

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

LUCAS MAGNO FREITAS OLIVEIRA

**SÍNTESE E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
OBTIDAS EM EXTRATO AQUOSO DE *Eucalyptus grandis***

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2021**

LUCAS MAGNO FREITAS OLIVEIRA

**SÍNTESE E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
OBTIDAS EM EXTRATO AQUOSO DE *Eucalyptus grandis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Renata Pereira Lopes Moreira

Coorientadores: Álvaro Vianna N. de C. Teixeira
Mayra Aparecida Nascimento

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

Oliveira, Lucas Magno Freitas, 1996-
O48s Síntese e atividade antibacteriana de nanopartículas de prata
2021 obtidas em extrato aquoso de *Eucalyptus grandis* / Lucas Magno
Freitas Oliveira. – Viçosa, MG, 2021.
64 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Renata Pereira Lopes Moreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 51-57.

1. Química verde. 2. Extratos vegetais. 3. Agentes
anti-infecciosos. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 660

LUCAS MAGNO FREITAS OLIVEIRA

**SÍNTESE E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
OBTIDAS EM EXTRATO AQUOSO DE *Eucalyptus grandis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de maio de 2021.

Assentimento:



Lucas Magno Freitas Oliveira

Autor



Renata Pereira Lopes Moreira

Orientadora

Aos meus pais, Inêz e José Carlos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Renata, a qual devo minha formação profissional e por ter desempenhado um papel quase maternal ao nutrir meu intelecto e me alentar nesses anos de convivência.

Aos professores Álvaro Vianna e Mayra Nascimento, por terem me coorientado e serem generosos e pacientes ao compartilhar comigo seus conhecimentos.

Ao professor Eduardo Borges, por ter fornecido a matéria prima para a realização deste trabalho.

Ao professor Eduardo Varejão e ao Ueveton, por me auxiliarem na caracterização do extrato.

Ao Departamento de Física, que possibilitou a realização de algumas análises em seus instrumentos, em especial, aos professores Álvaro Vianna e Sukarno.

Ao Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente, especialmente o professor Marcos Tótola e o Alex pelo suporte com as análises de fluorescência.

Ao Laboratório de Biotecnologia Molecular, particularmente a professora Andréa Ribon e o João Pedro Braga por possibilitarem que os testes de atividade antibacteriana fossem realizados.

Ao grupo de pesquisa LANAQUA, pela troca de experiências e aprendizados.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Química por viabilizarem a execução das atividades de pesquisa e também a todos os docentes que participaram da minha formação profissional.

E aos órgãos de fomento, CAPES, FAPEMIG e CNPq, este último pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

OLIVEIRA, Lucas Magno Freitas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2021. **Síntese e atividade antibacteriana de nanopartículas de prata obtidas em extrato aquoso de *Eucalyptus grandis*.** Orientadora: Renata Pereira Lopes Moreira. Coorientadores: Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira e Mayra Aparecida Nascimento.

Extratos vegetais são uma mistura complexa de substâncias que se origina do metabolismo de plantas e é transferida para um solvente durante o processo de extração. Nesses extratos existem compostos que atuam como agentes redutores e de estabilização permitindo que eles possam ser utilizados na síntese de nanopartículas de prata (NPs Ag). Este trabalho teve como objetivos a síntese de NPs Ag pelo extrato aquoso da folha de *Eucalyptus grandis* e a avaliação da atividade antibacteriana da suspensão resultante. Análises por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas indicaram que o extrato possui quatro classes de moléculas principais: ácidos carboxílicos, compostos fenólicos, terpenos e carboidratos, todas relacionadas à produção de NPs Ag. A condição de síntese utilizada: $[AgNO_3] = 0,50 \text{ mmol L}^{-1}$; razão volume de extrato/volume de suspensão = 0,40; $T = 45,00 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $pH = 9,00$ promoveu a formação de partículas com tamanhos medidos por espalhamento de dinâmico de luz iguais a: $(1,7 \pm 0,1) \text{ nm}$ e $(52,9 \pm 14,8) \text{ nm}$, duas bandas convolutas com máximos de absorção em 368 nm e 407 nm. Também foi observado por difração de raios X o sistema cristalino de face centrada da prata. A suspensão de NPs Ag sintetizada foi capaz de inibir o crescimento da bactéria *Escherichia coli*. Portanto, foi possível sintetizar NPs Ag a partir de um processo que se alinha aos princípios da química verde e que apresentam potencial como agente antibacteriano.

Palavras-chave: Resíduos de biomassa. Extrato vegetal. Química verde. Agente antibacteriano.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Lucas Magno Freitas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May 2021. **Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles obtained in aqueous extract of *Eucalyptus grandis*.** Adviser: Renata Pereira Lopes Moreira. Co-adviser: Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira and Mayra Aparecida Nascimento.

Plant extracts are a complex mixture of substances that originates from plant metabolism and is transferred to a solvent during the extraction process. In these extracts there are compounds that act as reducing and stabilizing agents, allowing them to be used in the synthesis of silver nanoparticles (NPs Ag). This work had as objectives the synthesis of NPs Ag by the aqueous extract of the *Eucalyptus grandis* leaf and the evaluation of the antibacterial activity of the resulting suspension. Analyzes by gas chromatography coupled with mass spectrometry indicated that the extract has four classes of main molecules: carboxylic acids, phenolic compounds, terpenes and carbohydrates, all related to the production of NPs Ag. The synthesis condition used: $[AgNO_3] = 0.50 \text{ mmol L}^{-1}$; extract volume/suspension volume ratio = 0.40; $T = 45.00 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and $\text{pH} = 9.00$ promoted the formation of particles with sizes measured by dynamic light scattering equal to: $(1.7 \pm 0.1) \text{ nm}$ and $(52.9 \pm 14.8) \text{ nm}$, two convoluted bands with absorption maxima at 368 nm and 407 nm. The face centered crystal system of silver was also observed by X-ray diffraction. The synthesized NPs Ag suspension was able to inhibit the growth of *Escherichia coli* bacteria. Therefore, it was possible to synthesize NPs Ag from a process that is in line with the principles of green chemistry and that have potential as an antibacterial agent.

Keywords: Biomass residues. Plant extract. Green chemistry. Antibacterial agent.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Esquema simplificado da síntese de nanopartículas em micelas reversas. X^{n+} representa o íon metal e Y, o agente redutor. Adaptado de: EASTOE et al., 2006..... 15
- Figura 2** Ilustração esquemática da estabilização promovida por ligantes na superfície de partículas coloidais. Adaptado de: GRUBBS, 2007..... 17
- Figura 3** Esquema da síntese de nanopartículas de prata a partir de extratos biológicos. As fórmulas estruturais apresentadas são somente exemplos de cada classe de composto que pode estar presente nos extratos biológicos. Adaptado de: ROY et al., 2019..... 18
- Figura 4** Esquema de interação entre o campo elétrico de uma radiação incidente e os elétrons de uma nanopartícula metálica menor que o comprimento de onda. Adaptado de: WILLETS; VAN DUYN, 2007. 20
- Figura 5** Espectro de extinção experimental (curva em preto) e calculado (curva em vermelho) para (A) esfera de Ag com 40 nm de raio, (B) cubo de Ag, (C) octaedro de Ag com 40 nm de arestas e (D) bipirâmide de Ag com 75 nm de aresta. Fonte: RYCENGA et al., 2011.. 21
- Figura 6** Esquema ilustrativo de uma das formas de promover a fluorescência amplificada em superfície. P_0 é a fonte de excitação e S_1 é o estado vibracional ao qual, geralmente, o fluoróforo é excitado. Fonte: LI; LI; AROCA, 2017..... 24
- Figura 7** Espectros no infravermelho da biomassa e do extrato aquoso de *E. grandis*.. 36
- Figura 8** Diâmetros hidrodinâmicos médios das populações de partículas do ponto central ao de um mês..... 39
- Figura 9** Diâmetros hidrodinâmicos médios das populações 1 (a) e 2 (b) de partículas das condições de síntese de NPs Ag testadas. 41
- Figura 10** Gráficos de distribuição de tamanhos (D_H) para AG4 sintetizada 48 h (a) e imediatamente (b) após o preparo do extrato. 42
- Figura 11** Espectros na região do ultravioleta-vísivel para AG4 sintetizada 48 h e imediatamente após o preparo do extrato. 43
- Figura 12** Espectros na região do ultravioleta-vísivel para AG4 e para o extrato..... 44
- Figura 13** Gráficos de distribuição de tamanhos (D_H) para as AG4 (a) e o extrato (b). 45

Figura 14 Difractogramas de AG4 (a) e do padrão de Ag JCPDS 89-3722 (b)..... 46

Figura 15 Espectros de emissão para AG4 e para o extrato, $\lambda_{\text{exc}} = 293 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{exc}} = 292 \text{ nm}$.
..... 47

Figura 16 Resultados dos ensaios de atividade antibacteriana para o extrato, AG4, suspensão AG4 sintetizada com o dobro da concentração de prata: AG4-2 e uma solução de nitrato de prata com a mesma concentração de AG4: Ag^+ . Inóculo se refere a população inicial. 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Reagentes utilizados para a realização deste trabalho.	29
Tabela 2 Equipamentos e instrumentos utilizados neste trabalho.	29
Tabela 3 Condições de síntese de NPs Ag testadas segundo o planejamento experimental CCD.	32
Tabela 4 Compostos derivatizados identificados e divididos por classe com os respectivos tempos de retenção observado, área relativa de pico e índice de retenção calculado. ...	37
Tabela 5 Análise de variância das populações de partículas do ponto central do planejamento experimental composto central.	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1. Métodos de síntese de nanopartículas de prata	14
2.2. Propriedades físicas das nanopartículas de prata	19
2.2.1. Ressonância de Plasmons de Superfície Localizado (LSPR).....	19
2.2.2. Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície (SERS).....	22
2.2.3. Fluorescência Amplificada em Superfície (SEF)	23
2.3. Propriedades antimicrobianas das nanopartículas de prata.....	24
2.4. <i>Nanoclusters</i> de prata.....	25
2.5. <i>Eucalyptus</i>	26
3. OBJETIVOS	28
3.2. Objetivos Específicos	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1. Reagentes, equipamentos e instrumentos	29
4.2. Obtenção da biomassa	30
4.3. Preparo do extrato vegetal	30
4.4. Caracterização do extrato vegetal	30
4.4.1. Procedimento de derivatização das amostras extraídas	31
4.4.2. Identificação dos compostos presentes no extrato	32
4.5. Síntese das NPs Ag	32
4.6. Caracterização das NPs Ag.....	33
4.7. Ensaio de atividade antimicrobiana	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1. Caracterização do extrato vegetal	36
5.2. Caracterização das NPs Ag.....	39
5.3. Atividade antibacteriana das NPs Ag	47

6. CONCLUSÃO	50
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	50
REFERÊNCIAS	51
APÊNDICE A – Cromatogramas	58
APÊNDICE B – Espectros de absorção e gráficos de distribuição de tamanhos das diferentes condições utilizadas na síntese de NPs Ag	59

1. INTRODUÇÃO

Nanopartículas (NPs) são materiais sólidos que possuem ao menos uma dimensão entre 1 e 100 nm e apresentam propriedades distintas daqueles de igual composição, porém em escala micrométrica ou maior (GAHLAWAT; CHOUDHURY, 2019). As aplicações das NPs emergem da alta razão área superficial/volume que as conferem diversas e desejáveis propriedades físicas e químicas. Por exemplo, aumentos da reatividade e eficiência catalítica, absorção óptica, condutividade elétrica, resistência mecânica e propriedades magnéticas (JAIN; MEHATA, 2017). Assim, as NPs podem ser aplicadas como catalisadores (DONG *et al.*, 2015), sensores bioquímicos (XU *et al.*, 2008), equipamentos eletroeletrônicos (ALSHEHRI *et al.*, 2012), dispositivos de armazenamento de dados (GU; ZHANG; LAMON, 2016), transportadores de fármacos, sistemas de imageamento de tumores (CHOW; HO, 2013) e tratamentos médicos (ARVIZO *et al.*, 2012).

Entre os constituintes de nanopartículas, os metais, especialmente ouro, prata e cobre, merecem destaque, pois, além de suas características intrínsecas que potencializam as aplicações em eletroeletrônica, neles ocorrem o fenômeno de ressonância de plasmons de superfície localizado (na sigla em inglês, LSPR - *Localized Surface Plasmon Resonance*). O fenômeno LSPR é a oscilação coletiva dos elétrons de condução confinados à superfície de uma partícula metálica em ressonância com uma onda eletromagnética incidente, o que resulta em intenso espalhamento e/ou absorção dessa radiação. A LSPR é um fenômeno relevante porque possibilita o emprego das nanopartículas metálicas como sensores ópticos (XIONG; LU, 2015).

A prata se sobressai entre os metais porque possui uma LSPR mais intensa ao longo de uma faixa mais ampla do espectro eletromagnético (RYCENGA *et al.*, 2011). Além disso, as nanopartículas de prata (NPs Ag) contam com propriedades antimicrobianas, o que as tornam uma alternativa terapêutica frente ao aumento de casos de resistência bacteriana à antibióticos (ABOU EL-NOUR *et al.*, 2010).

As propriedades das NPs Ag apresentam uma forte dependência em relação ao tamanho, formato e distribuição de tamanhos (AKHTAR; PANWAR; YUN, 2013). Geralmente, o controle das características morfológicas pode ser obtido ao variar as condições de síntese ou o processo de síntese em si. Entretanto, os procedimentos mais usuais apresentam um alto custo energético, ou financeiro, e utilizam substâncias tóxicas e/ou solventes não ambientalmente

amigáveis (ABOU EL-NOUR *et al.*, 2010). Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de processos de síntese de nanopartículas metálicas que sejam mais econômicos e benignos ao meio ambiente (JAIN; MEHATA, 2017).

Nesse cenário, surge o emprego de extratos vegetais na síntese de NPs Ag, por serem ricos em compostos que são capazes de promover a redução de íons metálicos e estabilização das nanopartículas resultantes, como esteroides, flavonoides, terpenos, carboidratos e proteínas (ROY *et al.*, 2019). Entre as plantas, o gênero *Eucalyptus* é uma interessante fonte de extrato porque ele é largamente cultivado ao redor do mundo, apresenta alta produtividade e substâncias com propriedades farmacêuticas que podem intensificar as propriedades antimicrobianas das NPs Ag (SALEHI *et al.*, 2019).

Diante do exposto, a proposta deste trabalho consistiu em sintetizar NPs Ag por um processo verde, empregando o extrato aquoso da folha de *Eucalyptus grandis*, e avaliar a atividade antibacteriana do nanomaterial obtido.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nanomateriais apresentam uma série de características distintas em relação aos mesmos materiais em tamanhos maiores. Dentre os metais usados para a síntese de nanopartículas, a prata se destaca pela forte resposta óptica e atividade antimicrobiana, sendo que o processo de síntese utilizado influencia as características do produto, bem como suas propriedades (RYCENGA *et al.*, 2011).

2.1. Métodos de síntese de nanopartículas de prata

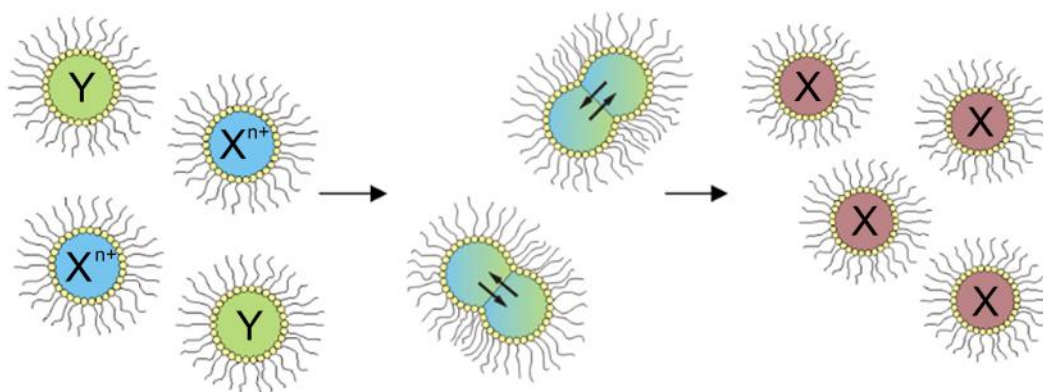
As NPs Ag podem ser produzidas e estabilizadas, geralmente, por duas abordagens: “*top-down*” ou “*bottom-up*” (em tradução livre, de cima pra baixo ou de baixo pra cima). A estratégia “*top-down*” consiste em sintetizar a nanoestrutura por desgaste físico de materiais macroscópicos, seja por esmerilhamento, moagem, pulverização, ablação por *laser*, litografia ou outros. Entretanto, é um modo de produção de nanopartículas energeticamente dispendioso e com baixo rendimento. Na estratégia “*bottom-up*”, a nanoestrutura é sintetizada por processos químicos ou biológicos de maneira que átomos se organizam para formar a partícula, por exemplo, por redução química ou fotoquímica (AHMED *et al.*, 2016).

Os processos “*bottom-up*” de produção de NPs Ag são preferidos em relação aos “*top-down*” por serem energeticamente mais econômicos, permitirem maior controle sobre as características do produto ao modular as condições de síntese e apresentarem alto rendimento. Porém, nesses processos é comum o uso de reagentes que apresentam riscos ao meio ambiente e a saúde humana, como hidrazina e bitartarato de potássio, o que reduz a biocompatibilidade das nanopartículas produzidas e restringe as possíveis aplicações biomédicas. Portanto, o desenvolvimento de métodos ambientalmente amigáveis ao mesmo tempo que permitem o controle da morfologia e estabilidade têm sido um foco de pesquisa recente (GAHLAWAT; CHOUDHURY, 2019).

A maioria dos processos “*bottom-up*” envolvem, inevitavelmente, a redução do íon metálico em solução ou a decomposição de uma substância que contenha o metal. Um exemplo de emprego desse princípio é o uso de micelas reversas para a síntese de nanopartículas (XIONG; LU, 2015).

Micelas reversas são agregados globulares formados pela automontagem de surfactantes em solventes apolares. Ao modular a razão água/surfactante, o tamanho da gota de uma micela reversa pode ser ajustado à escala nanométrica, e a região confinada no núcleo polar da micela reversa pode atuar como um nanorreator. Baseadas nesse fenômeno, a síntese de nanoestruturas metálicas pode ser alcançada pela mistura de duas micelas reversas, uma contendo o precursor do metal e a outra, o agente redutor responsável pela formação das nanopartículas desse metal. Após a mistura, as micelas colidem e as fases contendo o metal e o agente redutor se misturam levando à formação e crescimento de uma nanoestrutura metálica no interior da gota (XIONG; LU, 2015). Esse processo, esquematizado na Figura 1, permite o crescimento de nanoestruturas metálicas com tamanho, formato e composição controláveis. Isso ocorre porque uma característica importante das micelas reversas nas gotas de água em óleo é o processo dinâmico de troca que ocorre entre componentes de diferentes gotas ao colidirem. Esse processo é capaz de produzir de forma efetiva um sistema de nanopartículas metálicas de baixa dispersão. Porém, o tamanho fica limitado ao da micela reversa (SCHWARTZBERG; ZHANG, 2008). Além disso, o emprego de solventes orgânicos e surfactantes apresentam impacto ambiental e devem ser separados do sistema para a purificação do produto, o que aumenta o custo financeiro desse método (ABOU EL-NOUR *et al.*, 2010).

Figura 1 – Esquema simplificado da síntese de nanopartículas em micelas reversas. X^{n+} representa o íon metal e Y, o agente redutor.



Adaptado de: EASTOE *et al.*, 2006.

Radiações ionizantes como raios X e gama também podem ser usadas para produzir nanopartículas, porque elas causam a formação de elétrons hidratados e radicais $OH^\bullet$ e $H^\bullet$ durante a radiólise da água. A radiação ultravioleta também pode causar a formação de radicais

pela fotólise da água. Essas espécies químicas geradas, então, podem ser usadas para promover a redução do íon metálico e, portanto, formar nanopartículas (XIONG; LU, 2015). Apesar de ser um método rápido, dispensar altas temperaturas e oferecer controle sobre as características da nanoestrutura a partir da dose e tempo de exposição à radiação, pode ser uma técnica dispendiosa financeiramente e requerer profissionais qualificados (ČUBOVÁ; ČUBA, 2019).

De todos os processos “*bottom-up*”, a redução química é o mais usado para a síntese de NPs Ag estáveis, isto é, dispersão coloidal estável, em água ou solventes orgânicos. Agentes redutores comuns são o borohidreto, citrato, ascorbato, hidrogênio elementar e monóxido de carbono (ABOU EL-NOUR *et al.*, 2010). A proposta de mecanismo desse processo é a seguinte: inicialmente, ocorre a redução de vários íons de Ag^+ que leva à formação de átomos de Ag (nucleação), que irão se aglomerar formando NPs Ag (crescimento) (RYCENGA *et al.*, 2011).

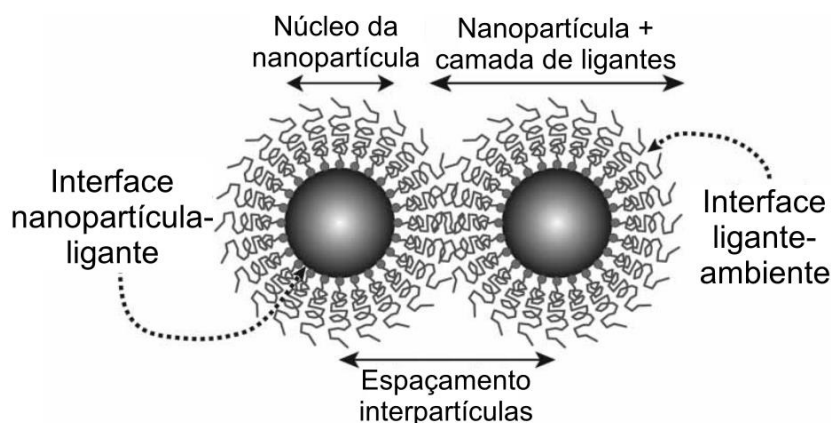
Para estabilizar o coloide gerado é comum o emprego de agentes estabilizantes, por exemplo, surfactantes e polímeros, tais como: brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), polivinilpirrolidona (PVP), polietilenoglicol (PEG), poli(ácido metacrílico) (PMAA), polimetilmetacrilato (PMMA), entre outros, que irão se adsorver ou se ligar à superfície da nanopartícula e evitar que a aglomeração continue (KANG *et al.*, 2019). Ao variar as condições da reação, como a temperatura, concentração dos reagentes ou tipo de agente estabilizante, é possível alcançar um alto grau de controle sobre as etapas de nucleação e crescimento e, portanto, do produto final (RYCENGA *et al.*, 2011).

A maioria das propriedades das nanopartículas exige não somente que a partícula seja de tamanho nanométrico, mas também que as partículas estejam dispersas no meio, sem se aglomerarem (ABOU EL-NOUR *et al.*, 2010). Assim, o agente estabilizante deve estar presente durante e depois das etapas de nucleação e crescimento para conferir estabilidade ao sistema coloidal, como esquematizado na Figura 2. Sem estabilizante, a nanoestrutura não se mantém, e as partículas se agregam ou se dissolvem (KANG *et al.*, 2019).

Além de garantir a estabilidade durante o armazenamento, o agente estabilizante pode controlar o formato e o tamanho das nanopartículas. Por exemplo, o PVP se liga preferencialmente à uma das faces do cristal de prata, sendo possível promover o crescimento de uma variedade de morfologias de nanopartículas ao variar sua concentração inicial no meio (XIA *et al.*, 2012). De forma semelhante, o CTAB se liga à superfície radial, fazendo com que

a nanopartícula cresça somente na direção axial conforme mais íons de Ag^+ são adicionados (SCHWARTZBERG; ZHANG, 2008). Haletos, por outro lado, podem alterar a cinética de redução e promover o crescimento anisotrópico da nanoestrutura (LOHSE *et al.*, 2014).

Figura 2 – Ilustração esquemática da estabilização promovida por ligantes na superfície de partículas coloidais.



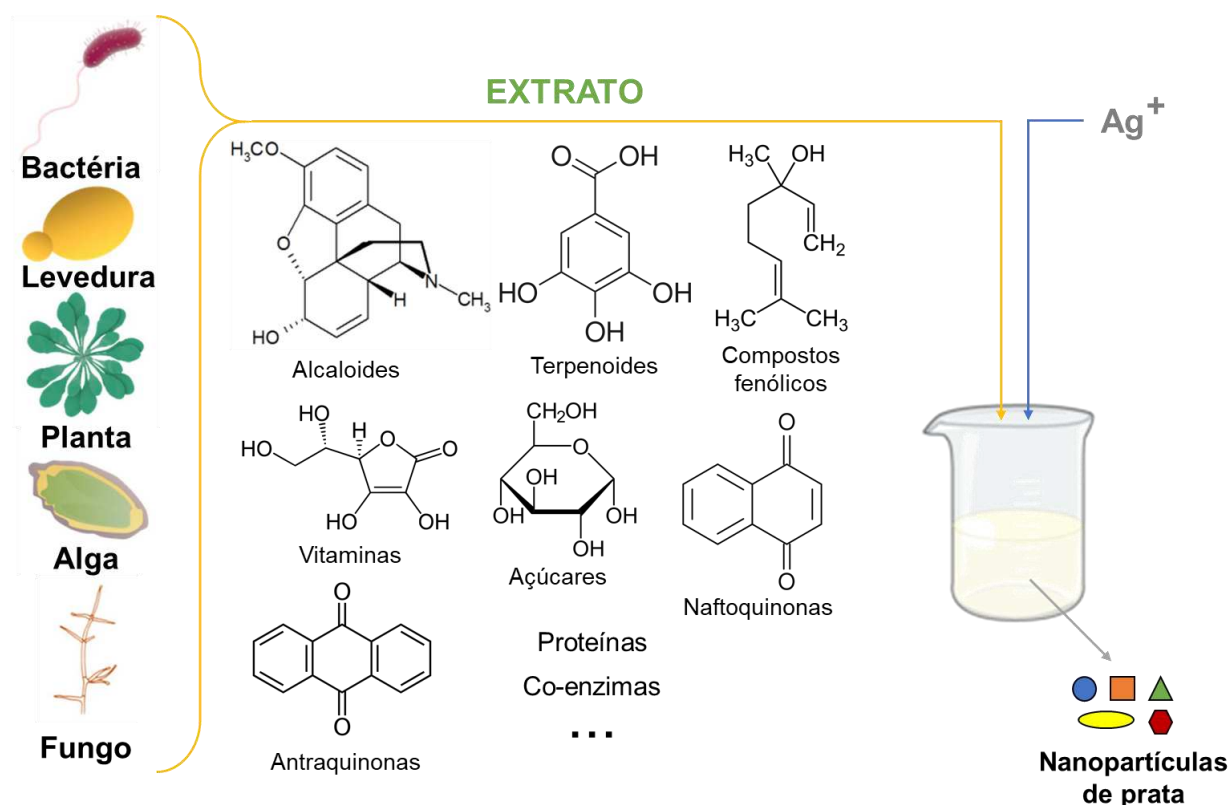
Adaptado de: GRUBBS, 2007.

A depender da aplicação, alcançar estabilidade coloidal usando agentes estabilizantes como citrato, CTAB ou PVP pode ser difícil. Principalmente, considerando condições biológicas como o interior de vasos sanguíneos, que apresentam alta força iônica, ao passo que a biocompatibilidade da nanopartícula também fica comprometida pela citotoxicidade dessas moléculas. Assim, biomoléculas como proteínas, que naturalmente apresentam afinidade por metais, são agentes estabilizantes potencialmente mais adequados para aplicações biomédicas das NPs Ag (KANG *et al.*, 2019).

Processos que empregam agentes redutores de origem biológica, vegetal ou microbiana, ou que aproveitam o metabolismo de microrganismos como bactérias, fungos e algas para a produção de NPs Ag, surgiram como alternativa aos processos de síntese convencionais e buscam se alinhar aos princípios da química verde (HEBBALALU *et al.*, 2013). São eles: (1) seleção do solvente, geralmente água no lugar de substâncias orgânicas; (2) escolha de agentes redutores ambientalmente benignos, no caso polissacarídeos, proteínas, entre outros, em vez de borohidreto, hidrazina e etc.; e (3) uso de compostos não tóxicos para promover a estabilização, onde normalmente o próprio agente redutor funciona como agente estabilizante dispensando o

uso de surfactantes (ABOU EL-NOUR *et al.*, 2010). Na Figura 3 é ilustrado o processo de síntese biológica de NPs Ag por substâncias de origem biológica.

Figura 3 – Esquema da síntese de nanopartículas de prata a partir de extratos biológicos. As fórmulas estruturais apresentadas são somente exemplos de cada classe de composto que pode estar presente nos extratos biológicos.



Adaptado de: ROY *et al.*, 2019.

Em oposição aos processos convencionais de síntese de NPs Ag, os processos biossintéticos não utilizam substâncias químicas agressivas ao meio ambiente e à saúde humana, não requerem a adição de agentes estabilizantes, pois já se fazem presentes no sistema, como peptídeos, ácidos nucleicos e proteínas (KANG *et al.*, 2019), e apresentam melhor custo benefício. Além disso, o produto costuma ser muito mais biocompatível, o que facilita o seu uso em aplicações biomédicas (GAHLAWAT; CHOUDHURY, 2019).

A síntese microbiológica é um exemplo de processo biossintético, que explora mecanismos de defesa de microrganismos como bactérias, fungos, leveduras, algas e vírus para a produção de nanopartículas. Isso porque esses organismos são frequentemente expostos a condições ambientais severas e altas concentrações de metais. Dessa forma, tais

microrganismos evoluíram diversas formas de proteção como sequestro intracelular, bombas de efluxo e precipitação extracelular, que podem ser manipulados para a produção de nanopartículas metálicas. A cápsula proteica que forma o capsídeo de vírus, por outro lado, pode ser modulada por engenharia genética e usada como molde para deposição de metais. Em resumo, a rota microbiológica de síntese permite que a formação das nanopartículas ocorra em meio aquoso e que as características do produto sejam controladas, além disso, é de fácil escalonamento industrial (GAHLAWAT; CHOUDHURY, 2019).

Em comparação com os métodos que empregam microrganismos, os métodos que fazem uso de extratos vegetais dispensam as etapas de isolamento, cultivo e manutenção da cultura microbiana e não requerem condições de alta assepsia. Ademais, a taxa de produção costuma ser mais rápida, com melhor custo-benefício e mais facilmente escalonável a produção industrial (AHMED *et al.*, 2016; AKHTAR; PANWAR; YUN, 2013).

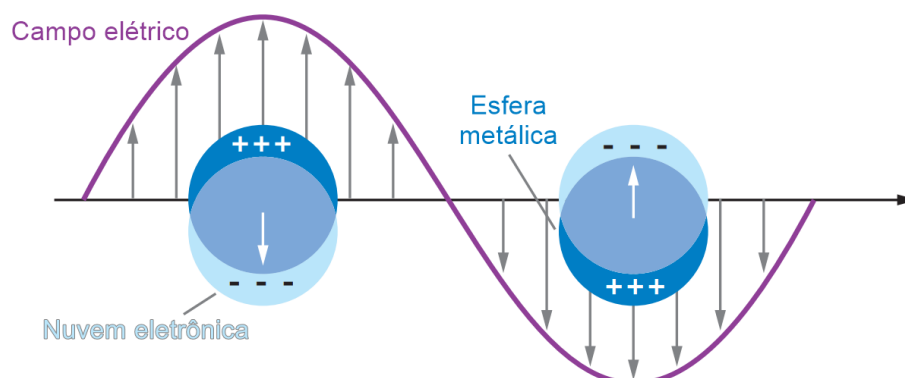
2.2. Propriedades físicas das nanopartículas de prata

2.2.1. Ressonância de Plasmons de Superfície Localizado (LSPR)

Quando partículas metálicas são menores que o comprimento de onda da luz incidente, a oscilação dos elétrons de condução pode ressonar na frequência da onda eletromagnética e dar origem a LSPR. Todas as nanopartículas metálicas exibem LSPR (XIONG; LU, 2015). Devido ao tamanho, o campo eletromagnético experimentado pela partícula é essencialmente uniforme e, à medida que a onda eletromagnética oscila na direção de polarização do campo elétrico, os elétrons fracamente ligados ao metal respondem coletivamente, como ilustrado na Figura 4. Quando a frequência da luz incidente coincide com a frequência de oscilação intrínseca dos elétrons, a luz é absorvida resultando na absorção de plasmon de superfície (XU *et al.*, 2008).

Quanto menos firmemente ligados os elétrons estão à malha metálica, menor a frequência de ressonância ou maior é o comprimento de onda da absorção plasmônica. No caso dos metais de cunhagem como cobre, prata e ouro, a condição de ressonância ocorre na região visível do espectro eletromagnético, tipicamente por volta de 390 nm para Ag, 520 nm para Au e 560 nm para Cu, considerando nanopartículas esféricas (SCHWARTZBERG; ZHANG, 2008).

Figura 4 – Esquema de interação entre o campo elétrico de uma radiação incidente e os elétrons de uma nanopartícula metálica menor que o comprimento de onda.



Adaptado de: WILLETS; VAN DUYN, 2007.

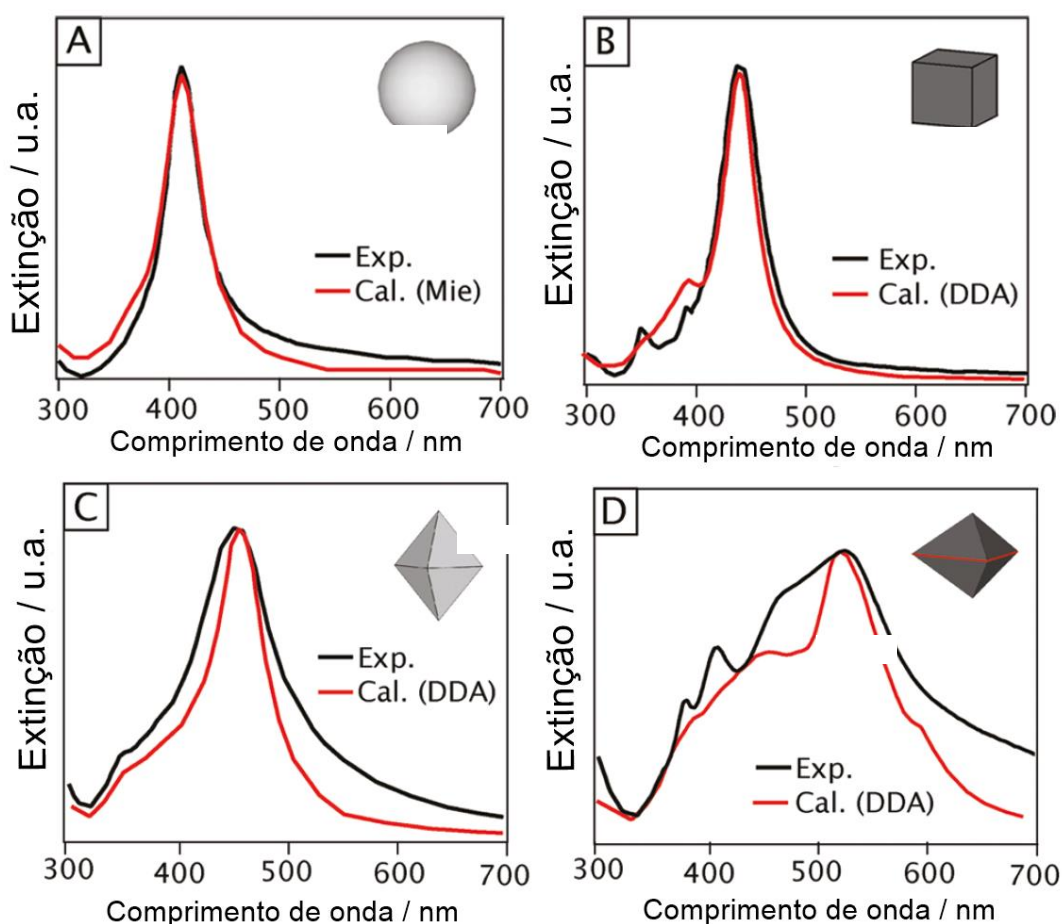
As propriedades plasmônicas das nanopartículas metálicas podem mudar significativamente com alterações em seu tamanho, formato, composição, arranjo ou ambiente químico em que se encontram (KANG *et al.*, 2019). Em princípio, partículas esféricas são completamente simétricas, logo há somente uma ressonância plasmônica, ou melhor, todos os modos possíveis são degenerados. Ao estender a partícula em uma direção, entretanto, é possível formar um segundo modo. À medida que a complexidade aumenta, muitos outros modos não degenerados surgem e, portanto, a absorção de radiação fica mais complexa, com diversas bandas ao longo de uma larga região do espectro. Em geral, quanto mais complexo e menos simétrica é a nanoestrutura, mais modos distintos ela possui e mais largo é o espectro de absorção plasmônica. Exemplos de formatos de nanopartículas incluem nanobastões, nanoprismas, nanogaiolas, *core/shells* e agregados (SCHWARTZBERG; ZHANG, 2008). Na Figura 5 são apresentadas algumas nanoestruturas de prata e os respectivos espectros de absorção da suspensão coloidal em água.

A prata é provavelmente o material plasmônico mais importante. Ela oferece muitas vantagens sobre outros metais como Li, Cu, Al e Au, que também exibem LSPR na região do ultravioleta, visível e infravermelho próximo. O lítio é muito reativo e de difícil manuseio. Estabilidade e toxicidade são as maiores preocupações em relação ao cobre, além da facilidade com que uma camada de óxido se forma em sua superfície, o que reduz significativamente a LSPR. O alumínio somente ressona fortemente na região do ultravioleta. E o ouro é 50 vezes mais caro que a prata. Em contraste, a prata é capaz de suportar um LSPR intensa ao longo de um largo espectro (de 300 nm até 1200 nm) e, quando exposta ao ar a prata não oxida, mas

forma uma camada superficial de sulfeto de prata, que é mais ou menos transparente a luz visível (RYCENGA *et al.*, 2011).

A LSPR depende dos índices de refração da nanopartícula e do meio em que ela se encontra. Assim, nanopartículas metálicas podem servir como transdutores, que convertem pequenas mudanças do índice de refração local em deslocamento espectrais em seus espectros de extinção (absorção) e espalhamento LSPR. Logo, ao monitorar o comprimento de onda da banda de LSPR, seja por absorção ou espalhamento, mudanças no ambiente químico ou bioquímico local podem ser detectadas.

Figura 5 – Espectro de extinção experimental (curva em preto) e calculado (curva em vermelho) para (A) esfera de Ag com 40 nm de raio, (B) cubo de Ag, (C) octaedro de Ag com 40 nm de arestas e (D) bipirâmide de Ag com 75 nm de aresta.



Fonte: RYCENGA *et al.*, 2011.

A maioria das moléculas orgânicas apresenta um índice de refração superior ao meio em que se encontram. Assim, ao se ligarem a uma nanopartícula, o índice de refração local

aumenta, causando um deslocamento para o vermelho (deslocamento batocrômico) no espectro de extinção e espalhamento LSPR (LOISEAU *et al.*, 2019). A ligação pode ser monitorada em tempo real e com alta sensibilidade ao usar uma simples técnica de espectrofotometria de absorção UV-Vis. Como foi relatado no trabalho de Elfassy *et al.* (2016), que usou nanocubos de prata para a quantificação de cisteína por espectrofotometria UV-Vis. Se a superfície do metal for propriamente funcionalizada, esses deslocamentos espectrais se tornam quimicamente específicos (XU *et al.*, 2008).

Outro modo de detecção se baseia no deslocamento no comprimento de onda induzido por mudanças na distância entre nanopartículas. Esse deslocamento na LSPR é devido ao acoplamento plasmônico entre partículas, ou seja, o campo elétrico da superfície de uma nanopartícula interage com o de uma nanopartícula vizinha. O acoplamento plasmônico depende fortemente da distância entre nanopartículas e decai quase que exponencialmente com a distância de separação entre partículas. A aglomeração de partículas, portanto, causa um deslocamento para o vermelho no espectro LSPR, com maiores deslocamentos para menores distâncias entre partículas e agregados de maior tamanho (DREADEN *et al.*, 2012). Baseados nessa estratégia, Xavier *et al.* (2014) fabricaram NPs Ag funcionalizadas com β -ciclodextrina, com a adição de melamina ao meio, as nanopartículas se aglomeravam permitindo a detecção visual da mudança de cor do sistema.

2.2.2. Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície (SERS)

As nanopartículas metálicas que exibem intensa LSPR também podem ser aplicadas para aumentar o sinal Raman de moléculas que estejam na superfície de uma nanopartícula metálica em várias ordens de magnitude, fenômeno conhecido como espectroscopia Raman amplificada por superfície (na sigla em inglês, SERS) (XIONG; LU, 2015).

Dois mecanismos primários são responsáveis pela SERS: um químico e outro eletromagnético. O mecanismo químico propõe que moléculas quimiossorvidas na superfície da nanopartícula têm sua polarizabilidade aumentada e, portanto, o sinal Raman, por transferência de carga. Esse mecanismo, se presente, contribui muito pouco (um fator de 100) comparado com o mecanismo eletromagnético (aproximadamente 10^{12}) (DREADEN *et al.*, 2012), segundo o qual, o metal plasmônico funciona como uma antena de duas vias: aumentando o fluxo de luz incidente na molécula e, logo, o número de absorções transientes, com isso o sinal Raman (XIONG; LU, 2015).

A amplificação SERS é inversamente correlacionada com a distância a décima potência e, logo, diminui rapidamente com o afastamento da superfície metálica. Assim, o máximo de amplificação é observado com moléculas adsorvidas na nanopartícula.

Nanoestruturas de prata exibem campos plasmônicos mais intensos que qualquer outro metal de mesmo tamanho e formato. Assim, os analitos que se adsorvem a nanopartícula podem ter o sinal Raman amplificado (DREADEN *et al.*, 2012). O trabalho de González Fá *et al.* (2019) exemplifica essa capacidade ao utilizar NPs Ag para detecção do antibiótico oxitetraciclina na ordem de ppb em mel, sem a necessidade de qualquer etapa de extração ou separação.

2.2.3. Fluorescência Amplificada em Superfície (SEF)

Semelhante ao SERS, a amplificação do campo eletromagnético na superfície do metal resulta no aprimoramento da fluorescência de fluoróforos nas proximidades, conhecido como fluorescência amplificada em superfície (na sigla em inglês, SEF).

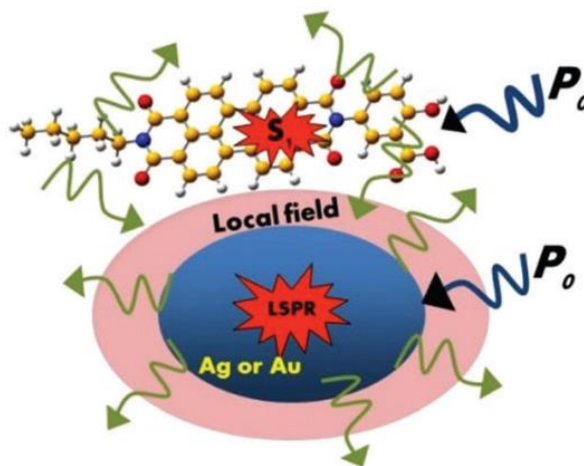
O plasmon pode interagir com o fluoróforo de diversas maneiras para aumentar sua emissão:

- (a) A LSPR pode aumentar a incidência de excitação, por aumentar o fluxo de fótons até o fluoróforo e, como isso, a frequência de eventos de excitação;
- (b) A LSPR pode aumentar a taxa de decaimento radiativo, acelerando a emissão do estado excitado;
- (c) A LSPR pode realizar acoplamento de campo distante com o fóton emitido aumentando a probabilidade de emissão. Na prática, a estrutura plasmônica funciona como uma antena bidirecional, que aumenta tanto o número de fótons absorvidos quanto os emitidos (XIONG; LU, 2015).

Na Figura 6 é ilustrado o processo de fluorescência amplificada em superfície de NPs Ag ou Au segundo a maneira (c).

Diferentemente dos fluoróforos, as nanopartículas plasmônicas não sofrem com fotobranqueamento, fornecendo praticamente uma fonte ilimitada de fótons em intervalos arbitrariamente longos (XU *et al.*, 2008). Com isso, Fu *et al.* (2008) foram capazes de aumentar fotoestabilidade do fluoróforo Cy5, usado na marcação de oligômeros de DNA.

Figura 6 – Esquema ilustrativo de uma das formas de promover a fluorescência amplificada em superfície. P_0 é a fonte de excitação e S_1 é o estado vibracional ao qual, geralmente, o fluoróforo é excitado.



Fonte: LI; LI; AROCA, 2017.

2.3. Propriedades antimicrobianas das nanopartículas de prata

A prata é um conhecido agente antimicrobiano com ação sobre uma ampla gama de microrganismos (mais de 650) como bactérias gram-negativas e gram-positivas, fungos e vírus. Durante o final do século XIX, após o parto, era uma prática comum administrar gotas de uma solução aquosa de nitrato de prata sobre os olhos de recém-nascidos para impedir a transmissão de *Neisseria gonorrhoeae* por mães infectadas (AHMED *et al.*, 2016), tratamento abandonado por causa da tendência dessa profilaxia resultar em conjuntivite (MALLIKA *et al.*, 2008).

A prata é geralmente usada na forma de sal de nitrato, AgNO_3 , para induzir o efeito antimicrobiano. Entretanto, a prata na forma de nanopartículas possui uma elevada área superficial disponível, sendo mais eficaz na interação com os microrganismos. Com a disseminação de bactérias patogênicas resistentes à um ou vários antibióticos, a medicina precisa de novos tratamentos, sendo as NPs Ag candidatas promissoras para desempenhar esse papel.

Os sistemas constituídos por NPs Ag apresentam várias vantagens que os tornam muito interessantes para o seu uso como agentes antimicrobianos. Entre as vantagens, está o fato de que possuem uma alta atividade contra uma ampla gama de microrganismos e parasitos, mesmo em baixas concentrações (a inibição total do crescimento de bactérias pode ocorrer com apenas

alguns mg/mL), nas quais a prata apresenta pouca toxicidade sistêmica para os seres humanos (LE OUAY; STELLACCI, 2015).

Dada a literatura recente no assunto, há um forte conjunto de evidências indicando que as NPs Ag sofrem oxidação no meio biológico sendo as espécies Ag^+ as principais responsáveis pelos efeitos antimicrobianos. Ao contrário de uma molécula de antibiótico, que possui como alvo um componente específico do ciclo de vida bacteriano, os íons Ag^+ podem interromper uma grande variedade de atividades biológicas, pois são capazes de se ligar a diversas moléculas, tais como aminas orgânicas, fosfatos e, principalmente, tióis. E ainda, os íons de prata podem atuar como um agente de polimerização entre tióis, formando cadeias que levam à agregação irreversível das moléculas portadoras desses grupos funcionais. Essa característica de interação com vários compostos possibilita às NPs Ag uma ação antimicrobiana contra um espectro mais amplo de microrganismos, quando comparada a uma classe de antibióticos (ROY *et al.*, 2019).

Apesar de não serem as espécies ativas, as NPs Ag podem trazer outras vantagens, uma vez que atuam como um veículo contendo vários milhares de átomos de Ag, as quais podem adsorver na membrana bacteriana, fornecendo localmente uma quantidade alta do agente antimicrobiano (Ag^+) (LE OUAY; STELLACCI, 2015). Além disso, as nanopartículas podem ser preparadas usando ligantes ou compostos que também possuem atividade antimicrobiana, o que pode levar a um efeito sinérgico, de modo que a ação ocorra em concentrações abaixo das quais nenhum dos sistemas estariam ativos se tomados individualmente (AHMED *et al.*, 2016). Isso foi demonstrado no trabalho de Tutaj *et al.* (2016) que utilizaram o antifúngico anfotericina B para síntese e estabilização de NPs Ag.

2.4. Nanoclusters de prata

As propriedades ópticas e eletrônicas dos metais variam de acordo com o tamanho em que se encontram. Na escala macrométrica, metais, geralmente, são bons condutores de eletricidade e refletores de radiação. Porém, em escala nanométrica (<100 nm), nanopartículas metálicas podem apresentar cores intensas devido à LSPR. E quando se encontram em estruturas menores que 2 nm, a densidade contínua dos estados energéticos se divide em níveis discretos, semelhante ao que é observado para moléculas (DÍEZ; RAS, 2011).

Essas estruturas formadas por algumas dezenas ou centenas de átomos metálicos com tamanho inferior a 2 nm recebem o nome de *nanoclusters* e possuem propriedades intermediárias entre a átomos e nanopartículas, como transições HOMO-LUMO explícitas e fortes emissões de luminescência. E outras propriedades de interesse prático, por exemplo, biocompatibilidade e fotoestabilidade (XIE *et al.*, 2020; ZHANG, Libing; WANG, 2014).

Em geral, moléculas fluoróforas possuem baixa fotoestabilidade. Já pontos quânticos de semicondutores costumam ser fotoestáveis, porém são relativamente grandes (10-20 nm) e formados por elementos tóxicos, o que compromete suas aplicações *in vivo*. Por outro lado, *nanoclusters* metálicos, em especial de prata, são fotoestáveis, sub-nanométricos e biocompatíveis, o que os qualifica como bons candidatos a sondas fluorescentes em aplicações biológicas (DÍEZ; RAS, 2011; ZHANG, Libing; WANG, 2014).

Nanoclusters de prata são usualmente sintetizados por processos “*bottom-up*”(YANG; JIN, 2019), com especial cuidado para evitar agregações que poderiam promover a formação de nanopartículas (DÍEZ; RAS, 2011). Para isso são usados ligantes orgânicos com grupos tióis, fosfinas ou alcinilos que possuem alta afinidade pela prata e envolvem a superfície do *nanocluster*, de modo a isolar a estrutura e prevenir agregações. Mas além de influenciar o processo de síntese, o ligante acaba determinando o tamanho, formato e propriedades do *nanoclusters* (XIE *et al.*, 2020).

2.5. *Eucalyptus*

Eucalyptus é um gênero de plantas perenes (vivem mais de 2 anos), composto por arbustos e árvores, e de crescimento rápido. Ao redor do mundo já foram identificadas mais de 800 espécies, sendo a maioria endêmica da Austrália, mas atualmente é cultivado em quase todas as regiões tropicais e subtropicais, especialmente na África do Sul, Angola, Argentina, Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Tanzânia, Uganda, Uruguai, Zâmbia e Zimbábue.

A polpa de sua madeira é a principal fonte de celulose usada para a produção de papel e produtos têxteis, com destaque para as espécies de *E. grandis*, *E. smithii*, *E. nitens*, *E. dunnii*, *E. globulus* e *E. urophylla*, os principais cultivos industriais para essas finalidades. É um gênero também usado para o plantio ambiental no controle da erosão hídrica e eólica, e suas folhas, como fonte de óleo essencial para as indústrias farmacêutica e de perfumaria (SALEHI *et al.*, 2019).

No Brasil, o *E. grandis* é amplamente cultivado e utilizado para a produção de celulose e papel e, geralmente, suas folhas constituem um resíduo industrial (BARBOSA; FILOMENO; TEIXEIRA, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Sintetizar nanopartículas de prata por um processo verde empregando extrato aquoso da folha de eucalipto (*Eucalyptus grandis*) e avaliar a sua atividade antibacteriana.

3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar o extrato aquoso por Espectroscopia no Infravermelho e Cromatografia a Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas;
- Estabelecer uma condição de síntese das nanopartículas de prata;
- Caracterizar as nanopartículas de prata por Espectrofotometria de Absorção Molecular na região UV/Vis, Espalhamento Dinâmico de Luz e Difração de Raios X;
- Avaliar a atividade antibacteriana das nanopartículas sintetizadas sobre: *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes, equipamentos e instrumentos

Os reagentes utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 1. As soluções aquosas foram preparadas com água Tipo 1, obtida por um sistema de purificação Milli-Q® (Millipore), e, quando não mencionado, foram armazenadas sob refrigeração a 4°C.

Tabela 1 – Reagentes utilizados para a realização deste trabalho.

Reagente	Marca	Pureza/%
Acetato de etila	Alphatec	99,5
Ácido sulfúrico	Alphatec	95
Cloreto de sódio	Isofar	99
Cromato de potássio	Merck	99,5
Glicerina	Alphatec	99,5
Hidróxido de potássio	Vetec	85
Hidróxido de sódio	Neon	99,67
Metanol	Alphatec	99,8
Nitrato de prata	Neon	99,9
Sulfato de magnésio anidro	Vetec	98

Os equipamentos e instrumentos utilizados para a realização dos experimentos e caracterização do extrato e das nanopartículas se encontram na Tabela 2.

Tabela 2 – Equipamentos e instrumentos utilizados neste trabalho.

Equipamento/Instrumento	Modelo	Marca
Agitador magnético com aquecimento	SL 91	Solab
Analizador de tamanho de partícula	Sistema BI-200SM e correlacionador TurboCorr	Brookhaven Co.
Balança analítica	ATX 224	Shimadzu
Banho termocriostático	MQBTC 99-20	Microquímica
Centrífuga	206-R	Fanem
Cromatógrafo a gás	GCMS-QP5050A	Shimadzu

Equipamento/Instrumento	Modelo	Marca
Difratômetro de Raios X	D8-Discover	Bruker
Espectrofotômetro de absorção molecular	Thermo Scientific	Evolution Array
Espectrógrafo de Infravermelho com Transformada de Fourier	660-FTIR	Varian
Espectrofluorímetro	Cary Eclipse	Agilent
Medidor de pH	K39-1014B	Kasvi

4.2. Obtenção da biomassa

A coleta e identificação taxonômica das folhas de *Eucalypto grandis* foram realizadas pelo Prof. Dr. Eduardo Euclides de Lima e Borges do Departamento de Engenharia Florestal, nas dependências da Universidade Federal de Viçosa. As folhas foram lavadas adequadamente com água destilada, secas em estufa (60 °C por 48h), trituradas em moinho de lâminas e armazenadas sob refrigeração a 4 °C até serem usadas.

4.3. Preparo do extrato vegetal

Para o preparo do extrato o método de SILVA *et al.* (2019) foi adaptado: para cada 10,00 mL de água deionizada a 90 °C, 0,1000 g de folhas de eucalipto trituradas foi adicionado e deixado sob agitação por 5 min; seguida de filtração em papel qualitativo e o filtrado foi centrifugado a 2500 rpm por 10 min. O uso do extrato foi padronizado para ser feito 48 horas após o seu preparo, ficando armazenado à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante esse período.

4.4. Caracterização do extrato vegetal

A caracterização do extrato aquoso das folhas de eucalipto por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e reflectância total atenuada (FTIR-ATR) foi realizada por um espectrômetro no Departamento de Química da UFV, da marca Varian e modelo 660-FTIR. As medidas foram realizadas com resolução de 4 cm⁻¹ e 16 varredura na região de 400 a 4000 cm⁻¹.

As análises por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas no cromatógrafo Shimadzu GCMS-QP5050A, que se encontra Departamento

de Química da UFV, nas seguintes condições operacionais: método por impacto de elétrons (70 eV); modo scan, m/z 30,00 a 700,00; coluna capilar RTx5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm); fluxo do gás de arraste (He) 1 mL min^{-1} ; razão de split 1:5; temperatura do injetor 290 °C; temperatura do detector 290 °C; volume de injeção da amostra foi de 1,0 μL com razão de Split 1:3; temperatura inicial de 80 °C por 5 min. e gradiente 4 °C min^{-1} até 300 °C.

Como a coluna do cromatógrafo utilizado era incompatível com água, então o extrato utilizado para a síntese das NPs Ag não pode ser analisado diretamente, sendo necessário realizar dois tipos de preparo de amostras:

(1) Em 10,00 mL de um extrato vegetal recém preparado, obtido nas mesmas condições mencionadas anteriormente (seção 4.3), porém com o quádruplo de matéria (0,5000 g), foi feita uma extração líquido-líquido utilizando acetato de etila em triplicata (10,0 mL por vez). Os extratos foram combinados e traços de água foram removidos com sulfato de magnésio anidro. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo a 40 °C. Em seguida, foi realizado um processo de hidrólise em que 20,0 mg do extrato foram adicionados em um balão de duas vias, junto de 10,00 mL de solução aquosa de hidróxido de potássio 1 mol L^{-1} em metanol 10% (v/v). Durante uma hora, a solução foi aquecida a 100 °C em banho de glicerina, sob refluxo e em atmosfera de nitrogênio. Após atingir a temperatura ambiente, a solução foi acidificada com solução aquosa de ácido clorídrico 1 mol L^{-1} até pH ~ 2. Foi então realizada uma nova extração líquido-líquido com acetato de etila (10,0 mL em triplicata), o extrato combinado e traços de água foram removidos com o auxílio de sulfato de magnésio anidro e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo (FREIRE; SILVESTRE; NETO, 2002).

(2) Também foi obtido um outro extrato, em que se adicionou 0,5000 g da matéria vegetal em 10,00 mL de metanol, que foi mantido a 50 °C por 30 minutos sob refluxo. Em seguida, o sistema foi filtrado em papel qualitativo e o extrato submetido ao processo de hidrólise como mencionado no item anterior.

4.4.1. Procedimento de derivatização das amostras extraídas

Os extratos com e sem etapa de hidrólise foram derivatizados. Para isso, 2,0 mg de cada extrato foram transferidos para um *vial* de fundo cônico, sob o qual foram adicionados 60 μL de piridina anidra, seguida por agitação em vórtex. Na sequência, 100 μL de N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) foram adicionados ao sistema, que também foi

agitado em vórtex (FREIRE; SILVESTRE; NETO, 2002; ISIDOROV, Valery A. *et al.*, 2008). A mistura foi colocada em banho de glicerina por 30 minutos a 70 °C e injetada no cromatógrafo a gás, acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM) (FREIRE; SILVESTRE; NETO, 2002).

4.4.2. Identificação dos compostos presentes no extrato

Para a identificação dos componentes dos extratos derivatizados foi avaliada a similaridade (acima de 90%) dos espectros de massas com os da biblioteca (Nist-11 e Wiley-7) e a confirmação foi feita pela comparação dos índices de retenção com os da literatura (ISIDOROV, V. A. *et al.*, 2007; ISIDOROV, Valery A. *et al.*, 2008).

4.5. Síntese das NPs Ag

Foi preparada uma solução aquosa estoque de nitrato de prata (10 mmol L⁻¹), padronizada pelo método de Mohr, que consiste em uma técnica de titulação volumétrica que utiliza cromato de potássio como indicador (DOUGHTY, 1924). A solução foi armazenada sob refrigeração (4 °C) até o momento de uso.

A condição de síntese utilizada neste trabalho foi selecionada com base no planejamento experimental composto central (CCD) com quatro variáveis, cujo objetivo, inicialmente, era otimizar a estabilidade coloidal do sistema obtido. Basicamente, esse tipo de planejamento de experimentos é composto por um ponto central (no caso, uma condição de síntese) executado com réplicas (foram realizadas 5), que fornece uma estimativa interna do erro puro (AIT-AMIR; POUGNET; EL HAMI, 2015). As condições testadas estão descritas na Tabela 3. A suspensão obtida para cada condição foi acompanhada ao longo de um mês por espalhamento dinâmico de luz e absorção molecular UV-vis, com as análises distanciadas por 7 dias.

Tabela 3: Condições de síntese de NPs Ag testadas segundo o planejamento experimental CCD.

Condição	[Ag ⁺] (mM)	Extrato/Suspensão (v/v)	Temperatura (°C)	pH
1	1,00	0,40	75,00	5,00
2	1,00	0,40	45,00	5,00
3	1,00	0,20	75,00	9,00
4	0,50	0,40	45,00	9,00
5	1,00	0,20	45,00	9,00
6	0,50	0,20	75,00	5,00
7	0,50	0,40	75,00	9,00

Condição	[Ag ⁺] (mM)	Extrato/Suspensão (v/v)	Temperatura (°C)	pH
8	0,50	0,20	45,00	5,00
9C	0,75	0,30	60,00	7,00
10	0,25	0,30	60,00	7,00
11	1,25	0,30	60,00	7,00
12	0,75	0,10	60,00	7,00
13	0,75	0,50	60,00	7,00
14	0,75	0,30	30,00	7,00
15	0,75	0,30	90,00	7,00
16	0,75	0,30	60,00	3,00
17	0,75	0,30	60,00	11,00

*9C: ponto central.

Por motivos a serem detalhados na seção 5.2 a estatística do CCD não foi usada. A síntese das nanopartículas de prata foi realizada de acordo com a condição 4 do CCD, ou seja: 20 mL do extrato (obtido de acordo com a seção 4.3) foi diluído de modo que o volume final fosse de 47,5 mL e o pH foi ajustado para 9,0 com soluções de ajuste de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ e NaOH 0,1 mol L⁻¹. O sistema foi deixado a temperatura ambiente por 48 horas antes de ser utilizado. Posteriormente, o sistema foi aquecido à 45 °C e a solução aquosa de nitrato de prata foi adicionada, de modo que a concentração final de Ag fosse igual a 0,5 mmol L⁻¹, permanecendo nessa temperatura por 1 hora. A suspensão de NPs Ag obtida foi armazenada sob temperatura ambiente ao abrigo de luz.

4.6. Caracterização das NPs Ag

O espectro de absorção da suspensão de NPs Ag foi obtido utilizando-se um espectrofotômetro de absorção molecular da marca Thermo Scientific modelo Evolution Array, que se encontra no Departamento de Química da UFV. Foi utilizada uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 10 mm. A suspensão de NPs Ag foi diluída 10 vezes e a varredura do espectro foi feita no intervalo de comprimento de onda de 190 a 1100 nm.

As medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foram realizadas no instrumento Brookhaven Co. com o sistema BI-200SM, correlacionador TurboCorr de 522 canais, tempos de correlação de até 100 ns. A fonte de luz era um laser de HeNe, com o comprimento de onda de 632,8 nm e com a potência de 75 mW. O instrumento se encontra no Departamento de Física da UFV. O monitoramento e tratamento dos dados foi feito pelo *BIC Dynamic Light Scattering*

Software, sendo que foi utilizado o modelo NNLS (*Non-Negative Least-Squares*) para o ajuste da função de correlação.

O difratograma de raios X foi obtido pelo instrumento da Bruker, modelo D8-Discover localizado no laboratório de Difração de Raios X do Departamento de Física da UFV. A amostra foi gotejada sobre uma lâmina de microscópio e deixada para secar à temperatura ambiente, ao abrigo de luz. Os picos foram analisados com o auxílio do *software* Search Match. As medidas foram realizadas utilizando-se um tubo de cobre (1,5406 Å) e uma velocidade de 1° min^{-1} , na faixa angular de $2\theta = 25$ a 75° .

Os espectros de fluorescência foram obtidos pelo espectrofluorímetro Cary Eclipse da Agilent que se encontra no Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente do Departamento de Microbiologia da UFV. As amostras foram diluídas 10 vezes e foi utilizada uma cubeta de poliestireno com caminho ótico igual a 10 mm.

4.7. Ensaio de atividade antimicrobiana

Os ensaios biológicos foram realizados com as seguintes cepas bacterianas: a Gram-positiva *Staphylococcus aureus* NRS 155 e a Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 29214. As culturas bacterianas foram transferidas para uma solução salina (NaCl 0,75% m/v) e o preparo do inóculo bacteriano foi realizado com base na escala de turbidez de Mc Farland (tubo 0,5), que relaciona uma determinada turvação a uma certa concentração bacteriana em meio líquido, no caso, aproximadamente 1×10^8 UFC (Unidades Formadoras de Colônia) por mL (CLSI, 2013).

O meio de cultura ágar Mueller Hinton® foi adicionado em água destilada numa proporção de 38 g de meio por litro e aquecido em um aparelho de micro-ondas doméstico para total solubilização. A esterilização foi realizada por calor úmido em autoclave na temperatura de 121°C , a 1 atm de pressão por 15 minutos. Aguardou-se que o meio fundido fosse resfriado para aproximadamente 40°C e, em seguida, ele foi distribuído em placas de Petri.

Foram analisados: o extrato vegetal, a suspensão descrita na seção 4.5, uma suspensão com o dobro da concentração mássica de Ag da descrita na seção 4.5, uma solução aquosa de nitrato de prata e, como controle positivo, água destilada. Para o ensaio, 500 μL da amostra a ser analisada foi adicionada a um tubo de ensaio junto de 10 μL do inóculo e 490 μL de meio de cultura líquido Mueller Hinton®. O conjunto foi incubado “*overnight*” a 37°C e 10 μL foram

plaqueados de acordo com a técnica da microgota. As placas de Petri foram incubadas “*overnight*” a 37°C e procedeu-se a contagem de UFC. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

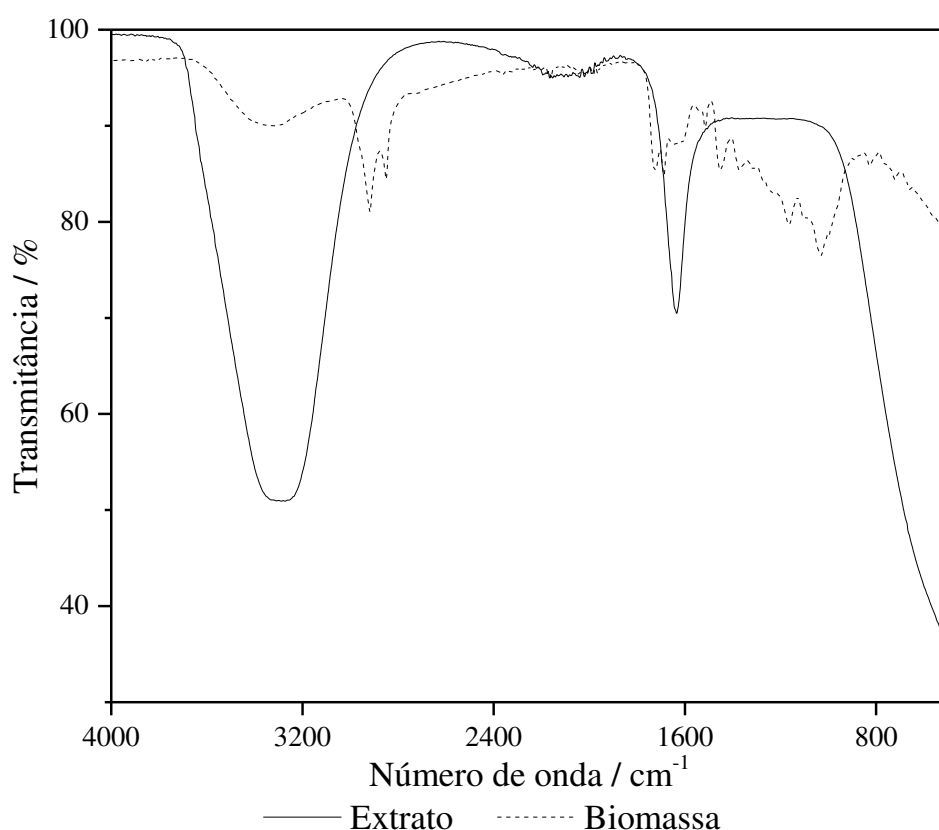
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do extrato vegetal

Extratos vegetais são uma mistura complexa de substâncias que se originam do metabolismo de plantas e são transferidas para um solvente durante o processo de extração (MIKHAILOV; MIKHAILOVA, 2019). O motivo para que sejam usados na síntese de nanopartículas é a presença de compostos que atuam como agentes redutores e de estabilização, ao prevenir a agregação (HEBBALALU *et al.*, 2013).

Com o objetivo de se conhecer a composição do extrato foram realizados ensaios de caracterização. A análise por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) do extrato aquoso e da biomassa de *E. grandis* é mostrada na Figura 7.

Figura 7 – Espectros no infravermelho da biomassa e do extrato aquoso de *E. grandis*.



Não é possível extrair informações relevantes do espectro do extrato aquoso, pois todas as bandas presentes se referiam à água (MEDDERS; PAESANI, 2015). No espectro da biomassa, porém: a banda em 3363 cm^{-1} pode ser atribuída a νOH e está relacionada a água, álcoois, ácidos carboxílicos e fenóis; as bandas em 2918 e 2850 cm^{-1} foram atribuídas a νCH

presentes em aldeídos; em 1726 cm^{-1} se refere a $\nu\text{C=O}$ de ácidos carboxílicos e aldeídos; em 1685 , 1514 e 1456 cm^{-1} podem ser atribuídas a $\nu\text{C=C}$ de compostos benzênicos; a banda em 1034 cm^{-1} foi atribuída a $\gamma\text{C-H}$ de alkenos; e as bandas em 1377 e 1165 cm^{-1} podem se referir a $\nu\text{C=N}$ de aminas (BARBOSA, 2007).

A fim de identificar os compostos presentes no extrato usado neste trabalho, análises por cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas foram realizadas de acordo com a seção 4.4, os cromatogramas se encontram no APÊNDICE A. Quatro classes de compostos foram identificadas (ácidos carboxílicos, compostos fenólicos, terpenos e carboidratos), resultados que se encontram na Tabela 4. Todas essas classes são apontadas na literatura como relacionadas à síntese de nanopartículas de prata.

Tabela 4: Compostos derivatizados identificados e divididos por classe com os respectivos tempos de retenção observado (T.R.), área relativa de pico e índice de retenção calculado (IR).

T.R.	Nome	Área / %				IR
		Acetato de Etila		Metanol		
		D.	H.D.	D.	H.D.	
	Ácidos carboxílicos	6,7	9,4	0,2	15,8	
7,22	Ácido láctico-TMS	6,7	5,6	-	6,6	-
7,77	Ácido glicólico-TMS	-	1,8	-	0,8	-
17,25	Ácido glicérico-TMS	-	-	-	0,2	1341
30,36	Ácido cis-aconítico-TMS	-	2,0	-	0,4	1759
32,65	Ácido tetradecanóico-TMS		-	-	0,1	1843
37,68	Ácido palmítico-TMS	-	-	0,2	2,3	2040
41,52	Ácido linoleico-TMS	-	-	-	0,9	2202
41,77	Ácido α -linolênico-TMS	-	-	-	4,3	2213
42,23	Ácido esteárico-TMS	-	-	-	0,2	2233
	Compostos fenólicos	10,6	12,3	1,1	3,3	
21,68	Eugenol-TMS	-	-	-	0,2	1472
24,82	Tirosol-TMS	-	-	-	0,2	1571
35,14	Ácido p-cumarico-TMS	-	-	-	0,6	1938
35,99	Ácido gálico-TMS	7,9	-	1,1	-	1971
38,98	Ácido ferúlico-TMS	2,7	12,3	-	2,3	2094
	Terpenos	48,7	45,6	9,3	4,2	
10,44	R-Citronelal	-	-	6,3	-	1153
13,73	L-Isopulegol-TMS	6,8	-	0,5	0,1	1244
16,19	Citronelol-TMS	3,3	-	1,0	0,6	1311
18,85	Ácido citronílico-TMS	-	2,6	0,2	0,4	1387
19,75	Trans-cariofileno	-	-	0,2	-	1413
22,61	Óxido de linalol-TMS	25,1	27,8	0,9	1,2	1500
23,35	Óxido de linalol-TMS	13,5	15,2	-	0,5	1524
40,77	Fitol-TMS	-	-	0,2	1,2	2169
53,88	Esqualeno	-	-	-	0,2	2811

T.R.	Nome	Área / %				IR
		Acetato de Etila		Metanol		
		D.	H.D.	D.	H.D.	
	Carboidratos	0	0	39,7	0	
29,96	Xilitol-TMS	-	-	0,2	-	1745
31,36	L-Fucitol-TMS	-	-	0,2	-	1795
32,37	D-Psicofuranose	-	-	3,5	-	1833
32,59	D-Frutofuranose	-	-	3,1	-	1841
32,65	D-Fructose-TMS	-	-	1,5	-	1843
34,66	α -D-Galactopirranose-TMS	-	-	6,7	-	1919
34,69	D-Glucopirranose-TMS	-	-	2,6	-	1920
35,78	Etil-D-Glucopiranosídeo-TMS	-	-	0,3	-	1963
36,51	Carboidrato N.E.	-	-	1,6	-	1992
37,10	D-Glicose-TMS	-	-	10,7	-	2015
39,57	Myo-Inositol-TMS	-	-	6,2	-	2118
51,66	Sacarose-TMS	-	-	2,1	-	2691
	Outros	0	1,2	0,6	0	
15,24	Glicerol-TMS	-	1,2	0,6	-	1285

*T.R.: tempo de retenção observado; I.R.: índice de retenção calculado; D.: derivatizado; H.D.: hidrolisado seguido de derivatização; TMS: trimetilsilil, grupo funcional adicionado à molécula no processo de derivatização; N.E.: não identificado.

Os compostos mais abundantes no gênero *Eucalyptus* são terpenos (SALEHI *et al.*, 2019). Os terpenos são moléculas sintetizadas por unidades de isopreno de cinco carbonos, bem como outros compostos fenólicos, cujos diferentes grupos funcionais podem provocar a redução de íons metálicos e, ao se adsorverem às nanopartículas, conferem a sua estabilização (MASHWANI *et al.*, 2016). Por exemplo, já foi sugerido que a transformação tautomérica de flavonoides, da forma enol para a forma cetona, pode liberar átomos de H que reduzem o cátion metálico (MAKAROV *et al.*, 2014).

A conversão do grupo funcional cetona em ácido carboxílico, em alguns flavonoides, também foi anteriormente apontada como possível candidata para a redução de Ag^+ . Entretanto, em um estudo recente (ZHANG *et al.*, 2019), que comparou as composições inicial e final de um extrato de pepino, utilizado na síntese de nanopartículas de prata, não foi encontrada variação na concentração de compostos fenólicos, mas foi observada variações na concentração de açúcares redutores e ácidos orgânicos. Tais resultados conduziram os pesquisadores a sugerirem que os principais responsáveis pela síntese seriam estes últimos compostos. Possivelmente, por transformações tautoméricas e oxidação de grupos aldeídos de carboidratos (AKHTAR; PANWAR; YUN, 2013; MAKAROV *et al.*, 2014).

É interessante notar que a presença de carboidratos somente foi identificada na extração por metanol e que houve um aumento da área corresponde a ácidos carboxílicos, para ambos os solventes, após o processo de hidrólise. Esta última observação indica, possivelmente, a presença de ésteres na amostra original, e que o processo de hidrólise leva à saponificação e, consequente, formação de ácidos carboxílicos (SOLOMONS; FRYHLE, 2011). Portanto, houve uma certa complementariedade entre as informações obtidas pelos solventes e procedimentos aos quais os extratos foram submetidos, de modo que a análise conjunta dos dados se aproxima mais da situação que seria observada no extrato aquoso do que cada um separadamente.

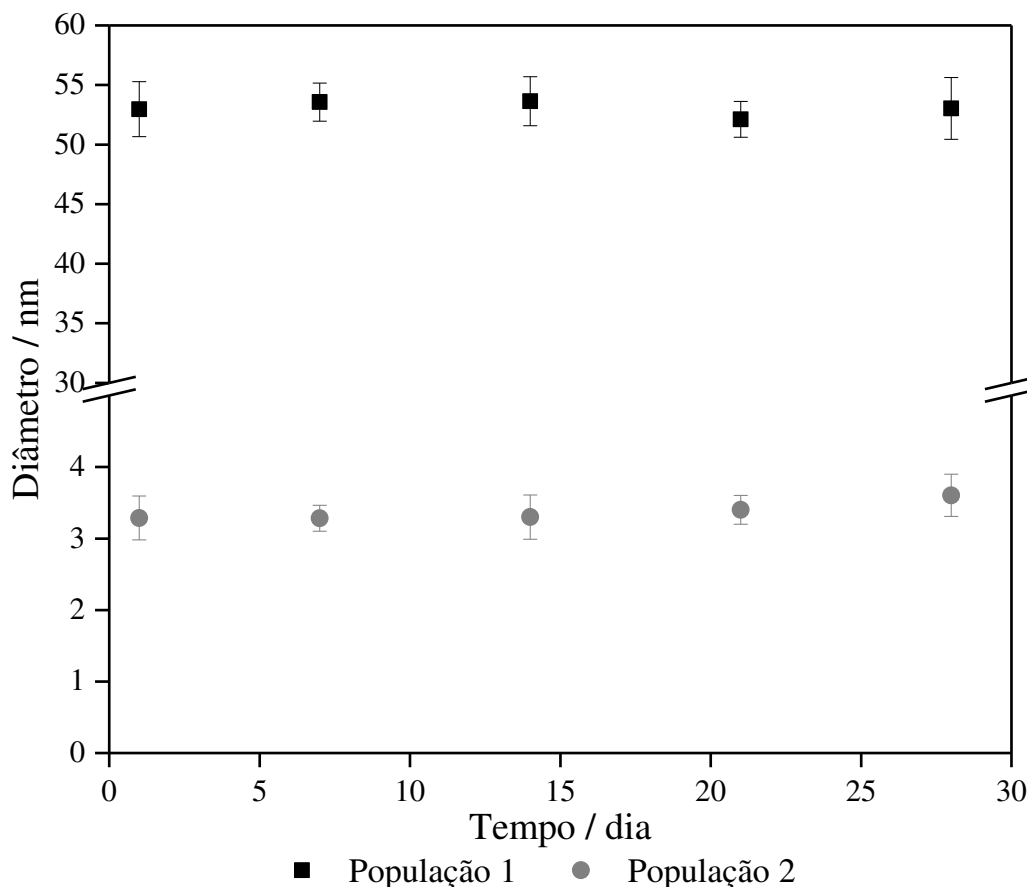
5.2. Caracterização das NPs Ag

Inicialmente, foi elaborado um planejamento experimental CCD, com quatro variáveis, visando otimizar a síntese de NPs Ag em termos da estabilidade coloidal, que pode ser indicada pela conservação do tamanho médio de partículas ao longo do tempo (MYERS, 2003). Por isso, o tamanho de partículas foi aferido por DLS, semanalmente, ao longo de um mês para cada produto de síntese obtido pelas condições descritas na Tabela 3.

Em todas as condições de síntese foram observadas duas populações de tamanhos de partículas. Na Figura 8 é apresentado os diâmetros hidrodinâmicos médios das populações de partículas do ponto central ao longo de um mês (condição 9C, na Tabela 3). Como pode ser observado, os resultados indicaram que não havia variação do tamanho médio de partículas das populações.

Para verificar a hipótese de que o tamanho médio das partículas não variava com o tempo (hipótese de nulidade H_0), foi realizado uma análise de variância (ANOVA) com os dados obtidos. A condição de síntese do ponto central é passível de análise estatística, pois era a única, naquele momento, com repetições, uma vez que o planejamento experimental realizado extrapola a variabilidade nesse ponto para as demais condições de síntese (AIT-AMIR; POUUNET; EL HAMI, 2015). Assim, pode-se ver na Tabela 5 os resultados da ANOVA sobre os dados de tamanhos de partículas do ponto central e confirmar que não houve variação significativa (a 5% de significância), pois o F_{cal} foi menor que o valor de $F_{tabelado\ 5\%}$ (2,87).

Figura 8 – Diâmetros hidrodinâmicos médios das populações de partículas do ponto central ao de um mês.



No APÊNDICE B é possível encontrar os espectros de absorção e gráficos de distribuição de tamanhos para as demais condições de síntese testadas. Pode-se notar que a condição de síntese influencia as características do produto, por exemplo, a condição 16 produziu uma população de partículas com tamanhos superiores a 200 nm e uma banda de absorção fraca por volta de 360 nm, enquanto as populações produzidas pela condição 17 estão abaixo de 100 nm e há uma forte banda de absorção com comprimento de onda máximo em 406 nm.

Tabela 5 – Análise de variância das populações de partículas do ponto central do planejamento experimental composto central.

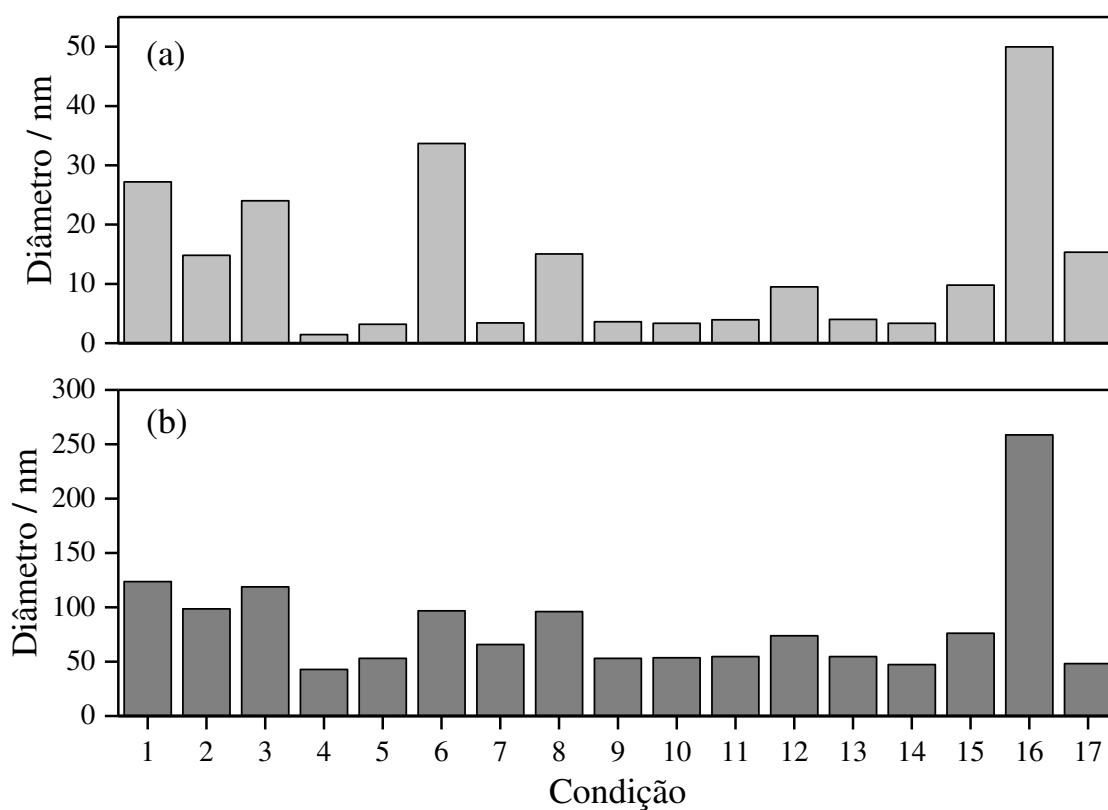
População 1					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F _{cal}	Valor p
Tratamento	4	0,37	0,09	1,32	0,29
Resíduo	20	1,40	0,07		
Total	24	1,77			

População 2					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F _{cal}	Valor p
Tratamento	4	7,40	1,85	0,44	0,78
Resíduo	20	84,36	4,22		
Total	24	91,76			

*GL: grau de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F_{cal}: valor calculado para o teste F.

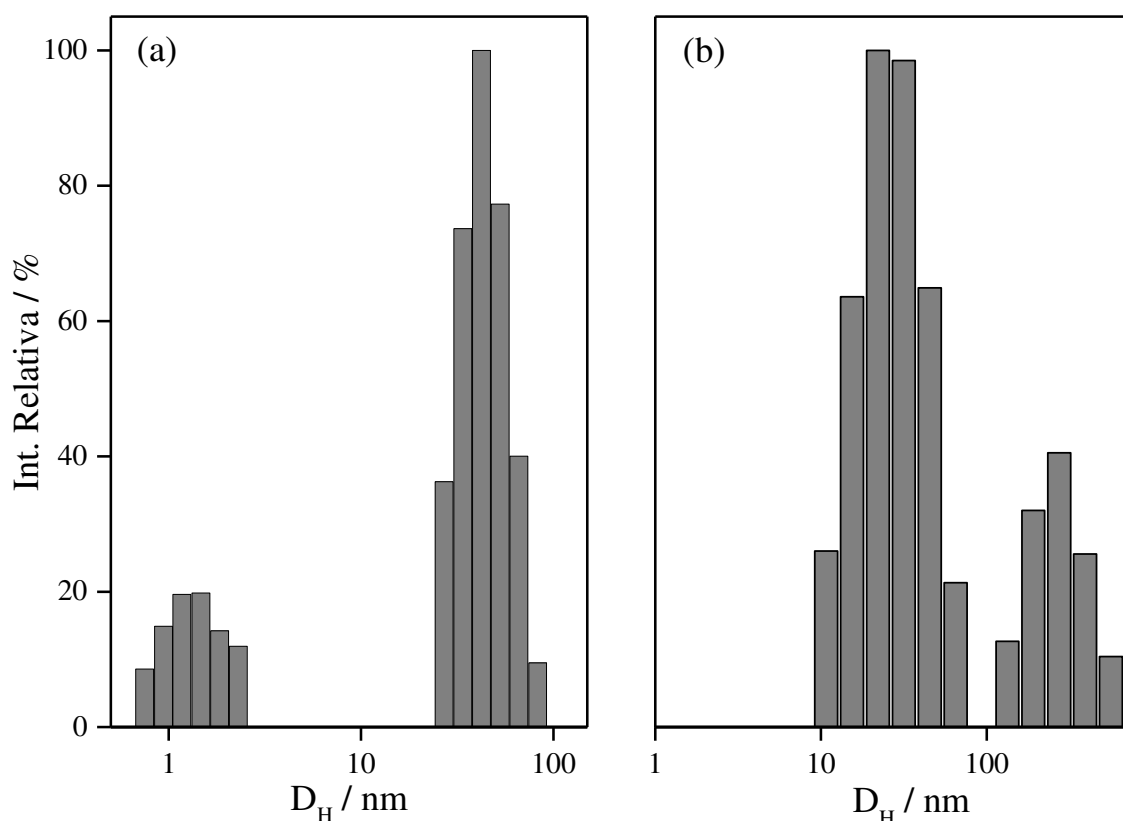
Dessa forma, a otimização estatística do planejamento experimental não foi usada, principalmente, porque se observou que a condição 4 ($[Ag^+] = 0,50 \text{ mmol L}^{-1}$, razão volume de extrato/volume de suspensão = 0,40, $T = 45,00 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\text{pH} = 9,00$) apresentou uma população de partículas com diâmetro hidrodinâmico médio igual a $(1,7 \pm 0,1) \text{ nm}$, o que se encaixa na faixa de tamanhos atribuída a *nanoclusters* ($<2 \text{ nm}$). Portanto, essa condição foi escolhida para ser elucidada (e abreviada para AG4). Logo, as condições de síntese para o planejamento experimental CCD foram utilizadas apenas como experimentos exploratórios. Os diâmetros hidrodinâmicos médios das populações de partículas das condições de síntese testadas estão apresentados na Figura 9.

Figura 9 – Diâmetros hidrodinâmicos médios das populações 1 (a) e 2 (b) de partículas das condições de síntese de NPs Ag testadas.



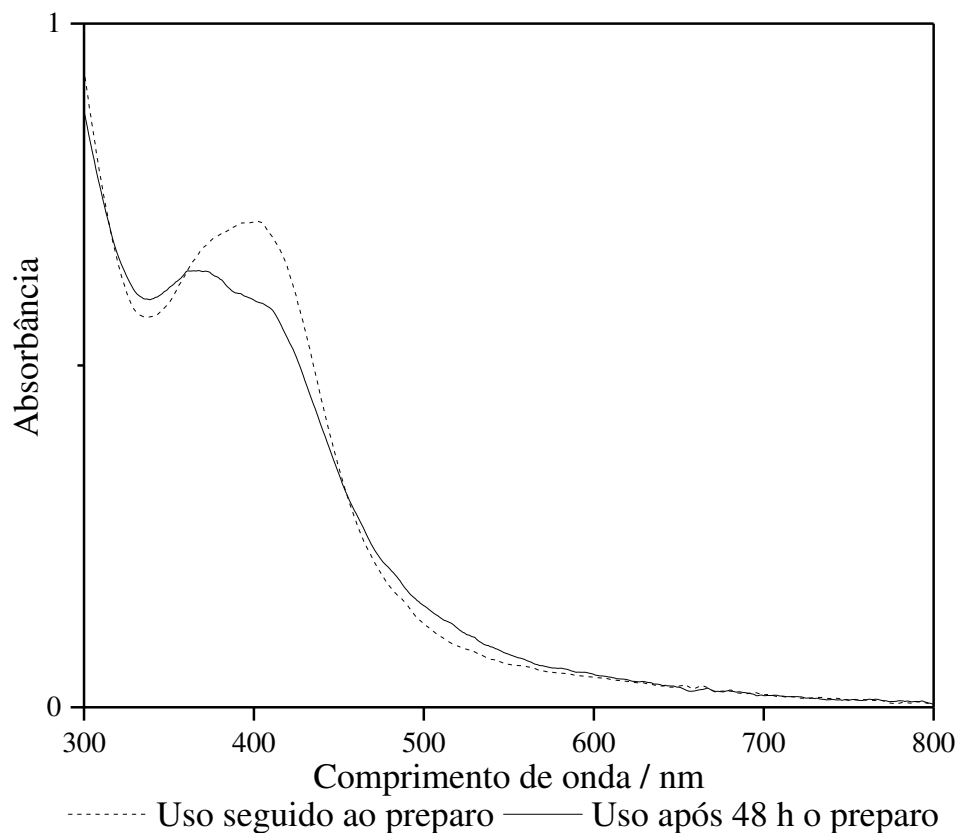
É necessário fazer um adendo quanto ao uso do extrato em relação ao tempo entre o seu preparo e sua utilização, pois se observou que isso influencia as características do produto de síntese. Na Figura 10 se encontram os gráficos de distribuição de tamanhos para a AG4 sintetizada nas condições descritas na seção 4.5 (a), isto é, extrato envelhecido por 48 h, e quando o extrato é utilizado imediatamente após seu preparo, nas mesmas condições 4.5 (b).

Figura 10 – Gráficos de distribuição de tamanhos (D_H) para AG4 sintetizada 48 h (a) e imediatamente (b) após o preparo do extrato.



Pode-se notar que o extrato recém preparado também produziu duas populações de partículas, porém uma com tamanho médio igual a $(23,6 \pm 3,1)$ nm e outra com (280 ± 20) nm. Acredita-se que essa segunda população pode ser referente a algo do extrato. Mas a população com tamanho por volta de 2 nm não é observada. Diferenças também são notadas nos espectros de absorção das suspensões de NPs Ag obtidas, apresentados na Figura 11. Na suspensão de NPs Ag produzida pelo extrato recém preparo pode-se observar somente uma banda com λ_{max} em 402 nm.

Figura 11 – Espectros na região do ultravioleta-vísivel para AG4 sintetizada 48 h e imediatamente após o preparo do extrato.



Como o extrato recém preparado não produziu a população de partículas com tamanho em torno de 2 nm, padronizou-se, então, o uso do extrato para 48 horas após o seu preparo. Salienta-se que todas as condições testadas na Tabela 3 obedeceram a esse critério.

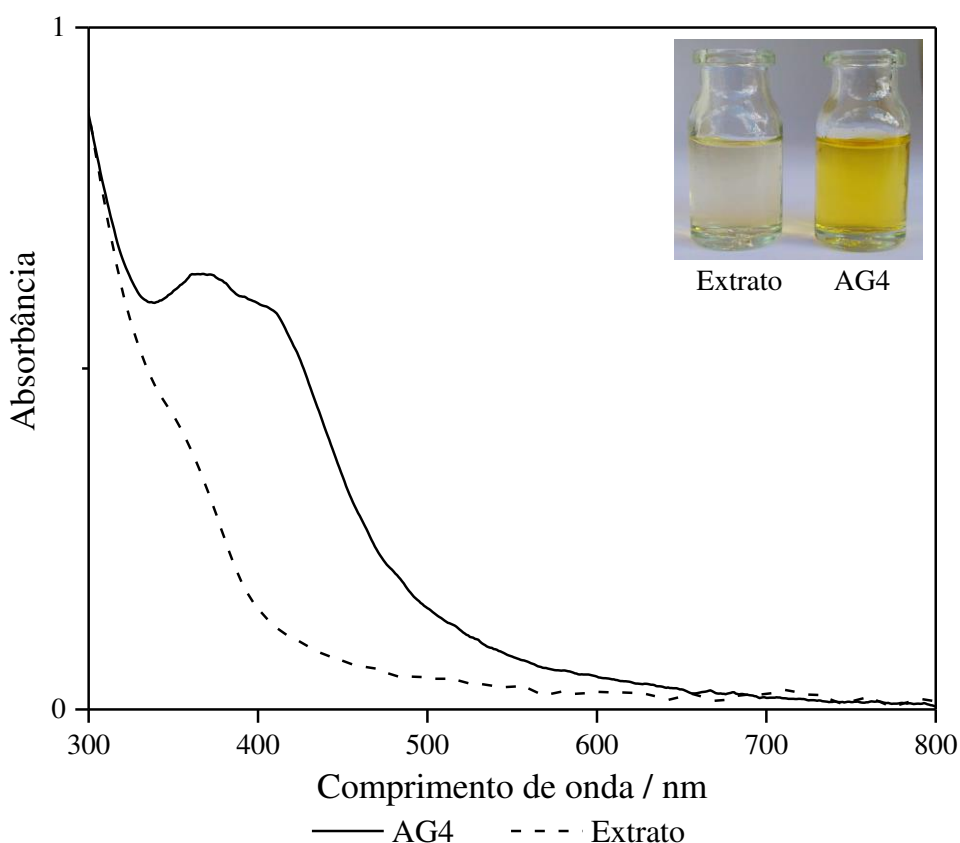
Não foram observadas mudanças no espectro de absorção ou na distribuição de tamanhos de partículas do extrato nesse período, mas como o produto de síntese apresentou características diferentes, pode-se supor que ocorra alguma alteração na composição do extrato durante esse período.

Na Figura 12 podem ser observados o espectro de absorção obtido na região UV-Vis da suspensão AG4 e do extrato vegetal, e uma foto de ambos no inserto. Devido ao fenômeno de LSPR, é possível notar uma banda característica de NPs Ag. Em geral, NPs Ag sintetizadas por extratos vegetais apresentam uma banda com comprimento de onda de máxima de absorção (λ_{max}) entre 400–460 nm (MIKHAILOV; MIKHAILOVA, 2019). Entretanto, neste trabalho, foram observados duas bandas convolutas, uma com λ_{max} em 368 nm e outra em 407 nm, em contraste com os demais trabalhos que investigam outras espécies de eucalipto para a síntese

de NPs Ag: *E. urophylla* – 447 nm, *E. citriodora* – 445 nm, *E. robusta* – 482 nm (MO *et al.*, 2015), *E. corymbia* – 425 nm (SILA *et al.*, 2019), *E. globulus* – 428 nm (ALI *et al.*, 2015; BALAMURUGAN; SARAVANAN, 2017) e *E. macrocarpa* 430 nm (EDDY *et al.*, 2013).

Compostos orgânicos, em especial alquenos, absorvem radiação na região do ultravioleta (<380 nm) (PASSOS *et al.*, 2018). Possivelmente, deve-se a esses compostos a banda observada no espectro do extrato contido na Figura 12. Mas deve-se enfatizar a banda característica de NPs Ag observada no espectro de AG4, o que indica sua formação.

Figura 12 – Espectros na região do ultravioleta-vísivel para AG4 e para o extrato.

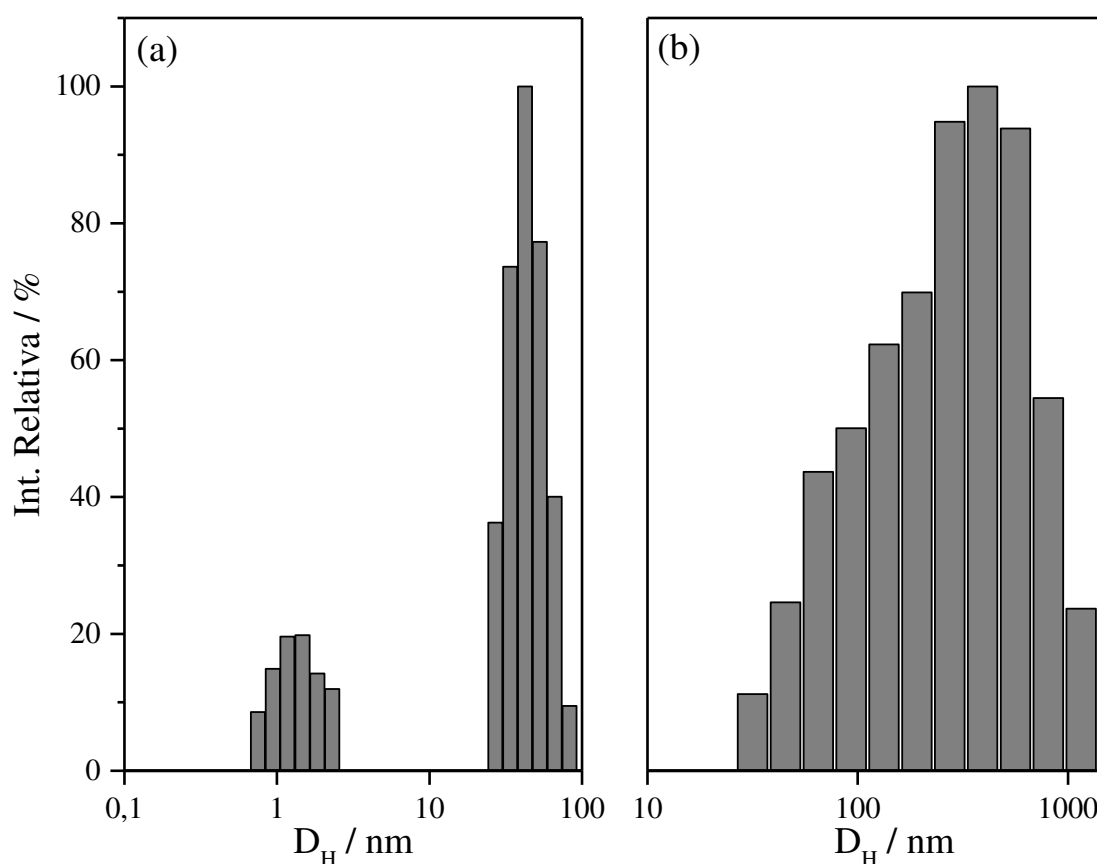


O DLS foi usado para determinar o diâmetro hidrodinâmico das NPs Ag em suspensão. É possível observar na Figura 13 (a), que consta a distribuição de tamanhos de uma das repetições de AG4, duas populações de partículas, uma com diâmetro hidrodinâmico médio igual a: $(1,7 \pm 0,1)$ nm e outra: $(52,9 \pm 14,8)$ nm. Ao passo que o extrato, Figura 13 (b), apresenta uma população com tamanho médio igual a (307 ± 47) nm, de natureza desconhecida. É interessante salientar que em uma das condições de síntese no trabalho de Balamurugan e Saravanan (2017), que utilizou folhas de *E. globulus* para a síntese de NPs Ag, também foi

observada uma população de partículas com tamanho médio em torno de 1 nm, porém os autores não destacaram essa população e afirmaram que o tamanho médio obtido foi igual a 33 nm.

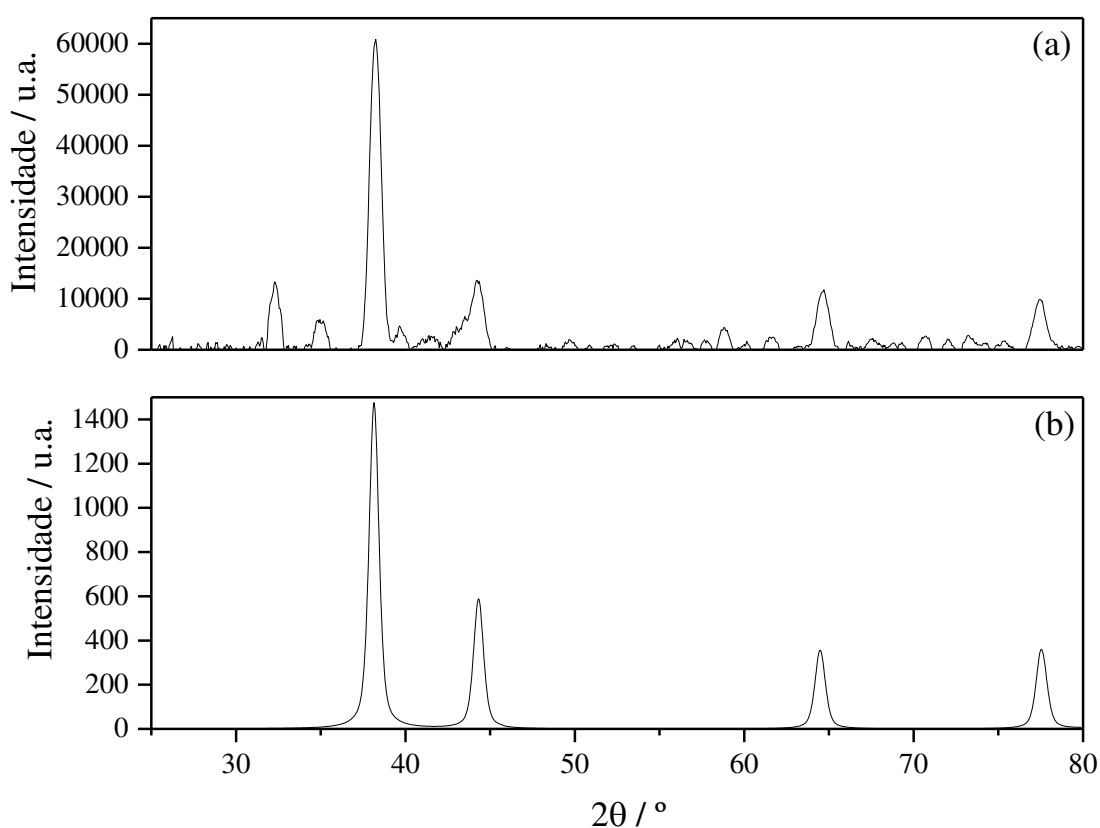
Apesar de ser a técnica mais indicada para a avaliação do tamanho de partículas em sistemas coloidais (RIBEIRO *et al.*, 2018), uma vez que, geralmente, dispensa preparos de amostras que poderiam introduzir artefatos na análise, o resultado fornecido não necessariamente corresponde ao tamanho real das partículas. Isso ocorre, pois, agregados não são distinguidos de seus constituintes e a camada adsorvida à partícula pode aumentar seu tamanho aparente. Assim, é necessário análises por microscopia eletrônica para confirmar e colaborar os resultados do DLS. Além disso, essa comparação entre técnicas deve ser feita de modo cauteloso porque é usual que elas apresentem discrepâncias devido ao preparo de amostras para a microscopia, que pode causar encolhimento e deformação das partículas (ESCOBAR-HERNÁNDEZ; ESCOBAR-REMOLINA, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2018).

Figura 13 – Gráficos de distribuição de tamanhos (D_H) para as AG4 (a) e o extrato (b).



A difração de raios X pode ser utilizada para avaliar a cristalinidade de nanopartículas metálicas (VIJAYARAGHAVAN; ASHOKKUMAR, 2017). No difratograma apresentado na Figura 14 é possível observar picos em 38,25°; 44,20°; 64,70° e 77,45° que correspondem aos respectivos planos cristalinos: (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0) e (3 1 1), de acordo com o padrão JCPDS 89-3722 referente ao sistema cristalino de face centrada da prata. Praticamente todos os trabalhos com NPs Ag reportam esse sistema cristalino (TARANNUM; DIVYA; GAUTAM, 2019).

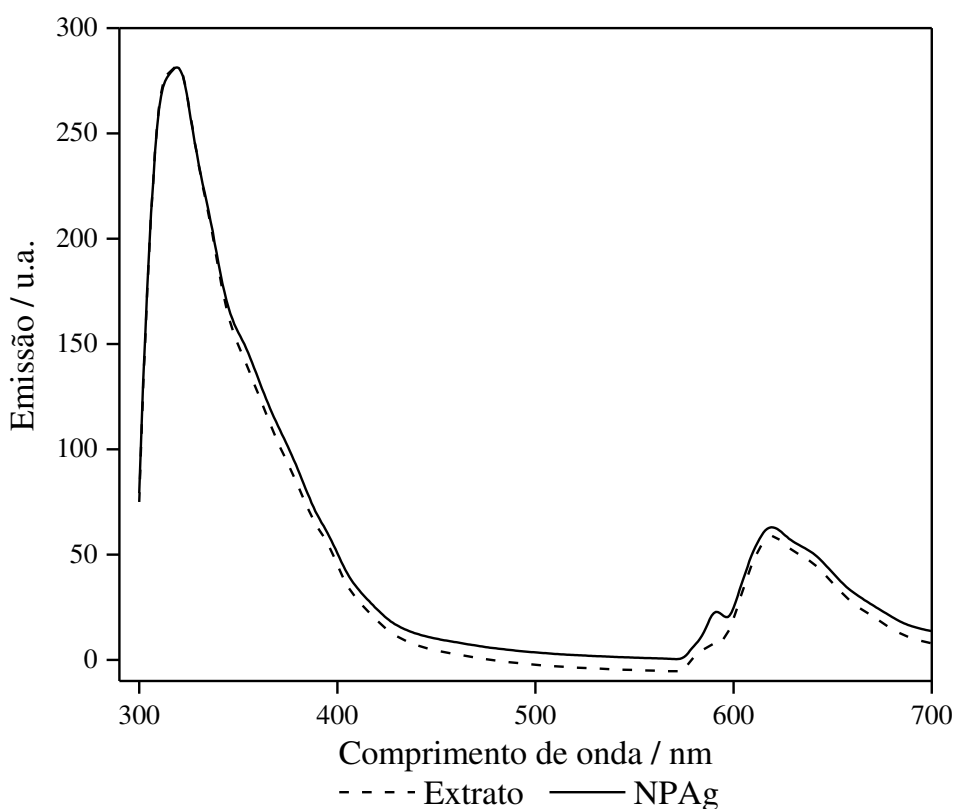
Figura 14 – Difratogramas de AG4 (a) e do padrão de Ag JCPDS 89-3722 (b).



Uma das propriedades que *nanoclusters* de metais nobres apresenta é a fluorescência (XIE *et al.*, 2020). Na Figura 15, é possível observar os espectros de emissão das AG4 e do extrato quando excitados em 293 nm e 292 nm, ambos com máximo de emissão em 319 nm. A semelhança entre os perfis dos espectros indica que a fluorescência observada, provavelmente, se deve ao mesmo composto, o que enfraquece a hipótese de formação de *nanoclusters* no sistema, mas não a descarta. Pois, geralmente, *nanoclusters* não apresentam um alto rendimento quântico (XIE *et al.*, 2020), principalmente *nanoclusteres* com centenas de átomos de prata (CHAKRABORTY *et al.*, 2014), como o tamanho medido por DLS sugere.

Apesar de não ter sido identificado nenhum aminoácido na composição do extrato por CG-MS, provavelmente, a fluorescência observada se deve a aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano), em especial, o triptofano devido aos comprimentos de onda de excitação e emissão observados. Entre AG4 e o extrato vegetal houve o deslocamento de 1 nm no comprimento de onda máximo de excitação, essa ligeira mudança pode indicar alguma alteração no meio em que se encontra esses aminoácidos (LAKOWICZ, 2006), entretanto não é indicativo de que eles, ou proteínas que os possuem, participam do processo de síntese, pois seria esperado observar o fenômeno SEF (LI; LI; AROCA, 2017), o qual intensificaria a intensidade da banda de emissão.

Figura 15 – Espectros de emissão para AG4 e para o extrato, $\lambda_{exc} = 293$ nm e $\lambda_{exc} = 292$ nm.



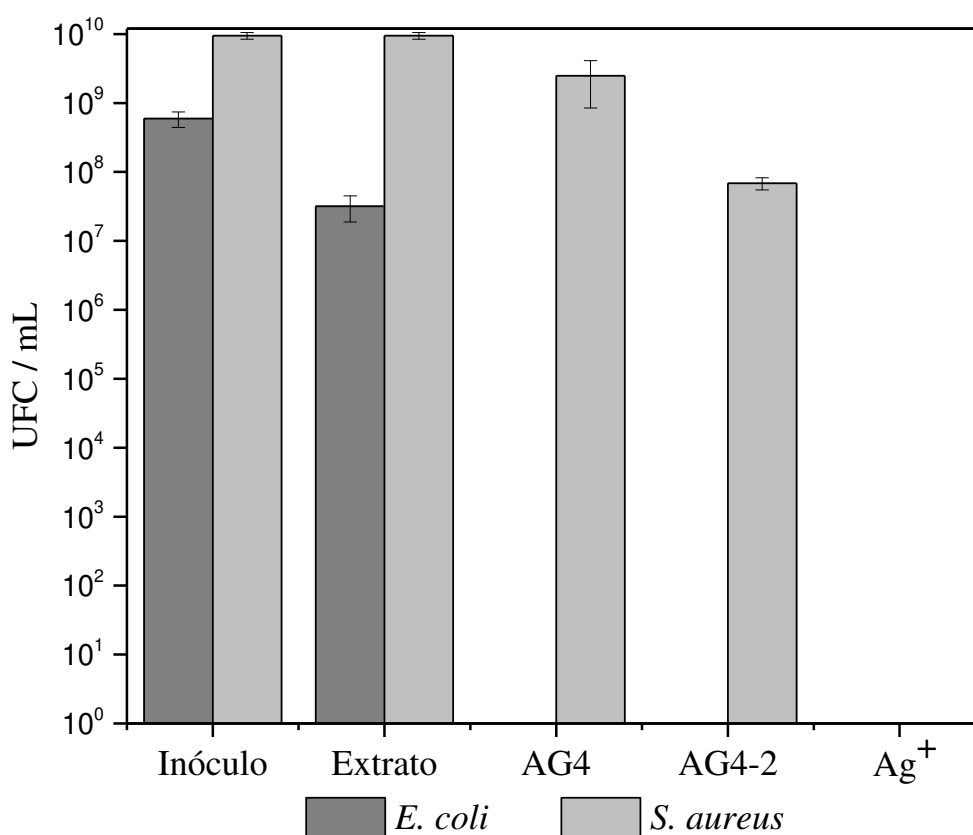
Uma possível explicação para a ausência desses compostos na análise por GC-MS é que a extração de proteínas costuma requerer processos mais laboriosos do que aquele empregado neste trabalho (NIU *et al.*, 2018).

5.3. Atividade antibacteriana das NPs Ag

Uma das principais propriedades de NPs Ag é a atividade antimicrobiana, tanto que, atualmente, é o principal motivo da maioria das aplicações comerciais (SYAFIUDDIN *et al.*,

2017). A fim de avaliar a atividade antibacteriana, foram executados ensaios como descritos na seção 4.7. Duas suspensões de NPs Ag foram utilizadas: a escolhida para caracterização, AG4, e uma outra sintetizada na mesma condição, porém com o dobro da concentração de Ag^+ (AG4-2). A solução de Ag^+ testada possuía a mesma concentração mássica ($53,9 \mu\text{g/mL}$) da utilizada na síntese de NPs Ag. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 16.

Figura 16 – Resultados dos ensaios de atividade antibacteriana para o extrato, AG4, suspensão AG4 sintetizada com o dobro da concentração de prata: AG4-2 e uma solução de nitrato de prata com a mesma concentração de AG4: Ag^+ . Inóculo se refere a população inicial.



É possível notar que o extrato apresentou pouca atividade antibacteriana para *E. coli*, a população foi reduzida em cerca de 5,4%, ao passo que não apresentou atividade alguma para a *S. aureus*. Ambas suspensões de NPs Ag foram capazes de inibir o crescimento de *E. coli*, entretanto para o patógeno *S. aureus* houve uma resposta dependente da concentração de prata utilizada na síntese da suspensão, quanto maior a concentração, maior foi a inibição, aproximadamente 2,6% para AG4 e 7,2% para AG4-2.

Provavelmente, a resposta observada se deve as características da parede celular de cada tipo de bactéria. A *E. coli*, por ser uma bactéria Gram-negativa, apresenta uma parede celular

menos espessa que a *S. aureus*, bactéria Gram-positiva. A espessura da parede celular confere proteção contra agentes antimicrobianos, em especial, nanopartículas metálicas (SLAVIN *et al.*, 2017). Assim, *S. aureus* foi capaz de crescer mesmo sob os efeitos das NPs Ag testadas.

Entretanto, é interessante notar que a solução de Ag^+ foi eficiente contra ambas bactérias, o que corrobora a hipótese de que o mecanismo da atividade antibacteriana de NPs Ag passa por uma etapa de liberação de íons Ag^+ (LE OUAY; STELLACCI, 2015).

Os resultados obtidos neste trabalho foram diferentes aos obtidos por ALI *et al.* (2015), que utilizaram um extrato da folha de *E. globulus* para a síntese de NPs Ag. Os autores também encontraram uma relação de dependência entre a concentração utilizada e a atividade antibacteriana. Porém, os autores encontraram que a *S. aureus* foi mais suscetível ao efeito das NPs Ag do que *E. coli*, isto é, 27 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de impedir o crescimento no caso da bactéria Gram-positiva, contra 36 $\mu\text{g/mL}$ para Gram-negativa. Talvez isso esteja relacionado ao fato de que o processo de síntese utilizado foi assistido por micro-ondas e, com isso, foi possível obter partículas com menores tamanhos (5-25 nm). Sabe-se que um tamanho menor colabora para a atividade antibacteriana (LIAO; LI; TJONG, 2019).

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados expostos, pode-se concluir que foram obtidas NPs Ag a partir de um processo que emprega o extrato aquoso da folha de *E. grandis*. As nanopartículas obtidas apresentam atividade antibacteriana pronunciada para *E. coli*, sendo um potencial agente antibacteriano contra essa espécie.

Assim, pode-se utilizar as folhas de *E. grandis* para obtenção de um produto com valor agregado, o que, em geral, confere uma aplicação mais nobre a um resíduo vegetal. Tal resíduo, quando utilizado, destina-se somente à obtenção de óleo essencial. Além disso, o processo empregado nesse trabalho se alinha a alguns princípios da química verde, por exemplo, o uso da água como solvente e matéria-prima renovável. E apresenta potencial de ser economicamente viável.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Propõe-se que em trabalhos futuros sejam realizadas as seguintes atividades:

- Obter imagens por microscopia eletrônica de transmissão das NPs Ag sintetizadas;
- Separar as populações de partículas e caracterizá-las individualmente;
- Investigar as alterações sofridas pelo extrato durante o período que permanece armazenado;
- Testar a atividade das NPs Ag sintetizadas contra cepas patogênicas de *E. coli*.

REFERÊNCIAS

- ABOU EL-NOUR, K. M. M.; EFTAIHA, A.; AL-WARTHAN, A.; AMMAR, R. A. A. Synthesis and applications of silver nanoparticles. **Arabian Journal of Chemistry**, vol. 3, no. 3, p. 135–140, 2010.
- AHMED, S.; AHMAD, M.; SWAMI, B. L.; IKRAM, S. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. **Journal of Advanced Research**, vol. 7, no. 1, p. 17–28, 2016.
- AIT-AMIR, B.; POUGNET, P.; EL HAMI, A. Meta-Model Development. *In*: EL HAMI, A.; POUGNET, P. B. T.-E. M. S. 2 (eds.). **Embedded Mechatronic Systems 2**. [S. l.]: Elsevier, 2015. p. 151–179.
- AKHTAR, M. S.; PANWAR, J.; YUN, Y. S. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, vol. 1, no. 6, p. 591–602, 2013.
- ALI, K.; AHMED, B.; DWIVEDI, S.; SAQUIB, Q.; AL-KHEDHAIRY, A. A.; MUSARRAT, J. Microwave Accelerated Green Synthesis of Stable Silver Nanoparticles with Eucalyptus globulus Leaf Extract and Their Antibacterial and Antibiofilm Activity on Clinical Isolates. **PLOS ONE**, vol. 10, no. 7, p. e0131178, 2015.
- ALSHEHRI, A. H.; JAKUBOWSKA, M.; MŁOŻNIAK, A.; HORACZEK, M.; RUDKA, D.; FREE, C.; CAREY, J. D. Enhanced Electrical Conductivity of Silver Nanoparticles for High Frequency Electronic Applications. **ACS Applied Materials & Interfaces**, vol. 4, no. 12, p. 7007–7010, 2012.
- ARVIZO, R. R.; BHATTACHARYYA, S.; KUDGUS, R. A.; GIRI, K.; BHATTACHARYA, R.; MUKHERJEE, P. Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future. **Chemical Society Reviews**, vol. 41, no. 7, p. 2943–2970, 2012.
- BALAMURUGAN, M.; SARAVANAN, S. Green Synthesis of Silver Nanoparticles by using Eucalyptus Globulus Leaf Extract. **Journal of The Institution of Engineers (India): Series A**, vol. 98, no. 4, p. 461–467, 2017.
- BARBOSA, L. C.; FILOMENO, C. A.; TEIXEIRA, R. R. Chemical Variability and Biological Activities of Eucalyptus spp. Essential Oils. **Molecules**, vol. 21, no. 12, 2016.

- CHAKRABORTY, I.; ERUSAPPAN, J.; GOVINDARAJAN, A.; SUGI, K. S.; UDAYABHASKARARAO, T.; GHOSH, A.; PRADEEP, T. Emergence of metallicity in silver clusters in the 150 atom regime: A study of differently sized silver clusters. **Nanoscale**, vol. 6, no. 14, p. 8024–8031, 2014.
- CHOW, E. K.-H.; HO, D. Cancer Nanomedicine: From Drug Delivery to Imaging. **Science Translational Medicine**, vol. 5, no. 216, p. 216rv4 LP-216rv4, 2013.
- ČUBOVÁ, K.; ČUBA, V. Synthesis of inorganic nanoparticles by ionizing radiation – a review. **Radiation Physics and Chemistry**, vol. 158, p. 153–164, 2019.
- DÍEZ, I.; RAS, R. H. A. Fluorescent silver nanoclusters. **Nanoscale**, vol. 3, no. 5, p. 1963–1970, 2011.
- DONG, X.-Y.; GAO, Z.-W.; YANG, K.-F.; ZHANG, W.-Q.; XU, L.-W. Nanosilver as a new generation of silver catalysts in organic transformations for efficient synthesis of fine chemicals. **Catalysis Science & Technology**, vol. 5, no. 5, p. 2554–2574, 2015.
- DOUGHTY, H. W. MOHR'S METHOD FOR THE DETERMINATION OF SILVER AND HALOGENS IN OTHER THAN NEUTRAL SOLUTIONS. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 46, no. 12, p. 2707–2709, 1924.
- DREADEN, E. C.; ALKILANY, A. M.; HUANG, X.; MURPHY, C. J.; EL-SAYED, M. A. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. **Chem. Soc. Rev.**, vol. 41, no. 7, p. 2740–2779, 2012.
- EASTOE, J.; HOLLAMBY, M. J.; HUDSON, L. Recent advances in nanoparticle synthesis with reversed micelles. **Advances in Colloid and Interface Science**, vol. 128–130, p. 5–15, 2006.
- EDDY, G.; POINERN, J.; CHAPMAN, P.; SHAH, M.; FAWCETT, D. Green biosynthesis of silver nanocubes using the leaf extracts from *Eucalyptus macrocarpa*. **Nano Bulletin**, vol. 2, no. 1, p. 1–7, 2013. .
- ELFASSY, E.; MASTAI, Y.; SALOMON, A. Cysteine sensing by plasmons of silver nanocubes. **Journal of Solid State Chemistry**, vol. 241, p. 110–114, 2016.
- ESCOBAR-HERNÁNDEZ, J. M. A.; ESCOBAR-REMOLINA, J. C. M. Nano-Structures & Nano-Objects Silver nanoparticles : Synthesis and mathematical-geometric formulation.

Nano-Structures & Nano-Objects, vol. 17, p. 259–268, 2019.

FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. Identification of new hydroxy fatty acids and ferulic acid esters in the wood of *Eucalyptus globulus*. **Holzforschung**, vol. 56, no. 2, p. 143–149, 2002.

FU, Y.; ZHANG, J.; LAKOWICZ, J. R. Reduced Blinking and Long-Lasting Fluorescence of Single Fluorophores Coupling to Silver Nanoparticles. **Langmuir**, vol. 24, no. 7, p. 3429–3433, 2008.

GAHLAWAT, G.; CHOUDHURY, A. R. A review on the biosynthesis of metal and metal salt nanoparticles by microbes. **RSC Advances**, , p. 12944–12967, 2019.

GONZÁLEZ FÁ, A.; PIGNANELLI, F.; LÓPEZ-CORRAL, I.; FACCIO, R.; JUAN, A.; DI NEZIO, M. S. Detection of oxytetracycline in honey using SERS on silver nanoparticles. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, vol. 121, p. 115673, 2019.

GRUBBS, R. B. Roles of polymer ligands in nanoparticle stabilization. **Polymer Reviews**, vol. 47, no. 2, p. 197–215, 2007.

GU, M.; ZHANG, Q.; LAMON, S. Nanomaterials for optical data storage. **Nature Reviews Materials**, vol. 1, no. 12, p. 16070, 2016.

HEBBALALU, D.; LALLEY, J.; NADAGOUDA, M. N.; VARMA, R. S. Greener Techniques for the Synthesis of Silver Nanoparticles Using Plant Extracts, Enzymes, Bacteria, Biodegradable Polymers, and Microwaves. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, vol. 1, no. 7, p. 703–712, 2013.

ISIDOROV, V. A.; RUSAK, M.; SZCZEPANIAK, L.; WITKOWSKI, S. Gas chromatographic retention indices of trimethylsilyl derivatives of mono- and diglycerides on capillary columns with non-polar stationary phases. **Journal of Chromatography A**, vol. 1166, no. 1–2, p. 207–211, 2007.

ISIDOROV, Valery A.; LECH, P.; ŻÓŁCIAK, A.; RUSAK, M.; SZCZEPANIAK, L. Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of metabolites from the needles and roots of pine seedlings at early stages of pathogenic fungi *Armillaria ostoyae* attack. **Trees - Structure and Function**, vol. 22, no. 4, p. 531–542, 2008.

JAIN, S.; MEHATA, M. S. Medicinal Plant Leaf Extract and Pure Flavonoid Mediated Green

Synthesis of Silver Nanoparticles and their Enhanced Antibacterial Property. **Scientific Reports**, vol. 7, no. 1, p. 1–13, 2017.

JOHN XAVIER, S. S.; KARTHIKEYAN, C.; GNANA KUMAR, G.; KIM, A. R.; YOO, D. J. Colorimetric detection of melamine using β -cyclodextrin-functionalized silver nanoparticles. **Analytical Methods**, vol. 6, no. 20, p. 8165–8172, 2014.

KANG, H.; BUCHMAN, J. T.; RODRIGUEZ, R. S.; RING, H. L.; HE, J.; BANTZ, K. C.; HAYNES, C. L. Stabilization of Silver and Gold Nanoparticles: Preservation and Improvement of Plasmonic Functionalities. **Chemical Reviews**, vol. 119, no. 1, p. 664–699, 2019.

LAKOWICZ, J. R. Protein Fluorescence. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Boston, MA: Springer US, 2006. p. 529–575.

LE OUAY, B.; STELLACCI, F. Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. **Nano Today**, vol. 10, no. 3, p. 339–354, 2015.

LI, J. F.; LI, C. Y.; AROCA, R. F. Plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy. **Chemical Society Reviews**, vol. 46, no. 13, p. 3962–3979, 2017.

LIAO, C.; LI, Y.; TJONG, S. Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 20, no. 2, p. 449, 2019.

LOHSE, S. E.; BURROWS, N. D.; SCARABELLI, L.; LIZ-MARZÁN, L. M.; MURPHY, C. J. Anisotropic Noble Metal Nanocrystal Growth: The Role of Halides. **Chemistry of Materials**, vol. 26, no. 1, p. 34–43, 2014.

LOISEAU, A.; ASILA, V.; BOITEL-AULLEN, G.; LAM, M.; SALMAIN, M.; BOUJDAY, S. Silver-Based Plasmonic Nanoparticles for and Their Use in Biosensing. **Biosensors**, vol. 9, no. 2, p. 78, 2019.

MAKAROV, V. V.; LOVE, A. J.; SINITSYNA, O. V.; MAKAROVA, S. S.; YAMINSKY, I. V.; TALIANSKY, M. E.; KALININA, N. O. “Green” nanotechnologies: synthesis of metal nanoparticles using plants. **Acta naturae**, vol. 6, no. 1, p. 35–44, 2014.

MALLIKA, P.; ASOK, T.; FAISAL, H.; AZIZ, S.; TAN, A.; INTAN, G. Neonatal conjunctivitis - a review. **Malaysian family physician : the official journal of the Academy of Family Physicians of Malaysia**, vol. 3, no. 2, p. 77–81, 2008.

- MASHWANI, Z. ur R.; KHAN, M. A.; KHAN, T.; NADHMAN, A. Applications of plant terpenoids in the synthesis of colloidal silver nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, vol. 234, p. 132–141, 2016.
- MEDDERS, G. R.; PAESANI, F. Infrared and Raman Spectroscopy of Liquid Water through “First-Principles” Many-Body Molecular Dynamics. **Journal of Chemical Theory and Computation**, vol. 11, no. 3, p. 1145–1154, 2015.
- MIKHAILOV, O. V.; MIKHAILOVA, E. O. Elemental silver nanoparticles: Biosynthesis and bio applications. **Materials**, vol. 12, no. 19, 2019.
- MO, Y.; TANG, Y.; WANG, S.; LIN, J.; ZHANG, H.; LUO, D. Green synthesis of silver nanoparticles using eucalyptus leaf extract. **Materials Letters**, vol. 144, p. 165–167, 2015.
- MYERS, D. Colloids and Colloidal Stability. **Surfaces, Interfaces, and Colloids**. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2003. vol. 4, p. 214–252.
- NIU, L.; YUAN, H.; GONG, F.; WU, X.; WANG, W. Protein Extraction Methods Shape Much of the Extracted Proteomes. **Frontiers in Plant Science**, vol. 9, p. 802, 2018.
- PASSOS, M. L. C.; SARRAGUÇA, M. C.; SARAIVA, M. L. M. F. S.; PRASADA RAO, T.; BIJU, V. M. Organic Compounds. *In*: WORSFOLD, P.; POOLE, C.; TOWNSHEND, A.; MIRÓ, M. B. T.-E. of A. S. (Third E. (eds.). **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. Oxford: Elsevier, 2018. p. 236–243.
- RIBEIRO, L. N. D. M.; COUTO, V. M.; FRACETO, L. F.; DE PAULA, E. Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids. **Scientific Reports**, vol. 8, no. 1, p. 1–8, 2018.
- ROY, A.; BULUT, O.; SOME, S.; MANDAL, A. K.; YILMAZ, M. D. Green synthesis of silver nanoparticles: Biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. **RSC Advances**, vol. 9, no. 5, p. 2673–2702, 2019.
- RYCENGA, M.; COBLEY, C. M.; ZENG, J.; LI, W.; MORAN, C. H.; ZHANG, Q.; QIN, D.; XIA, Y. Controlling the Synthesis and Assembly of Silver Nanostructures for Plasmonic Applications. **Chemical Reviews**, vol. 111, no. 6, p. 3669–3712, 2011.
- SALEHI, B.; SHARIFI-RAD, J.; QUISPE, C.; LLAIQUE, H.; VILLALOBOS, M.; SMERIGLIO, A.; TROMBETTA, D.; EZZAT, S. M.; SALEM, M. A.; ZAYED, A.;

SALGADO CASTILLO, C. M.; YAZDI, S. E.; SEN, S.; ACHARYA, K.; SHAROPOV, F.; MARTINS, N. Insights into Eucalyptus genus chemical constituents, biological activities and health-promoting effects. **Trends in Food Science & Technology**, vol. 91, p. 609–624, 2019.

SCHWARTZBERG, A. M.; ZHANG, J. Z. Novel Optical Properties and Emerging Applications of Metal Nanostructures.pdf. **J. Phys. Chem. C.**, vol. 112, no. 28, 2008.

SILA, M. J.; NYAMBURA, M. I.; ABONG'O, D. A.; MWAURA, F. B.; IWUOHA, E. Biosynthesis of Silver Nanoparticles from *Eucalyptus corymbia* Leaf Extract at Optimized Conditions. **Nano Hybrids and Composites**, vol. 25, p. 32–45, 2019.

SLAVIN, Y. N.; ASNIS, J.; HÄFELI, U. O.; BACH, H. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. **Journal of Nanobiotechnology**, vol. 15, no. 1, p. 65, 2017.

SYAFIUDDIN, A.; SALMIATI; SALIM, M. R.; BENG HONG KUEH, A.; HADIBARATA, T.; NUR, H. A Review of Silver Nanoparticles: Research Trends, Global Consumption, Synthesis, Properties, and Future Challenges. **Journal of the Chinese Chemical Society**, vol. 64, no. 7, p. 732–756, 2017.

TARANNUM, N.; DIVYA; GAUTAM, Y. K. Facile green synthesis and applications of silver nanoparticles: A state-of-the-art review. **RSC Advances**, vol. 9, no. 60, p. 34926–34948, 2019.

TUTAJ, K.; SZLAZAK, R.; SZALAPATA, K.; STARZYK, J.; LUCHOWSKI, R.; GRUDZINSKI, W.; OSINSKA-JAROSZUK, M.; JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; SZUSTER-CIESIELSKA, A.; GRUSZECKI, W. I. Amphotericin B-silver hybrid nanoparticles: synthesis, properties and antifungal activity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, vol. 12, no. 4, p. 1095–1103, 2016.

VIJAYARAGHAVAN, K.; ASHOKKUMAR, T. Plant-mediated biosynthesis of metallic nanoparticles: A review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, vol. 5, no. 5, p. 4866–4883, 2017.

WILLETS, K. A.; VAN DUYNE, R. P. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. **Annual Review of Physical Chemistry**, vol. 58, no. 1, p. 267–297, 2007.

XIA, X.; ZENG, J.; OETJEN, L. K.; LI, Q.; XIA, Y. Quantitative Analysis of the Role Played

by Poly(vinylpyrrolidone) in Seed-Mediated Growth of Ag Nanocrystals. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 134, no. 3, p. 1793–1801, 2012.

XIE, Y. P.; SHEN, Y. L.; DUAN, G. X.; HAN, J.; ZHANG, L. P.; LU, X. Silver nanoclusters: Synthesis, structures and photoluminescence. **Materials Chemistry Frontiers**, vol. 4, no. 8, p. 2205–2222, 2020.

XIONG, Y.; LU, X. **Metallic nanostructures: From controlled synthesis to applications**. Cham: Springer International Publishing, 2015.

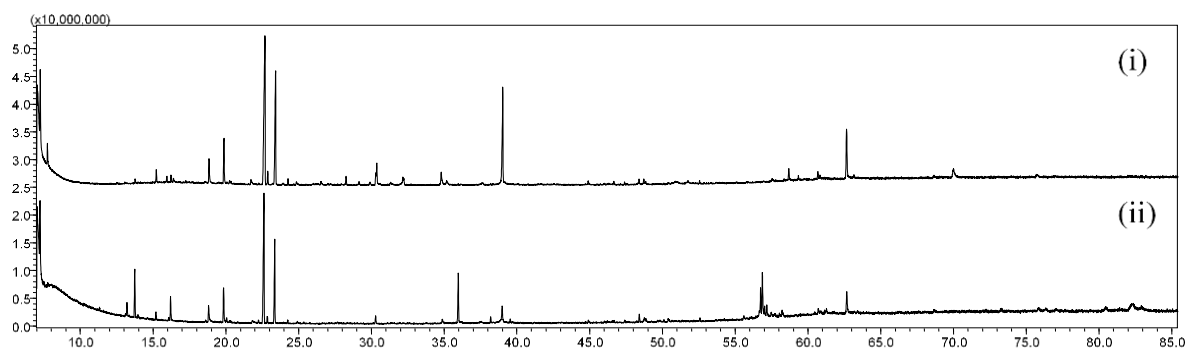
XU, G.; LIN, G.; LIN, S.; WU, N.; DENG, Y.; FENG, G.; CHEN, Q.; QU, J.; CHEN, D.; CHEN, S.; NIU, H.; MEI, S.; YONG, K. T.; WANG, X. Biosensing with plasmonic nanosensors. **Nature materials**, vol. 7, no. June, p. 442–453, 2008.

YANG, J.; JIN, R. New Advances in Atomically Precise Silver Nanoclusters. **ACS Materials Letters**, vol. 1, no. 4, p. 482–489, 2019.

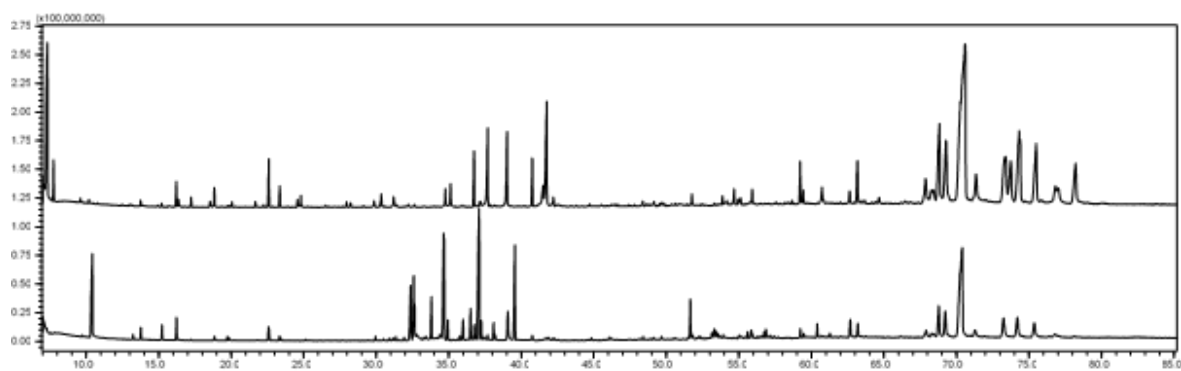
ZHANG, H.; HUANG, Y.; GU, J.; KELLER, A.; QIN, Y.; BIAN, Y.; TANG, K.; QU, X.; JI, R.; ZHAO, L. Single particle ICP-MS and GC-MS provide a new insight into the formation mechanisms during the green synthesis of AgNPs. **New Journal of Chemistry**, vol. 43, no. 9, p. 3946–3955, 2019.

ZHANG, L.; WANG, E. Metal nanoclusters: New fluorescent probes for sensors and bioimaging. **Nano Today**, vol. 9, no. 1, p. 132–157, 2014.

APÊNDICE A – Cromatogramas



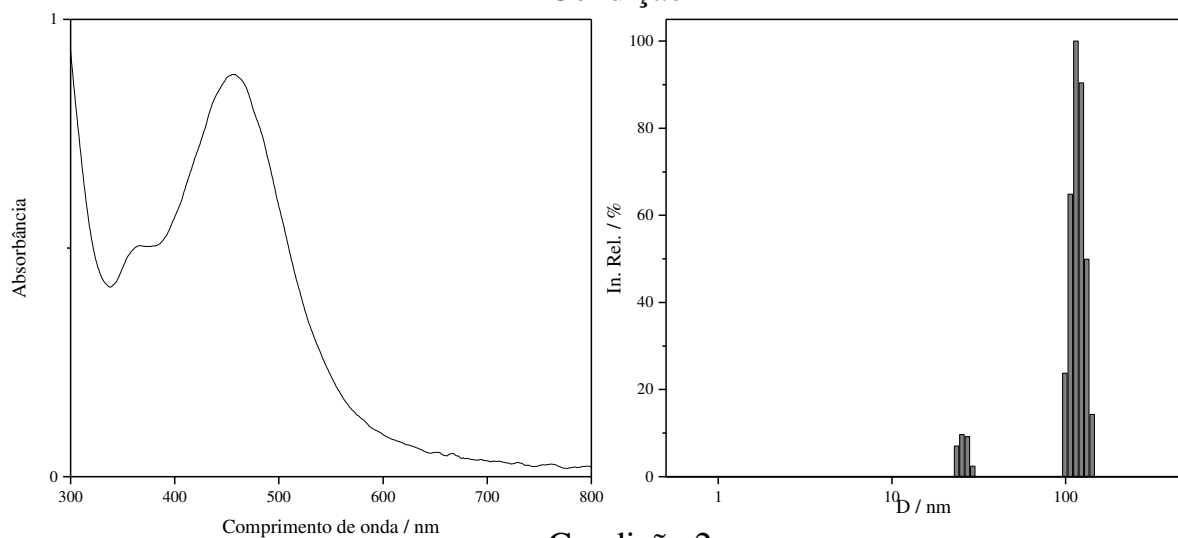
Cromatograma de íons totais da extração líquido-líquido do extrato aquoso de *E. grandis* com acetato de etila, (i) derivatizado e (ii) hidrolisado e derivatizado.



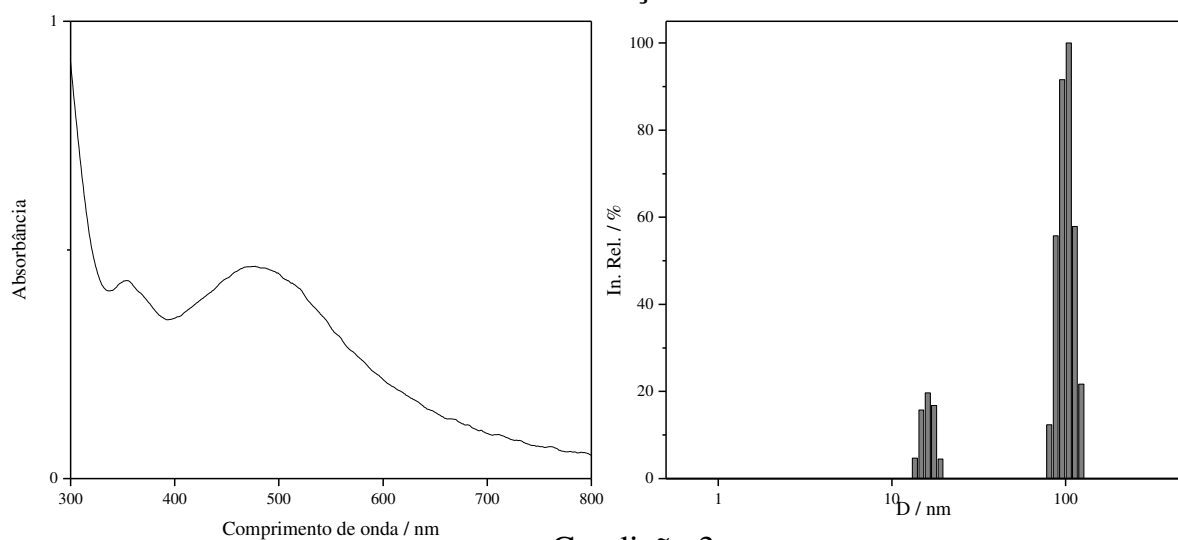
Cromatograma de íons totais do extrato em metanol das folhas de *E. grandis*, (i) derivatizado e (ii) hidrolisado e derivatizado.

APÊNDICE B – Espectros de absorção e gráficos de distribuição de tamanhos das diferentes condições utilizadas na síntese de NPs Ag

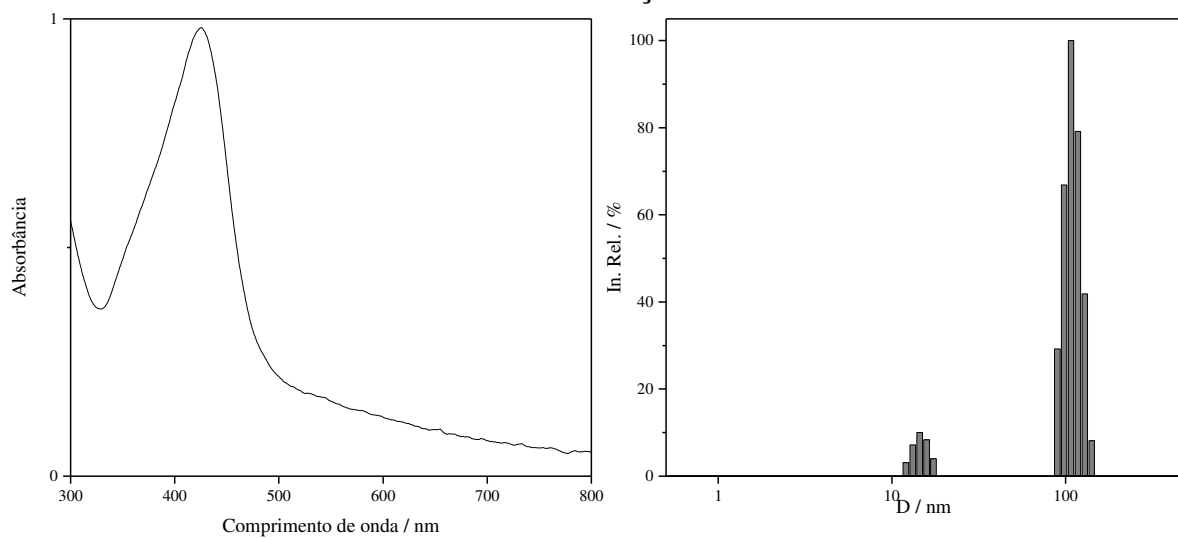
Condição 1



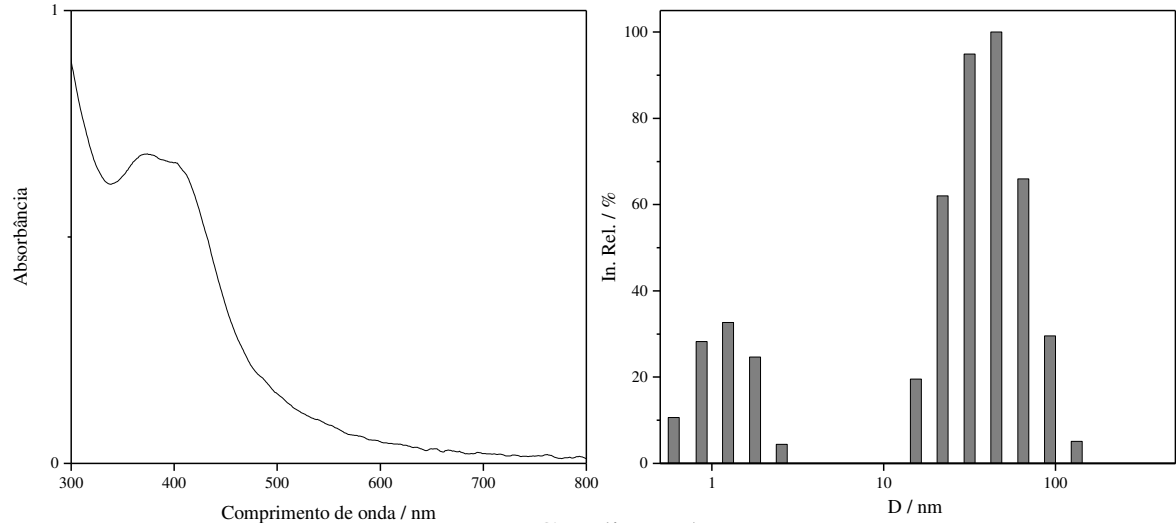
Condição 2



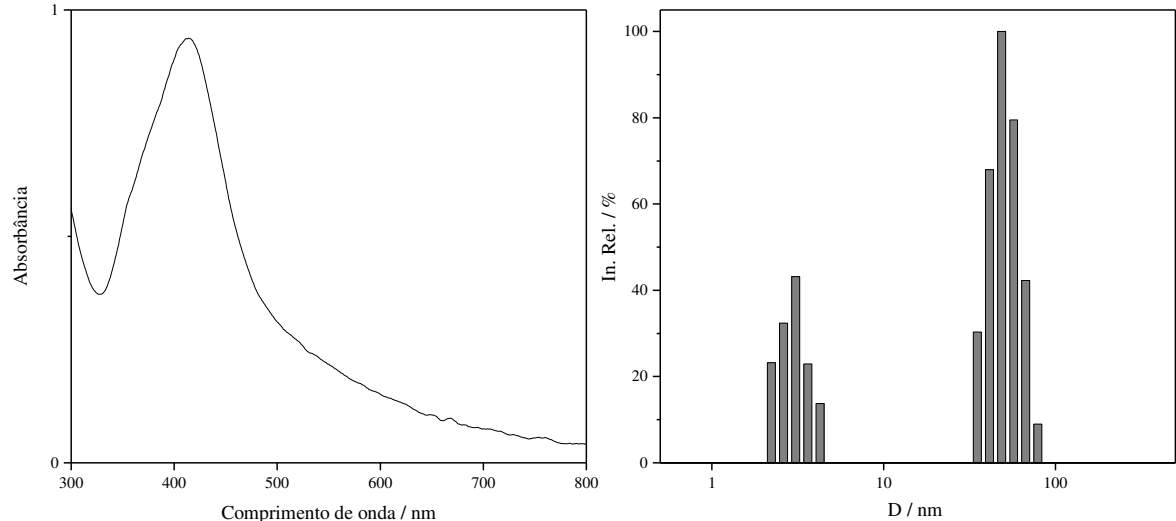
Condição 3



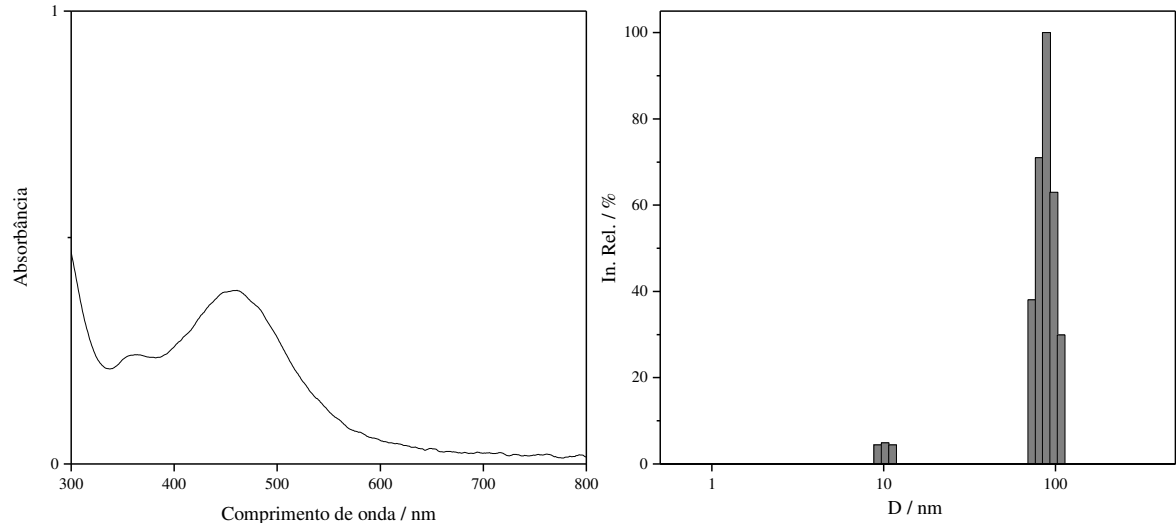
Condição 4



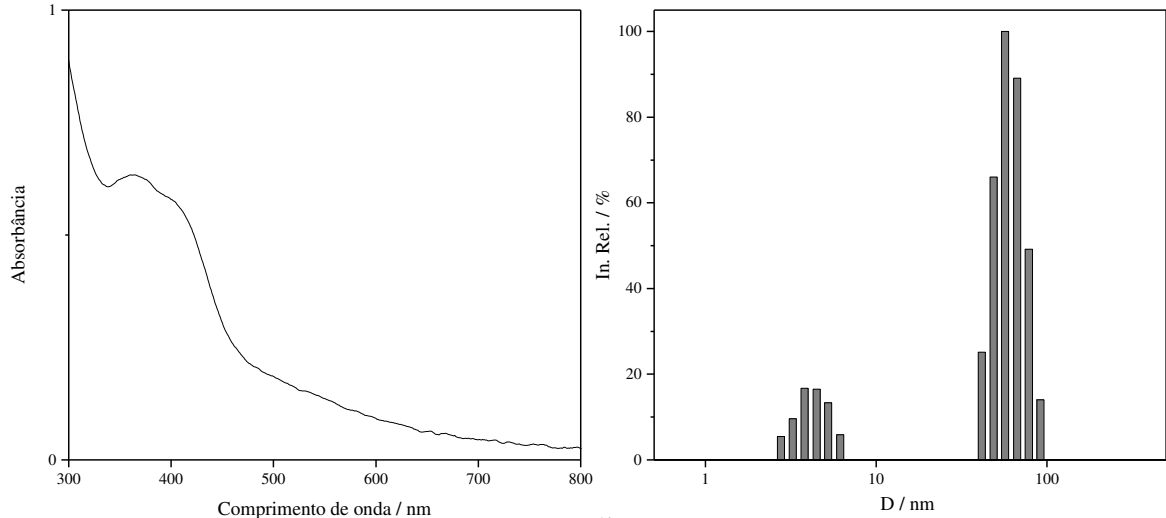
Condição 5



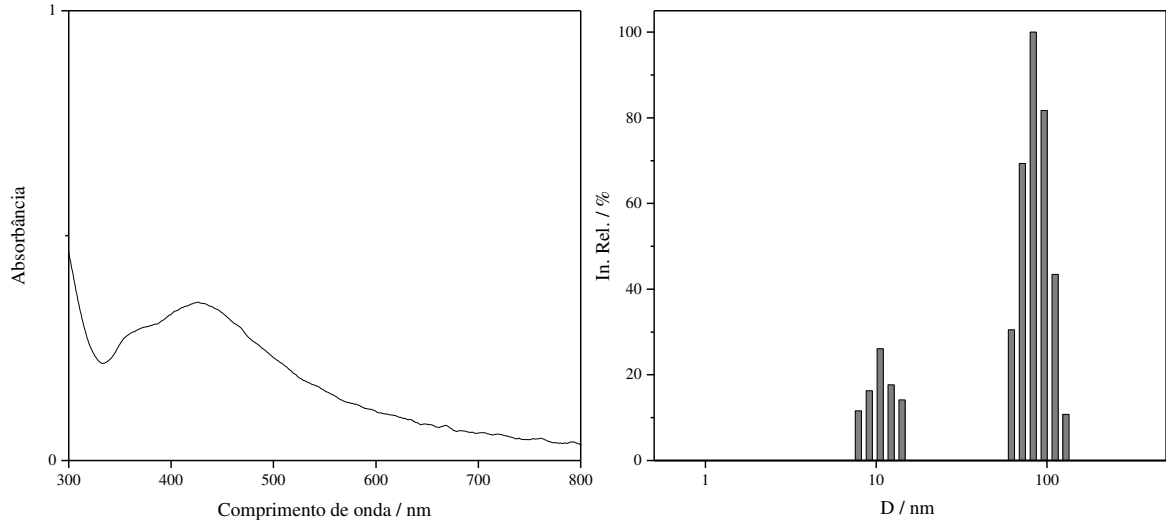
Condição 6



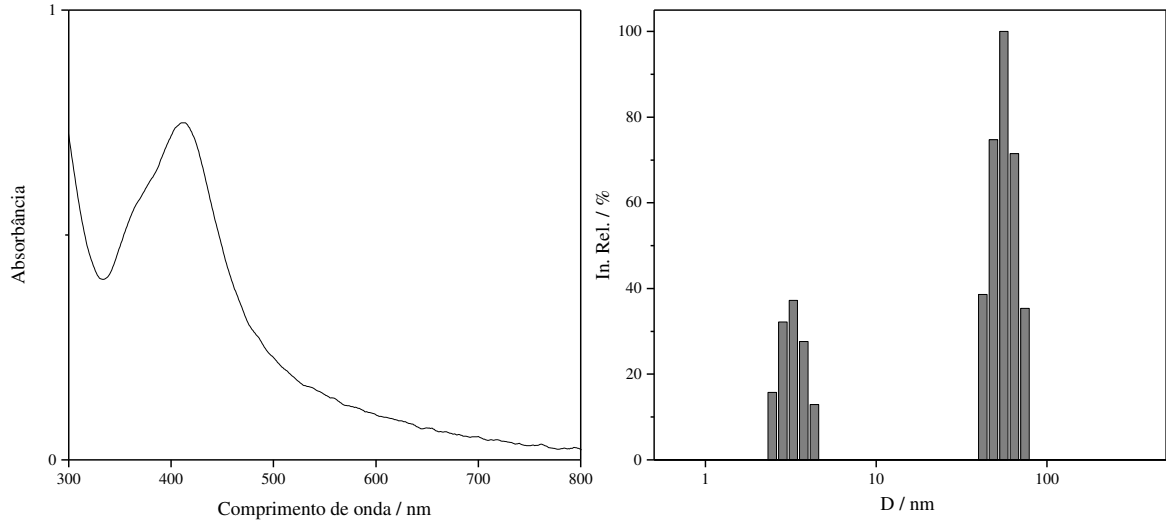
Condição 7



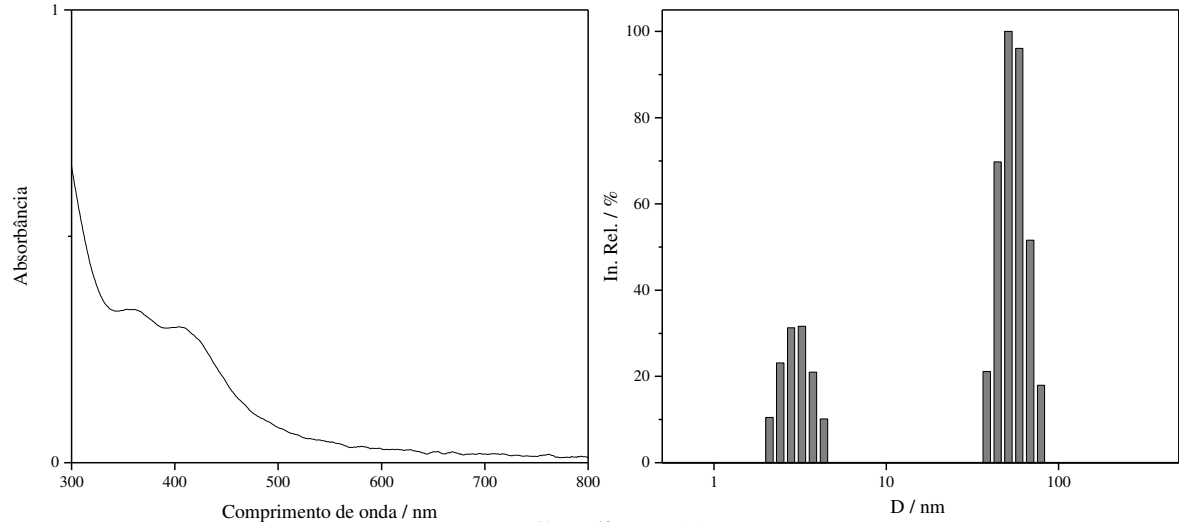
Condição 8



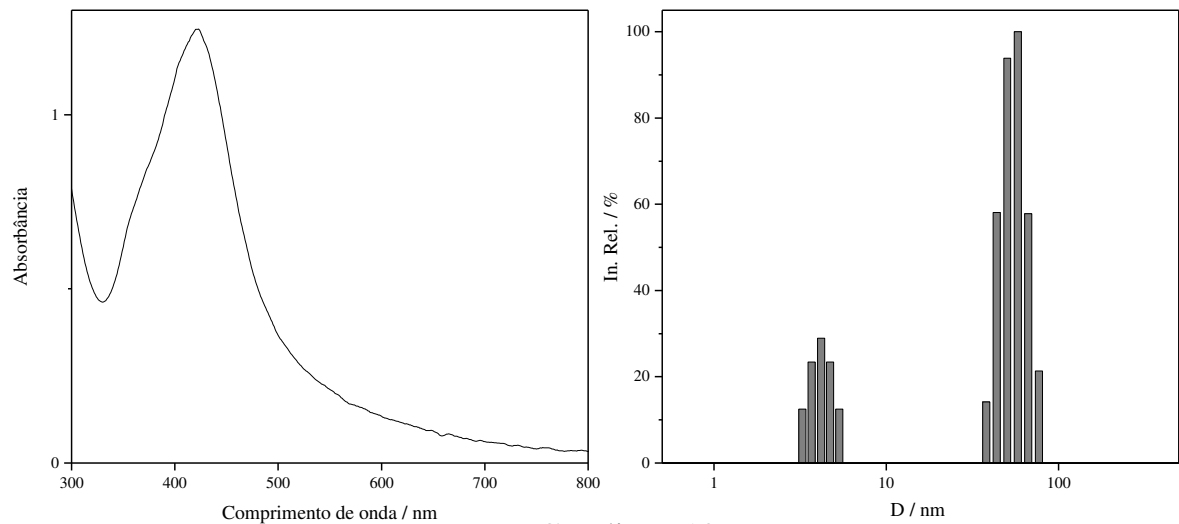
Condição 9



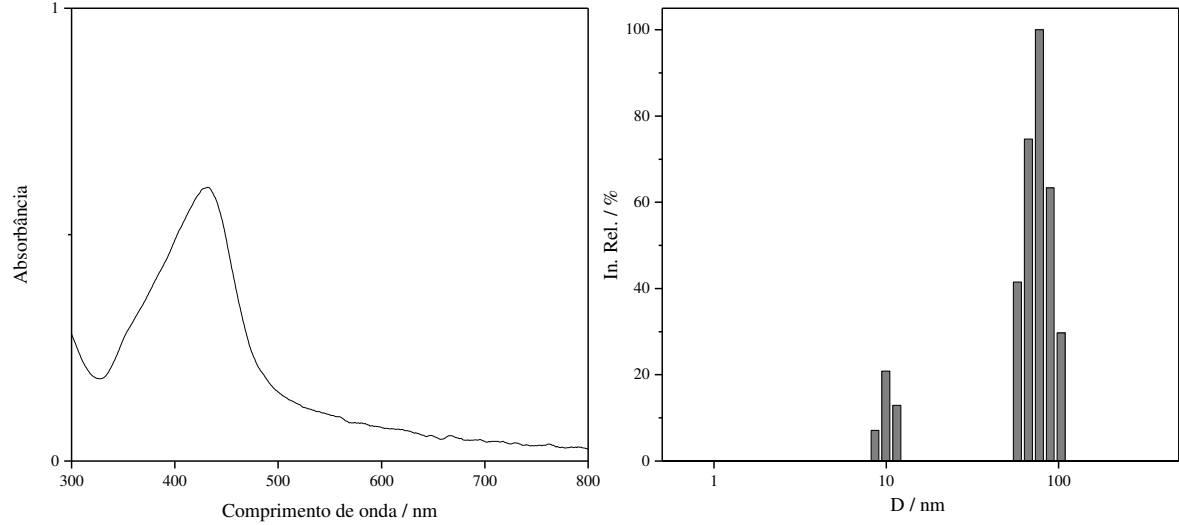
Condição 10



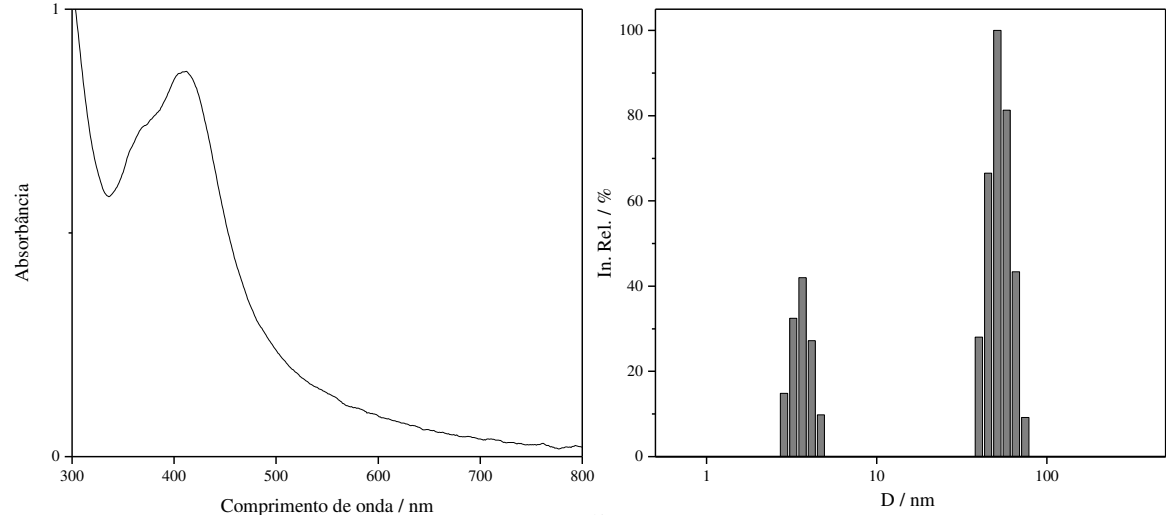
Condição 11



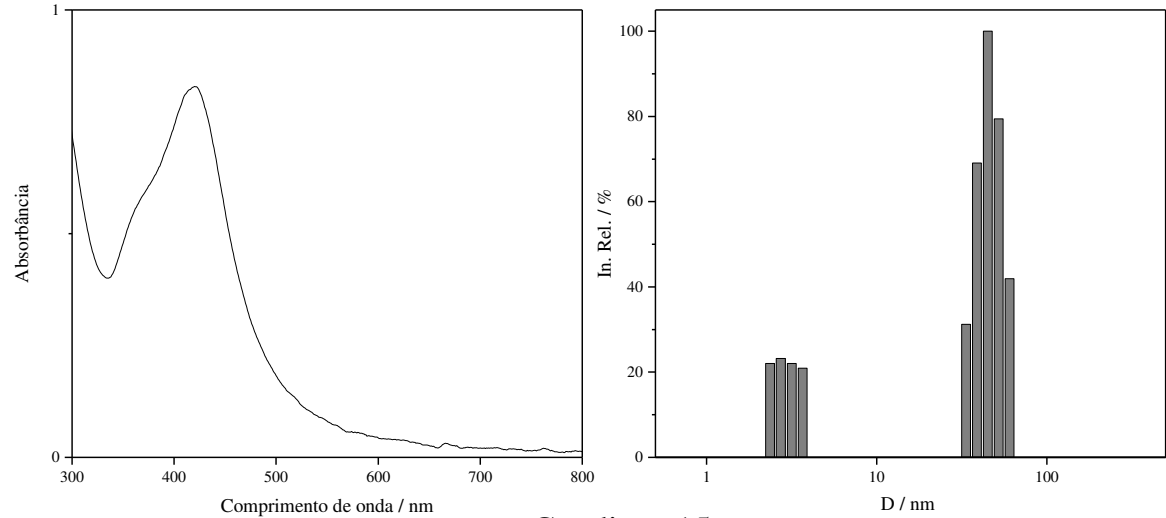
Condição 12



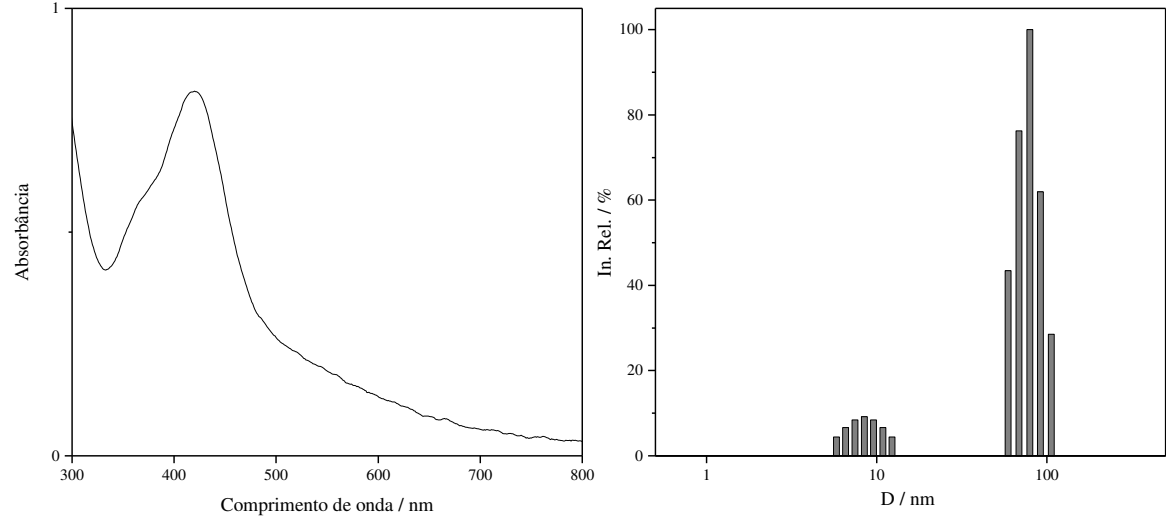
Condição 13



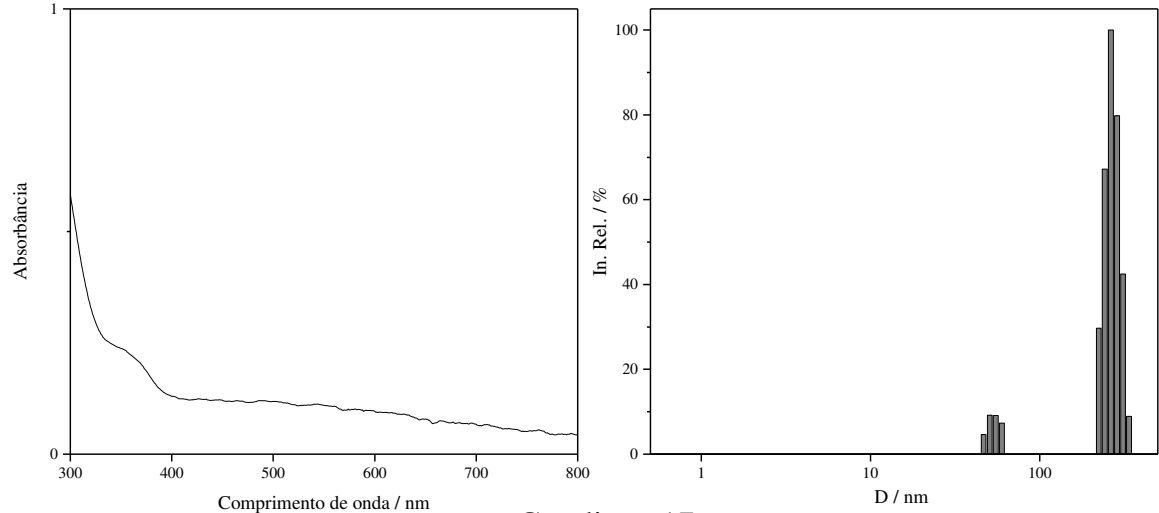
Condição 14



Condição 15



Condição 16



Condição 17

