

ARTHUR BRANDÃO DIAS PEREIRA

**SÍNTESE DE BIOFILMES DOPADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA:
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO**

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

Coorientadora: Mayra Aparecida Nascimento

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

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

T

P436s
2021

Pereira, Arthur Brandão Dias, 1996-
Síntese de biofilmes dopados com nanopartículas de prata :
caracterização e aplicação / Arthur Brandão Dias Pereira. –
Viçosa, MG, 2021.

66 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Renata Pereira Lopes Moreira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 59-66.

1. Química verde. 2. Sustentabilidade. 3. Nanotecnologia.
4. Biopolímeros. 5. Nanopartículas metálicas. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Química. Programa de
Pós-Graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 547.7

ARTHUR BRANDÃO DIAS PEREIRA

**SÍNTESE DE BIOFILMES DOPADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA:
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO**


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 março de 2021

Assentimento:



Arthur Brandão Dias Pereira
Autor



Renata Pereira Lopes Moreira
Orientadora

*Dedico esse trabalho as minhas avós
Mitzi e Helena... Amo vocês... Saudades!!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho. Primeiramente a minha Família por todo apoio e carinho. Sem eles eu não teria conseguido chegar onde cheguei. Essa conquista não é somente minha é NOSSA. Muito obrigado Pai e Mãe.

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa e seus funcionários pela oportunidade e todo suporte nessa etapa. A agência de fomento, CNPq pela concessão da bolsa e por me proporcionar tudo isso.

Aos laboratórios LANAQUA e LABEM por terem me proporcionado bons momentos e principalmente muito aprendizado.

Agradeço também a minha orientadora Renata (Rena) por muitas vezes ter sido mais que uma orientadora e sim uma mãe nessa etapa tão importante na minha vida. Aos meus colegas de laboratório (LANAQUA) por terem me ajudado a estar sempre em pé e sempre confiante. Em especial a minha amiga, Marianne, que esteve presente em todo meu caminho, me ensinando e ajudando. Passamos noites juntos e quem diria, de uma colega de laboratório, saiu uma irmã!! Te amo flor!!

Aos meus amigos, por estarem do meu lado ouvindo-me reclamar e comemorar. Obrigado Andiará, Ariany, Laud, Gue, Tefa e Romeu, eu adoro muito vocês e sei que sempre posso contar com vocês.

Ao meu amigo Rafael por ter me ensinado e acreditado em todo meu potencial, você não tem ideia do quanto você me ajudou e ainda me ajuda! Agradeço sempre por ter te encontrado nessa vida. Um irmão que a pesquisa me deu. Muito obrigado!!

Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e Fapemig, pelo financiamento de projeto. E em especial a CNPq, pela concessão da bolsa.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Química.

E finalmente, a todos que contribuíram de alguma forma para minha formação.

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

RESUMO

PEREIRA, Arthur Brandão Dias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2021. **Síntese de biofilmes dopados com nanopartículas de prata: caracterização e aplicação.** Orientadora: Renata Pereira Lopes Moreira. Coorientadora: Mayra Aparecida Nascimento.

Atualmente, as embalagens plásticas são muito utilizadas para o armazenamento de alimentos, devido à degradação dessas matrizes por microrganismos. Contudo, o uso intensivo e inadequado desses materiais trouxe graves problemas ambientais. Com isso, tecnologias de substituição dessas embalagens por materiais com menor tempo de degradabilidade vêm sendo desenvolvidas. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo produzir um biofilme a partir do biopolímero metil celulose e dopá-lo com nanopartículas de prata (NP's Ag), visando incorporar atividade antimicrobiana à embalagem. As NP's Ag foram sintetizadas via síntese verde empregando extrato de erva mate (*Ilex paraguariensis*), obtendo-se nanopartículas com tamanho médio de 45 nm, com banda de absorção característica em 450 nm e potencial zeta de -23mV. A presença de grupos funcionais presentes no extrato, como os polifenóis, compostos responsáveis redução da prata para síntese das NP's Ag foram identificados por espectroscopia no infravermelho. A síntese dos biofilmes ocorreu pelo método de casting, utilizando diferentes volumes (0, 6, 12, 18 e 24 mL) de NP's Ag, sem (T1-T5) e com agente plastificante (T6-T10), o glicerol. As propriedades mecânicas, a estabilidade térmica e a barreira ao vapor de água dos filmes foram avaliadas, sendo que a adição de NP's Ag não modificou tais propriedades. Em contrapartida, a adição de agente plastificante diminuiu a resistência à tração e o módulo de elasticidade, além de aumentar a elongação dos filmes e a barreira ao vapor d' água. Em especial, o filme T10 (24 mL de suspensão) apresentou uma transmitância de 9%, possuindo capacidade de ser utilizado como bloqueador de luz UV, que é uma característica interessante para embalagens alimentícias. Por Microscopia Eletrônica de Varredura foi possível verificar que as NP's Ag foram incorporadas com êxito aos filmes. A atividade antibacteriana foi avaliada para bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*) e gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonus fluorescens*). Os biofilmes apresentaram atividade frente a bactéria *Pseudomonus fluorescens*. Portanto, pode-se concluir que foi produzido um biofilme "ECO-FRIENDLY", com atividade contra a bactéria *Pseudomonus fluorescens*, podendo ser utilizado em embalagens alimentícias. Como sugestão de trabalhos futuros, propõe-se a avaliação e quantificação da difusão de NP's Ag em matrizes lácteas, como queijo.

Palavras-chave: Química verde. Sustentabilidade. Nanotecnologia. Biopolímeros. Eco-friendly. Nanopartículas metálicas

ABSTRACT

PEREIRA, Arthur Brandão Dias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2021. **Synthesis of biofilms doped with silver nanoparticles: characterization and application.** Advisor: Renata Pereira Lopes Moreira. Co-Advisor: Mayra Aparecida Nascimento.

Nowadays, plastic packaging is widely used for food storage, due to the degradation of these matrices by microorganisms. However, the intensive and inappropriate use of these materials has brought serious environmental problems. As a result, technologies to replace these packages with materials with a shorter degradability time have been developed. In this context, this work aimed to produce a biofilm from the biopolymer methyl cellulose and dope it with silver nanoparticles (NP's Ag), aiming to incorporate antimicrobial activity into the packaging. The NP's Ag were synthesized by green synthesis using yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*), obtaining nanoparticles with an average size of 45 nm, with a characteristic absorption band at 450 nm and a zeta potential of -23mV. The presence of functional groups presents in the extract, such as polyphenols, compounds responsible for reducing silver for the synthesis of NP's Ag were identified by infrared spectroscopy. The synthesis of biofilms occurred by the casting method, using different volumes (0, 6, 12, 18 and 24 mL) of NP's Ag, without (T1-T5) and with plasticizer (T6-T10), glycerol. The mechanical properties, thermal stability and water vapor barrier of the films were evaluated, and the addition of NP's Ag did not modify these properties. On the other hand, the addition of plasticizer reduced the tensile strength and the modulus of elasticity, in addition to increasing the elongation of the films and the barrier to water vapor. In particular, the T10 film (24 mL of suspension) showed a 9% transmittance, having the ability to be used as a UV light blocker, which is an interesting feature for food packaging. By Scanning Electron Microscopy it was possible to verify that the NP's Ag were successfully incorporated into the films. Antibacterial activity was evaluated for gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*) and gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*). Biofilms showed activity against the bacterium *Pseudomonas fluorescens*. Therefore, it can be concluded that a biofilm "ECO-FRIENDLY" was produced, with activity against the bacterium *Pseudomonas fluorescens*, and can be used in food packaging. As a suggestion for future work, we propose the evaluation and quantification of the diffusion of NP's Ag in dairy matrices, such as cheese.

Keywords: Green chemistry. Sustainability. Nanotechnology. Biopolymers. Eco-friendly. Metal nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1. 1-** Reação de formação do polietileno. 15
- Figura 1. 2-** Reação de formação do PET. 16
- Figura 1. 3-** Fórmula estrutural do polímero de celulose. 19
- Figura 1. 4-** Fórmula estrutural do polímero metil celulose. 20
- Figura 1. 5-** Prata coloidal em vários estágios de agregação³³ 21
- Figura 1. 6-** Esquema de interação de luz eletromagnética com a superfície da NP's metálicas, ocorrendo o fenômeno ressonância plasmônica de superfície. Adaptado de Hutter, Fendler (2004) ³⁴ 21
- Figura 1. 7-** Esquema de síntese e crescimento de Np's Ag via processo bottom-up ⁶¹.25

Capítulo 2

- Figura 2. 1-** Espectro de Infravermelho obtido para a erva mate. 32
- Figura 2. 2-** Espectros de absorção na região plasmônica de superfície para dois diferentes lotes de suspensões de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde empregando extrato vegetal de *Ilex Paraguensis* 33
- Figura 2. 3-** Distribuição de tamanho das partículas da suspensão de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde empregando extrato vegetal de *Ilex Paraguensis* obtidas por Espalhamento Hidrodinâmico de Luz. 34

Capítulo 3

- Figura 3. 1-** Ensaio colorimétrico realizado para os filmes T1-T5 sem plastificante (a) e T6-T10 com plastificante (b). 40
- Figura 3. 2-** Relação entre o parâmetro b* e volume de suspensão de nanopartículas de prata adicionado ao biofilme. (a) sem plastificante, tratamentos: T1-T5 (b) com plastificante, tratamentos: T6-T10. 41

Figura 3. 3- Espectros de Transmitância no UV-Visível dos biofilmes contendo nanopartículas de prata (a) tratamentos: T1-T5 (b) tratamentos: T6-T10.....	42
Figura 3. 4- Espectro de infravermelho (FTIR) do extrato aquoso de <i>Ilex paraguariensis</i> (erva mate) (—); Tratamento T1 (—); Tratamento T5(—).	43
Figura 3. 5- Curvas termogravimétricas obtidas para os tratamentos T5 (a) e T10 (b).44	
Figura 3. 6- Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para os biofilmes dopados com NPs g nas condições de síntese T1, T2, T3. T4 e T5 com magnificação em 400x.....	45
Figura 3. 7- Imagens de Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) para os biofilmes dopados com NPs Ag nas condições de síntese T6, T7, T8. T9 e T10 com magnificação em 400x.....	46
Figura 3. 8- Imagens da Microscopia Eletronica de Varredura para os biofilmes dopados com nanopartículas de prata dos tratamentos T6, T7 e T10 com detecção de prata.	46
Figura 3. 9- Elongação Percentual calculada dos filmes (—) sem plastificante (—) com plastificante.....	48
Figura 3. 10- Modulo de elasticidade obtidos para os filmes (—) sem plastificante (—) com plastificante.....	48
Figura 3. 11- Resistência máxima tração calculada para os filmes (—) sem plastificante (—) com plastificante.	49

Capítulo 4

Figura 4. 1- Ensaio biológico para as bactérias (a) <i>Listeria innocua</i> (b) <i>Staphylococcus aureus</i> (c) <i>Escherichia coli</i> (d) <i>Pseudomonus fluorescens</i> para os filmes T1 e T5.	54
Figura 4. 2- Regressão exponencial não linear aplicada para os valores de halo encontrados nos tratamentos de T1 a T5.	55

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. 1- Obtenção de nanopartículas de prata por diferentes métodos.....	22
Tabela 1. 2- Descrição dos 12 princípios da química verde. (Adaptado) ⁵²	23
Tabela 1. 3- Exemplos de nanopartículas de prata sintetizadas com diferentes extratos vegetais.....	26

Capítulo 2

Tabela 2. 1- Reagentes utilizados para síntese das nanopartículas de prata.	30
Tabela 2. 2- Equipamentos utilizados para a síntese das nanopartículas de prata.....	30

Capítulo 3

Tabela 3. 1- Reagentes utilizados para a produção dos biofilmes.	37
Tabela 3. 2- Equipamentos utilizados para a produção dos biofilmes.....	37
Tabela 3. 3- Condições de síntese dos biofilmes dopados com nanopartículas de prata.	38
Tabela 3. 4- Ensaio colorimétrico dos biofilmes contendo nanopartículas de prata sem plastificante, tratamentos T1-T5 e com plastificante, tratamentos: T6-T10.....	41
Tabela 3. 5- Valores de temperatura máxima de degradação para os filmes sem plastificantes (T1-T5) e para os filmes com plastificantes (T6-T10).....	44
Tabela 3. 6- Porcentagem dos elementos (O, C, Ag) para os biofilmes dopados com nanopartículas de prata dos tratamentos T6, T7 e T10.....	47
Tabela 3. 7- Valores de espessura e seus respectivos desvio padrão para os biofilmes dopados com nanopartículas de prata.	47
Tabela 3. 8- Permeabilidade ao vapor de água (g um/m ² dia kPa) dos biofilmes dopados com nanopartículas de prata.	50

Capítulo 4

Tabela 4. 1- Valores médios dos halos de crescimento para <i>P. fluorescens</i> para os biofilmes dopados com NP's Ag.	54
--	----

LISTA DE ABREVIações

ANVISA – Agencia nacional de vigilância sanitária

DLS- Espalhamento Dinâmico de Luz

EDX - Espectroscopia de Energia dispersiva de raio X

EFSA - Autoridade Europeia para Segurança Alimentar

EM- erva mate

MC- metil celulose

MEV- microscopia eletrônica de varredura

NP's Ag- Nanopartículas de prata

PE- Polietileno

PET-politereftalato de etileno

PVA- poliacetato de vinila

PVC- policloreto de vinila

RPS- Ressonância Plasmônica de Superfície

SDD- silicon drift detector

SN2- Substituição Nucleofílica Bimolecular

UFC- unidade formadora de colônias

SUMÁRIO

1.1. INTRODUÇÃO.....	14
1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
1.2.1. Embalagens plásticas alimentícias	15
1.2.2. Polímeros verdes	17
1.2.3. Metil celulose.....	19
1.2.4. Nanopartículas de prata	20
1.2.5. Síntese verde	23
1.2.6. Embalagens ativas	26
1.3 OBJETIVOS.....	27
1.3.1. Objetivo Geral	27
1.3.2. Objetivos Específicos	28
2.1. MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.1.1. Padrões e reagentes	30
2.1.2. Equipamentos	30
2.1.3. Preparo de soluções.....	30
2.1.4. Síntese das nanopartículas	30
2.1.5. Caracterização das nanopartículas	31
2.1.5.1. UV-Visível.....	31
2.1.5.2. DLS e Potencial Zeta	31
2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
2.2.1. Caracterização do extrato vegetal	32
2.2.2. Espectroscopia UV-Visível	33
2.2.3. DLS e Potencial Zeta.....	34
3.1. MATERIAS E MÉTODOS	37
3.1.1. Padrões e Reagentes.....	37
3.1.2. Equipamentos	37
3.1.3. Produção de biofilmes dopados com nanopartículas de prata.....	37

3.1.4. Caracterização dos biofilmes dopados com nanopartículas de prata	38
3.1.4.1. Colorimetria	38
3.1.4.2. Espectroscopia no UV-Vis	38
3.1.4.3. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier	38
3.1.4.4. Termogravimetria	39
3.1.4.5. Microscopia eletrônica de varredura e transmissão	39
3.1.4.6. Espessura e propriedades mecânicas	39
3.1.4.7. Propriedades a barreira de vapor d'água	39
3.2. RESULTADO E DISCUSSÃO	40
3.2.1 Colorimetria	40
3.2.2. Espectroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-vis)	42
3.2.3. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Furrier (IRTF)	43
3.2.4. Termogravimetria (TG)	43
3.2.5. Microscopias Eletrônicas de Varredura (MEV)	45
3.2.6. Espessura e propriedades mecânicas	47
3.2.7. Barreira a vapor de água	49
4.1. MATÉRIAS E MÉTODOS	53
4.1.1. Ensaio biológico <i>in vitro</i>	53
4.1.1.1 Microorganismos	53
4.1.1.2. Preparo do inóculo	53
4.1.1.3. Avaliação dos halos de inibição	53
4.2. RESULTADOS	54
4.2.1 Ensaio biológico	54
5. CONCLUSÃO GERAL	58
6. SUGESTÃO DE NOVOS TRABALHOS	58
7. REFERÊNCIAS	59

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO, REVISÃO DA LITERATURA E OBJETIVO

1.1. INTRODUÇÃO

Desde o seu desenvolvimento no início do século XX, o plástico tem sido utilizado em larga escala, substituindo materiais que se encontravam no mercado, como o metal e o vidro. Essa substituição ocorreu devido às propriedades únicas do plástico, como a sua versatilidade para diversas aplicações, sua densidade e, principalmente, pelo seu baixo custo de produção. Uma das aplicações mais impactantes foi no setor de embalagens, que trouxe ao mercado uma diversa economia e praticidade.

As embalagens se tornaram essenciais para a vida do homem. São encontradas em diversos setores, mas principalmente no setor alimentício. Sua função é de proteger o alimento desde a etapa de preparo e acondicionamento até o consumo. Atualmente, a maioria das embalagens são fabricadas utilizando plástico. Contudo, a produção em massa desse material acarretou em sérios problemas ambientais devido à sua baixa degradabilidade. Para se ter uma ideia, o politereftalato de etileno (PET), um tipo de plástico comumente empregado, demora cerca de 200 anos para ser degradado.

Um das alternativas para substituir o plástico é a utilização de polímeros verdes. Tais polímeros possuem um tempo de degradabilidade bem menor que o plástico, em torno de poucos meses. No setor de embalagens, a celulose e seus derivados tem ganhado grande destaque devido à sua disponibilidade, uma vez que a celulose é o material orgânico mais abundante do planeta.

Contudo, para utilizar polímeros verdes para fabricação de embalagens, faz-se necessário utilizar a nanotecnologia, uma vez que os nanomateriais melhoram as propriedades físico-químicas dos filmes. As nanopartículas de prata possuem atividade antimicrobiana e, por isso, vem sendo estudada para ser implementada nos filmes a base de polímeros verdes. Porém, devido à difusão destes materiais para o alimento, não se sabe ao certo as implicações destas nanopartículas na saúde do consumidor.

Um das maiores preocupações no setor alimentício é a segurança alimentar. Os nanomateriais, muitas vezes, são de origem metálica e, por isso, requerem um cuidado quando utilizados em embalagens para alimentos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou, em 2014, um órgão para monitorar nanomateriais em embalagens alimentícias, porém não se encontra ainda uma legislação e fiscalização para tais.

Não se encontra na literatura trabalhos que estudem a difusão de nanomateriais em matrizes alimentícias. Esses estudos são de extrema importância uma vez que os nanomateriais podem apresentar certa toxicidade em determinadas concentrações. Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo sintetizar um biofilme a base de celulose,

incorporando nanopartículas de prata para melhoramento de suas propriedades mecânicas, caracterizá-lo por diferentes técnicas e avaliar a sua difusão pelo efeito antibactericida.

1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1. Embalagens plásticas alimentícias

Durante a Segunda Guerra Mundial, o plástico, material derivado do petróleo, obteve um grande impulso em seu desenvolvimento¹. Este material foi muito utilizado em materiais bélicos, aviões e veículos. Com isso, as empresas de roupas e utensílios bélicos também começaram a fazer o uso deste material, uma vez que ao utilizá-los, as roupas de guerra acabavam sendo mais leves e impermeáveis¹. Depois da guerra, os plásticos ganharam as mais diversas aplicações, de tal forma que hoje parece indispensável para a vida moderna.

As substâncias que são utilizadas para a matéria prima de fabricação do plástico são obtidas a partir do petróleo². O petróleo é constituído por uma mistura de compostos orgânicos, que após destilação fracionada são separadas em várias frações, como a gasolina, a nafta e o óleo diesel. A nafta é a fração responsável para a produção do plástico^{2,3}, a qual, ao sofrer o processo de craqueamento dá origem aos monômeros. O processo de craqueamento é basicamente a quebra da molécula de nafta em moléculas menores³. A partir dessas moléculas, via processo de polimerização, ocorre a formação do polímero, dando origem aos diversos tipos de plásticos^{4,2}, como o politereftalato de etileno (PET) e o polietileno (PE).

A reação de polimerização pode ocorrer de duas maneiras, a polimerização de adição e a polimerização de condensação⁴. O polietileno é um exemplo de plástico que se forma a partir da adição. Essa reação, mostrada na Figura 1.1, ocorre pela saturação catalisada da ligação dupla do etileno, ou seja, a dupla ligação é quebrada com ajuda de um catalisador. Após a quebra da ligação, ocorre uma reação de adição entre as moléculas do etano que tem como produto o polietileno.

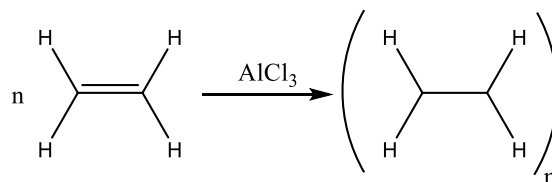


Figura 1. 1- Reação de formação do polietileno.

O PET, por sua vez, é formado pela reação de polimerização de condensação. Para que essa reação ocorra, é necessário que exista duas moléculas com grupos funcionais distintos⁴. No caso da reação do PET, ocorre a reação de um ácido e de um álcool, conhecida

como esterificação. Nessas condições, o ácido carboxílico é protonado, e o álcool ataca o grupo carbonila, produzindo então um éster. Além da duplicidade do grupo funcional, na reação ocorre a perda de uma molécula pequena, no caso água. Essa reação é mostrada na Figura 1.2.

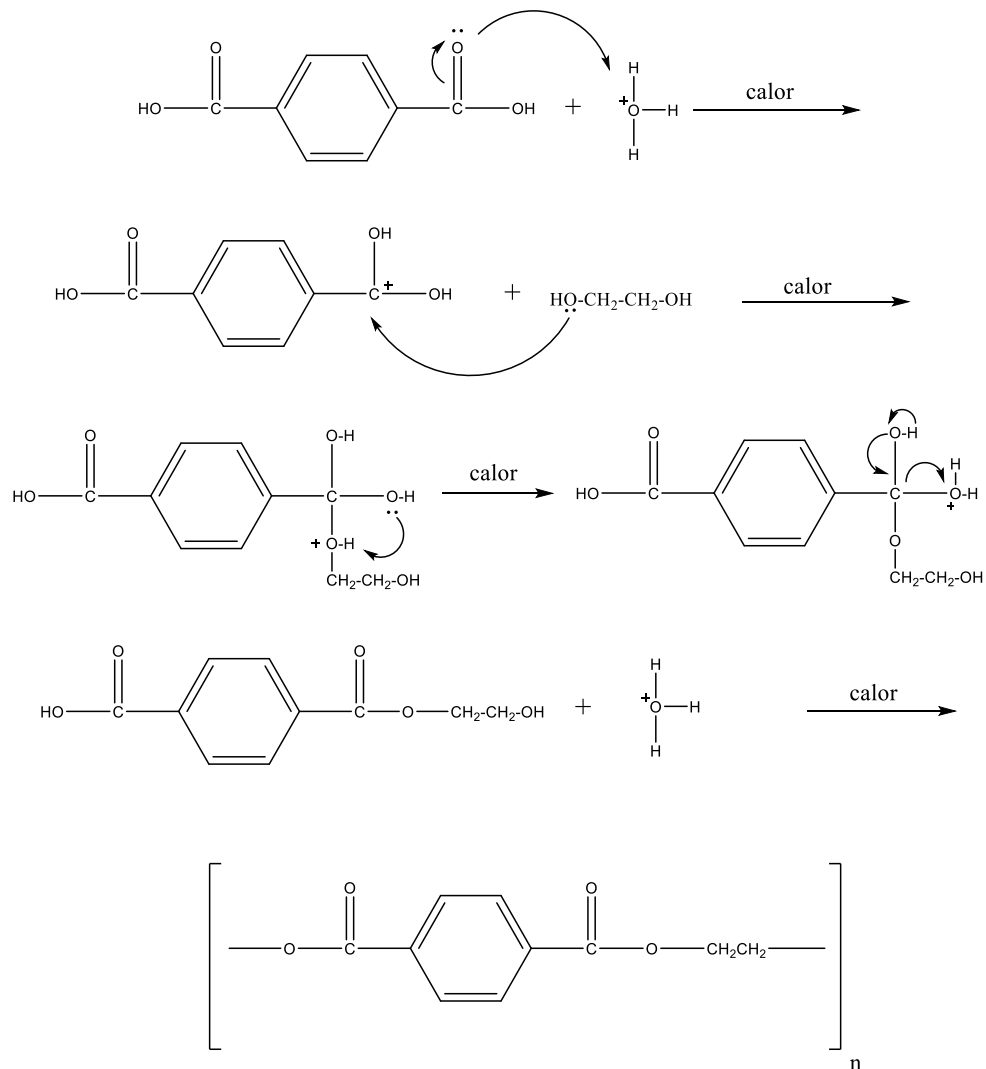


Figura 1. 2- Reação de formação do PET.

Uma das maiores vantagens da utilização do plástico é a econômica. Com este material foi possível confeccionar diversos tipos de objetos com custo reduzido, portanto, mais acessíveis à população. Embalagens como de manteiga, produtos de beleza e bebidas passaram a ser produzidas utilizando plástico e não mais metal ou vidro.

Na vida moderna, o consumismo passou a ser parte da vida cotidiana, o qual fomenta diversas inovações tecnológicas. Conseqüentemente, novos produtos vêm sendo criados e industrializados, que por sua vez, gera um aumento na produção de embalagens ¹. As embalagens são encontradas em amplos setores, como, por exemplo, vestuário, alimentos e cosméticos⁵.

No setor alimentício, as embalagens possuem como principal função proteger o alimento, desde a etapa de acondicionamento até a etapa de consumo⁶. Os alimentos são produtos perecíveis, isto é, susceptíveis a diversos tipos de degradação, seja ela de natureza física (perda de água, mudança em seus estados físicos e textura), química (oxidação) ou microbiológica (doenças fúngicas e microbiológicas)⁶. Diante disso, a embalagem proporciona a segurança do produto, cuja finalidade consiste em aumentar o tempo de prateleira além de preservar as diversas características do alimento como o sabor, textura e aroma⁷.

Devido ao aumento da população mundial ao longo dos anos e, conseqüentemente, o aumento do consumo de alimentos, foi necessário aumentar a produção de embalagens no mercado. Em 1935 o plástico foi inserido globalmente no mercado de embalagens devido a algumas propriedades, tais como facilidade de modelamento e baixa densidade, quando comparada a embalagens de vidro ou metal. Com as embalagens plásticas, o transporte de alimentos tornou-se mais prático e rápido, devido às suas propriedades, além de fácil maleabilidade⁴. Desde então, a produção de plástico vem aumentando consideravelmente nos últimos anos. Para se ter uma ideia, o Brasil é o 4º maior produtor de lixo plástico do mundo, cerca de 11 milhões de toneladas por ano⁸.

Contudo, o uso intensivo de embalagens plásticas tem causado diversos impactos ambientais. Isso ocorre em função da sua pouca degradabilidade, o que faz com que os plásticos permaneçam na natureza por longos períodos, cerca de 200 anos⁹. Além de causar poluição visual e, sobretudo, química do ambiente, o plástico é um causador de desastres ambientais de grandes proporções, como mortes de animais marinhos, por exemplo¹⁰. Diante dessa problemática, alternativas tecnológicas capazes de substituir o plástico derivado do petróleo são necessárias. Nesse sentido, os polímeros verdes apresentam potencial para tal substituição⁹. Além de substituir o plástico, ações como reciclar, reutilizar e reaproveitar tem sido utilizada para diminuir o impacto ambiental que é causado pelo descarte de embalagens plásticas.

1.2.2. Polímeros verdes

Os polímeros verdes são classificados como sustentáveis, pois em seu processo de fabricação produzem um menor impacto ambiental comparado com os polímeros sintéticos. Isso ocorre porque durante a sua produção, há uma maior captação de gás carbônico, além de não utilizar derivados do petróleo (recurso não renovável) como matéria-prima. Nesse caso, recursos renováveis como milho, celulose ou cana de açúcar¹ são utilizados como matéria-prima.

Vários destinos podem ser dados aos polímeros verdes ao final de sua vida útil. Como, por exemplo, a reutilização e a reciclagem. Podem, também, ser enviados para o sistema de

reciclagem energética, no qual há emissão neutra de gás carbônico, uma vez que o gás liberado pelo sistema é captado pela próxima safra. Para se ter uma ideia, a reciclagem de uma tonelada de garrafas de polímero verde poupa a emissão de até 1,5 toneladas de gás carbônico¹.

Muitos dos polímeros verdes possuem características que podem ser comparadas com os polímeros convencionais, como, por exemplo, capacidade de geleificação para formação de filmes, maleabilidade e baixa densidade. Por isso, a sua entrada no mercado vem aumentando consideravelmente nos últimos anos¹¹. Devido a isso, a taxa com que os polímeros biodegradáveis estão sendo utilizados no mercado tem aumentando consideravelmente.

Polímeros verdes são classificados como polímeros produzidos a partir de fontes renováveis. Uma ressalva importante é que nem todo polímero verde é biodegradável, um equívoco muito comum¹. Os polímeros verdes biodegradáveis são mais interessantes, pois causam menor impacto ao ambiente, devido à sua total mineralização¹¹. Para se ter uma ideia, o plástico PET demora cerca de 200 anos para se decompor enquanto o PET verde demora cerca de 12 meses⁹. Nesse contexto, os polímeros biodegradáveis vêm ganhando destaque para emprego na substituição do plástico.

Contudo, algumas propriedades dos polímeros biodegradáveis como alta barreira à vapor de água, baixo ponto de fusão e baixa viscosidade fazem com que os polímeros tenham dificuldades para formar filmes¹¹. Deste modo, novas tecnologias têm sido estudadas visando suprir essas deficiências, com o intuito de poder aproveitar melhor esses filmes biodegradáveis, reduzindo o uso de plástico convencional (filme) no dia a dia¹².

Dentre as tecnologias mais estudadas, a nanotecnologia tem ganhado destaque nos centros de pesquisas. Nanomateriais consistem em materiais que possuem pelo menos uma das suas dimensões em escala entre 1-100 nm¹³. Os nanomateriais podem ser utilizados em diversos setores, como na medicina, em nanochips¹⁴, no setor de embalagem¹⁵, cosméticos¹⁶ e também no setor ambiental. Comparando esses materiais com os mesmos em sua escala micro e macroestrutural, os nanomateriais possuem propriedades distintas como propriedades óticas, reativas, mecânicas e elétricas¹¹.

Para filmes, uma das vantagens de se adicionar materiais em escala nanométrica na matriz polimérica é que, mesmo com uma adição baixa (5% v/v), pode-se obter resultados incríveis nas propriedades mecânicas e químicas deste material^{11,12}. São reportados na literatura trabalhos com produção de filmes a base de polímeros biodegradáveis (gelatina, celulose, PET verde) utilizando-se nanotecnologia. A metil-celulose tem mostrado grande relevância na produção de biofilmes. Como, por exemplo, no trabalho de Tunç e Duman (2011)¹⁷, que foi sintetizado um filme a base de metil-celulose utilizando nanopartículas de

carvacrol (óleo essencial de orégano) e argila com a finalidade de produzir um filme com atividade microbiológica.

1.2.3. Metil celulose

A celulose é o material orgânico mais abundante na terra, com uma produção anual de mais de 50 bilhões de toneladas. A celulose pode ser encontrada em diversas fontes naturais, como plantas, madeira e frutos. Outra fonte de celulose consiste no uso de resíduos agrícolas¹⁸. O Brasil é um grande produtor agrícola e, portanto, gera toneladas de resíduos agrícolas¹⁹. Para se ter uma ideia da importância da atividade agrícola no país, o valor da produção agrícola em 2018 foi de R\$ 343,8 bilhões. A unidade repetitiva da celulose é composta por duas moléculas de glicose eterificadas por ligações β -1,4-glicosídicas (Figura 1.3).

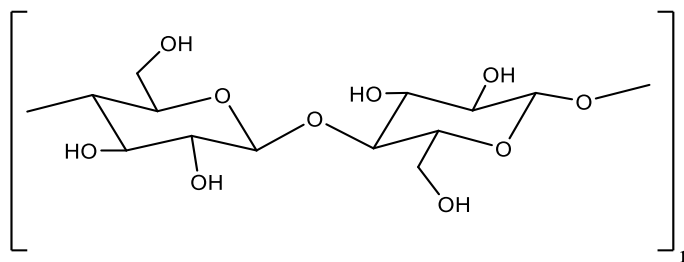


Figura 1. 3- Fórmula estrutural do polímero de celulose.

Entre as moléculas de celulose ocorrem diversas ligações de hidrogênio, o que resulta em um fortalecimento de suas cadeias, tornando-a insolúvel em água. Porém, se essas cadeias sofrerem modificações químicas, a sua solubilidade em água pode ser mudada. A metil celulose (Figura 1.4) é um exemplo dessa transformação²⁰.

O processo de obtenção da metil celulose a partir da celulose é bastante simples. Para isso, faz-se um tratamento alcalino da celulose, seguido da adição de cloreto de metila ou sulfato de dimetila. A síntese da metil celulose ocorre via reação de Williaamson. Primeiramente, ocorre a formação de um íon, a álcali celulose, em que o hidróxido de sódio atua como base de Lewis e retira um próton da celulose. Então, o íon alcóxido (álcali celulose) reage com um haleto de alquila (cloreto de metila), via mecanismo de Substituição Nucleofílica Bimolecular (SN2), formando a metil celulose. A metil celulose é um dos derivados mais simples da celulose e, também, menos hidrofílico e mais resistente à água²¹.

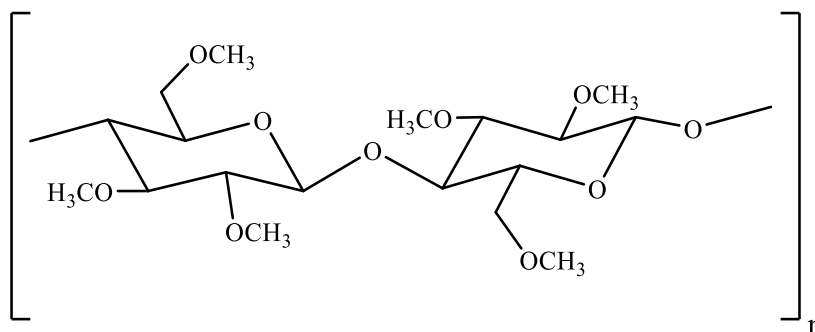


Figura 1. 4- Fórmula estrutural do polímero metil celulose.

A geleificação da metil celulose ocorre em meio aquoso entre 50 e 70°C. Esse processo ocorre devido a três interações que ocorrem: (1) as interações hidrofóbicas dos grupos metilas; (2) as ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas não modificadas (3) e as interações entre os grupos hidroxilas e a água²². Devido a esse processo, a metil-celulose possui uma ótima propriedade de formar filmes. Além disso, a produção de metil celulose possui baixo custo e, portanto, pode ser aplicada em diversos ramos como em embalagens de alimentos, cosméticos, área médica e farmacêutica.

Os filmes produzidos a partir de metil celulose apresentam características de serem inodoros, transparentes, resistência moderada e alta permeabilidade a vapor de água¹⁵. Para poder melhorar a resistência e a permeabilidade dos biofilmes de celulose, nanomateriais podem ser adicionados na matriz polimérica da metil celulose conferindo diferentes propriedades, tais como antioxidantes e antimicrobiológicas. Os nanomateriais são inseridos ao filme plástico obtido a partir de polímeros biodegradáveis com o intuito de modificar as suas propriedades²³. Como exemplo, tem-se nanotubos de carbono, nanocristais de celulose, nanopartículas metálicas (prata, ferro, óxidos) e também óleos essenciais nanoencapsulados²⁴.

1.2.4. Nanopartículas de prata

Nos anos recentes, as nanopartículas de prata (NP's Ag) têm atraído bastante atenção por suas diversas aplicações. Dentre elas, podem-se destacar o seu uso como catalisador²⁵, potencial como agente antimicrobiótico em embalagens de alimentos²⁶, além de seu uso nas áreas da medicina²⁷ e farmácia²⁸. Além de suas aplicações, as nanopartículas de prata possuem boa condutividade térmica e excelente estabilidade química²⁹.

É reportado na literatura o uso das nanopartículas de prata como agente desinfetante, devido à sua propriedade antimicrobiana e antifúngica³⁰. A prata é utilizada desde 1000 A.C como agente desinfetante na área da saúde (Medicina Ayurveda) na China. Além dessa aplicação, a prata pode ser aplicada na biomedicina³⁰, na indústria têxtil³¹ e alimentícia³².

Estudos mostram que as propriedades das nanopartículas de prata estão altamente ligadas aos seus formatos e tamanhos²⁸, como as propriedades ópticas, por exemplo. Diversas cores podem ser observadas para as suspensões de nanopartículas de prata, como a amarela, marrom (claro) e cinza³³, que é mostrado na Figura 1.5. As cores dessas suspensões podem ser explicadas pelo processo físico denominado Ressonância Plasmônica de Superfície (RPS). Esse processo ocorre quando os elétrons de condução das nanopartículas metálica entram em ressonância com a luz incidente, ou seja, quando os elétrons da luz e das nanopartículas de prata vibram na mesma frequência³³. Pode-se ver na Figura 1.6 um esquema do fenômeno RPS.



Figura 1. 5- Prata coloidal em vários estágios de agregação³³.

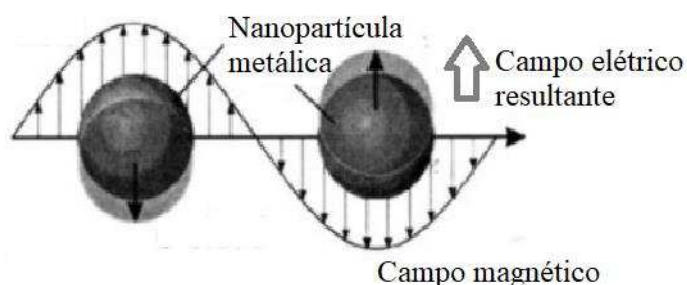


Figura 1. 6- Esquema de interação de luz eletromagnética com a superfície da NP's metálicas, ocorrendo o fenômeno ressonância plasmônica de superfície. Adaptado de Hutter, Fendler (2004) ³⁴.

Pela teoria de Maxell-Garnet, a cor que observamos para suspensão de nanopartículas de prata estão associadas ao tamanho e a distância entre as partículas. Esse efeito é conhecido como *red-shift*, que é o alargamento e deslocamento da banda de RPS para menores energias devido a interação do campo magnético de uma nanopartícula com a outra^{35,36}. A agregação das nanopartículas de prata em uma suspensão são uma das maiores dificuldades que se encontra na síntese, pois devido à alta energia superficial as partículas tendem a aglomerar^{33,35}. Logo, pode-se afirmar que o controle das condições de síntese é de

extrema importância, uma vez que o método de síntese interfere na estabilidade das suspensões de nanopartículas de prata e, portanto, em suas propriedades.

O tamanho da nanopartícula também varia de acordo com os estabilizantes (citrato de sódio, reagente de Tollen, poliol, redutores verdes)³⁷ que estão presentes no sistema na hora da síntese.²⁸ É possível observar na Tabela 1.1 alguns trabalhos que apresentam diferentes métodos de síntese que formam nanopartículas de prata em diferentes formatos e tamanhos.

Tabela 1. 1- Obtenção de nanopartículas de prata por diferentes métodos.

Método de Redução	Redutor	Formato	Tamanho (nm)	Referência
Radiação Micro-ondas	Etileno Glicol;	Nanoprisma	--	40
Redução Química	Hidrato de Hidrazina	Triangular	50-200	41
Redução Química	Tartarato de Potássio	Nanorods	--	42
Radiação Micro-ondas	Glicerol	Nanofios	--	43
Redução Química	Pentano-1,5-diol	Cúbica	80	44
Síntese verde	<i>Eucalyptus macrocarpa</i>	Cúbica	10-50	45
Redução Química	Borohidreto de Sódio	Esférica	7	46
Síntese Verde	<i>Cassia angustifolia</i>	Esférica	9-31	47

Dentre os métodos de sínteses de nanopartículas, o mais popular é o de redução química. Esse método utiliza, normalmente, o borohidreto de sódio como agente redutor (reductor forte), na presença de um agente estabilizante. Contudo, este método utiliza reagentes tóxicos, como o próprio agente redutor, solventes e até mesmo alguns dos estabilizantes³⁸. Para a produção de embalagens alimentícias, é essencial que a toxicidade seja pequena. Por isso, o método de síntese coloidal via borohidreto para a produção de filmes plásticos que serão utilizados em embalagens de alimentos não é recomendada³⁹.

A segurança alimentar é umas das maiores preocupações no setor de alimentos, os quais são propícios a diversos ataques de microrganismo, desde o preparo até o seu consumo⁷. Uma das formas de eliminar a contaminação/ataque de microrganismos é utilizando embalagens. As NP's Ag são materiais bactericidas promissores no ramo de

embalagens. Isso porque, como mencionado anteriormente, possuem atividade contra fungos, bactérias e vírus e, por isso, tem grande potencial de serem utilizadas em nessa área²⁶.

Trabalhos reportados na literatura relatam que as nanopartículas de prata possuem atividade antimicrobiana. Ozturk *et al.* (2019)⁴⁸ sintetizaram nanopartículas de prata que possuem atividade biológica (*in vitro*) frente *E. coli* e *C. albicans*. Baruah *et al.* (2019)²⁵ também sintetizaram nanopartículas de prata que foram promissoras no combate as bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e ao fungo *Candida albicans*. Outro trabalho que também mostra a eficiência das nanopartículas de prata como agente antimicrobiano é o de Hekmati *et al.* (2020)⁴⁹ que obtiveram as nanopartículas com potencial para eliminar as bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Diante do emprego das AgNP's em embalagens, a preocupação com a contaminação dos alimentos com esses nanomateriais é recorrente, pois ainda não se sabe ao certo o mecanismo de difusão destes compostos⁵⁰. O EFSA (Autoridade Europeia para Segurança Alimentar) estabeleceu um limite de migração de nanopartícula de prata em embalagens para alimentos de 0,05 mg/kg²⁶. Além disso, a síntese das NP's Ag deve ser totalmente verde, ou seja, não deve conter nenhum agente tóxico. Para isso, a síntese verde em sistemas coloidais é altamente utilizada, visto que os agentes redutores são substâncias naturais, muitas vezes presentes em folhas, raízes ou microrganismo⁵¹.

1.2.5. Síntese verde

As nanopartículas metálicas podem ser sintetizadas por diferentes abordagens, porém, o método empregando os princípios da química verde é mais sustentável e confiável em termos de toxicidade³⁸. Por meio desta abordagem, a síntese das nanopartículas não prejudica o ambiente e nem a saúde humana. Os 12 princípios da química verde têm como objetivo principal minimizar ou não utilizar solventes tóxicos nos processos e análises químicas, assim como a não geração de resíduos resultante desses processos⁵². Esses princípios são mostrados na Tabela 1.2. Devido à importância dos nanomateriais no mercado, a busca por novas rotas sintéticas com este princípio tornaram-se necessária^{53, 54}.

Tabela 1. 2-Descrição dos 12 princípios da química verde. (Adaptado)⁵²

Número	Princípio	Descrição do Princípio
1	Prevenção	Prevenção em função da geração de resíduos. Melhor evitar formá-los do que os tratar posteriormente.

2	Economia atômica	Os métodos sintéticos devem ser planejados para que o produto final incorpore o máximo possível de reagentes utilizados durante a síntese.
3	Síntese química mais segura	Métodos sintéticos devem ser projetados para que use e gere substâncias com baixa ou nenhuma toxicidade ambiental.
4	Design de produtos químicos seguros	Grande importância deve ser dada à toxicidade dos produtos químicos que serão sintetizados.
5	Uso de solventes mais seguros	O uso de solventes e outros reagentes e auxiliares deve ser evitado sempre que possível.
6	Eficiência energética	Os processos químicos devem ser eficazes em termos de gastos energéticos.
7	Uso de matérias-primas renováveis	Sempre que é economicamente e tecnicamente viável, devem ser usadas matérias-primas renováveis em vez de não-renováveis.
8	Redução de derivados	Processos de derivatização devem ser evitados ou minimizados, pois requerem uso de mais reagentes, portanto, gera mais resíduos.
9	Catálise	O uso de reagentes catalíticos é melhor que o uso de estequiométricos.
10	Design de produtos de degradação	Preferência por sintetizar produtos químicos que ao final de sua função sejam degradados por completo.
11	Análise em tempo real para prevenção de poluição	Análise para métodos analíticos devem ser monitorados em tempo real para evitar a formação de substâncias tóxicas.
12	Prevenção de acidentes	Tanto as substâncias quanto a maneira como são usadas em um processo químico devem ser escolhidas considerando a minimização de possíveis acidentes.

A síntese de nanopartículas metálicas pode ser realizada através de duas estratégias conhecidas como *top-down* ou *bottom-up*. Na estratégia *top-down*, as nanopartículas são obtidas a partir de um material granular que, através de processos físicos, como fresagem mecânica (moagem)^{55 56}, litografia^{57 58} ou ablação por laser⁵⁹ obtém-se o material em escala nano. Na estratégia *bottom-up* as nanopartículas são formadas através de moléculas ou átomos até sua nucleação, crescimento e estabilização.⁵¹

No processo *bottom-up*, as nanopartículas de prata podem ser obtidas por duas vias: *i*) via química, que utiliza reagentes redutores como o borohidreto de sódio ou *ii*) via biológica,

que utiliza agentes biológicos como fungos, bactérias ou extratos vegetais. Uma das maiores vantagens da via biológica é que essa não utiliza reagentes tóxicos na síntese das NP's Ag.⁶⁰ Pode-se ver na Figura 1.7 um esquema de crescimento das NP's Ag utilizando um extrato vegetal.

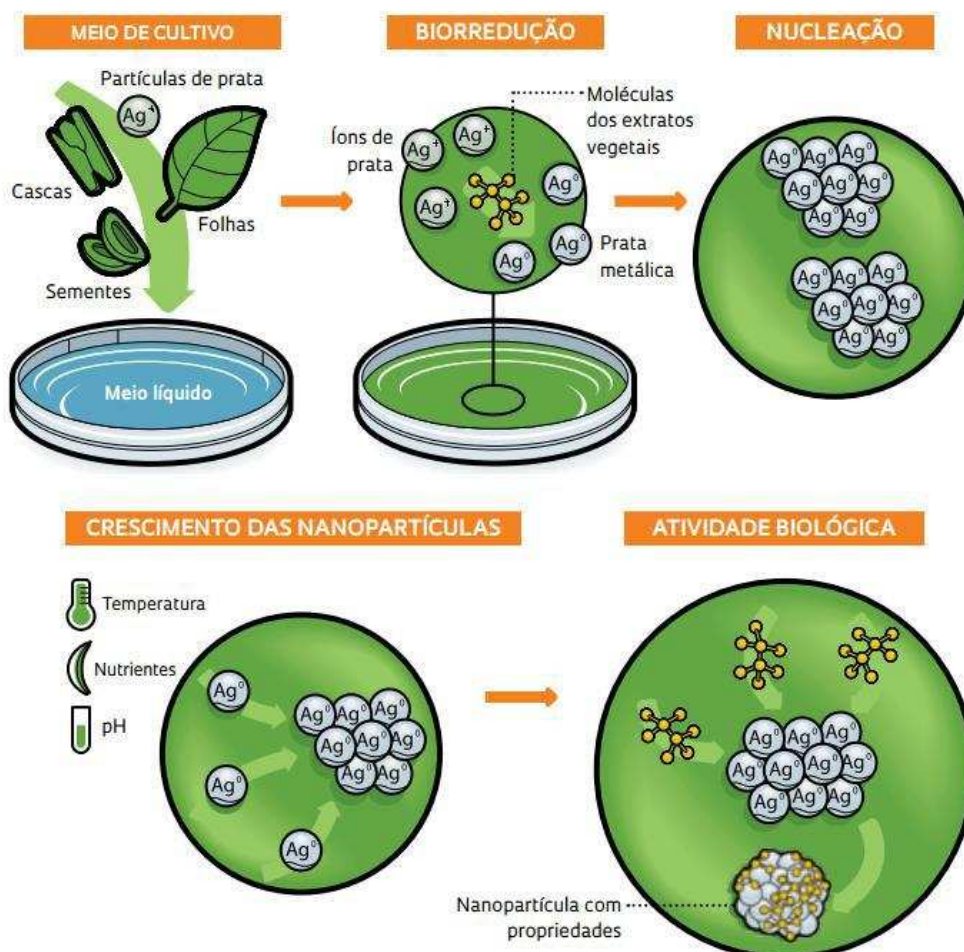


Figura 1. 7- Esquema de síntese e crescimento de Np's Ag via processo bottom-up ⁶¹.

A síntese biológica, em geral, ocorre por meio de processo de redução dos íons metálicos pelos redutores verdes, seguido pelo processo de estabilização. Tais processos são realizados por componentes moleculares extraídos de plantas ou organismos em solução aquoso^{60,61}. Normalmente, as substâncias que promovem a redução do íon metálico também são responsáveis pela estabilização das nanopartículas⁶⁰.

Na literatura, são descritos processos de síntese de nanopartículas de prata a partir da estratégia de *bottom-up* com o uso de extratos vegetais. Muitas das características da nanopartícula e da eficiência da reação é mudada de acordo com o tipo de extrato, seja ele semente, folha, casca ou raiz⁶⁰. Pode-se ver na Tabela 1.3 alguns exemplos de plantas que foram empregados na síntese de nanopartículas de prata.

Tabela 1. 3- Exemplos de nanopartículas de prata sintetizadas com diferentes extratos vegetais.

Extrato vegetal	Tamanho médio (nm)	Formato	Aplicação	Referência
<i>Capsicum annuum</i>	10	Poli esférico	-----	62
<i>Camellia sinensis</i>	4	Cúbico	-----	63
<i>Allium cepa</i>	33,6	Esférica	Atividade bactericida	64
<i>Citrus limonum</i>	25	Esférica	-----	65
<i>Hibiscus rosa sinensis</i>	13	Esférica	-----	29
<i>Senna alata</i>	10-30	Esférica	Atividade Antimicrobiana	66
<i>Gelidium corneum</i>	20-50	Cúbico	Atividade Antimicrobiana	48
<i>Alpinia nigra</i>	4-8	Esférica	Degradação de corantes	25
<i>Allium rotundum, Falcaria vulgaris Bernh Ferulago angulate Boiss</i>	20,5	Esférica	Atividade Antimicrobiana	49
<i>Capparis zeylanica</i>	23	Esférica	Atividade Anti-proliferação	67

Logo, o método de síntese NP's Ag empregando a abordagem da química verde para a produção de embalagens alimentícias é o mais promissor, visto que é um método sustentável, barato e que não faz o uso de substâncias tóxicas.

1.2.6. Embalagens ativas

Uma das maiores preocupações das indústrias alimentícias é que o alimento chegue intacto à mesa do consumidor. Entretanto, o principal desafio encontrado por tais indústrias consiste em prolongar a validade dos alimentos nas prateleiras dos grandes centros urbanos⁶⁸. Nesse contexto, surge as embalagens ativas. Tais embalagens contêm aditivos que mantêm ou prolonga a vida útil e qualidade do alimento⁶⁹. Esses aditivos podem ser de diversas fontes, como nanopartículas metálicas⁷⁰, óleos essenciais²⁴ ou nanopartículas orgânicas⁷¹.

A utilização de compostos antimicrobianos em alimentos pode alterar o sabor, aroma e textura do produto, fazendo com que este perca seu valor no mercado. Na indústria de alimentos é imprescindível a utilização destas substâncias, pois o controle de qualidade é

extremamente rigoroso⁷¹. Uma das maneiras de driblar o uso excessivo de tais substâncias é a utilização de embalagens ativas antimicrobiológicas. Essas embalagens contêm um agente antimicrobiológico, que pode reduzir ou eliminar a ação da atividade microbiana⁷². Tais agentes diminuem o uso de substâncias antimicrobiológicas diretamente no alimento, mantendo, dessa forma, seu odor, sabor e textura. Alguns dos tipos de agente antimicrobiológicos são óleos essenciais, enzimas, ácidos e sais orgânicos e nanopartículas metálicas

Encontra-se na literatura o uso de nanopartículas de prata como agente antimicrobiano para a síntese de embalagens⁷³. Mathew *et al.* (2019)³² sintetizou malotes biodegradáveis a partir de PVA (poliacetato de vinila), reforçados com nanopartículas de prata, para embalar linguiças de frango. Segundo os autores, ao adicionar nanopartículas de prata, o filme teve sua resistividade mecânica melhorada e, além disso, atividade frente a bactéria *Salmonella paratyphi*. No trabalho de Carbone *et al.* (2017)²⁶, foi produzido um biofilme antimicrobiano contendo nanopartículas de prata para embalar frutas frescas. Segundo os autores, a adição de prata ao filme aumentou o tempo de prateleira desses alimentos, uma vez que a prata inibiu o crescimento de bactérias totais aeróbicas. Braga *et al.* (2018)⁷⁴ avaliaram a ação microbiológica de nanopartículas de prata em filmes de PVC frente a bactéria *Bacillus subtilis* e ao fungo *Fusarium solani*, cujos resultados mostraram atividade para ambos agentes. Nunes *et al.* (2018)⁷⁵ também utilizaram nanopartículas de prata em filmes de metil celulose para avaliar atividade frente *Escherichia coli*. Este filme apresentou atividade significativa para este patógeno.

Diante do exposto, o uso de nanopartículas de prata, além de melhorar as características mecânicas de filmes a base de polímeros verdes, pode atuar como agente antimicrobiológico na síntese de embalagens ativas, aumentando o tempo de prateleira dos alimentos.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo Geral

Diante do exposto, este trabalho tem por objetivo geral sintetizar um biofilme ativo contendo nanopartículas de prata e avaliar a difusão dessas nanopartículas por meio de ensaio microbiológico.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar nanopartículas de prata via síntese verde utilizando um redutor a partir de extrato de *Ilex paraguariensis*;
- Caracterizar a suspensão de nanopartículas de prata por Microscopia Eletrônica, Espalhamento de Luz Hidrodinâmico e Potencial Zeta.
- Produzir um biofilme à base de metil-celulose dopado com nanopartículas de prata;
- Caracterizar o biofilme por ensaios físicos, químicos e biológicos;

CAPÍTULO 2
SÍNTESIS VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
EMPREGANDO EXTRATO VEGETAL *Ilex*
paraguariensis

2.1. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1. Padrões e reagentes

Os reagentes utilizados para a preparação das nanopartículas (NP's Ag) de prata estão listados na Tabela 2.1.

Tabela 2. 1- Reagentes utilizados para síntese das nanopartículas de prata.

Reagente	CAS NUMBER	MARCA
Nitrato de prata	7761-88-8	Neon
Cloreto de sódio	7647-14-5	Neon (P.A)
Cromato de potássio	7789-00-6	Merck
Chá mate (<i>Ilex paraguasiensis</i>)	–	Chá mate foi obtido no comércio local da cidade de Viçosa/MG

2.1.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 2.2

Tabela 2. 2- Equipamentos utilizados para a síntese das nanopartículas de prata.

Equipamentos	Modelo	Marca
Mesa agitadora	SL-180/A	SOLAB
Chapa de aquecimento	114	Nova Ética
Balança analítica	ATX-224	Shimadzu

2.1.3. Preparo de soluções

A solução de nitrato de prata foi preparada a partir da pesagem do sal de nitrato e diluída com água tipo 1, Milli Q (Millipore Corporation). Essa solução foi padronizada utilizando o método de Mohr⁷⁶, obtendo-se a concentração de 2,00 mmol L⁻¹. A solução foi armazenada na ausência de luz e sob refrigeração a 4 °C (geladeira) até o momento de uso.

2.1.4. Síntese das nanopartículas

Para a síntese das nanopartículas de prata, utilizou-se o método descrito adaptado de SILVEIRA, 2018⁵¹. Primeiramente, obteve-se o extrato vegetal, em que 0,1000 g de chá mate industrial foi pesado em um béquer, sob o qual foram adicionados 50 mL de água tipo 1. Então, a mistura foi aquecida a 100 °C por 15 minutos, filtrada em papel de filtro qualitativo e

o filtrado teve o seu volume ajustado em um balão volumétrico de 50,00 mL. Na sequência, a solução de nitrato de prata (50,00 mL à 2,00 mmol L⁻¹) foi adicionada à 50,00 mL extrato vegetal, que foi mantida sob agitação utilizando mesa agitadora, à temperatura ambiente (25,0 °C), por 3,5 horas na ausência de luz. Posteriormente, essa solução foi caracterizada por Espectroscopia de Absorção Molecular UV-Visível.

2.1.5. Caracterização das nanopartículas

2.1.5.1. UV-Visível

Para a Espectroscopia de Absorção Molecular UV-Visível foi utilizado um equipamento Thermo Scientific do modelo Evolution Array, empregando uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Os espectros foram obtidos no modo de varredura de 200 a 1000 nm. O preparo da amostra consistiu na diluição de 1,00 mL da suspensão de nanopartículas, obtidas como descrito no item 1.2.4, em balão de 10,00 mL e, então, submetida à análise.

2.1.5.2. DLS e Potencial Zeta

As análises de Espalhamento Dinâmico de Luz e de Potencial Zeta foram realizadas no Zetasizer (NanoZS, Malvern, UK). Para a análise, 10 µL de suspensão de nanopartículas foram diluídos em balão de 10,00 mL com água deionizada. Então, com auxílio de uma seringa, 2 mL da suspensão diluída foi adicionada na cubeta modelo DTS-1070. As análises foram feitas em triplicata com ângulo de 173°, a temperatura de 25 C°.

2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a síntese das NP's Ag utilizou-se o extrato de erva mate (*Ilex paraguariensis*). Esse extrato vegetal possui uma grande quantidade de polifenóis, que são compostos que possuem capacidade de atuar como agentes redutores, logo são capazes de reduzir íons prata a prata zero formando as NP's Ag. Após a síntese das NP's Ag, esse material foi armazenado e caracterizado por diferentes técnicas de caracterização. Os resultados obtidos são mostrados nos próximos itens.

2.2.1. Caracterização do extrato vegetal

A caracterização da erva mate foi realizada por Espectroscopia Infravermelho (Figura 2.1). Pode-se observar que o espectro é bastante complexo, devido à sua variedade de compostos orgânicos, como polifenóis e ácidos orgânicos^{77,78}. A banda localizada em torno de 3416 pode ser atribuída ao estiramento da ligação O-H, enquanto as bandas em 2923 e 2850 cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento da vibração da ligação C-H. As bandas em 1612 cm^{-1} podem ser atribuídas aos grupos carbonila, presentes nos polifenóis e ácidos orgânicos. A banda em torno de 1461 cm^{-1} pode ser atribuída aos estiramentos O-C-O, enquanto a banda em 1250 cm^{-1} pode ser atribuída à vibração dos grupos C-O. A banda em torno de 830 cm^{-1} é atribuída à vibração da ligação C-H dos anéis aromáticos dos polifenóis e ácidos orgânicos⁵¹.

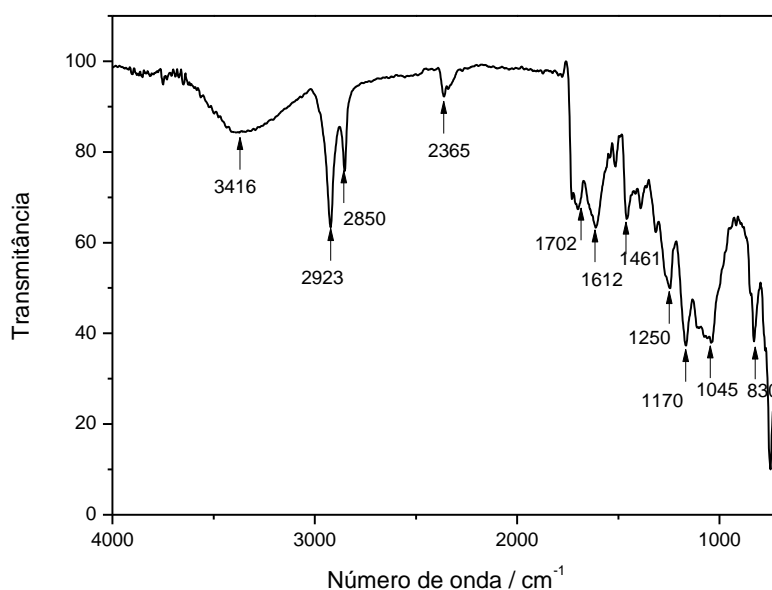


Figura 2. 1- Espectro de Infravermelho obtido para a erva mate.

Pela técnica de FTIR é possível verificar a presença de grupos funcionais que são responsáveis pela redução e estabilidade das nanopartículas⁷⁹, como polifenóis e ácidos orgânicos. DOS SANTOS *et al.*⁸⁰ descreveram que o ácido clorogênico, cafeína e flavonoides como a rutina, são as principais espécies responsáveis pela redução e estabilização das NP's Ag.

2.2.2. Espectroscopia UV-Visível

O processo de formação de nanopartículas pôde ser observado macroscopicamente, onde a reação do extrato vegetal com a solução de nitrato de prata apresentou uma coloração marrom alaranjada, indicando a formação das NP's Ag devido ao fenômeno de ressonância plasmônica de superfície. A coloração da suspensão de NP's Ag é mostrada no inset da Figura 2.2. Para caracterização da suspensão de nanopartículas de prata, utilizou-se a Espectroscopia de Absorção Molecular no UV-Visível, cujos espectros são mostrados na Figura 2.2. É possível observar que houve formação das nanopartículas de prata devido à presença de um pico de absorção em torno de 450 nm. Essa banda é devido ao fenômeno de ressonância plasmônica de superfície, que ocorre com partículas metálicas de tamanho 45 nm⁸¹. Além disso, é possível observar que duas sínteses diferentes apresentaram um espectro muito semelhante, praticamente sobrepostas (Figura 2.2), o que permite concluir que a síntese é reprodutiva.

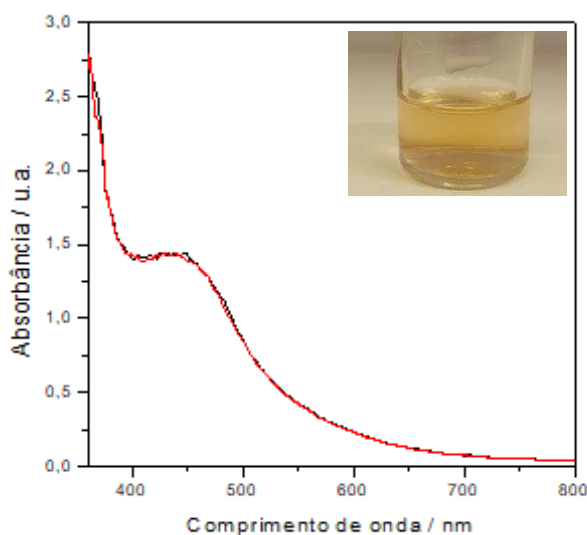


Figura 2. 2- Espectros de absorção na região plasmônica de superfície para dois diferentes lotes de suspensões de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde empregando extrato vegetal de *Ilex Paraguensis*. Inset: Foto da suspensão de NP's Ag.

Portanto, foi possível comprovar por Espectroscopia de Absorção Molecular que as nanopartículas de prata foram sintetizadas pelo método de síntese verde.

2.2.3. DLS e Potencial Zeta

A análise de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) foi utilizada para estimar o tamanho das nanopartículas de Ag em suspensão. Pode-se ver na Figura 2.3 que a suspensão de nanopartículas de prata apresenta duas distribuições de tamanho de partículas, uma centrada em 45 nm e outra em 400 nm. Essa característica pode ser atribuída à polidispersidade da suspensão, uma vez que se encontrou partículas em escala nanométrica (<100 nm) e partículas de tamanho maiores. As partículas de ≈ 45 nm podem ser atribuídas às nanopartículas de prata. Esse valor está de acordo com os resultados obtidos por Espectroscopia UV-Visível. Outros trabalhos encontrados na literatura apresentaram resultados semelhantes como Alkhulaifi *et al.*⁸² que sintetizaram NP's Ag com extrato de *Citrus limon* com tamanho entre 10-25 nm. Tailor *et al.*⁸³ sintetizaram NP's Ag utilizando extrato de *Ocimum canum* com tamanho de 16 nm e Ponsanti *et al.*⁸⁴ obtiveram nanopartículas de tamanho de 48 nm.

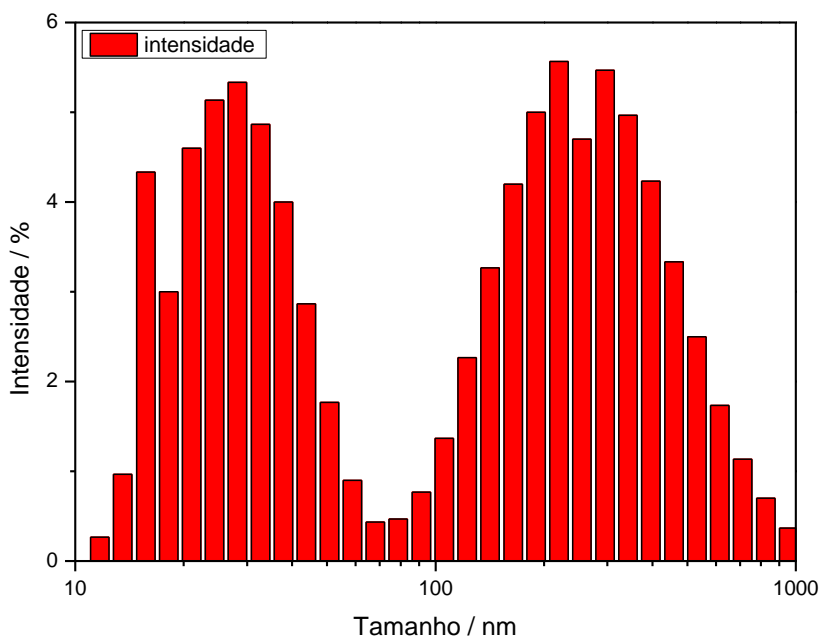


Figura 2. 3-Distribuição de tamanho das partículas da suspensão de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde empregando extrato vegetal de *Ilex Paraguensis* obtidas por Espalhamento Hidrodinâmico de Luz.

Outros valores de tamanho na ordem de 200-300 nm também foram observados com grande frequência na suspensão de nanopartículas de prata. Essas partículas podem ser atribuídas aos componentes do chá mate, o qual é composto por moléculas orgânicas como carboidratos, que possuem tamanhos nessa ordem de grandeza.

O Potencial Zeta encontrado para a suspensão de nanopartículas de prata foi de $-23,8 \pm 1,2$ mV. Esse valor está de acordo com a literatura para síntese verde de nanopartículas de prata. Rolim *et al.*⁸⁵ utilizaram extrato de chá verde para obtenção de nanopartículas de prata, obtendo-se Potencial Zeta de $-35,5 \pm 3,2$. Umai *et al.*⁸⁶ utilizaram uma espécie de oliva (*Olea europaea*) para reduzir os íons prata e obteve Potencial Zeta de -35 mV para a suspensão sintetizada. Potenciais negativos indicam que a carga da dupla camada nas nanopartículas é negativa, ou seja, moléculas com carga negativas estão estabilizando as nanopartículas de prata. Contudo, o valor não é muito alto, o que faz com que a suspensão de nanopartículas não seja muito estável. Para uma suspensão ser considerada estável, faz-se necessário que seu potencial zeta seja maior, em módulo, que 30 mV⁸⁷. Isso ocorre devido às forças de interação e repulsão entre as nanopartículas. Quanto maior (em módulo) for o valor do Potencial Zeta, maior será a estabilidade da suspensão e, portanto, maior será o valor de repulsão eletrostática⁸⁷.

2.2.4. Conclusão Parcial

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que foram obtidas nanopartículas de prata via síntese verde empregando extrato vegetal de *Ilex Paraguensis*. As NP's Ag possuem tamanho aproximado em torno de 45 nm, sendo que a suspensão é polidispersa e apresenta um potencial zeta no valor de $-23,8 \pm 1,2$ mV.

CAPÍTULO 3

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES DOPADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA

3.1. MATÉRIAS E MÉTODOS

3.1.1. Padrões e Reagentes

Os reagentes utilizados na produção dos biofilmes são mostrados na Tabela 3.1.

Tabela 3. 1- Reagentes utilizados para a produção dos biofilmes.

Reagentes	CAS-NUMBER	Marca
Metil-celulose	9004-67-5	Sigma Aldrich
Glicerol (98%)	56-81-5	Sigma Aldrich

3.1.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados neste trabalho são mostrados na Tabela 3.2.

Tabela 3. 2- Equipamentos utilizados para a produção dos biofilmes.

Equipamento	Modelo	Marca
Chapa aquecedora	114	114
Mesa agitadora	SL-180/A	SOLAB

3.1.3. Produção de biofilmes dopados com nanopartículas de prata

Para a preparação dos filmes foi utilizado o método de casting¹⁵, com adaptações. Inicialmente, foram adicionados 4,0 g de polímero metil celulose (MC) em um béquer contendo um determinado volume de água deionizada à 100 °C, como mostrado na Tabela 3.1. O sistema foi submetido a agitação constante em mesa agitadora por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado um determinado volume da suspensão de nanopartículas de prata, cujo procedimento foi descrito no Cap. 2, pág 3, e em alguns casos, o agente plastificante, glicerol 15% (m/m em relação a massa do polímero), como mostrado na Tabela 3.3.

O sistema foi submetido novamente à agitação por mais 10 minutos. Essa dispersão foi vertida em placas de vidro com bordas (34 cm x 18,5 cm), deixada à temperatura ambiente (25°C) por 24 horas e, em seguida, armazenadas a 23 °C e 55 % de Umidade Relativa (%UR) por 24 horas para evaporação do solvente. Foram realizadas 10 diferentes condições de síntese, variando-se a quantidade de água, volume de suspensão, com/sem plastificante, as quais são mostradas na Tabela 3.3.

Tabela 3. 3- Condições de síntese dos biofilmes dopados com nanopartículas de prata.

Condição	Volume de água (mL)	Volume de suspensão (mL)	Plastificante*
T1	200	0	SEM
T2	194	6	SEM
T3	188	12	SEM
T4	182	18	SEM
T5	176	24	SEM
T6	200	0	COM
T7	194	6	COM
T8	188	12	COM
T9	182	18	COM
T10	176	24	COM

* glicerol 15% (m/m em relação a massa do polímero)

3.1.4. Caracterização dos biofilmes dopados com nanopartículas de prata

3.1.4.1. Colorimetria

A cor dos filmes foi analisada colorímetro XE Color Quest Hunter lab (Reston, Virgínia, EUA). Todos os valores medidos foram de acordo com a escala CIELAB. Para esse trabalho apenas a coordenada b (no sentido negativo para o positivo, do azul para o amarelo) será discutida. Para cada biofilme, amostras retangulares foram cortadas (2,5 cm x 15 mm), sendo selecionados 5 pontos diferentes de cada filme. Todas as análises foram feitas em triplicatas.

3.1.4.2. Espectroscopia no UV-Vis

Para a analisar a transparência dos filmes utilizou o espectrofotômetro UV/VIS (Modelo UV-18000, Shimadzu Co., Kyoto, Japão) no intervalo de comprimento de onda de 200 nm (região ultravioleta) a 800 nm (região visível). Os filmes foram cortados de forma retangular (2,5 cm x 15 mm) e posicionados no suporte para filmes do equipamento. Para controle, utilizou-se o suporte vazio, ou seja, na ausência de filme.

3.1.4.3. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

A análise de FTIR foi realizada num espectrômetro Nicolet 6700 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) equipado com acessório ATR com cristal de germânio. Foram utilizados cerca de 4 cm de cada biofilme para fazer a análise. Entre cada amostra de filme, utilizou-se acetona para limpeza do cristal. Os espectros foram obtidos numa resolução de 4 cm⁻¹, com número de onda de 4000 a 700 cm⁻¹ e 32 varreduras foram realizadas para cada espectro

3.1.4.4. Termogravimetria

A decomposição térmica dos filmes foi avaliada pelo método termogravimétrico usando um analisador TGA, modelo DTG-60H (Shimadzu, Japão). Aproximadamente 3 mg de cada filme foram cortados e aquecidos em cadinhos de alumina até 450°C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min.

3.1.4.5. Microscopia eletrônica de varredura e transmissão

Amostras de biofilmes de aproximadamente 4 cm foram inseridas em adesivo de grafite. As imagens foram obtidas por um Microscópio Eletrônico de Varredura, modelo TM3000 (Hitachi High Technologies America, Inc. Schaumburg, IL, EUA). A tensão de aceleração de elétrons usada foi de 15 kV com ampliação das imagens de 400x. Para verificação da presença das NP's Ag foi utilizado EDX (Espectroscopia de Energia dispersiva de raio X) usando o detector SDD (silicon drift detector).

3.1.4.6. Espessura e propriedades mecânicas

Para determinação da espessura e propriedades mecânicas, foram preparados 3 filmes de cada tratamento (Tabela 3.4) e para cada filme utilizou-se 5 corpos de prova (150 x 25 mm), que foram coletados em diferentes pontos dos filmes.

A espessura dos filmes foi determinada com o auxílio de um micrômetro digital, com precisão de 0,001 mm (Mitutoyo Corporation, Japão). As medidas foram realizadas em 10 pontos aleatórios para cada amostra.

A resistência máxima à tração (TS), o alongamento na ruptura (EB) e o módulo de Young (YM) foram determinados por ensaio de tração usando Máquina Universal de Ensaio Mecânicos, modelo 3367 (Instron Corporation, Norwood, MA, USA), equipada com célula de carga de 500 N. A análise foi realizada de acordo com a norma ASTM D883-12 (ASTM, 2014)⁸⁸.

3.1.4.7. Propriedades a barreira de vapor d'água

A barreira a vapor de água dos biofilmes foi determinada por meio do método dessecante, de acordo com a norma ASTM E96/ E96M (ASTM, 2010)⁸⁹, com modificações. Os biofilmes foram cortados e dimensionados com 80,0 mm de diâmetro. Então, foram colocados sob as cápsulas circulares de parafina, numeradas e vedadas com parafina líquida. Utilizou-se uma solução saturada de MgCl₂ no interior das cápsulas, atingindo 33% de umidade relativa. Esses filmes, então, foram armazenados em dessecador contendo solução

saturada de NaCl a 76% de umidade relativa (UR), tendo como umidade relativa final de 43%. As amostras foram pesadas a cada 2 horas durante 22 horas. A permeabilidade a vapor de água foi calculada utilizando três repetições e expressa em (g um/m² dia kPa).

3.2. RESULTADO E DISCUSSÃO

Os filmes depois de produzidos foram embalados e selados a vácuo para melhor conservação. Diversas técnicas foram utilizadas para a caracterização física e química dos filmes. Os resultados são apresentados nos próximos itens.

3.2.1 Colorimetria

Um dos parâmetros mais importantes para a produção de uma embalagem consiste na cor, a qual é uma propriedade que tem como principal função atrair o consumidor. A cor é avaliada a partir do parâmetro “b”, que indica o índice de cor amarela do filme. Dessa forma, esse parâmetro foi determinado para cada condição de síntese do biofilme dopado com nanopartículas e os resultados são mostrados nas Figura 3.1a-b e na Tabela 3.4. Pode-se observar que à medida que se aumenta o volume de suspensão de nanopartículas, maior é o valor da coordenada “b” dos filmes, para ambos os tratamentos, sem e com plastificante. Os biofilmes foram preparados com diferentes volumes de suspensão e, portanto, espera-se que, ao aumentar o volume de suspensão adicionado no preparo dos filmes mais amarelo o biofilme ficará.

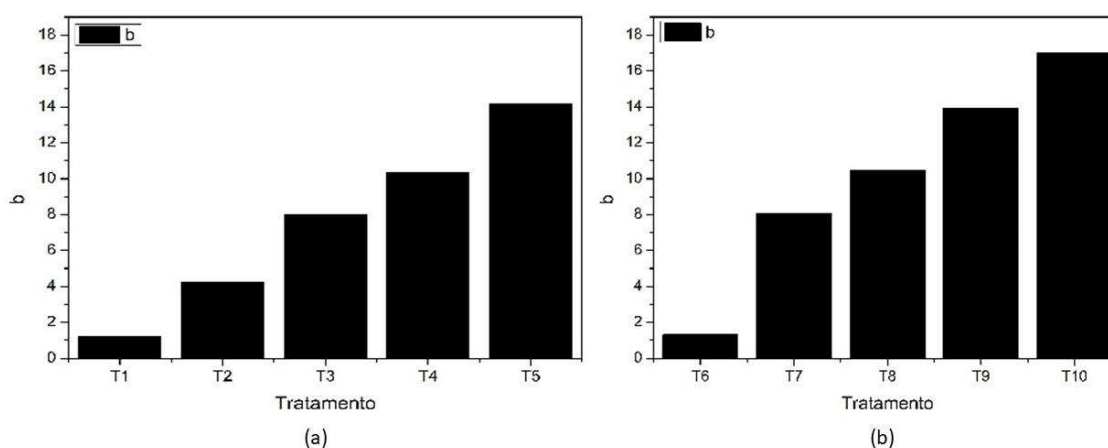


Figura 3. 1- Ensaio colorimétrico realizado para os filmes T1-T5 sem plastificante (a) e T6-T10 com plastificante (b).

Tabela 3. 4- Ensaio colorimétricos dos biofilmes contendo nanopartículas de prata sem plastificante, tratamentos T1-T5 e com plastificante, tratamentos: T6-T10.

Tratamento	Valor da coordenada b	Tratamento	Valor da coordenada b
T1	1,24	T6	1,31
T2	4,23	T7	8,06
T3	7,99	T8	10,46
T4	10,34	T9	13,94
T5	14,19	T10	17,00

As relações do parâmetro “b”, para cada condição de síntese dos biofilmes, com os volumes de suspensão são mostradas nas Figuras 3.2. a (sem plastificante) e 3.2 b (com plastificante). Pode-se observar uma relação linear entre estes parâmetros (R_2 ajustado > 0,95), para ambas as condições com e sem plastificante, isto é, à medida que o volume de suspensão adicionado aumenta, aumenta-se o valor da coordenada b* de forma linear.

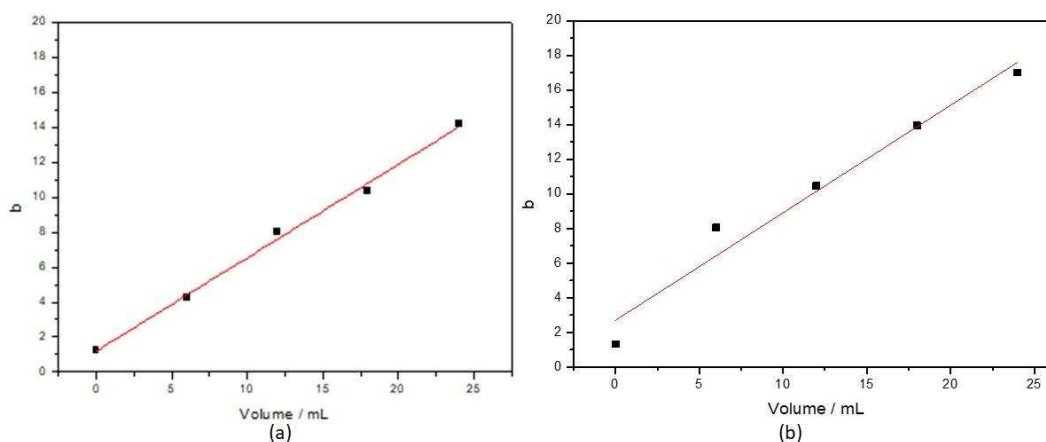


Figura 3. 2- Relação entre o parâmetro b* e volume de suspensão de nanopartículas de prata adicionado ao biofilme. (a) sem plastificante, tratamentos: T1-T5 (b) com plastificante, tratamentos: T6-T10.

Trabalhos como de Ortega *et al.*⁹⁰ mostraram que à medida que NP's Ag foram adicionadas à matriz do biofilme, maior foi o valor da coordenada de b*. Isso ocorre devido a coloração que as NP's Ag apresentam no visível devido ao efeito de RPS (ressonância plasmônica de superfície) das nanopartículas metálicas.

3.2.2. Espectroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-vis)

Outro parâmetro importante em filmes é sua transparência, uma vez que os consumidores tendem a querer observar o produto que desejam comprar. Esse parâmetro foi avaliado por Espectroscopia UV-vis, cujos resultados são mostrados nas Figuras 3.3 a-b para biofilmes sem e com plastificante.

Pode-se observar nas Figuras 3.3a-b o mínimo de transmitância em 395 nm, que corresponde à maior absorção. À medida que o volume de suspensão adicionado aumentou (T1 a T5 e T6 a T10), houve um menor valor de transmitância em 395 nm como observado para os biofilmes com e sem plastificante. A diminuição do valor de transmitância em 395 nm indica que a cor amarela do filme é aumentada. Dessa forma, tal resultado é compatível com os resultados obtidos por colorimetria, pois a coordenada “b” aumenta com o aumento do volume de suspensão adicionado.

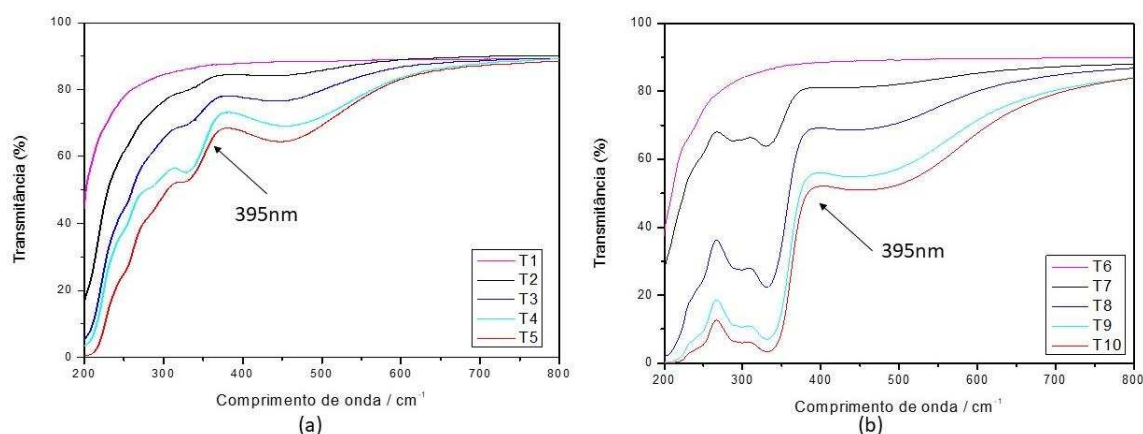


Figura 3. 3-Espectros de Transmitância no UV-Visível dos biofilmes contendo nanopartículas de prata (a) tratamentos: T1-T5 (b) tratamentos: T6-T10.

Além disso, um valor de transmitância pequeno (<10%) na faixa do ultravioleta (UVA, UVB e UVC, 100-400 nm) e do visível (400-700 nm), indica que o filme apresenta características de ser bloqueador de luz⁹⁰. O biofilme produzido na condição T10, apresenta um valor de transmitância baixo tanto na faixa do UVB (220-280 nm), quanto na faixa do UVC (280-100 nm). Dessa maneira, o biofilme T10 apresenta potencial como bloqueador de luz, que é interessante na área de alimentos, uma vez que possíveis alimentos tendem a sofrer degradação na presença de luz. Caso esse alimento seja revestido com um filme bloqueador, essa degradação é diminuída⁹⁰.

3.2.3. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Furrier (IRTF)

Os biofilmes também foram caracterizados por Espectroscopia no Infravermelho e os resultados do extrato vegetal (EM), T1 e T5 são mostrados na Figura 3.4. É possível observar que, a banda em 985 cm^{-1} , referente à metil celulose¹⁵, é observada nos biofilmes T1 e T5. Bandas referentes ao chá mate⁵¹ ($2923, 2850, 2036, 1702, 1461, 1205, 830\text{ cm}^{-1}$) estão presentes apenas no T5, que se justifica pelo fato que T1 não apresentar o extrato de chá e, portanto, nanopartículas de prata em sua composição.

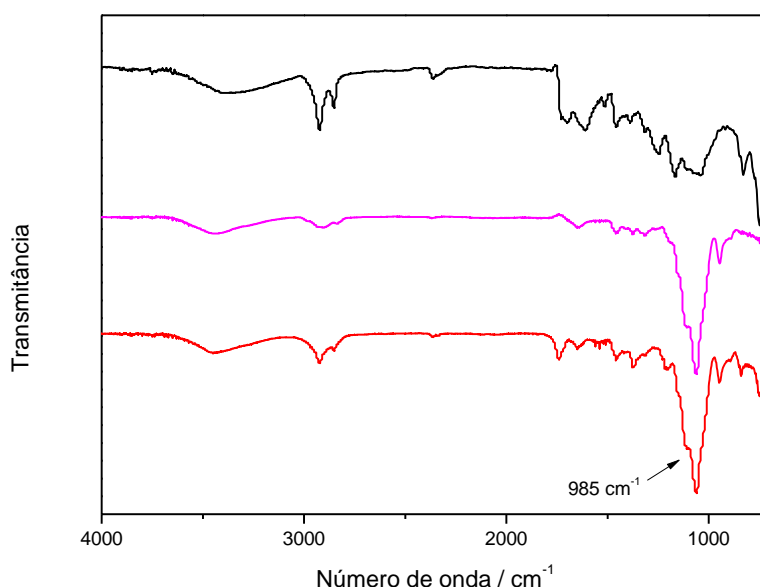


Figura 3. 4- Espectro de infravermelho (FTIR) da erva *Ilex paraguariensis* (erva mate) (—); Tratamento T1 (—); Tratamento T5(—).

Assim, através da técnica de infravermelho foi possível observar indícios que substâncias, descritas na literatura, como os polifenóis, estão presentes no extrato vegetal, as quais foram capazes de reduzir os íons de prata. Além disso, apenas os filmes que contém o extrato da erva mate possuem bandas referentes a erva mate. Logo, pode-se ter um indício de que as NP's Ag foram incorporadas nos filmes de metil celulose.

3.2.4. Termogravimetria (TG)

A estabilidade térmica dos filmes produzidos foi avaliada por termogravimetria e os resultados dos biofilmes T5 e T10 são mostrados, respectivamente, nas Figura 3.5 a-b. Pode-se observar um evento térmico na temperatura de 85°C , que ocorre para ambos os filmes, isto é, T5 (sem plastificante) e T10 (com plastificante). Nesse evento cerca de 10% de matéria

é perdida, que pode ser atribuída à desorção e evaporação da água⁹¹, uma vez que o polímero utilizado (MC) é hidrofílico e, logo, apresenta bastante afinidade com a água.

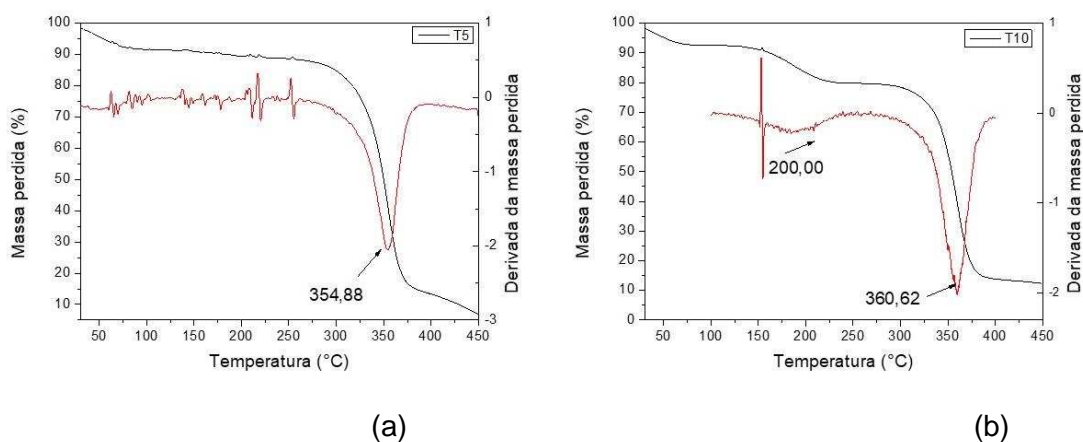


Figura 3. 5-Curvas termogravimétricas obtidas para os tratamentos T5 (a) e T10 (b).

Para o filme T10 é observado um evento térmico em ~ 200 °C, em que cerca de 10% da massa é perdida. Possivelmente, essa perda de massa está relacionada ao agente plastificante, presente apenas no filme T10. A temperatura de ebulição do glicerol é de 290°C, contudo, como essa substância interage com as cadeias poliméricas da metil celulose, seu ponto de ebulição é diminuído⁹², como pode ser observado na Figura 3.6 (b).

Tabela 3. 5- Valores de temperatura máxima de degradação para os filmes sem plastificantes (T1-T5) e para os filmes com plastificantes (T6-T10).

Tratamento	Temperatura Máxima de degradação (°C)	Tratamento	Temperatura Máxima de degradação (°C)
T1	356	T6	346
T2	344	T7	352
T3	360	T8	348
T4	341	T9	358
T5	355	T10	361

Outro evento, comum a todos os biofilmes (Tabela 3.5), ocorre entre 341-361 °C, que pode ser atribuído à degradação do polímero MC. Dicastillo *et al.* (2016)⁹³ também observou a degradação desse polímero em 361°C Logo, pode-se concluir que as nanopartículas de prata não contribuíram para aumentar a estabilidade térmicas dos filmes produzidos.

3.2.5. Microscopias Eletrônicas de Varredura (MEV)

As imagens dos biofilmes sem plastificante, obtidas por MEV, são mostradas na Figura 3.6. Pode-se observar que poucos grânulos, atribuídos à metil celulose, em destaque vermelho nas imagens, são observados. Pode-se, portanto, concluir que o biopolímero utilizado, metil celulose (MC), foi bem incorporado. E à medida que aumenta o volume de suspensão adicionado, aumenta-se a dispersão do biopolímero.

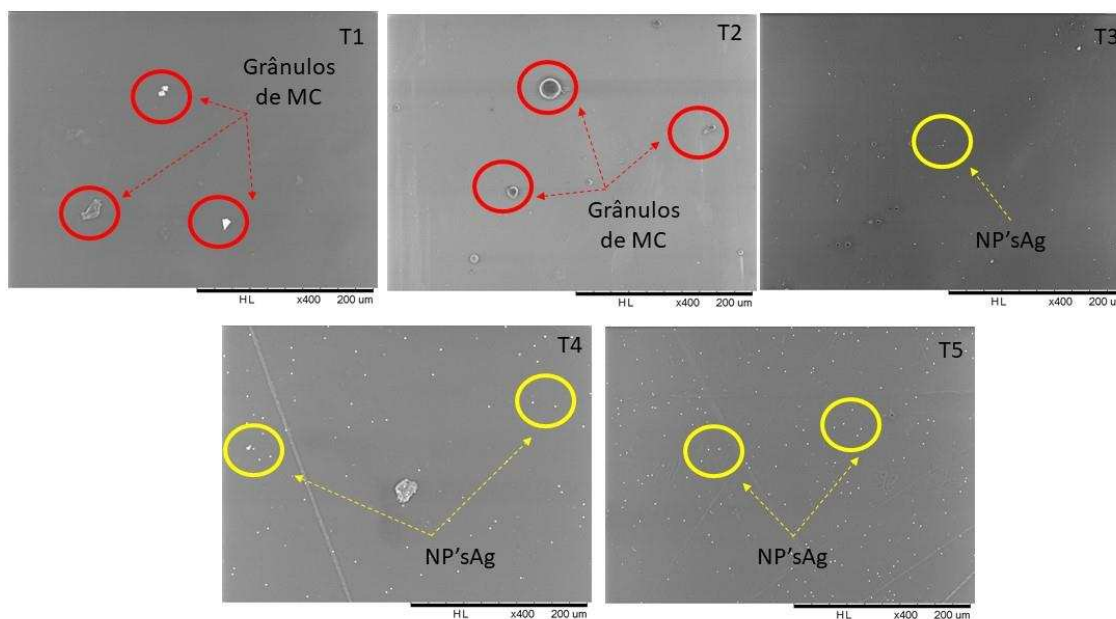


Figura 3. 6- Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para os biofilmes dopados com NPs g nas condições de síntese T1, T2, T3, T4 e T5 com magnificação em 400x.

Também é possível observar que, à medida que o volume de suspensão aumenta, há um aumento de pequenas manchas brancas no biofilme, em destaque amarelo nas imagens. Pode-se concluir, portanto, que essas manchas são, possivelmente, devido às nanopartículas de prata.

Como observado na Figura 3.7, um comportamento semelhante é observado para as condições de síntese T6 a T10, que utilizam glicerol como agente plastificante. Pode-se também observar que os filmes contendo glicerol foram mais homogêneos, uma vez que biopolímero teve uma melhor dispersão.

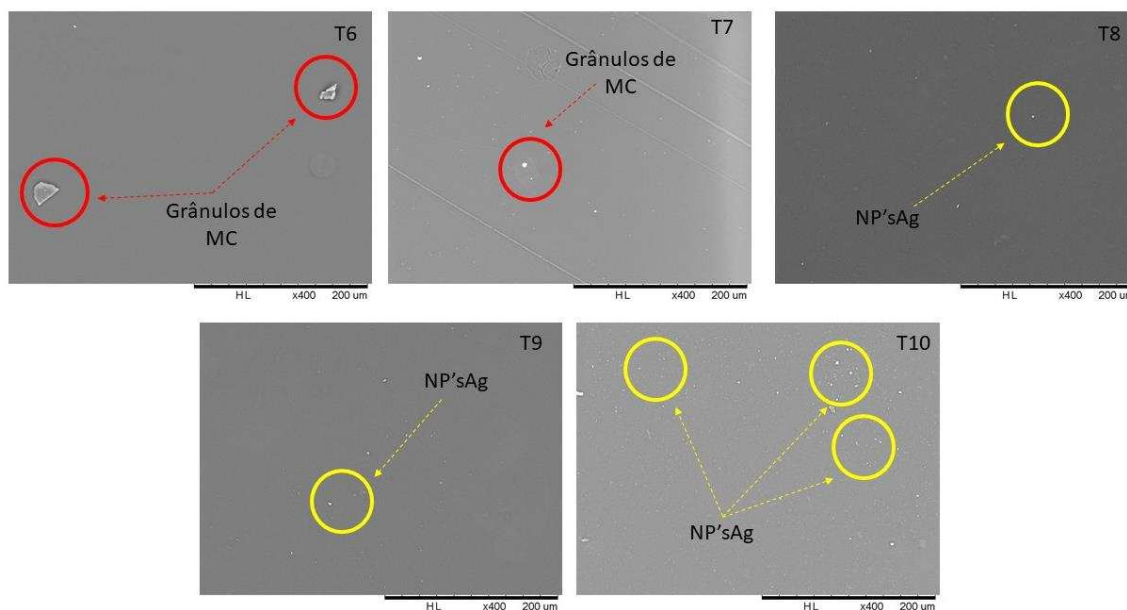


Figura 3. 7- Imagens de Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) para os biofilmes dopados com NPs Ag nas condições de síntese T6, T7, T8, T9 e T10 com magnificação em 400x.

Análises de EDX para os filmes T6, T7 e T10 são mostradas na Figura 3.8. Como T6 não possui prata, apenas o mapeamento de carbono e oxigênio é mostrado em 3.8(a). A composição de cada filme é mostrada na Tabela 3.6. Pode-se observar que a concentração de prata no filme T10 é maior que no filme T7, o que era esperado, pois foi adicionado maior de suspensão de NP's Ag em T10.

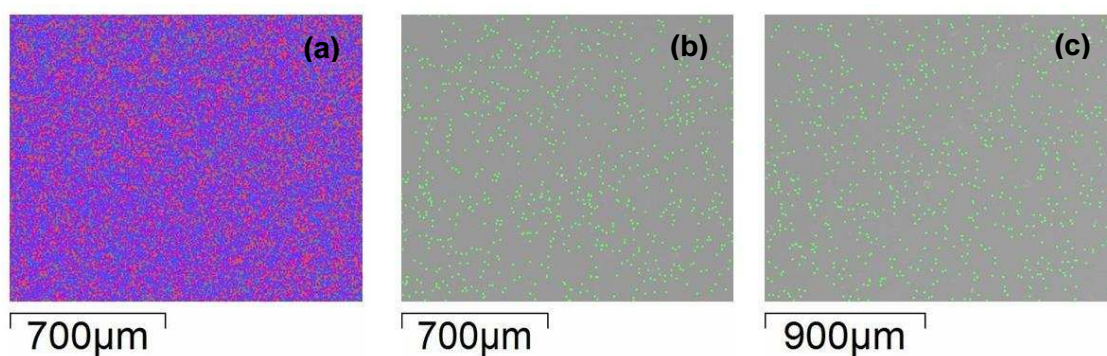


Figura 3. 8- Imagens da Microscopia Eletrônica de Varredura para os biofilmes dopados com nanopartículas de prata dos tratamentos (a) Mapeamento químico de oxigênio e Carbono de T6, (b) Mapeamento químico de prata de T7, (c) Mapeamento químico de prata T10.

De acordo com as imagens da Figura 3.8 comprova-se a presença de NP's de prata no biofilme. Desse modo, pode-se concluir que as NP's Ag foram incorporadas à matriz do biopolímero (MC). As imagens obtidas pelas análises de microscopia eletrônica de varredura comprovaram a incorporação das NP's Ag e dispersão das nanopartículas nos filmes produzidos.

Tabela 3. 6- Porcentagem dos elementos (O, C, Ag) para os biofilmes dopados com nanopartículas de prata dos tratamentos T6, T7 e T10.

Filme	% Oxigênio	% Carbono	% Prata
T6	40,919	59,081	0,000
T7	41,262	58,725	0,013
T10	42,979	56,982	0,039

3.2.6. Espessura e propriedades mecânicas

Os valores de espessuras dos biofilmes são mostrados na Tabela 3.7. Observa-se que não houve nenhuma correlação entre a espessura do filme e volume de suspensão de NP's Ag, obtendo-se uma espessura média de 0,057 e 0,061 mm para os biofilmes sem e com plastificante, respectivamente. Foi realizado um Teste de Tukey para os filmes de T1-T5 e para os filmes de T6-T10, a fim de avaliar se as nanopartículas de prata e o agente plastificante influencia em suas espessuras. Com o resultado obtido foi possível verificar que, ao nível de confiança de 95%, todas as médias são iguais. Logo, pode-se concluir que esse parâmetro não é influenciado pela adição de nanopartículas e nem pelo uso de plastificante ao filme.

Tabela 3. 7-Valores de espessura e seus respectivos desvio padrão para os biofilmes dopados com nanopartículas de prata.

Tratamento	Espessura (mm)	Tratamento	Espessura (mm)
T1	0,056 ± 0,011 ^a	T6	0,060 ± 0,008 ^a
T2	0,062 ± 0,019 ^a	T7	0,064 ± 0,001 ^a
T3	0,060 ± 0,006 ^a	T8	0,065 ± 0,001 ^a
T4	0,054 ± 0,005 ^a	T9	0,056 ± 0,013 ^a
T5	0,053 ± 0,019 ^a	T10	0,062 ± 0,006 ^a
Espessura média T1-T5	0,057	Espessura média T6-T10	0,061

As propriedades mecânicas dos filmes foram caracterizadas pelo cálculo de sua alongação percentual, resistência máxima a tração e módulo de elasticidade. Na Figura 3.10 é mostrado a alongação percentual dos filmes sem e com plastificante. Avaliando os valores encontrados, é possível verificar que a adição de plastificante aumenta consideravelmente a alongação dos filmes, que apresenta um valor médio de 18%. Esse fato pode ser explicado pelo fato do agente plastificante aumentar a distância de uma cadeia polimérica com a outra, o que aumenta a elasticidade do filme e, conseqüentemente, a sua alongação, o filme consegue esticar mais. A adição das NP's Ag para o filme sem o agente plastificante (Figura 3.9) não alterou a alongação dos filmes.

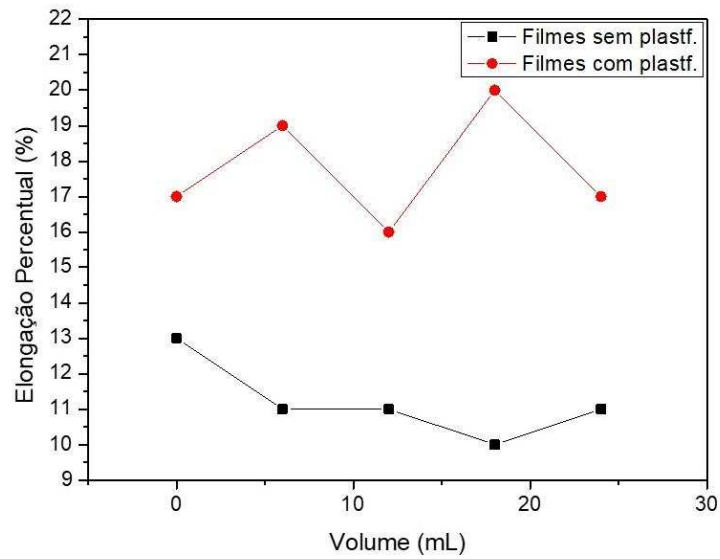


Figura 3. 9- Elongação Percentual calculada dos filmes (—) sem plastificante (—) com plastificante.

Também foi avaliado a resistência máxima à tração dos filmes (Figura 3.10) e seus modos de elasticidade (Figura 3.11). O módulo de elasticidade é definido pela razão do estresse que o filme sofreu pela tensão que uma carga é aplicada ao filme. O valor do módulo de elasticidade é justamente o valor máximo de tensão que o filme suporta sem sofrer deformação permanente. Ou seja, o módulo de elasticidade está relacionado com o valor de resistência máxima a tração que é a tensão máxima que o filme pode suportar ao ser esticado ou puxado.

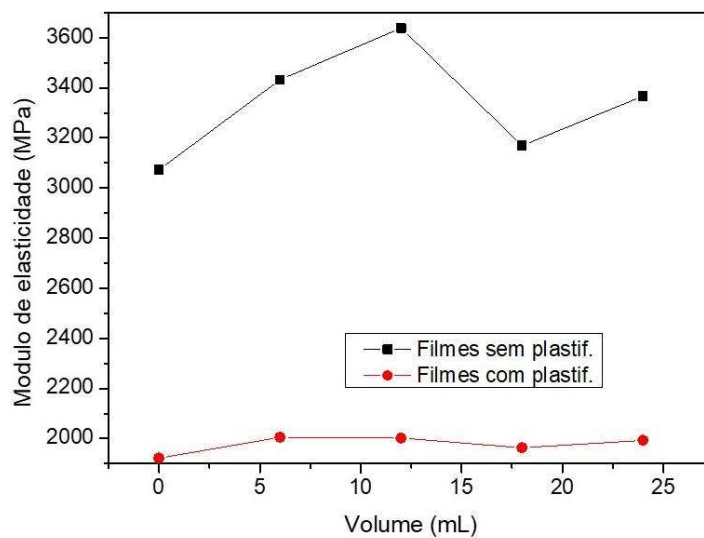


Figura 3. 10- Módulo de elasticidade obtidos para os filmes (—) sem plastificante (—) com plastificante

Pode-se perceber que ao adicionar agente plastificante (glicerol) tanto o módulo de elasticidade do filme quanto a resistência máxima a tração dos filmes foi diminuída. Esse fato ocorre, pois, a introdução do agente plastificante na cadeia polimérica do filme faz com que ocorra interações do tipo ligação de hidrogênio entre o agente plastificante e os grupos oxigenados da molécula de MC (metil celulose). Logo, ocorre uma menor interação entre as cadeias poliméricas, diminuindo a resistência e o módulo de elasticidade dos filmes. Em relação às nanopartículas, não foi possível observar nenhuma correlação entre os parâmetros avaliados.

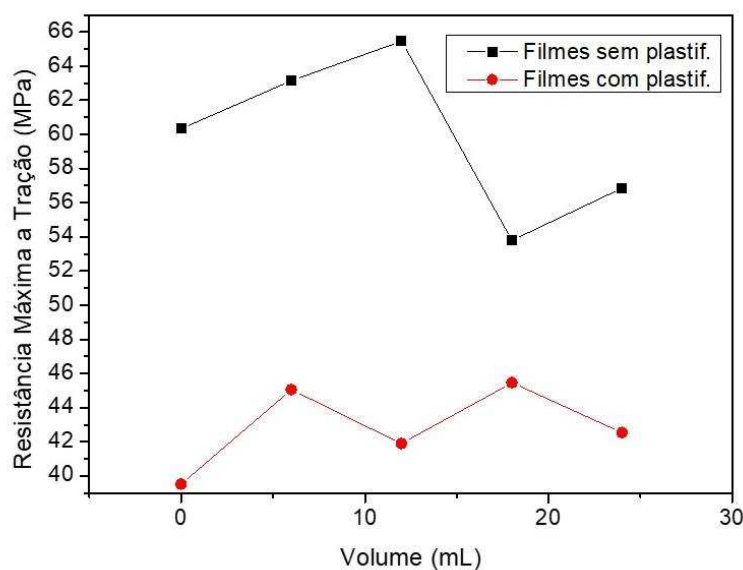


Figura 3. 11- Resistência máxima tração calculada para os filmes (—) sem plastificante (—) com plastificante.

Logo, pode-se concluir que a adição de agente plastificante altera as propriedades mecânicas dos filmes, uma vez que aumentou a elongação percentual, diminuiu a resistência máxima a tração e, também, o módulo de elasticidade dos filmes. Em relação às NP's Ag, a sua adição não alterou as propriedades mecânicas do filme, uma vez que não foi possível observar nenhuma correlação entre os parâmetros avaliados.

3.2.7. Barreira a vapor de água

A propriedade a vapor de água é uma das principais características de filmes biodegradáveis usados como embalagens de alimentos, uma vez que, dependendo de seu valor, a embalagem pode ser aplicada em alimentos mais secos ou mais úmidos. Para obter tais resultados, utilizou-se o método de dessecante e os resultados são mostrados na Tabela 3.8.

Tabela 3. 8- Permeabilidade ao vapor de água (g um/m² dia kPa) dos biofilmes dopados com nanopartículas de prata.

Filme/ Tratamento	Permeabilidade ao vapor de água (x 10 ⁵) / (g um/m ² dia kPa)	Filme/ Tratamento	Permeabilidade ao vapor de água (x 10 ⁵) / (g um/m ² dia kPa)
T1	2,07	T6	3,01
T2	2,31	T7	2,28
T3	1,63	T8	2,99
T4	2,41	T9	3,22
T5	2,35	T10	3,27

Pode-se observar que os tratamentos que contém o agente plastificante (T6-T10) possuem uma permeabilidade mais alta (2,28-3,27 g um/m² dia kPa), quando comparados com os tratamentos sem plastificante (T1-T5), cuja permeabilidade variou de 1,63 a 2,35 g.um/m² dia kPa. Tais resultados podem ser justificados pelo fato que, ao adicionar agente plastificante, as cadeias poliméricas se afastam e, conseqüentemente, as moléculas de água são absorvidas mais facilmente. Portanto, aumenta-se o valor da permeabilidade ao vapor de água. Vale ressaltar que os biofilmes foram sintetizados pelo biopolímero metil celulose (MC), que é bastante hidrofílico, ou seja, absorve bastante água.

Vieira *et al.* também produziram um biofilme utilizando NP's Ag. Segundo os autores, a permeabilidade ao vapor de água dos filmes produzidos também não foi modificada com a adição das NP's Ag. Porém, Ortega *et al.* (2017)⁹⁰ obtiveram permeabilidade ao vapor de água do filme aumentada de filmes a base de amido de milho dopados com NP's Ag, mas apenas para um filme com concentração de prata igual a 143 ppm.

Dessa maneira, pode-se concluir que os biofilmes dopados com NP's Ag sintetizados são hidrofílicos, mesmo com a adição das NP's Ag e devem ser utilizados em alimentos mais secos para viabilizar uma melhor aplicação.

3.2.8 Conclusão Parcial

Por meio das técnicas de colorimétrica e Espectroscopia no UV-Visível foi possível determinar as propriedades óticas dos filmes, como o valor da coordenada b, que indica o índice de amarelo dos filmes, e também para o filme T10 que obteve capacidade de ser um filme bloqueador de luz UV. Além disso as técnicas de Espectroscopia no Infravermelho e Microscopia Eletrônica deram indícios que as NP's Ag foram incorporadas aos filmes de MC, dando destaque a uma melhor dispersão das NP's nos filmes que contém agente plastificante (glicerol). As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas e a adição das NP's Ag não influenciou em suas propriedades. A estabilidade térmica dos filmes foi determinada por Termogravimetria, sendo observado que as NP's, também, não influenciaram a estabilidade dos materiais. Os resultados de permeabilidade ao vapor de água mostraram que os filmes

produzidos tem capacidade para atuar em alimentos mais secos. Portanto, pode-se concluir que foram obtidos biofilmes dopados com NP's Ag uniformemente distribuídos na matriz polimérica, que não influenciaram nas propriedades mecânicas dos filmes.

CAPÍTULO 4
APLICAÇÃO DOS BIOFILMES DOPADOS COM
NANOPARTÍCULAS DE PRATA

4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1. Ensaios biológicos *in vitro*

Os ensaios biológicos *in vitro* foram realizados devido à capacidade antimicrobiológica que as nanopartículas de prata podem apresentar. Esses ensaios foram realizados no departamento de embalagens da Universidade Federal de Viçosa (LABEM). Todos os materiais e reagentes utilizados foram fornecidos pelo laboratório.

4.1.1.1 Microorganismos

Foram utilizadas culturas das bactérias de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* e *Listeria innocua*. Tais bactérias estavam armazenadas em placas em câmaras de refrigeração em temperaturas de -80°C no Departamento de Embalagens da UFV (LABEM).

4.1.1.2. Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo, utilizou-se alça de platina previamente esterilizada para retirar os micro-organismos e colocá-los em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura MH (Cado Mueller-Hinton, Difco Laboratories). Depois de um período de incubação de 24 horas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, uma alíquota de cada bactéria foi retirada e colocada em uma placa de petri contendo ágar MH (Ágar Mueller-Hinton, MHA; Difco Laboratories) e incubada novamente por um período de 24 horas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Assim, uma colônia isolada de cada placa foi inoculada em 5 mL de meio MH e armazenada em estufa de incubação durante 24 horas. Após esse período, várias colônias de todas as cepas foram suspensas em solução salina de NaCl 0,9%, utilizando-se como padrão a escala de 0,5 de McFarland (concentração final de aproximadamente 10^8 UFC/mL). Em seguida, várias diluições foram realizadas até chegar à concentração final de 10^5 UFC/mL. Todos procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar para evitar ao máximo a contaminação de outros microrganismos.

4.1.1.3. Avaliação dos halos de inibição

A atividade antimicrobiana dos biofilmes foi avaliada por meio do método de difusão em ágar (CLSI, 2012). Para essa análise, placas de petri contendo ágar Mueller-Hinton foram inoculadas com a suspensão de bactérias na concentração de 10^5 UFC·mL⁻¹ e esgotadas com auxílio de alça de platina. Uma vez inoculadas, as placas receberam discos (d= 1 cm)

dos filmes produzidos (T1-T10). Em seguida, as placas foram incubadas por 24 h a 32 °C e os halos de inibição medidos com auxílio de um paquímetro. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2. RESULTADOS

As nanopartículas de prata possuem efeito antimicrobiano e, por essa razão, foram realizados ensaios biológicos com os biofilmes sintetizados. Foram utilizados 4 tipos diferentes de bactérias, sendo duas do tipo gram-positiva (*Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*) e duas gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*).

4.2.1 Ensaio biológicos

A atividade antibacteriana dos biofilmes sintetizados foi avaliada a partir do ensaio de halo (Figura 4.1).

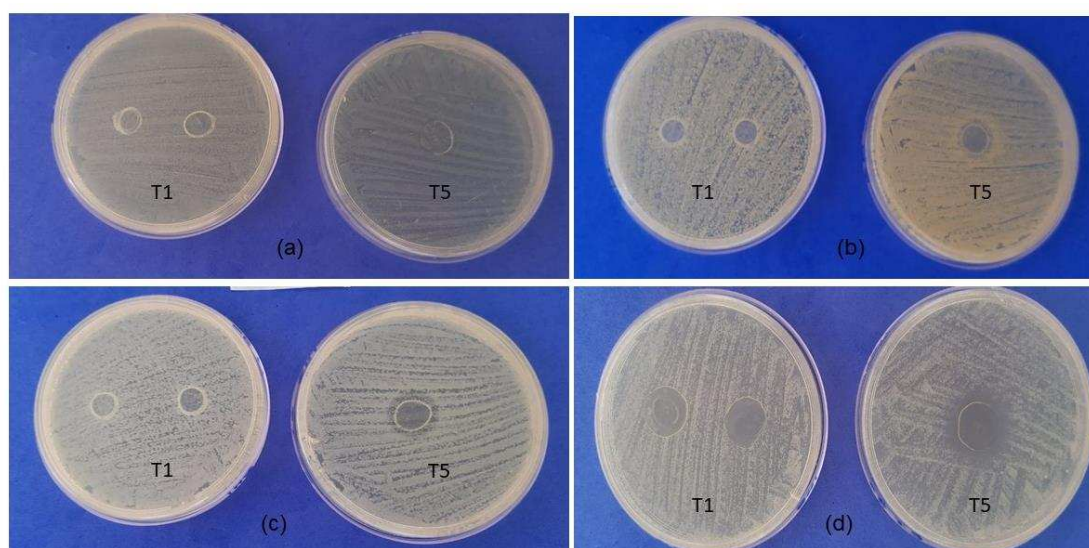


Figura 4. 1- Ensaio biológico para as bactérias (a) *Listeria innocua* (b) *Staphylococcus aureus* (c) *Escherichia coli* (d) *Pseudomonas fluorescens* para os filmes T1 e T5.

Os biofilmes apresentaram ação microbiológica apenas para o tipo gram-negativa e somente para *P.fluorescens*, mostrando que os filmes foram seletivos para essa espécie de bactéria, com halo de inibição variando de 1,45 a 1,70 cm, como mostrado na Tabela 4.1. Para T1 o halo foi de zero porque nesse tratamento não há presença das NP's Ag.

Tabela 4. 1-Valores médios dos halos de crescimento para *P. fluorescens* para os biofilmes topados com NP's Ag.

Tratamento	Valor do halo (cm)	Tratamento	Valor do halo (cm)
T1	0	T6	0

T2	1,45	T7	0
T3	1,52	T8	0
T4	1,58	T9	0
T5	1,70	T10	1,73

Para comparações estatísticas foi realizado uma regressão exponencial entre os valores do crescimento de halo para os filmes de T1-T5. A curva de regressão exponencial para o grupo sem plastificante (T1-T5) é mostrada na Figura 4.2.

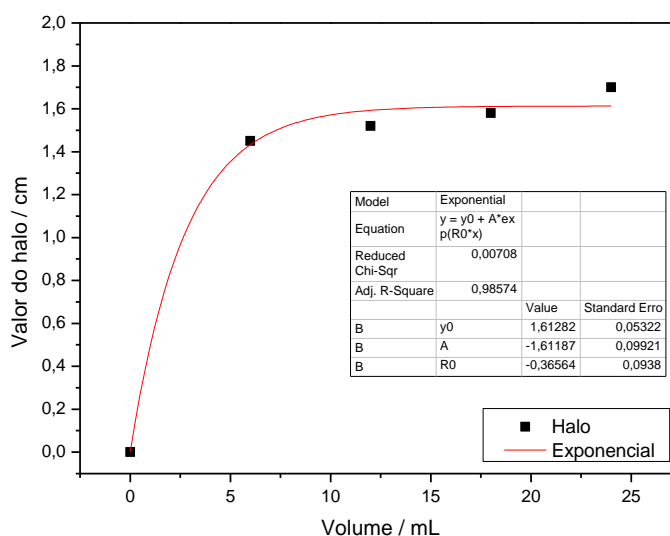


Figura 4. 2-Regressão exponencial não linear aplicada para os valores de halo encontrados nos tratamentos de T1 a T5.

Modelos mais simples foram ajustados aos dados obtidos, porém o modelo que melhor ajustou aos dados foi o modelo exponencial não linear (Eq. 4.1), com R ajustado de 0,9857, que é um valor satisfatório. O modelo mostra que o crescimento do halo só é observado depois que é adicionado suspensão ao filme, portanto, tal atividade está relacionada à suspensão de nanopartículas e não ao polímero (MC).

$$Halo = 1,61 + [-1,61 \times \exp(-0,36 \times \text{volume adicionado})] \quad \text{Eq. 4.1}$$

Para os filmes de tratamento T6-T10, foi possível observar atividade apenas para o filme T10. Uma possível explicação para esse resultado é que o glicerol, o agente plastificante, também é utilizado como agente estabilizante de nanopartículas de prata e ouro. Possivelmente, o glicerol interage fortemente com as nanopartículas de prata e impedem que essas difundam para o meio de cultura e, então, diminuindo a atividade antimicrobiana.

Tais resultados são compatíveis com a literatura, em que apresentam as nanopartículas de prata ativas contra a bactéria do gênero *Pseudomonas*⁹⁴. Como por

exemplo de Sarkar *et al.* (2019)⁹⁵, que obteve atividade de 130 µg/mL frente a *Pseudomonas putida*. Contudo, devido à composição do chá mate, tal atividade não foi muito elevada, uma vez que na composição do chá são encontrados carboidratos que são fontes de alimento para essas bactérias.

4.2.2 Conclusão Parcial

A partir dos ensaios realizados foi possível verificar que os biofilmes possuem atividade apenas à bactéria gram-negativa *Pseudomonas fluorescens*. Para os filmes sem plastificante, foi possível ajustar um modelo exponencial que relaciona o volume de NP's Ag adicionados ao filme e o halo de inibição. Para os filmes com plastificante, não foi possível obter um modelo, uma vez que o glicerol atua como agente estabilizante das NP's Ag, que influenciou nas atividades dos filmes. Assim, os biofilmes produzidos possuem capacidade de atuar como embalagens antimicrobianas ECO-FRIENDLY.

CAPÍTULO 5
CONCLUSÃO GERAL

5. CONCLUSÃO GERAL

Foram sintetizados 10 novos biofilmes dopados com nanopartículas de prata com potencial para serem utilizados como embalagens ativas antimicrobianas. A suspensão de nanopartícula de prata foi sintetizada pelo método de síntese verde e as partículas tiveram tamanho médio de 45 nm e estabilidade determinada pelo potencial zeta de -23 mV. O biofilme T10 obteve capacidade de ser bloqueador de luz UV, uma vez que esse filme obteve refletância de 9% no comprimento de onda < 300nm. Além disso os biofilmes sintetizados apresentaram atividade frente a bactéria gram-negativa *Pseudomonus fluorescens*. Assim pode-se concluir que este trabalho apresentou uma produção eficaz para biofilmes que possuem potencial para serem utilizados como embalagens na área de alimentos.

6. SUGESTÃO DE NOVOS TRABALHOS

Como proposta de novos trabalhos, sugere-se utilizar os biofilmes produzidos neste trabalho como embalagens de alimentos que são afetados pela bactéria *Pseudomonus fluorescens*, como o queijo, e avaliar a difusão das NP's Ag nesse alimento

7. REFERÊNCIAS

1. Landim APM, Bernardo CO, Beatriz Araujo Martins I, Rodrigues Francisco M, Barreto Santos M, Ramos de Melo N. Sustentabilidade quanto às embalagens de alimentos no Brasil Sustainability concerning food packaging in Brazil. 2014;1-11. doi:10.1590/0104-1428.1897
2. Gad SC, Services GC. *Petroleum Hydrocarbons*. Vol 3. Third Edition. Elsevier; 2014. doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00899-X
3. Miranda JG. Era do Plástico. 2010.
4. Piatti TM, Augusto R, Rodrigues F, Al M. Plásticos : características , usos , produção e impactos ambientais. 2005.
5. Coelho MMP, Afonso AF, Trogo B. RC04 - História das embalagens: contribuições da ciência para a conservação dos alimentos. *História da Ciência e Ensino construindo interfaces*. 2017;16:31. doi:10.23925/2178-2911.2017v16i1a31
6. Braga LR, Federal D, Federal D. Embalagens ativas : uma nova abordagem para embalagens alimentícias. :170-186.
7. Sousa LCFS, Sousa J da S, Borges M da GB, et al. Tecnologia de embalagens e conservação de alimentos quanto aos aspectos químico e microbiológico. *ACSA-Agropecuária Científica no Semi-Árido*. 2012;V. 8,(1):19-27. doi:10.1109/ICASSP.2009.4959919
8. Coelho T. *O Brasil é o 4º Maior Produtor de Lixo Plástico Do Mundo e Recicla Apenas 1%*. Rio de Janeiro; 2014. <https://g1.globo.com/natureza/noticia/2019/03/04/brasil-e-o-4o-maior-produtor-de-lixo-plastico-do-mundo-e-recicla-apenas-1.ghtml>.
9. Innocentni-mei, Lucia Helena; Mariani PDSC. VISÃO GERAL SOBRE POLÍMEROS OU PLÁSTICOS AMBIENTALMENTE DEGRADÁVEIS PADs. 2005:27.
10. Silva CO, Santos GM, Silva LN. A DEGRADAÇÃO AMBIENTAL CAUSADA PELO DESCARTE INADEQUADO DAS EMBALAGENS PLÁSTICAS: Estudo de Caso. *Rev Eletrônica em Gestão, Educ e Tecnol Ambient*. 2013;13(13):2683-2689. doi:10.5902/223611708248
11. Ojijo V, Sinha Ray S. Processing strategies in bionanocomposites. *Prog Polym Sci*. 2013;38(10-11):1543-1589. doi:10.1016/j.progpolymsci.2013.05.011
12. Hule RA, Pochan DJ. Polymer nanocomposites for biomedical applications. *MRS Bull*. 2007;32(4):354-358. doi:10.1557/mrs2007.235
13. He X, Deng H, Hwang H min. The current application of nanotechnology in food and agriculture. *J Food Drug Anal*. 2019;27(1):1-21. doi:10.1016/j.jfda.2018.12.002
14. Lad AN, Pandya A, Agrawal YK. Overview of nano-enabled screening of drug-facilitated

- crime: A promising tool in forensic investigation. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2016;80(June):458-470. doi:10.1016/j.trac.2015.07.016
15. Espitia PJP, De Fátima Ferreira Soares N, Teófilo RF, et al. Physical-mechanical and antimicrobial properties of nanocomposite films with pediocin and ZnO nanoparticles. *Carbohydr Polym.* 2013;94(1):199-208. doi:10.1016/j.carbpol.2013.01.003
 16. Katz LM, Dewan K, Bronaugh RL. Nanotechnology in cosmetics. *Food Chem Toxicol.* 2015;85:127-137. doi:10.1016/j.fct.2015.06.020
 17. Tunç S, Duman O. Preparation of active antimicrobial methyl cellulose/carvacrol/montmorillonite nanocomposite films and investigation of carvacrol release. *LWT - Food Sci Technol.* 2011;44(2):465-472. doi:10.1016/j.lwt.2010.08.018
 18. Vieira JG. Produção da metilcelulose a partir da celulose do bagaço de cana-de-açúcar usando dois agentes metilantes: sulfato de dimetila e iodometano, para aplicação como aditivo na formulação de argamassas. 2012:1-115.
 19. Menegale VL de C, Leão AL, Filho HG, Campos Menegale ML de. Resíduos Agroindustriais Para Enriquecimento De Fertilizante Orgânico. *Energ Na Agric.* 2012;27(2):113. doi:10.17224/energagric.2012v27n2p113-123
 20. Psomiadou E, Arvanitoyannis I, Yamamoto N. Edible films made from natural resources; microcrystalline cellulose (MCC), methylcellulose (MC) and corn starch and polyols - Part 2. *Carbohydr Polym.* 1996;31(4):193-204. doi:10.1016/S0144-8617(96)00077-X
 21. Peressini D, Bravin B, Lapasin R, Rizzotti C, Sensidoni A. Starch-methylcellulose based edible films: Rheological properties of film-forming dispersions. *J Food Eng.* 2003;59(1):25-32. doi:10.1016/S0260-8774(02)00426-0
 22. Tomšič M, Prossnigg F, Glatter O. A thermoreversible double gel: Characterization of a methylcellulose and κ-carrageenan mixed system in water by SAXS, DSC and rheology. *J Colloid Interface Sci.* 2008;322(1):41-50. doi:10.1016/j.jcis.2008.03.013
 23. Bodvik R, Dedinaite A, Karlson L, et al. Aggregation and network formation of aqueous methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose solutions. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2010;354(1-3):162-171. doi:10.1016/j.colsurfa.2009.09.040
 24. Atarés L, Chiralt A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends Food Sci Technol.* 2016;48:51-62. doi:10.1016/j.tifs.2015.12.001
 25. Baruah D, Yadav RNS, Yadav A, Das AM. *Alpinia nigra* fruits mediated synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial and photocatalytic activities. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2019;201(September):111649. doi:10.1016/j.jphotobiol.2019.111649
 26. Carbone M, Donia DT, Sabbatella G, Antiochia R. Silver nanoparticles in polymeric matrices for fresh food packaging. *J King Saud Univ - Sci.* 2016;28(4):273-279.

- doi:10.1016/j.jksus.2016.05.004
27. Stevens KNJ, Crespo-Biel O, van den Bosch EEM, et al. The relationship between the antimicrobial effect of catheter coatings containing silver nanoparticles and the coagulation of contacting blood. *Biomaterials*. 2009;30(22):3682-3690. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.03.054
 28. Khodashenas B, Ghorbani HR. Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. *Arab J Chem*. 2015;12(8):1823-1838. doi:10.1016/j.arabjc.2014.12.014
 29. Philip D. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using Hibiscus rosa sinensis. *Phys E Low-Dimensional Syst Nanostructures*. 2010;42(5):1417-1424. doi:10.1016/j.physe.2009.11.081
 30. Deshmukh SP, Patil SM, Mullani SB, Delekar SD. Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review. *Mater Sci Eng C*. 2019;97(December 2018):954-965. doi:10.1016/j.msec.2018.12.102
 31. Manna J, Goswami S, Shilpa N, Sahu N, Rana RK. Biomimetic method to assemble nanostructured Ag@ZnO on cotton fabrics: Application as self-cleaning flexible materials with visible-light photocatalysis and antibacterial activities. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(15):8076-8082. doi:10.1021/acsami.5b00633
 32. Mathew S, S S, Mathew J, Radhakrishnan EK. Biodegradable and active nanocomposite pouches reinforced with silver nanoparticles for improved packaging of chicken sausages. *Food Packag Shelf Life*. 2019;19(December 2018):155-166. doi:10.1016/j.fpsl.2018.12.009
 33. Silver POF. *Quim. Nova*,. 2012;35(9):1872-1878.
 34. Hutter BE, Fendler JH. Exploitation of Localized Surface Plasmon Resonance **. 2004;(19):1685-1706. doi:10.1002/adma.200400271
 35. Ferreira J, Santos L, José M, et al. Revisão. 2016;39(9):1098-1111.
 36. Petryayeva E, Krull UJ. Analytica Chimica Acta Localized surface plasmon resonance : Nanostructures , bioassays and biosensing — A review. *Anal Chim Acta*. 2011;706(1):8-24. doi:10.1016/j.aca.2011.08.020
 37. Pryshchepa O. Silver nanoparticles: Synthesis , investigation techniques , and properties. 2020;284:87-100. doi:10.1016/j.cis.2020.102246
 38. Bhattarai B, Zaker Y, Bigioni TP. Green synthesis of gold and silver nanoparticles: Challenges and opportunities. *Curr Opin Green Sustain Chem*. 2018;12:91-100. doi:10.1016/j.cogsc.2018.06.007
 39. Chaudhry Q, Castle L. Food applications of nanotechnologies: An overview of opportunities and challenges for developing countries. *Trends Food Sci Technol*. 2011;22(11):595-603. doi:10.1016/j.tifs.2011.01.001

40. Darmanin T, Nativo P, Gilliland D, et al. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects Microwave-assisted synthesis of silver nanoprisms / nanoplates using a “ modified polyol process .” 2012;395:145-151. doi:10.1016/j.colsurfa.2011.12.020
41. Kelly JM, Keegan G. Triangular Silver Nanoparticles: Their Preparation , Functionalisation and Properties. 2012;122(2):337-345.
42. Gu X, Nie C, Lai Y, Lin C. Synthesis of silver nanorods and nanowires by tartrate-reduced route in aqueous solutions. 2006;96:217-222. doi:10.1016/j.matchemphys.2005.07.006
43. Online VA, Varma RS. Speedy fabrication of diameter-controlled Ag nanowires using glycerol under microwave irradiation conditions †. 2013;(111):692-694. doi:10.1039/c2cc37696b
44. Signatures S. Polyhedral Silver Nanocrystals with Distinct Scattering Signatures**. 2006:4597-4601. doi:10.1002/anie.200601277
45. Eddy G, Poinern J, Chapman P, Shah M, Fawcett D. Green biosynthesis of silver nanocubes using the leaf extracts from Eucalyptus macrocarpa. 2013;2(1):1-7.
46. Lee KJ, Jun BH, Kim TH, Joung J. Direct synthesis and inkjetting of silver nanocrystals toward printed electronics. 2006;2424. doi:10.1088/0957-4484/17/9/060
47. Thapa N, Ebrahiminezhad A, Taghizadeh S, Singh K, Naidoo Y. Biogenic synthesis of silver nanoparticles by leaf extract of Cassia angustifolia. doi:10.1088/2043-6262/3/4/045006
48. Yılmaz Öztürk B, Yenice Gürsu B, Dağ İ. Antibiofilm and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles using marine red algae Gelidium corneum. *Process Biochem.* 2020;89:208-219. doi:10.1016/j.procbio.2019.10.027
49. Hekmati M, Hasanirad S, Khaledi A, Esmaeili D. Green synthesis of silver nanoparticles using extracts of Allium rotundum L, Falcaria vulgaris Bernh, and Ferulago angulate Boiss, and their antimicrobial effects in vitro. *Gene Reports.* 2020;19:100589. doi:10.1016/j.genrep.2020.100589
50. Durán N, Durán M, de Jesus MB, Seabra AB, Fávaro WJ, Nakazato G. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2016;12(3):789-799. doi:10.1016/j.nano.2015.11.016
51. Silveira AP, Bonatto CC, Lopes CAP, Rivera LMR, Silva LP. Physicochemical characteristics and antibacterial effects of silver nanoparticles produced using the aqueous extract of Ilex paraguariensis. *Mater Chem Phys.* 2018;216(July 2017):476-484. doi:10.1016/j.matchemphys.2018.05.068

52. de Marco BA, Rechelo BS, Tócoli EG, Kogawa AC, Salgado HRN. Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. *Saudi Pharm J.* 2019;27(1):1-8. doi:10.1016/j.jsps.2018.07.011
53. Vaid P, Raizada P, Saini AK, Saini R V. Biogenic silver, gold and copper nanoparticles - A sustainable green chemistry approach for cancer therapy. *Sustain Chem Pharm.* 2020;16(August 2019):100247. doi:10.1016/j.scp.2020.100247
54. Julio Jimenez LF, Herrera Barros A, Caamaño De Ávila ZI. Synthesis and characterization of Fe₅₅Co₄₅ magnetic nanoparticles by polyol and green chemistry method. *Results Phys.* 2019;15(November):102785. doi:10.1016/j.rinp.2019.102785
55. Rahaei MB, Yazdani rad R, Kazemzadeh A, Ebadzadeh T. Mechanochemical synthesis of nano TiC powder by mechanical milling of titanium and graphite powders. *Powder Technol.* 2012;217:369-376. doi:10.1016/j.powtec.2011.10.050
56. Mendoza-Ruiz DC, Estrada-Guel I, Antúnez-Flores W, Martínez-Sánchez R. Microstructural characterization of aluminum - Silver nanoparticles composites produced by mechanical milling. *Microsc Microanal.* 2008;14(SUPPL. 2):368-369. doi:10.1017/S143192760808608X
57. Huang HL, Chen JK, Hounng MP. Using soft lithography to fabricate gold nanoparticle patterns for bottom-gate field effect transistors. *Thin Solid Films.* 2012;524:304-308. doi:10.1016/j.tsf.2012.09.078
58. Wang Q, Zhang C, Gong T, et al. Large-scale diamond silver nanoparticle arrays as uniform and sensitive SERS substrates fabricated by surface plasmon lithography technology. *Opt Commun.* 2019;444(December 2018):56-62. doi:10.1016/j.optcom.2019.03.071
59. Ghaem EN, Dorrnian D, Sari AH. Characterization of cobalt oxide nanoparticles produced by laser ablation method: Effects of laser fluence. *Phys E Low-Dimensional Syst Nanostructures.* 2020;115(August 2019). doi:10.1016/j.physe.2019.113670
60. Li X, Xu H, Chen ZS, Chen G. Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. *J Nanomater.* 2011;2011. doi:10.1155/2011/270974
61. Ereno D, Silva L. Plantas do cerrado são usadas na produção de nanossistemas para controle de patógenos e pragas da agricultura, entre outras aplicações. 2014:70-73.
62. Li S, Shen Y, Xie A, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* L. extract. *Green Chem.* 2007;9(8):852-858. doi:10.1039/b615357g
63. Loo YY, Chieng BW, Nishibuchi M, Radu S. Synthesis of silver nanoparticles by using tea leaf extract from *Camellia Sinensis*. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:4263-4267. doi:10.2147/IJN.S33344
64. Saxena A, Tripathi RM, Singh RP. Biological synthesis of silver nanoparticles by using

- onion (*Allium cepa*) extract and their antibacterial activity. *Dig J Nanomater Biostructures*. 2010;5(2):427-432.
65. Prathna TC, Chandrasekaran N, Raichur AM, Mukherjee A. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by Citrus limon (lemon) aqueous extract and theoretical prediction of particle size. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2011;82(1):152-159. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.08.036
 66. Ontong JC, Paosen S, Shankar S, Voravuthikunchai SP. Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles using Senna alata bark extract and its antimicrobial mechanism through enhancement of bacterial membrane degradation. *J Microbiol Methods*. 2019;165(July):105692. doi:10.1016/j.mimet.2019.105692
 67. Nilavukkarasi M, Vijayakumar S, Kumar SP. Materials Science for Energy Technologies Biological synthesis and characterization of silver nanoparticles with Capparis zeylanica L . leaf extract for potent antimicrobial and anti proliferation efficiency. *Mater Sci Energy Technol*. 2020;3:371-376. doi:10.1016/j.mset.2020.02.008
 68. Hotchkiss JH. Naringinase Immobilization in Packaging Films for Reducing Naringin. 1998;63(1):61-65.
 69. Vilela C, Kurek M, Hayouka Z, et al. A concise guide to active agents for active food packaging. *Trends Food Sci Technol*. 2018;80(July):212-222. doi:10.1016/j.tifs.2018.08.006
 70. Vaezi K, Asadpour G, Sharifi H. Effect of ZnO nanoparticles on the mechanical, barrier and optical properties of thermoplastic cationic starch/montmorillonite biodegradable films. *Int J Biol Macromol*. 2019;124:519-529. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.142
 71. Nguyen Van Long N, Joly C, Dantigny P. Active packaging with antifungal activities. *Int J Food Microbiol*. 2016;220:73-90. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.001
 72. Chawla R, Sivakumar S, Kaur H. Antimicrobial edible films in food packaging : Current scenario and recent nanotechnological advancements- a review. *Carbohydr Polym Technol Appl*. 2021;2(August 2020):100024. doi:10.1016/j.carpta.2020.100024
 73. Peighambardoust SJ, Peighambardoust SH, Mohammadzadeh Pournasir N, Pakdel P. Properties of active starch-based films incorporating a combination of Ag, ZnO and CuO nanoparticles for potential use in food packaging applications. *Food Packag Shelf Life*. 2019;22(December 2018):100420. doi:10.1016/j.fpsl.2019.100420
 74. Braga LR, Rangel ET, Anselmo P, Suarez Z, Machado F. Simple synthesis of active films based on PVC incorporated with silver nanoparticles : Evaluation of the thermal , structural and antimicrobial properties. *Food Packag Shelf Life*. 2018;15(November 2017):122-129. doi:10.1016/j.fpsl.2017.12.005
 75. Ramos M, Souza M De, Castilho M, et al. Antioxidant and antimicrobial methylcellulose

- fi lms containing Lippia alba extract and silver nanoparticles. 2018;192(March):37-43.
76. Skoog; West;Holler;Crouch. *FUNDAMENTOS DE QUÍMICA ANALÍTICA*. 8° edição. USA: THOMSON; 2014.
 77. Blum-Silva CH, Luz ABG, Nascimento MVPS, et al. Qualitative and quantitative analysis data of the major constituents of Ilex paraguariensis leaves by UPLC-PDA and QTOF-MS. *Data Br*. 2016;8:295-299. doi:10.1016/j.dib.2016.05.022
 78. Filip R, Lotito SB, Ferraro G, Fraga CG. Antioxidant activity of Ilex paraguariensis and related species. *Nutr Res*. 2000;20(10):1437-1446. doi:10.1016/S0271-5317(00)80024-X
 79. Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on Ilex paraguariensis research: Minireview. *J Ethnopharmacol*. 2011;136(3):378-384. doi:10.1016/j.jep.2010.06.032
 80. Santos LP dos, Caon T, Battisti MA, et al. Antioxidant polymeric nanoparticles containing standardized extract of Ilex paraguariensis A. St.-Hil. for topical use. *Ind Crops Prod*. 2017;108(August):738-747. doi:10.1016/j.indcrop.2017.07.035
 81. Noguez C. Surface Plasmons on Metal Nanoparticles : The Influence of Shape and Physical. 2007:3806-3819.
 82. Alkhulaifi MM, Alshehri JH, Alwehaibi MA, et al. Saudi Journal of Biological Sciences Green synthesis of silver nanoparticles using Citrus limon peels and evaluation of their antibacterial and cytotoxic properties. 2020;(xxxx).
 83. Tailor G, Yadav BL, Chaudhary J, Joshi M, Suvalka C. Green synthesis of silver nanoparticles using Ocimum canum and their anti-bacterial activity. *Biochem Biophys Reports*. 2020;24(December):100848. doi:10.1016/j.bbrep.2020.100848
 84. Pechyen C. A flower shape-green synthesis and characterization of silver nanoparticles (AgNPs). *Integr Med Res*. 2020;9(5):11003-11012. doi:10.1016/j.jmrt.2020.07.077
 85. Rolim WR, Pelegrino MT, Araújo B De, et al. Applied Surface Science Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles : Characterization , cytotoxicity evaluation and antibacterial activity. *Appl Surf Sci*. 2019;463(August 2018):66-74. doi:10.1016/j.apsusc.2018.08.203
 86. Umai D, Vikranth A, Meenambiga SS. Materials Today : Proceedings A study on the green synthesis of silver nanoparticles from Olea europaea and its activity against oral pathogens. *Mater Today Proc*. 2020;(xxxx). doi:10.1016/j.matpr.2020.10.681
 87. Haider MJ, Mehdi MS. Study of morphology and Zeta Potential analyzer for the Silver Nanoparticles. 2014;5(7):381-387.
 88. Products G, Materi- EI, Transmittance L. *Plastics 1*. 2014:1-16. doi:10.1520/D0883-12.2
 89. Electrical S, Tape I. Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials

1. 1995;04:1-8.
90. Ortega F, Giannuzzi L, Arce VB, García MA. Food Hydrocolloids Active composite starch films containing green synthesized silver nanoparticles. *Food Hydrocoll.* 2017;70:152-162. doi:10.1016/j.foodhyd.2017.03.036
91. Montero B, Rico M, Rodríguez-Ilamazares S, Barral L. Effect of nanocellulose as a filler on biodegradable thermoplastic starch films from tuber, cereal and legume. *Carbohydr Polym.* 2017;157:1094-1104. doi:10.1016/j.carbpol.2016.10.073
92. Rahman WAWA, Tin L, Rahmat AR, Samad AA. Thermal behaviour and interactions of cassava starch filled with glycerol plasticized polyvinyl alcohol blends. *Carbohydr Polym.* 2010;81(4):805-810. doi:10.1016/j.carbpol.2010.03.052
93. Dicastillo D, Bustos F, Guarda A, Jos M. Food Hydrocolloids Cross-linked methyl cellulose films with murta fruit extract for antioxidant and antimicrobial active food packaging. 2016;60. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.03.020
94. Lewisoscar F, Nithya C, Vismaya S, Arunkumar M, Thajuddin N. Progress in Organic Coatings In vitro analysis of green fabricated silver nanoparticles (AgNPs) against Pseudomonas aeruginosa PA14 biofilm formation, their application on urinary catheter. *Prog Org Coatings.* 2021;151(December 2020):106058. doi:10.1016/j.porgcoat.2020.106058
95. Sarkar R, C AK, Kumbhakar P, Mandal T. ScienceDirect Aqueous synthesis and antibacterial activity of Silver nanoparticles against pseudomonas putida. *Mater Today Proc.* 2019;11:686-694. doi:10.1016/j.matpr.2019.03.028