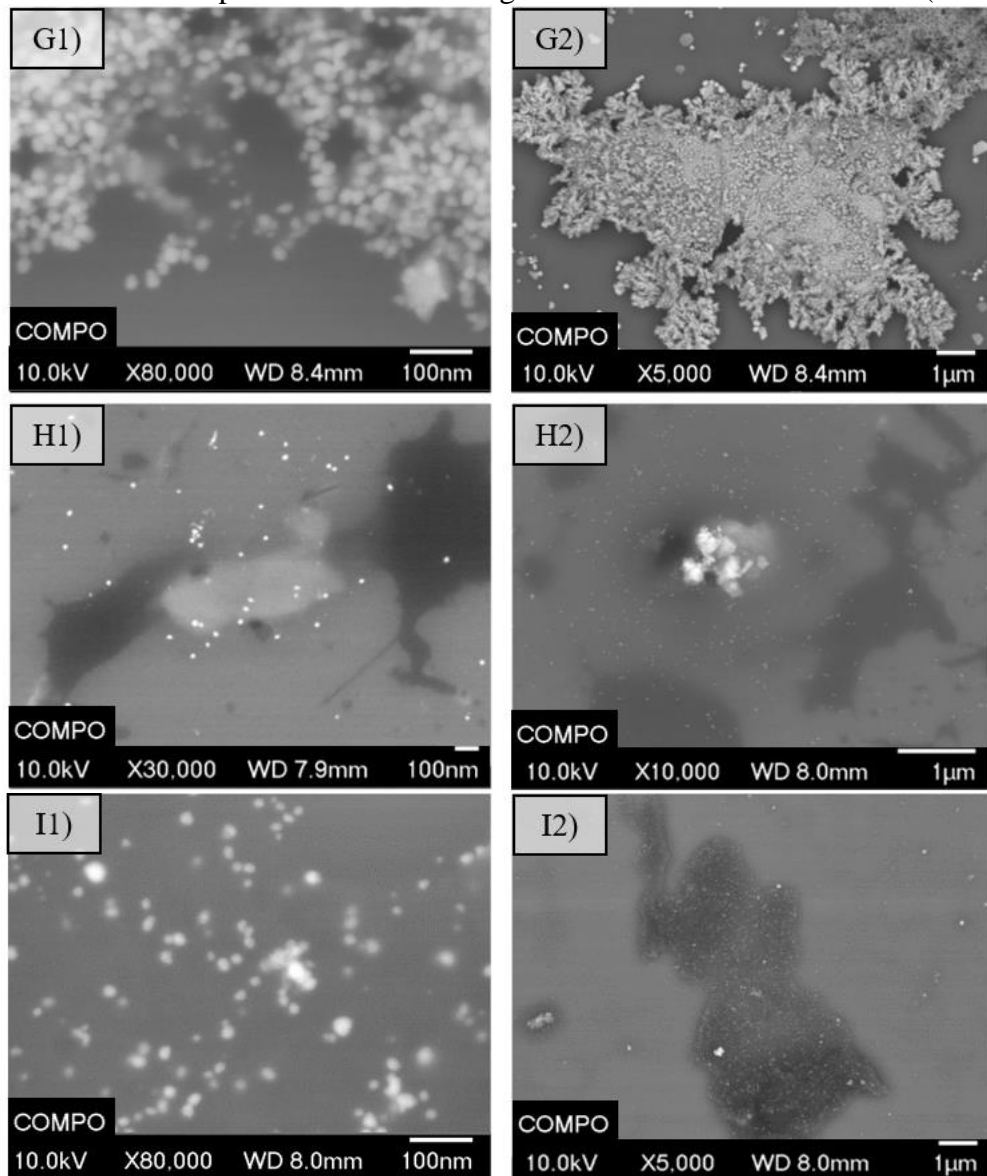


Figura 14 – MEV-FEG para as amostras de AgNPs biossintetizadas com EBU (Conclusão).



Legenda: A1-A2) síntese de 15 minutos, B1-B2) síntese de 30 minutos, C1-C2) síntese de 45 minutos, D1-D2) síntese de 60 minutos, E1-E2) síntese de 90 minutos, F1-F2) síntese de 125 °C, G1-G2) síntese de 150 °C, H1-H2) síntese com 0,05 g/mL de EBU, I1-I2) síntese com 0,15 g/mL de EBU.

Fonte: Da autora (2023).

5.2.5 Potencial Zeta e Dispersão de Luz Dinâmica (DLS)

O DLS agrega informações sobre o tamanho e a distribuição do tamanho das partículas em suspensão. As AgNPs sintetizados pelo método hidrotérmico com EBU-IN exibiram distribuição de tamanho de 13 a 5.560 nm, porém, com faixa de concentração entre 37 nm (síntese de 0,05 g/mL) a 4150 nm (síntese de 15'), variando de acordo com os parâmetros de cada reação (FIGURA 15). As sínteses realizadas em tempos abaixo de 60 minutos e temperaturas acima de 100 °C produziram aglomerados com diâmetros maiores que 100 nm. Temperaturas acima da temperatura ambiente são favoráveis para reduzir o tempo de reação e

reduzir o tamanho das partículas, mas quando muito elevadas passam a proporcionar a aglomeração das partículas (SIDHU; VERMA; KAUSHAL, 2022; VANLALVENI *et al.*, 2021). Maiores temperaturas elevam a energia cinética das biomoléculas redutoras dos íons de prata, reduzindo o tempo de reação, aumentando a obtenção de NPs do meio reacional e aumentando a eficiência de capeamento (MIU; DINISCHIOTU, 2022). A característica de capeamento das moléculas é descrita como a função de estabilizar ou ligar as superfícies das AgNPs, impedindo a aglomeração e o aumento de tamanho (SIDHU; VERMA; KAUSHAL, 2022).

A distribuição de tamanho de partículas também foi influenciada pela concentração do extrato do bagaço da uva no meio reacional (FIGURA 15). O tamanho médio das AgNPs diminuiu e a distribuição de tamanho ficou mais estreita na síntese com menor concentração de EBU (0,05 g/mL), sendo tais resultados almejados no presente estudo. Em suma, a reação hidrotermal sob temperatura de 100 °C, duração de 60 minutos e extrato a 0,05 g/mL obteve êxito perante as demais na síntese com 0,375 mM de AgNO₃. González-Ballesteros; Rodríguez-González; Rodríguez-Argüelles (2018) também concluíram que soluções de EBU menos concentradas são mais efetivas na síntese de AgNPs.

O tamanho das nanopartículas determinado pelo DLS altera-se em função das características da solução, como concentração, viscosidade e temperatura, além das características das partículas, como a forma e a carga superficial. Assim, resultados diferentes podem ser encontrados a cada leitura e a alteração da carga das partículas, conforme supracitado e discutido anteriormente, afeta o tamanho das AgNPs.

A parcela analisada da amostra em suspensão das sínteses S6 (125 °C) e S7 (150 °C) apresentam distribuição monodispersas, com tamanho médio de 396 e 122 nm, respectivamente, o que isoladamente pode ser analisado como um dado favorável, todavia, a análise por UV-vis bem como a análise visual mostraram que estas condições não formaram AgNPs devido à ausência do pico alusivo à formação de prata metálica (Ag⁰) e coloração clara divergente ao padrão típico das AgNPs que exibem cor amarronzada. A análise por UV-vis também destacou a síntese de 90 minutos (S5), devido ao pico elevado observado na curva que sobressaiu em relação às sínteses a 60 minutos, e poderia representar maior formação de AgNPs, porém, observa-se que também houve um aumento no tamanho médio e por este motivo o tempo de 60 minutos foi selecionado para a sequência de ensaios.

Figura 15 – Distribuição de tamanho das partículas do bagaço de uva e das AgNPs no dia da síntese e após período de armazenamento sob refrigeração (Continua).

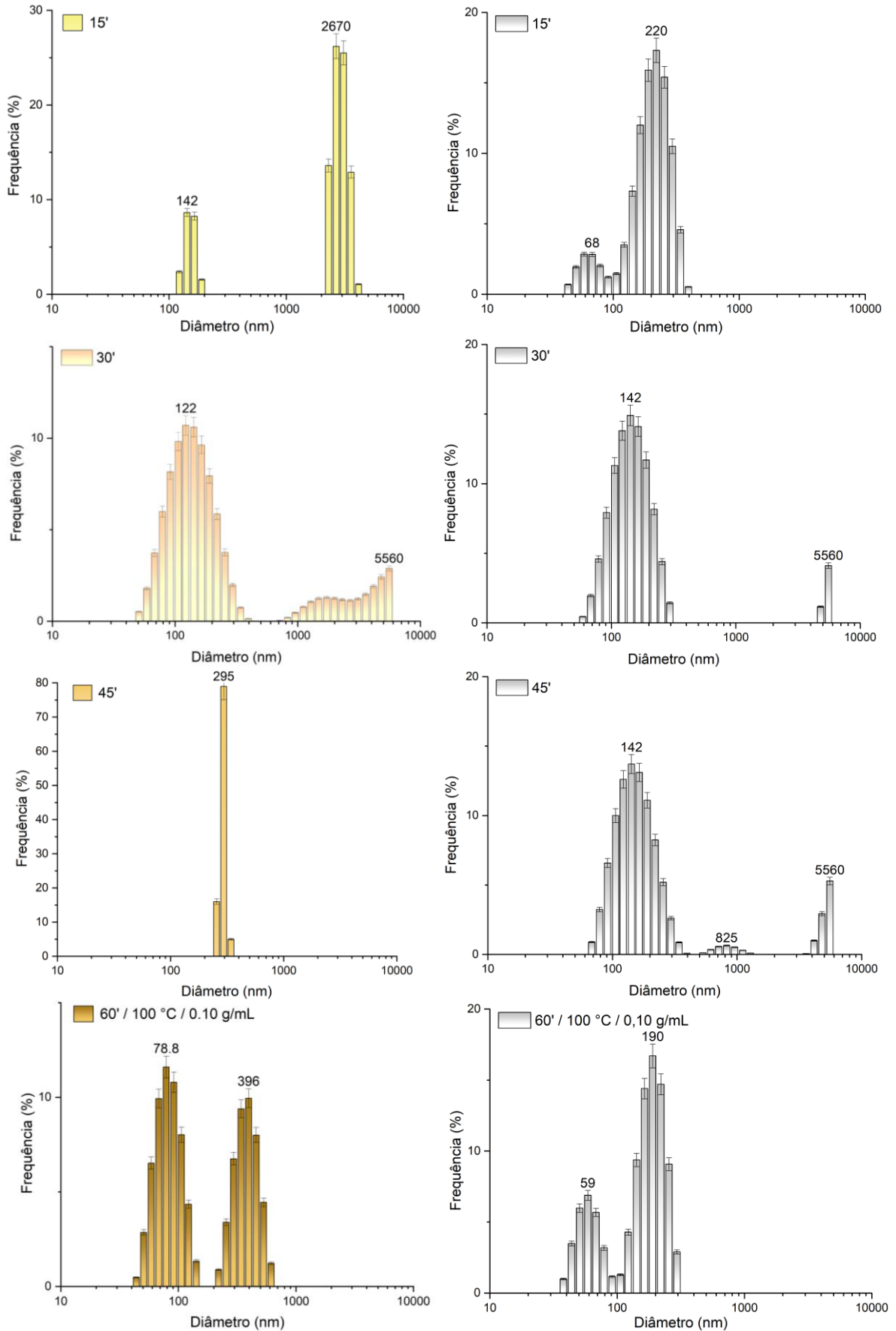


Figura 15 – Distribuição de tamanho das partículas do bagaço de uva e das AgNPs no dia da síntese e após período de armazenamento sob refrigeração (Continua).

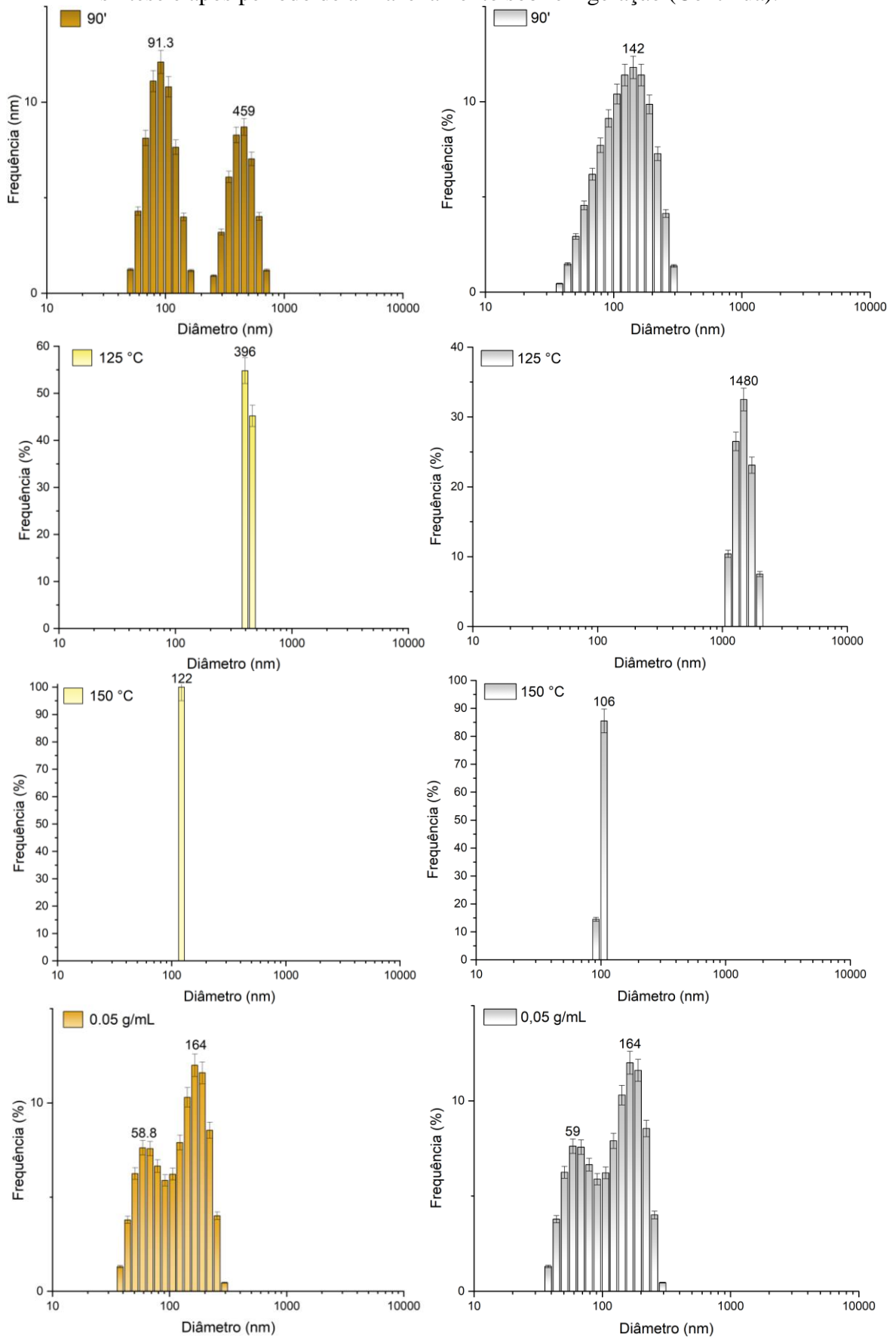
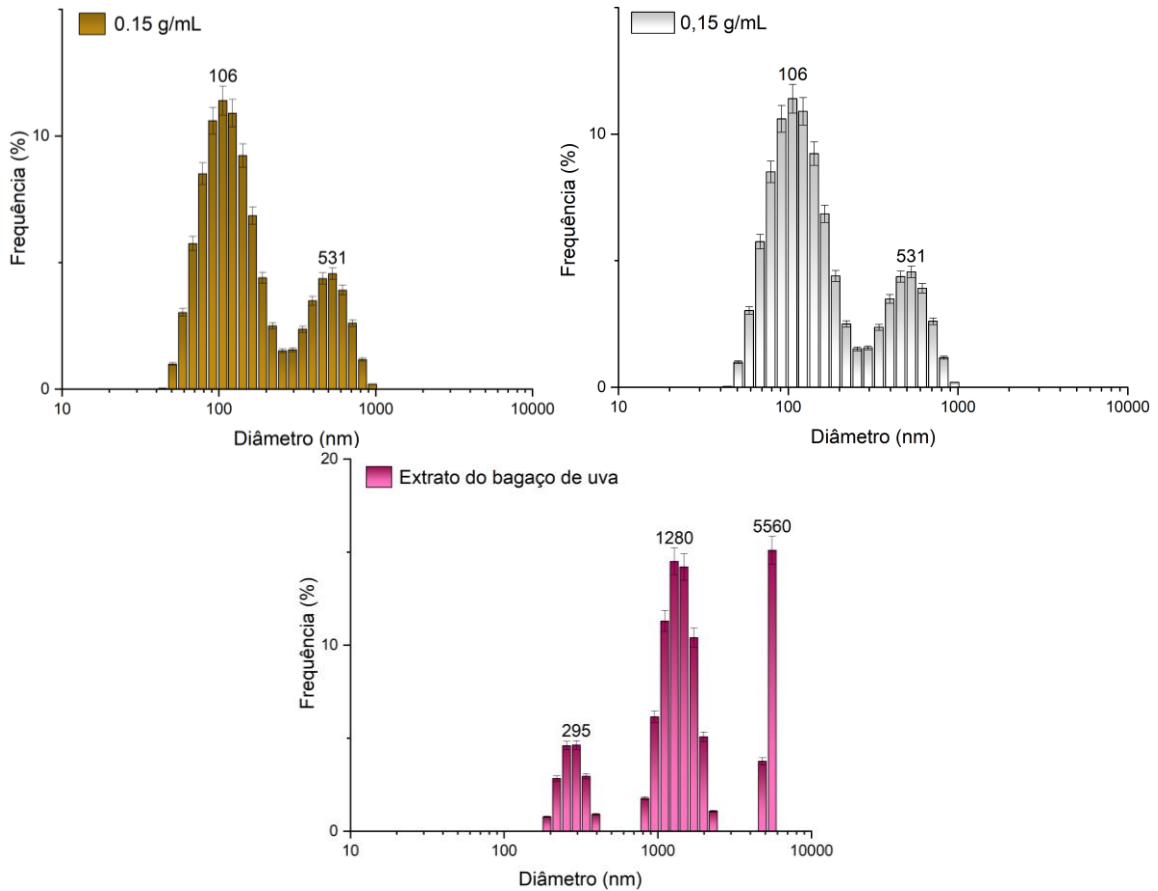


Figura 15 – Distribuição de tamanho das partículas do bagaço de uva e das AgNPs no dia da síntese e após período de armazenamento sob refrigeração (Conclusão).



Legenda: As sínteses com variação de tempo foram realizadas a 100 °C com EBU a 0,10 g/mL. As sínteses a 125 °C e 150 °C foram realizadas em 60 minutos com EBU a 0,10 g/mL. As sínteses a 0,05 e 0,15 g/mL de extrato foram realizadas em 60 minutos e 100 °C. O extrato do bagaço de uva foi analisado na concentração de 0,10 g/mL.

Fonte: Da autora (2023).

Com base nos gráficos, observa-se que houve o deslocamento das faixas de distribuição e consequente alteração dos tamanhos médios após o período de armazenamento sob refrigeração. O aumento no tamanho médio pode indicar que houve aglomerações, como no caso das sínteses S3 (45') e S6 (125 °C). As sínteses S2 (30'), S8 (0,05 g/mL) e S9 (0,15 g/mL) foram analisadas dentro de um espaço de tempo menor entre a primeira e segunda leitura (21 dias), o que pode favorecer uma menor alteração. Porém, vale ressaltar novamente que as sínteses a 100 °C e 60 minutos, com as três diferentes concentrações de extrato, apresentaram menor variação no perfil de distribuição bem como tamanho médio, resultados que podem ser corroborados pelo maior potencial Zeta que reforça a estabilidade das AgNPs destas soluções.

Adicionalmente, a análise da solução de EBU visou apresentar o tamanho das partículas existentes no extrato do bagaço de uva, as quais majoritariamente apresentam tamanho maiores que 1000 nm. Esta comparação permite inferir que nas sínteses S1 (15') e S2 (30'), além da S3

(45') após armazenamento, houve micropartículas residuais da solução de EBU que pode ser ocasionado devido ao tempo insuficiente para realizar a reação de redução da prata e consumir todo o extrato disponível. Acima de 60 minutos nota-se que não houve a mesma ocorrência, já a variação na concentração de extrato exibida pelas sínteses S4 (0,10 g/mL), S8 (0,05 g/mL) e S9 (0,15 g/mL), apresenta um deslocamento para a direita conforme aumento da concentração, ou seja, infere-se que maior concentração de extrato levou ao aumento do tamanho médio das AgNPs dentre as condições analisadas.

O bagaço de uva possui um notável teor de lignina, que consiste em uma classe de polímeros orgânicos complexos com elevada estabilidade térmica devido a moléculas aromáticas estáveis (BEDA *et al.*, 2020; ILYAS *et al.*, 2021). A quantidade correta inserida na reação sob temperaturas elevadas pode, conseqüentemente, levar a uma estrutura de estabilidade chave para compor e beneficiar as AgNPs. Há uma variedade de estudos na biossíntese da prata, as AgNPs com *Hypericum perforatum* (erva-de-são-joão) variaram de 20 a 40 nm e potencial Zeta de -19 mV (ALAHMAD *et al.*, 2022), extrato de *Chrysanthemum morifolium* Ramat. resultou em 20 a 50 nm (HE *et al.*, 2013), casca de banana em 23,7 nm (IBRAHIM, 2015), *Capsicum frutescens* (pimenta-tabasco) em 20 a 25 nm, (SHANKAR *et al.*, 2017), *Aspergillus oryzae* DPUA 1624 em 61.15 ± 11.45 nm and -28.7 mv (SILVA *et al.*, 2017), e parte aérea de *Lippia nodiflora* variando de 30 a 60 nm e potencial Zeta de -25.2 mV (SUDHA; JEYAKANTHAN; SRINIVASAN, 2017). Por sua vez, o extrato de bagaço de uva de vinícola resultou em partículas com 42.9 ± 6.4 nm (GONZÁLEZ-BALLESTEROS; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ; RODRÍGUEZ-ARGÜELLES, 2018).

A fim de complementar a discussão disposta, os valores de potencial Zeta são avaliados de forma interligada para averiguar se corroboram com os resultados obtidos pelo DLS. As partículas dentro de um líquido formam uma dupla camada de íons em torno de sua superfície. O potencial Zeta é o potencial elétrico existente no plano de deslizamento no qual essas partículas se movem. Assim, mede indiretamente a estabilidade pois indica o grau de interação das partículas em dispersão por meio da quantificação do potencial das camadas superficiais, baseado na relação de repulsão e atração eletrostática (LU; GAO, 2010). Geralmente, potencial Zeta com valores superiores ou em torno de 25 mV, em módulo, ou seja, sejam eles positivos ou negativos, descreve uma dispersão mais estável, o oposto é atrelado à instabilidade coloidal e possível agregação, coagulação ou floculação (SHNOUDEH *et al.*, 2019).

Os maiores valores de potencial Zeta foram obtidos para as soluções sintetizadas a 100 °C por 60 minutos. Ocorreu uma variação de acordo com a concentração de extrato utilizado, sendo o potencial de -20, -17 e -17 obtidos para as suspensões de prata das soluções realizadas

com extrato a 0,05 g/mL (S8); 0,10 g/mL (S4) e 0,15 (S9) g/mL, respectivamente. Por mais que os valores sejam inferiores ao estimado, a carga negativa das partículas em solução também tende a prover maior estabilidade e podem ser derivadas dos compostos fenólicos, polissacarídeos carboxilados e da cadeia lateral de alguns aminoácidos residuais (ALAHMAD *et al.*, 2022; SUDHA; JEYAKANTHAN; SRINIVASAN, 2017).

Em média, o potencial Zeta de todas as AgNPs foi de -17 e mudou para -15 após o armazenamento. Já as três sínteses S4 (0,10 gm/L), S8 (0,05 g/mL) e S9 (0,15 g/mL), com as diferentes concentrações de extratos mencionadas, apresentaram uma média de -18 alterada para -17. Respectivamente, as sínteses com EBU a 0,05; 0,10 e 0,15 g/mL tiveram potencial Zeta de -20, -15 e -15 na segunda medição.

Portanto, a única síntese que manteve o potencial Zeta estável pelo período em análise foi a síntese com 0,05 de extrato de uva, endossando a eficácia como agente redutor, bem como agente de capeamento (do inglês *capping*). O uso do extrato em menor concentração pode ter garantido a saturação das partículas de bagaço de uva, resultando em menos resíduos orgânicos, dado que a leitura não distingue partículas de AgNPs de demais substâncias diluídas no solvente.

Em resumo, a fonte do extrato e a concentração do extrato da planta impacta a distribuição e o tamanho das nanopartículas obtidas. Em um valor ótimo, a concentração do extrato irá resultar nanopartículas com menor diâmetro e maior atividade antimicrobiana, uma vez que menor tamanho corresponde à maior área superficial de contato, ultrapassar esse valor levará à aglomeração e maior tamanho (VANLALVENI *et al.*, 2021).

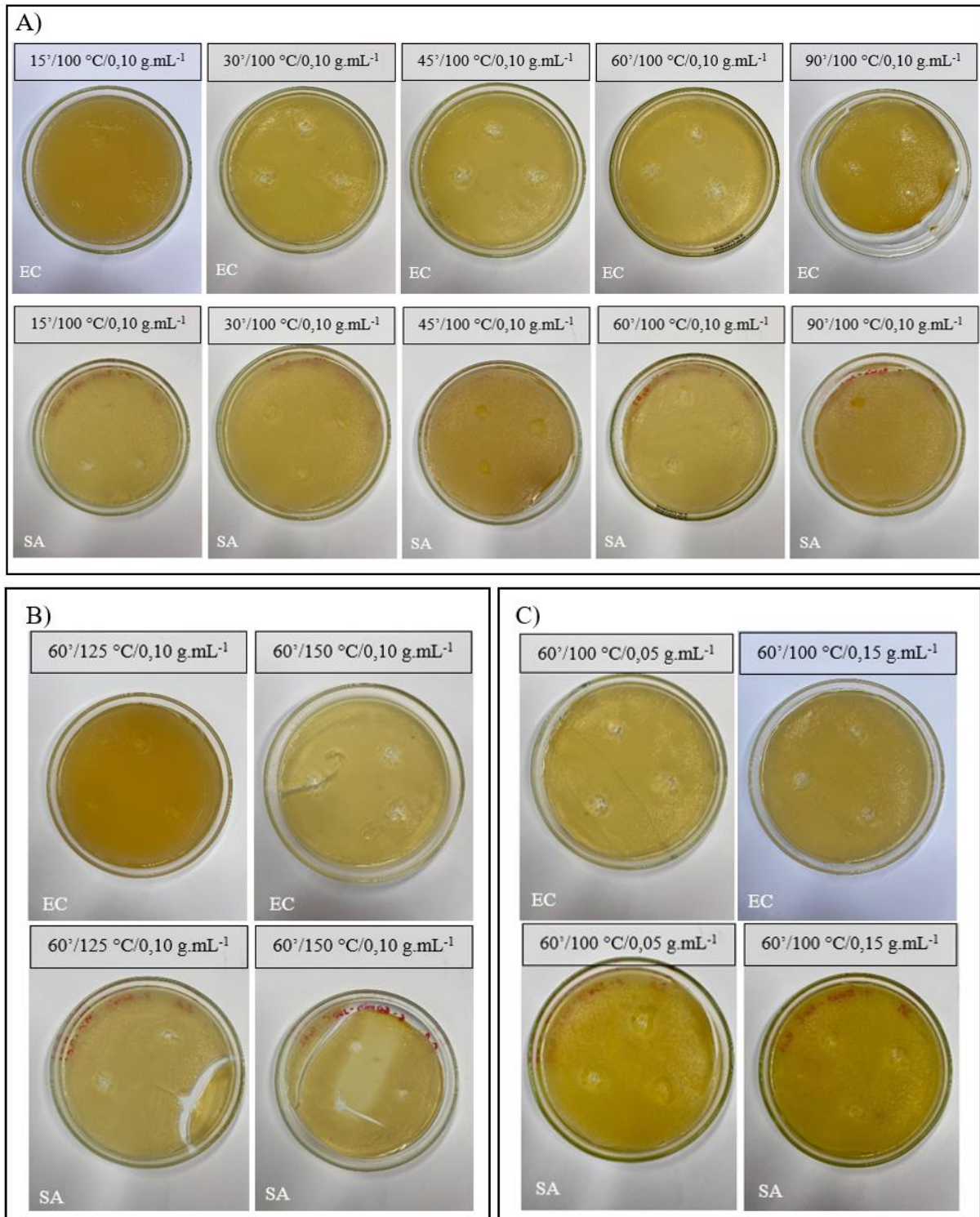
As análises de caracterização e estabilidade das AgNPs em suspensão são importantes para avaliar e acompanhar seu curso de ação e funcionalidade em função da aplicação desejada. No intuito de avaliar o potencial antibacteriano das AgNPs obtidas, o conjunto de tais características analisadas foi determinante para concluir este potencial conforme apresentado nos tópicos a seguir.

5.3 Potencial antibacteriano das AgNPs

5.3.1 Teste de difusão em disco

Este teste foi aplicado para todas as soluções obtidas nos diferentes tempos, temperaturas e concentrações de extrato. As sínteses S3 (45', 100 °C, 0,10 g/mL) e S5 (90', 100 °C, 0,10 g/mL) não apresentaram zona de inibição contra *S. aureus*, enquanto a síntese S6 (60', 125 °C, 0,10 g/mL) não apresentou contra *E. coli*, conforme Figura 16 e Quadro 3.

Figura 16 – Teste de difusão de disco das soluções de AgNPs sintetizadas com extrato de bagaço de suco de uva Isabel (*Vitis labrusca*, L.) contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.



Legenda: A) Ensaios de variação do tempo de síntese. B) Ensaios de variação do temperatura de síntese. C) Ensaios de variação da concentração do extrato. EC = *Escherichia coli* e SA = *Staphylococcus aureus*.

Fonte: Da autora (2023).

Quadro 3 – Existência de halo de proteção das AgNPs sintetizadas com EBU (*Vitis labrusca*, L.) contra bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Síntese	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Conc. do extrato (g/mL)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
S1	15	100	0,10	S	S	
S2	30			S	S	
S3	45			S	N	
S4	60			S	S	
S5	90			S	N	
S6	60	125	0,05	N	S	
S7		150		S	S	
S8		100		0,05	S	S
S9				0,15	S	S

Legenda: S = sim, existência de halo. N = não, ausência de halo.

Fonte: Da autora (2023).

Conforme apresentado nos itens anteriores, após afinamento dos parâmetros, as sínteses de maior interesse foram as sintetizadas a 100 °C por 60 minutos com as três variações de concentração do extrato do bagaço de uva. Estas soluções apresentaram halos de inibição maiores e mais evidentes e por isso foram medidos para comparação. Assim, os resultados da zona de inibição foram obtidos pela medição do halo de proteção, os quais foram superiores para o extrato a 0,05 g/mL contra as representantes *S. aureus* e superiores para o extrato a 0,15 g/mL contra as representantes *E. coli* (TABELA 3). Estes resultados corroboram os obtidos em relação às melhores condições para síntese das AgNPs.

Tabela 3 – Halo de proteção das AgNPs sintetizadas com EBU nas concentrações de 0,05; 0,10 e 0,15 g/mL contra bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Sínteses realizadas com extrato de bagaço de uva Isabel (*Vitis labrusca*, L.) oriundo de suco integral de uva.

Extrato (g/mL)	Halo de proteção (cm)				
	<i>S. aureus</i>	Média	Relação	<i>E. coli</i>	Média
0,05	0,070 / 0,120 / 0,075	0,088	>	0,017 / 0,015 / 0,014	0,015
0,10	0,055 / 0,020 / 0,050	0,042	>	0,030 / 0,015 / 0,015	0,020
0,15	0,080 / 0,040 / 0,030	0,050	<	0,100 / 0,055 / 0,035	0,063

Fonte: Da autora (2023).

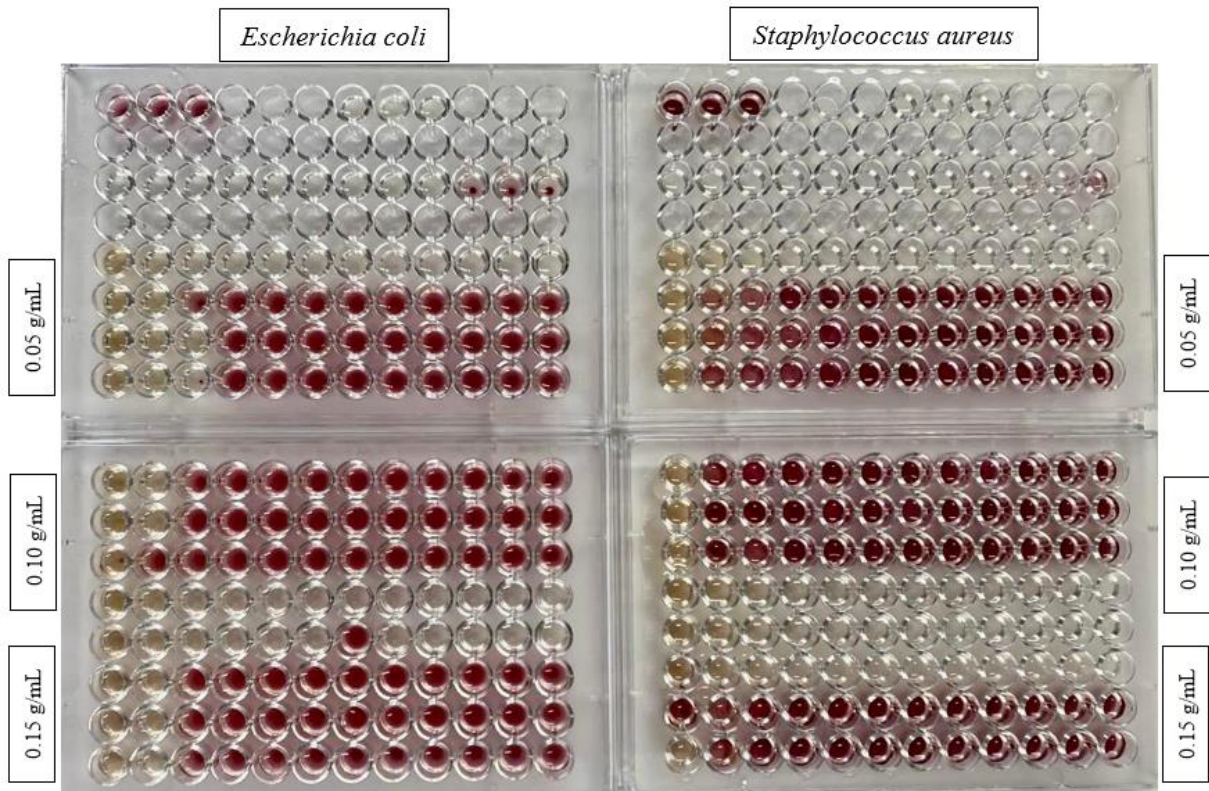
5.3.2 Teste em microplaca

O teste em microplaca foi realizado com as soluções obtidas na última fase da otimização da síntese, ou seja, com as soluções de AgNPs obtidas a 100 °C, 60 minutos e concentração de extrato a 0,05; 0,10 e 0,15 g/mL. Os testes contra *E. coli* (Gram-negativa) e *S. aureus* (Gram-positiva) foram realizados em triplicatas em diluição seriada resultando em 12 concentrações diferentes para cada amostra. A eficiência foi comparada à solução de estreptomicina, antibiótico com atividade principal contra bactérias Gram-negativas e com

atividade variável contra bactérias Gram-positivas (FIGURA 17).

Todas as soluções, AgNP-0,05 (S8), AgNP-0,10 (S4) e AgNP-0,15 (S9) mostraram atividade bactericida na sua concentração total. As soluções de AgNPs feitas com EBU a 0,05 g/mL foram as que obtiveram melhores resultados contra ambas as bactérias, sendo que os resultados contra *E. coli* foram os mais satisfatórios, chegando até a terceira diluição.

Figura 17 – Análise microbiológica das soluções de AgNPs mediadas por extrato de bagaço de suco de uva Isabel (*Vitis labrusca*, L.) nas concentrações de 0,05; 0,10 e 0,15 g/mL contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Da autora (2023).

A concentração inibitória mínima, MIC (do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*), é a menor concentração do agente antimicrobiano responsável por limitar o crescimento visível da bactéria, definida como atividade bacteriostática. Por sua vez, a concentração bactericida mínima, MBC (do inglês *Minimum Bactericidal Concentration*), é a concentração mínima do agente antimicrobiano para matar a bactéria, ou ação bactericida (CLSI, 2015). O teste da microplaca indica a MIC, conforme a diretriz do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Assim, a MIC das amostras de AgNPs em suspensão sintetizadas com 0,05; 0,10 e 0,15 g/mL de extrato de uva obtiveram MIC de 12,5; 25 e 25 μ L para *E. coli*, respectivamente. As três soluções de AgNPs apresentaram MIC de 50 μ L para *S. aureus*.

Metais sintetizados com uma gama de plantas ou microrganismos são testados contra *E. Coli* e *S. aureus*, dentre outras bactérias. Comparativamente, AuNPs sintetizadas com *Alternanthera bettzickiana* apresentaram valor MIC de 20 µL contra *S aureus*. ZnONPs reduzidas por *Suaeda aegyptiaca* apresentou MIC de 1,56–12,50 mg/mL contra *E. coli* e 0,39–1,56 mg/mL contra *S. aureus*. CuONPs sintetizadas pela alga *Cystoseira trinodis* registraram MIC em 2,5 µg/mL contra ambas *E. coli* e *S. aureus* (SÁNCHEZ-LÓPEZ *et al.*, 2020). Para as sínteses com prata, 2,5 µg/mL de AgNPs com extrato de *Chrysanthemum morifolium* Ramat foi o suficiente para sintetizar ambas as bactérias (HE *et al.*, 2013). AgNPs mediadas por casca de banana resultou em concentração mínima necessária de 3,4 e 5,1 mg/mL para *E. Coli* e *S. aureus* (IBRAHIM, 2015). AgNPs sintetizadas por *Ficus ingens* tiveram valor MIC de 10 mg/mL enquanto o extrato de *Allium cepa* resultou em 16,05 µg/mL contra *E. Coli* (SAHNI; PANWAR; KAUR, 2015; SALAR; SHARMA; KUMAR, 2015).

A diversidade da capacidade inibitória das NPs são associadas não apenas ao agente sintetizante, mas resultam em função do tamanho e forma. Ainda há incertezas quanto ao poder inibitório das AgNPs contra Gram-positivas e Gram-negativas (VANLALVENI *et al.*, 2021). Vijayan, Joseph e Mathew (2018) descreveram que AgNPs possuem menor eficácia contra Gram-positivas devido à desvantagem ao entrar na membrana citoplasmática causada pelas camadas de peptidoglicano nas paredes de bactérias. Neste sentido, as AgNPs mediadas pelo extrato do bagaço da uva deste estudo corroboram com o disposto ao relatar maior eficiência contra as Gram-negativas (*E. coli*).

A alta concentração de compostos fenólicos presentes na uva pode ser relacionada à eficiência da síntese das AgNPs, uma vez que a habilidade de extratos de planta em reduzir íons metálicos tem sido atribuída à atividade antioxidante dos componentes presentes nestes extratos. Todavia, a atividade antibacteriana apresentada pelas AgNPs não está totalmente desmistificada, podendo esta ser proporcionada pelas NPs, pelos compostos presentes nelas, ou seja, com possível incorporação de biomoléculas ativas como agente de cobertura nas NPs obtidas, por uma mistura desses fatores ou até mesmo por influência de outros compostos (MARSLIN *et al.*, 2018).

Contudo, o processo reacional deste estudo corroborou com as conclusões de Tippayawat *et al.* (2016) de que o uso do método hidrotérmico possibilita a reação de compostos orgânicos como tanino, saponina, terpenoides e flavonoides na redução de AgNO₃. As AgNPs obtidas podem então elevar a permeabilidade após ligarem na membrana celular das bactérias e consequentemente matá-las.

A farmacologia enfrenta dificuldades contra as bactérias geneticamente evoluídas que

apresentam resistência aos antibióticos produzidos desde o século XX, propulsionando a busca por medicamentos não tradicionais como os nanomateriais. As nanopartículas podem agir por três vias: contato direto com a superfície da célula das bactérias (carga negativa) por ação eletrostática (NPs com cargas positivas), ligação à membrana causando o rompimento da parede celular (NPs com cargas negativas), e através da liberação de íons metálicos capazes de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SÁNCHEZ-LÓPEZ *et al.*, 2020). Todos esses fatores têm sido estudados a fim de preencher as lacunas apresentadas sobre as funcionalidades e atuação das NPs.

6 CONCLUSÃO

Foi possível obter com sucesso nanopartículas de prata com ação antimicrobiana, através de síntese verde utilizando o processo hidrotérmal, e resíduos da agroindústria brasileira da uva. Mesmo após altas temperaturas para produção do suco, os compostos de interesse ainda estavam presentes nos extratos dos resíduos de uva. A caracterização físico-química do BU-IN e BU-S mostrou o grande valor dos biocompostos do resíduo de uva, geralmente descartado.

Nanopartículas de Ag foram obtidas a partir de uma abordagem *bottom-up* hidrotérmica, variando o processo de reação. O funcionamento do sistema hidrotérmico mostrou ser um processo controlado em termos de tempo de síntese, temperatura e razão de aquecimento. O uso do extrato de bagaço de uva, obtido num processo de fácil preparo, como agente redutor permitiu maior estabilidade ao capear as nanopartículas mantendo tamanho estável por até um mês nas sínteses sob melhores condições de reação. As sínteses de 60 minutos a 100 °C apresentaram os melhores resultados. A solução com melhor estabilidade e menor tamanho das nanopartículas foi a obtida com o uso de 0,05 g/mL de extrato do bagaço da uva na síntese por 60 minutos e a 100 °C. Nesta condição, o potencial Zeta foi de -20 mV e o tamanho médio de 37 nm.

Uma notável atividade antibacteriana foi observada contra *Staphylococcus aureus* e principalmente *Escherichia coli* com valores MIC variando de 12.5 a 50 µL. As características estruturais aliadas à ação bactericida legitimam a abordagem da síntese verde e do uso do processo hidrotérmal, constituindo uma opção adequada para potencializar e expandir a cadeia produtiva da uva por meio de novas aplicações para seus resíduos.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, N. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Extracts of *Ananas comosus*. **Green and Sustainable Chemistry**, v. 02, p. 141–147, 1 Jan. 2012.
- AHMED, S. *et al.* A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. **Journal of advanced research**, v. 7, n. 1, p. 17–28, Jan. 2016.
- ALAHMAD, A. *et al.* Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Hypericum perforatum L. Aqueous Extract with the Evaluation of Its Antibacterial Activity against Clinical and Food Pathogens. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 5, 1 May 2022.
- ALI, Z. A. *et al.* Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Apple Extract and Its Antibacterial Properties. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2016, p. 4102196, 2016.
- ALMEIDA, P. V. *et al.* Effect of phenolic compound recovery from agro-industrial residues on the performance of pyrolysis process. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, n. 10, p. 4257-4269, 1 Oct. 2022.
- ALONSO, E.; REVILLA, E.; BOURZEIX, M. Suitability of water/ethanol mixtures for the extraction of catechins and proanthocyanidins from *Vitis vinifera* seed containers in a winery by-product. **Seed Science and Technology**, v. 19, p. 545-552, 1991.
- ANVISA. **RESOLUÇÃO - RDC Nº 360 de 23 de dezembro de 2003**, 2003.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC international**. Gaithersburg: , 2012.
- ARCANJO, N. M. DE O. *et al.* Quality evaluation of red wines produced from the Isabella and Ives cultivar (*Vitis labrusca*): Physicochemical parameters, phenolic composition and antioxidant activity. **Food Science and Technology (Brazil)**, v. 37, n. 2, p. 184-192, 2017.
- BARRY, A.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. **American Society for Microbiology**. Washington, DC., 5th ed., 1991.
- BASTOS-ARRIETA, J. *et al.* Green Synthesis of Ag Nanoparticles Using Grape Stalk Waste Extract for the Modification of Screen-Printed Electrodes. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 11, p. 946, 17 Nov. 2018.
- BEDA, A. *et al.* Impact of biomass inorganic impurities on hard carbon properties and performance in Na-ion batteries. **Sustainable Materials and Technologies**, v. 26, Dec. 2020.
- BENDER, A. B. B. *et al.* Obtenção e caracterização de farinha de casca de uva e sua utilização em snack extrusado. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, 2016.
- BERGER, T. J. *et al.* Electrically generated silver ions: quantitative effects on bacterial and mammalian cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 9, n. 2, p. 357-358, Feb. 1976.

BISWAS, A. *et al.* Advances in top-down and bottom-up surface nanofabrication: Techniques, applications & future prospects. **Advances in colloid and interface science**, v. 170, p. 2-27, 16 Nov. 2011.

Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais – CDMF. **Nanotecnologia ajuda na geração de renda no interior de SP com solução inovadora virucida para aplicação em tecidos no combate à pandemia.** São Carlos, 2020.

CELE, T. Preparation of Nanoparticles. **Materials Science**. Engineered Nanomaterials - Health and Safety, 16 Feb. 2020.

CHEN, W. K. *et al.* Flavonoid and aromatic profiles of two *Vitis vinifera* L. teinturier grape cultivars. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 24, n. 3, p. 379-389, 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, C. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** Approved standard-10th ed., 2015.

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, 1 Sept. 2020.

CASTILHOS, M. B. M. *et al.* Isabel red wines produced from grape pre-drying and submerged cap winemaking: A phenolic and sensory approach. **LWT**, v. 81, p. 58–66, 1 ago. 2017.

DEMIRKOL, M.; TARAKCI, Z. Effect of grape (*Vitis labrusca* L.) pomace dried by different methods on physicochemical, microbiological and bioactive properties of yoghurt. **LWT**, v. 97, p. 770-777, 1 Nov. 2018.

DENG, Q.; PENNER, M. H.; ZHAO, Y. Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2712-2720, Nov. 2011.

DESAI, P. P.; PRABHURAJESHWAR, C.; CHANDRAKANTH, K. R. Hydrothermal assisted biosynthesis of silver nanoparticles from *Streptomyces* sp. GUT 21 (KU500633) and its therapeutic antimicrobial activity. **Journal of Nanostructure in Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 235-246, 2016.

DIKSHIT, P. K. *et al.* Green Synthesis of Metallic Nanoparticles: Applications and Limitations. **Catalysts**, 2021.

DRUMMER, S.; MADZIMBAMUTO, T.; CHOWDHURY, M. Green Synthesis of Transition-Metal Nanoparticles and Their Oxides: A Review. **Materials**, 2021.

DUBEY, S. P. *et al.* Bioprospective of *Sorbus aucuparia* leaf extract in development of silver and gold nanocolloids. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 80, n. 1, p. 26–33, out. 2010.

EMBRAPA. **Produção Nacional**. 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/busca->

de-noticias/-/noticia/24428422/producao-nacional>. Acesso em: 16 mar. 2023.

EMEKA, E. E. *et al.* Evaluation of antibacterial activities of silver nanoparticles green-synthesized using pineapple leaf (*Ananas comosus*). **Micron (Oxford, England: 1993)**, v. 57, p. 1–5, Feb. 2014.

FARINELLA, N. V.; MATOS, G. D.; ARRUDA, M. A. Z. Grape bagasse as a potential biosorbent of metals in effluent treatments. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 10, p. 1940-1946, July 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. **Production Indices**. 2020. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QI>>. Acesso em: 24 jan. 2023.

GONZÁLEZ-BALLESTEROS, N.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, J. B.; RODRÍGUEZ-ARGÜELLES, M. C. Harnessing the wine dregs: An approach towards a more sustainable synthesis of gold and silver nanoparticles. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 178, p. 302–309, Jan. 2018.

GOWMAN, A. C. *et al.* Apple & grape pomaces. **BioResources**. [s.l: s.n.]. 2019.

GUISBIERS, G.; MEJÍA-ROSALES, S.; LEONARD DEEPAK, F. Nanomaterial Properties: Size and Shape Dependencies. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p. 180976, 2012.

HE, Y. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles by *Chrysanthemum morifolium* Ramat. extract and their application in clinical ultrasound gel. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 1809-1815, 2013.

HEUZÉ, V.; TRAN, G. **Grape Pomace**. 2020. Disponível em: <https://www.feedipedia.org/node/691>. Acesso em: 14 fev. 2023.

HUSTON, M. *et al.* Green Synthesis of Nanomaterials. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 8, Aug. 2021.

IBRAHIM, H. M. M. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 8, n. 3, p. 265-275, July 2015.

ILYAS, T. *et al.* Sustainable green processing of grape pomace for the production of value-added products: An overview. **Environmental Technology and Innovation**. Elsevier B.V., 1 Aug. 2021.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. [s.l: s.n.]. 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção de uva**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/uva/br>. 2021. Acesso em: 24 jan. 2023.

ISLAM, J.; KABIR, Y. Effects and Mechanisms of Antioxidant-Rich Functional Beverages on Disease Prevention. Em: **Functional and Medicinal Beverages**. [s.l.] Elsevier, p. 157-

198, 2019.

HARISH, K. K. *et al.* Metallic Nanoparticle: A Review. **Biomedical Journal of Scientific and Technical Research**, v. 4, n. 2, p. 3765-3775, 2018.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908-931, 2019.

KHIARI, B.; JEGUIRIM, M. Pyrolysis of grape marc from Tunisian wine industry: Feedstock characterization, thermal degradation and kinetic analysis. **Energies**, v. 11, n. 4, 1 Apr. 2018.

KOKILA, T.; RAMESH, P. S.; GEETHA, D. Biosynthesis of silver nanoparticles from Cavendish banana peel extract and its antibacterial and free radical scavenging assay: a novel biological approach. **Applied Nanoscience**, v. 5, n. 8, p. 911-920, 2015.

KRISHNASWAMY, K.; VALI, H.; ORSAT, V. Value-adding to grape waste: Green synthesis of gold nanoparticles. **Journal of Food Engineering**, v. 142, p. 210-220, 1 Dez. 2014.

LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of Drying Temperature on the Stability of Polyphenols and Antioxidant Activity of Red Grape Pomace Peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1390–1393, 1 Apr. 1997.

LEKAMGE, S. *et al.* The Toxicity of Silver Nanoparticles (AgNPs) to Three Freshwater Invertebrates With Different Life Strategies: *Hydra vulgaris*, *Daphnia carinata*, and *Paratya australiensis*. **Frontiers in Environmental Science**, v. 6, p. 152, 2018.

LIMA, A. K. O. *et al.* Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Amazon Fruits. **International Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 3, p. 179-188, 2019.

LU, G. W.; GAO, P. CHAPTER 3 - Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. Em: KULKARNI, V. S. (Ed.). **Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems**. Boston: William Andrew Publishing, p. 59-94, 2010.

MARKHAM and MABRY. Ultraviolet-Visible and Proton Magnetic - livro. [s.d.]. 1975.

MARSLIN, G. *et al.* **Secondary metabolites in the green synthesis of metallic nanoparticles**. **MaterialsMDPI AG**, , 3 June 2018.

MELO, M. A. *et al.* Preparação de nanopartículas de prata e ouro: Um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872-1878, 2012.

MIU, B. A.; DINISCHIOTU, A. **New Green Approaches in Nanoparticles Synthesis: An Overview**. **Molecules MDPI**, 1 Oct. 2022.

NARAYANAMMA, A.; RANI, M. E.; RAJU, K. M. Natural Synthesis of Silver Nanoparticles by Banana Peel Extract and as an Antibacterial Agent. **International Journal of Science and Research (IJSR) ISSN**, v. 3, n. 1, p. 17-25, 2013.

NASROLLAHI, A.; POURSHAMSIAN, K.; MANSOURKIAEE, P. Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi. **international journal of nano dimension**, v. 1, p. 233-239, 2011.

NASROLLAHZADEH, M. *et al.* (Eds.). **An Introduction to Green Nanotechnology**. [s.l.] Elsevier, v. 28, p. 1-27, 2019.

NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE: NNI. **Size of the Nanoscale**, 2021. Disponível em: <https://www.nano.gov/you/standards>. Acesso em: 20 set. 2022.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. 2003.

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**, v. 238, 1 May 2017.

OSTROSKY, E. A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, June. 2008.

PIÑÓN-SEGUNDO, E.; MENDOZA-MUÑOZ, N.; QUINTANAR-GUERRERO, D. Nanoparticles as Dental Drug-Delivery Systems. *In*: SUBRAMANI, K.; AHMED, W., **Nanobiomaterials in Clinical Dentistry**. Chapter 23, 2013. p. 567-593.

PUJOL, D. *et al.* Chemical characterization of different granulometric fractions of grape stalks waste. **Industrial Crops and Products**, v. 50, 494-500, 2013.

QIDWAI, A. *et al.* Advances in biogenic nanoparticles and the mechanisms of antimicrobial effects. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, n. 4, p. 592-603, 2018.

RAI, M. Nanobiotecnologia verde: biossínteses de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos. **Ciência e Cultura**, v. 65, n. 3, p. 44-48, 2013.

RAMAKRISHNAN, S. G. *et al.* Nanotechnology based solutions to combat zoonotic viruses with special attention to SARS, MERS, and COVID 19: Detection, protection and medication. **Microbial Pathogenesis**, v. 159, p. 105133, Apr. 2021.

RAVICHANDRAN, V. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using *Atrocarpus altilis* leaf extract and the study of their antimicrobial and antioxidant activity. **Materials Letters**, v. 180, n. C, p. 264-267, 2016.

RODRIGUES, P. DE A. R. *et al.* Neuroprotective effects of proanthocyanidins of grape seed extracts against oxidative stress and apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in PC12 cells. **Conjecturas**, v. 21, n. 2, p. 68-86, 30 June 2021.

ROOPAN, S. M. *et al.* Low-cost and eco-friendly phyto-synthesis of silver nanoparticles using *Cocos nucifera* coir extract and its larvicidal activity. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 631-635, May 2013.

- 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, Aug. 2010.
- SAHA, S. *et al.* Anthocyanin profiling using UV-vis spectroscopy and liquid chromatography mass spectrometry. **Journal of AOAC International**. Oxford University Press, 2021.
- SAHNI, G.; PANWAR, A.; KAUR, B. Controlled green synthesis of silver nanoparticles by *Allium cepa* and *Musa acuminata* with strong antimicrobial activity. **International Nano Letters**, v. 5, n. 2, p. 93-100, 2015.
- SALAR, R. K.; SHARMA, P.; KUMAR, N. Enhanced antibacterial activity of streptomycin against some human pathogens using green synthesized silver nanoparticles. **Resource-Efficient Technologies**, v. 1, n. 2, p. 106-115, Dec. 2015.
- SALATI, S.; DOUDI, M.; MADANI, M. The Biological Synthesis of Silver Nanoparticles by Mango Plant Extract and Its Anti-Candida Effects. **Journal of Applied Biotechnology Reports**, v. 5, n. 4, p. 157-161, 2018.
- SAMAK, D. H. *et al.* Developmental toxicity of carbon nanoparticles during embryogenesis in chicken. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 16, p. 19058-19072, 1 June 2020.
- SÁNCHEZ-LÓPEZ, E. *et al.* Metal-based nanoparticles as antimicrobial agents: An overview. **Nanomaterials** MDPI AG, 1 Feb. 2020.
- SANTANA, J. C. DOS S.; BACKX, B. P. Produção de blendas poliméricas e estudo da eficiência do meio dispersivo de euterpe oleracea para nanopartículas de prata. **IX Encontro Técnico de Materiais e Química**, p. 1-4, 2017.
- SARATALE, G. D. *et al.* Exploiting Fruit Waste Grape Pomace for Silver Nanoparticles Synthesis, Assessing Their Antioxidant, Antidiabetic Potential and Antibacterial Activity Against Human Pathogens: A Novel Approach. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 8, p. 1457, 25 July 2020.
- SHANKAR, T. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum frutescens* and its intensified activity against *E. coli*. **Resource-Efficient Technologies**, v. 3, n. 3, p. 303-308, set. 2017.
- SHARMA, R. K. *et al.* Characterization of chars from pyrolysis of lignin. **Fuel**, v. 83, n. 11-12, p. 1469-1482, ago. 2004.
- SHNOUDEH, A. J. *et al.* Chapter 15 - Synthesis, Characterization, and Applications of Metal Nanoparticles. Em: TEKADE, R. K. (Ed.). **Biomaterials and Bionanotechnology**. [s.l.] Academic Press, p. 527-612, 2019.
- SIDHU, A. K.; VERMA, N.; KAUSHAL, P. Role of Biogenic Capping Agents in the Synthesis of Metallic Nanoparticles and Evaluation of Their Therapeutic Potential. **Frontiers in Nanotechnology** Frontiers Media S.A., 31 Jan. 2022.
- SILVA, C. N. DA *et al.* Uso potencial de resíduo de uvas no desenvolvimento de produtos

funcionais: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 17, p. e249101724906, 30 dez. 2021.

SILVA, T. A. *et al.* Silver nanoparticles biosynthesis and impregnation in cellulose acetate membrane for anti-yeast therapy. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 27, p. 1490-1500, 2017.

SISA, M. *et al.* Photochemistry of flavonoids. **Molecules**, Aug. 2010.

SOARES *et al.* Phenolic compounds and antioxidant activity in skin of Niagara and Isabel grapes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, mar. 2008.

SPINEI, M.; OROIAN, M. The Potential of Grape Pomace Varieties as a Dietary Source of Pectic Substances. **Foods**, 2021.

STORCK, C. R. *et al.* Qualidade microbiológica e composição de farinhas de resíduos da produção de suco de frutas em diferentes granulometrias. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 277-284, 1 out. 2015.

SUDHA, A.; JEYAKANTHAN, J.; SRINIVASAN, P. Green synthesis of silver nanoparticles using *Lippia nodiflora* aerial extract and evaluation of their antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects. **Resource-Efficient Technologies**, v. 3, n. 4, p. 506-515, Dec. 2017.

TARLEY, C. R. T.; ARRUDA, M. A. Z. Biosorption of heavy metals using rice milling by-products. Characterization and application for removal of metals from aqueous effluents. **Chemosphere**, v. 54, n. 7, p. 987-995, Feb. 2004.

TELES, A. S. C. *et al.* Effect of temperature on the degradation of bioactive compounds of Pinot Noir grape pomace during drying. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018.

TREMILIOSI, G. C. *et al.* Ag nanoparticles-based antimicrobial polycotton fabrics to prevent the transmission and spread of SARS-CoV-2. **bioRxiv**, p. 2020.06.26.152520, 1 Jan. 2020.

UMOREN, S. *et al.* Green synthesis, characterization and antibacterial activities of silver nanoparticles from strawberry fruit extract. **Polish Journal of Chemical Technology**, v. 19, 1 Dez. 2017.

VALDEZ-SALAS, B. *et al.* Promotion of surgical masks antimicrobial activity by disinfection and impregnation with disinfectant silver nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 16, p. 2689–2702, 2021.

VAN DER ZANDE, M. *et al.* Distribution, Elimination, and Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions in Rats after 28-Day Oral Exposure. **ACS Nano**, v. 6, n. 8, p. 7427–7442, 28 Aug. 2012.

VANLALVENI, C. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts and their antimicrobial activities: a review of recent literature. **RSC Advances** Royal Society of Chemistry, 13 Jan. 2021.

VIJAYAN, R.; JOSEPH, S.; MATHEW, B. *Indigofera tinctoria* leaf extract mediated green

synthesis of silver and gold nanoparticles and assessment of their anticancer, antimicrobial, antioxidant and catalytic properties. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 46, n. 4, p. 861–871, 19 May 2018.

WANG, L. *et al.* Characterization, antioxidant and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles from *Psidium guajava* L. leaf aqueous extracts. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 86, p. 1-8, May 2018.

WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. In R. E. Wrolstad (Ed.), **Current protocols in food analytical chemistry**. John Wiley & Sons, Inc.
Wijeratne, S. S. K., Amarowicz, R., & Shahidi, F. (2006). Antioxidant activity, 2002.

WATERS, C. L. *et al.* Staged thermal fractionation for segregation of lignin and cellulose pyrolysis products: An experimental study of residence time and temperature effects. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 126, p. 380–389, 1 Jul. 2017.

YANG, H. *et al.* Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. **Fuel**, v. 86, n. 12–13, p. 1781–1788, Aug. 2007.

YANG, J.; PAN, J. Hydrothermal synthesis of silver nanoparticles by sodium alginate and their applications in surface-enhanced Raman scattering and catalysis. **Acta Materialia**, v. 60, n. 12, p. 4753-4758, 2012.

YU, D. *et al.* Controllable Synthesis of CaCO₃ Micro/Nanocrystals with Different Morphologies in Microemulsion. **Chemical Research in Chinese Universities**, v. 26, p. 678-682, 25 Sept. 2010.

ZHAO, G.; STEVENS, S. E. J. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. **Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**, v. 11, n. 1, p. 27-32, Jan. 1998.