

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GRASIELI BELONI DE MELO

**SÍNTESE VERDE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
PRATA USANDO EXTRATO AQUOSO DE ERVA MATE (*Ilex
paraguariensis*)**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2015

GRASIELI BELONI DE MELO

**SÍNTESE VERDE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
PRATA USANDO EXTRATO AQUOSO DE ERVA MATE (*ILEX
PARAGUARIENSIS*)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos, do Departamento de Engenharia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dra. Mirela Vanin dos Santos Lima

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Fernanda Vitória Leimann

CAMPO MOURÃO

2015



TERMO DE APROVAÇÃO

**SÍNTESE VERDE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
USANDO EXTRATO AQUOSO DE ERVA MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*)**

por

GRASIELI BELONI DE MELO

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 30 de novembro de 2015 como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Mirela Vanin dos Santos Lima
Prof^a Orientadora

Odinei Hess Gonçalves
Membro titular

Paulo Henrique Março
Membro titular

AGRADECIMENTOS

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná por ceder espaço físico e pelo ensino de qualidade que foram proporcionados, assim como aos professores que colaboraram direta e indiretamente para minha formação acadêmica.

À minha orientadora, Dr^a Mirela Vanin S. Lima, por me acompanhar ao longo destes quase 3 anos, por todos os ensinamentos, todas as palavras de apoio e incentivo, cito uma frase uma vez dita por ela e que se tornou lema durante as pesquisas e, que mais lembrarei e que vou levar para a vida “a paciência é a ciência do pesquisador”. Também à minha co-orientadora, Fernanda V. Leimann, pela paciência, presteza, atenção ao longo deste trabalho.

Agradeço a banca examinadora, Prof. Dr. Odinei H. Gonçalves e Prof. Dr. Paulo H. Março pela atenção e contribuição dedicadas a este trabalho.

Aos técnicos de laboratório, Marcos Viera, Vanessa, Adrielle e aos estagiários Michel, Carina e Daniele por sempre estarem dispostos a me ajudar.

À Carla Monteiro, pela ajuda nas análises microbiológicas, e à Lorrany, me salvando nas dúvidas de microbiologia.

Aos meus amigos Fernando Anjo e Lorrany Matos (novamente), por sempre estarem do meu lado ao longo destes anos, nos dias bons e nos ruins também. A Samara, minha amiga, que a princípio era apenas colega de apartamento. A Íris que foi realizar um sonho mas sempre esteve presente, mesmo que longe. Ao lago, pela amizade, e que acabou se tornando quase pertencente a minha família.

Ao meu namorado Gabriel, por ser a calma nos momentos de desespero, por ser a alegria nos momentos de tristeza, por ser a esperança quando eu não acreditava mais, por sempre estar ao meu lado mesmo com a distância, e por me fazer mais feliz.

Às minhas tias Sonia, Fá e Gê pela ajuda nos momentos que mais precisei. Aos meus familiares que participaram direta ou indiretamente da minha formação, contribuindo de alguma forma e torcem pelo meu sucesso.

Em especial, agradeço aos meus queridos pais, por sempre acreditarem, confiarem e investirem no meu desejo de ser uma Engenheira de Alimentos, por abdicarem muitas coisas para realização do meu sonho. Vocês são os melhores pais.

RESUMO

MELO, Grasieli Beloni de. **Síntese verde e caracterização de nanopartículas de prata usando extrato aquoso de erva mate (*Ilex paraguariensis*)**. 2015. 39f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2015

O uso de síntese verde para obtenção de nanopartículas de prata é um método eficiente e frequentemente estudado por não utilizar reagentes e solventes que possam provocar toxicidade tanto no produto da síntese quanto residual do processo, ampliando assim sua aplicação. Neste trabalho foi pela primeira vez relatado como redutor de íon prata, extrato aquoso de erva mate (*Ilex paraguariensis*), planta típica da região sul do Brasil apreciada de forma quente (chimarrão) ou fria (tereré) e, países ao sul do continente americano. Foi realizado planejamento experimental do tipo fatorial completo 2^2 com triplicata no ponto central, sendo a concentração de extrato $5 \pm 2\%$, e pH 5; 6,8 e 8,5. A caracterização do tamanho das partículas de prata obtidas foi realizada por UV-Visível e Espalhamento dinâmico de luz (DLS); os compostos funcionais foram analisados por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Além destas, foram realizadas análises para determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) das nanopartículas obtidas para bactérias promotoras de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs), *P. aeruginosa*, *B. cereus* e *S. aureus*. Após a análise dos resultados, pelo UV-Vis verificaram-se picos de absorvância entre 423-449nm, determinou-se também o diâmetro através do método da largura a meia altura (FWHM) variando de 112 a 280nm. Por DLS as dimensões variaram de 34nm (experimento E7, 2,5% de concentração de extrato e pH 8,5) a 154nm (experimento E8, 7,5% de concentração de extrato e pH 5), enquanto para o Índice de Polidispersão (PDI) variou de 0,29 (E9, 7,5% de concentração de extrato e pH 8,5) a 0,51 (E7). Por FTIR, sugere-se que compostos de cadeia aromática, polifenóis e/ou carboidratos podem ter sido responsáveis pela redução de Ag^+ a Ag^0 . De maneira geral as AgNPs sintetizadas apresentaram atividade bacteriostática e bactericida para *P. aeruginosa*, *B. cereus* e *S. aureus*, no entanto, para *P. aeruginosa* por ser Gram-negativa, necessitou de maior concentração de AgNPs para a inibição bacteriana, enquanto o *B. cereus* necessitou de menor concentração de AgNPs.

Palavras-chave: Síntese verde. Nanopartícula de prata. *Ilex paraguariensis*. Erva mate. Análise antimicrobiana.

ABSTRACT

MELO, Grasieli Beloni de. **Synthesis and characterization of silver nanoparticles using aqueous extract of erva mate (*Ilex paraguariensis*)**. 2015. 39p. Work of completion of course (Food Engineering) - Federal Technology University - Parana. Campo Mourao, 2015.

The use of green synthesis to obtain silver nanoparticles is an efficient method that has the advantage of not using reagents and solvents that can cause toxicity in both synthesis and waste. In this work was first reported as silver ion reducing silver ion, aqueous extract of yerba mate (*Ilex paraguariensis*), a plant typical of the south of South America used in the making of hot (chimarrão) or cold (tereré) beverage in the region. It was carried out experimental design of complete factorial 2^2 with triplicate at the midpoint, and the extract concentration of 5 ± 2 , and pH 5; 6.8 and 8.5. The size measurement of the obtained silver particles was performed by UV-visible and dynamic light scattering (DLS); functional compounds were analyzed by Infrared Spectroscopy Fourier Transform (FTIR) were also carried out analysis to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the nanoparticles obtained for Promoting Foodborne Diseases (DTAs) bacteria, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *B. cereus*. After analyzing the results, the UV-Vis presented absorbance peaks between 423-449nm, and the half-width (FWHM) ranging from 112 to 280nm. For DLS, dimensions ranged from 34nm (E7 experiment, 2.5% extract concentration and pH 8.5) at 154nm (E8 experiment, 7.5% extract concentration and pH 5), while for PDI ranging from 0.29 (E9, 7.5% extract concentration and pH 8.5) to 0.51 (E7). For FTIR, it is suggested that aromatic chain compounds, polyphenols and/or carbohydrates may have been responsible for the bioreduction of Ag^+ to Ag^0 . In general the synthesized AgNPs showed bacteriostatic and bactericidal activity to *P. aeruginosa*, *B. cereus* and *S. aureus*, however, for the Gram-negative *P. aeruginosa* higher concentration of AgNPs were required for bacterial inhibition, while *B. cereus* required lowest concentration AgNPs.

Keywords: Green synthesis. Silver nanoparticle. *Ilex paraguariensis*. Yerba mate. Antimicrobial analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. ESQUEMA DE CRESCIMENTO DAS AGNPs.....	13
FIGURA 2. FOTOS DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS NO PE1	21
FIGURA 3. FOTOGRAFIAS DOS EXPERIMENTOS DO PE2	23
FIGURA 4. RESULTADO DE ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISÍVEL PARA PE2	24
FIGURA 5. ESQUEMA REPRESENTATIVO DO CÁLCULO DE FWHM.....	24
FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO BIMODAL.....	26
FIGURA 7. ANOVA PARA FWHM.....	27
FIGURA 8. ESTIMATIVA DE EFEITOS PARA FWHM	28
FIGURA 9. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA INFLUENCIA DA CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO E PH NO FWHM.....	28
FIGURA 10. ANOVA PARA Dz	29
FIGURA 11. ANOVA PARA PDI.....	29
FIGURA 12. FTIR PARA AGNPs DO EXPERIMENTO E6 OBTIDAS POR SÍNTESE VERDE PELO MÉTODO BIOLÓGICO.....	30
FIGURA 13. FTIR PARA AGNPs DE TODOS OS EXPERIMENTOS OBTIDOS POR SÍNTESE VERDE PELO MÉTODO BIOLÓGICO	30

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. RESULTADOS EXPERIMENTAIS DE DLS PARA O PE1	22
TABELA 2. RESULTADO DO CÁLCULO DO DIÂMETRO DAS AGNPs POR FWHM PARA PE2 ...	25
TABELA 3. DADOS OBTIDOS POR DLS PARA O PE2.....	26
TABELA 4. DADOS EXPERIMENTAIS DE FWHM, DZ E PDI.....	27
TABELA 5. CONCENTRAÇÃO DE PRATA ($\mu\text{G.ML}^{-1}$) INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	32
TABELA 6. CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).....	32
TABELA 7. CORRELAÇÃO DE CIM E CBM DA LITERATURA E EXPERIMENTAL	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNPs	nanopartículas de prata
AgNO ₃	nitrito de prata
Ag ⁺	íon prata
Ag ⁰	átomo de prata ou prata metálica
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DTAs	Doenças Transmitidas por Alimentos
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Espalhamento dinâmico de luz)
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared</i> (Infravermelho com Transformada de Fourier)
FWHM	<i>Full width at half maximum</i> (cálculo da largura a meia altura)
NPs	nanopartículas
PDI	<i>Polydispersity Index</i> (Índice de polidispersão)
UV-Vis	Espectrofotometria Ultra-Violeta no visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 NANOPARTÍCULAS DE PRATA	11
2.2 SÍNTESE VERDE	11
2.3 ESCOLHA DO EXTRATO VEGETAL: <i>Ilex paraguariensis</i> (ERVA MATE)	13
2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS AgNPs	14
3 OBJETIVOS	16
3.1 OBJETIVO GERAL	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 SOLUÇÃO DE NITRATO DE PRATA	17
4.2 EXTRATO DE ERVA MATE	17
4.3 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA	17
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS AgNPs.....	18
4.6 CARACTERIZAÇÃO QUANTO AOS GRUPOS FUNCIONAIS.....	18
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA E GRÁFICOS	19
4.8 ATIVIDADE INIBITÓRIA E BACTERICIDA DE AgNPs.....	19
4.8.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	19
4.8.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)	20
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	21
5.1 SÍNTESE VERDE	21
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AgNPs.....	23
5.2.1 ANÁLISE POR UV-VIS	23
5.2.2 ANÁLISE DE ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICA (DLS)	25
5.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	27
5.3 ANÁLISE POR INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER	29
5.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA E BACTERICIDA MÍNIMA	31
6 CONCLUSÃO	34
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	35
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1 INTRODUÇÃO

Materiais nanoestruturados têm recebido considerável atenção por suas propriedades química e física, e suas importantes aplicações em eletrônicos, óptica, biomedicina, magnetismo, mecânica, catálise, agricultura, cosméticos, meio ambiente e embalagens de alimentos (RAI, 2013). Os materiais em dimensões nanométricas podem ocorrer naturalmente como proteínas, enzimas, DNA e, ou na atmosfera, como em erupções vulcânicas. A sua manipulação pelo homem foi relatada no século 10 AC, onde nanopartículas (NPs) de ouro e prata eram utilizadas para colorir vidros cerâmicos e vitrais (ALBRECHT et al., 2006).

O contato de humanos com nanopartículas (NPs) tem sido crescente como resultado da exposição destas produzidas por combustão simples, processos de industrialização. A ação das NPs pode ser realizada de maneira benéfica, com a finalidade de melhorar a qualidade de vida, como mecanismos de dosagem de drogas controladas no organismo, melhoria na tecnologia da informação, tecidos “inteligentes” que se ajustam para atender a temperatura ou possuem ação antimicrobiana, melhoria em produtos químicos, embalagens de alimentos “inteligentes” que indicam em mudança de cor quando há deterioração do alimento ou (bio)polímeros incorporados de NPs de prata com ação antimicrobiana (ALBRECHT et al., 2006).

Embora haja crescente investimento em pesquisa para o uso de nanomateriais, a pesquisa para sua toxicidade não é expressiva na maioria dos países, com exceção dos constituintes da União Europeia (PASCHOALINO et al., 2010). Visando a diminuição da quantidade de prata para obter êxito antimicrobiano, menor uso de solventes tóxicos na síntese, e conseqüentemente ampliar as aplicações, surgiram os métodos de síntese verde, que consistem em utilizar compostos ou substâncias biológicas como agente redutor dos íons metálicos de prata presentes no meio.

Neste sentido, pesquisas objetivando estudar a capacidade e a eficiência de extratos vegetais comuns na obtenção de nanopartículas de prata são relevantes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

O método mais utilizado para síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) é o de redução química obtendo uma solução coloidal estável em água ou solventes orgânicos. Os redutores frequentemente usados são borohidreto, citrato, ascorbato e hidrogênio elementar. A redução de íon prata (Ag^+) promove a formação de átomos de prata (Ag^0), seguido pela aglomeração de partículas que em solução aquosa geralmente produz prata coloidal. Quando as partículas coloidais são muito menores do que o comprimento de onda da luz visível, as soluções apresentam cor amarela com uma banda intensa entre 380-400 nm e outras bandas menos intensas ou menores em mais comprimento de onda no espectro de absorção (SHARMA, 2008). Por serem partículas nanoestruturadas, elas adquirem novas propriedades óticas sendo uma delas a absorção de luz pela prata metálica em um comprimento de onda que o metal, na sua forma iônica, não absorvia (SILVA, 2014).

A força do agente redutor influi no diâmetro das NPs, bem como o pH do meio reacional, sendo que quanto mais forte o agente redutor menores serão as NPs e, meio ácido tende a formar aglomerados e, conseqüentemente partículas maiores, enquanto meio mais alcalino tende a formação de partículas menores (SHARMA et al., 2008; ALBERNAZ, 2014).

2.2 SÍNTESE VERDE

A síntese verde promove a redução do metal utilizando agentes redutores de baixa ou nula toxicidade, como substituinte a regentes químicos, tornando-se uma alternativa sustentável (ALBERNAZ, 2014). Nesta via de síntese podem ser citados os métodos dos polissacarídeos, de Tollens, de irradiação, de polioxometalatos e biológico (SHARMA et al., 2008).

O método biológico consiste na utilização de extratos vegetais contendo moléculas capazes de reduzir íons metálicos a NPs em apenas uma etapa. Assim,

redução é a redução do íon (Ag^+) para a sua forma metálica (Ag^0), esta etapa é realizada de forma rápida em condições normais de temperatura e pressão. Alguns autores chamam esta redução de biorredução, provavelmente por ser promovida por agentes redutores de origem biológica, incluindo as plantas. Os agentes de redução de extratos vegetais envolvidos incluem metabólitos hidrossolúveis de plantas (como alcalóides, compostos fenólicos, terpenóides), enzimas, proteínas, aminoácidos, polissacarídeos, flavonoides, ácido cítrico, grupos funcionais (álcool, aldeídos e aminas), compostos heterocíclicos e ácido tânico, podendo ser encontrados em talos, folhas, sementes ou mistura destes. A vantagem deste método ao químico tradicional é que as plantas produzem biomoléculas funcionais que reduzem os íons metálicos, e aderem à superfície dessas NPs o que lhes confere características diferenciadas como proteção e estabilidade, além de alto rendimento e baixo custo de produção (MITTAL et al., 2013; ALBERNAZ, 2014; SILVA, 2014).

As AgNPs tem sido sintetizadas com o uso de extratos vegetais, sendo que a eficiência da reação e as características do produto formado podem ser alteradas de acordo com a parte da planta (folhas, raízes, cascas ou sementes) que compõe o extrato. Como exemplo de plantas já estudadas, podem-se citar *Capsicum annuum* (LI et al., 2007), *Camellia sinensis* (chá verde) (VILCHIS-NESTOR et al., 2008; LOO et al., 2012), *Allium cepa* (cebola) (SAXENA, et al., 2010), limão (PRATHNA et al., 2011), *Hibiscus rosa sinensis* (PHILIP, 2009), *Brosimum gaudichaudii* (ALBERNAZ, 2014).

Para a produção de NPs utilizando extrato de plantas, de forma geral, o extrato (obtido de folhas, cascas e sementes) é misturado a uma solução aquosa de sal metálico, geralmente nitrato de prata, onde ocorre a redução química ou biorredução. O esquema de síntese de AgNPs pode ser visto na Figura 1. Alguns fatores como a natureza e concentração do extrato; a concentração do sal metálico; pH e temperatura podem afetar a velocidade da reação, a quantidade obtida, estabilidade das NPs, bem como, outras características destas (MITTAL et al., 2013).

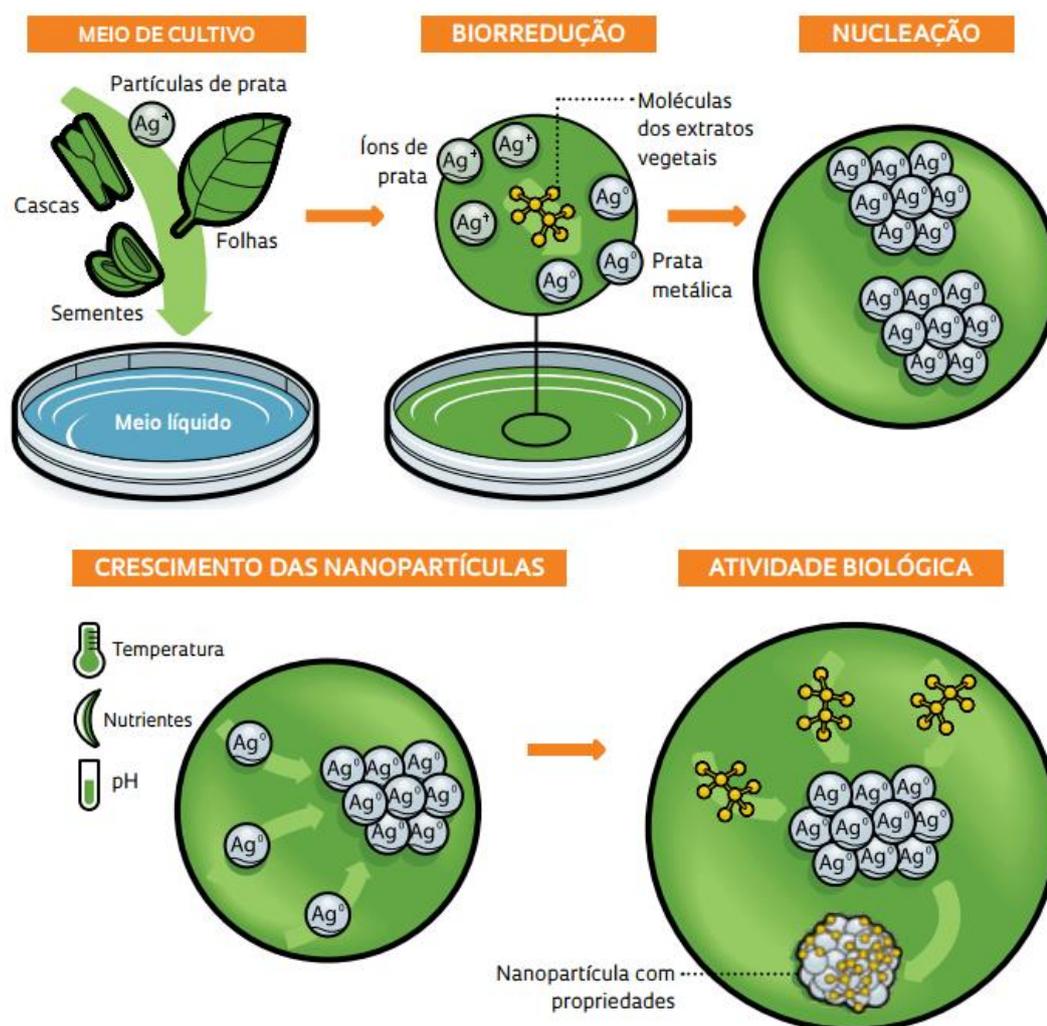


Figura 1. Esquema de crescimento das AgNPs
 Fonte: SILVA – (EMBRAPA-CENARGEN)- Revista Pesquisa Fapesp, 2014.

2.3 ESCOLHA DO EXTRATO VEGETAL: *Ilex paraguariensis* (ERVA MATE)

Para a seleção do vegetal a ser utilizado como agente redutor deve-se levar em consideração fatores como primeiro relato do uso do extrato, disponibilidade geográfica cosmopolita, presença de compostos redutores capazes de sintetizar NPs a partir de sais metálicos (ALBERNAZ, 2014). *Ilex paraguariensis* ou “erva-mate” foi adotada por habitantes nativos (índios guaranis) de uma região que compreende o Paraguai, Uruguai, Nordeste da Argentina e Sul do Brasil e tem sido popular há séculos para preparação de bebidas estimulantes ou por suas propriedades medicinais. Após os jesuítas promoverem o cultivo da planta, seu consumo passou a ser realizado não apenas pelos nativos, mas também por

brancos. A bebida possui três formas de adição de água ao material seco, simples adição de água em ebulição, sucessivas repetições de adição de água em ebulição ou ainda adição de água fria, sendo conhecida como, “yerba mate”, “maté”, “hierba mate”, “erva-mate”, “chimarrão” e “tereré” (FILIP et al., 2000; BRACESCO et al., 2011).

Segundo Alikaridis (1987) o gênero *Ilex* (aquifoliaceae) possui cerca de 400 espécies que crescem como árvores ou arbustos na Ásia, América Central e principalmente na América do Sul. O autor cita que o extrato possui fenóis e ácidos fenólicos, metilxantinas, aminoácidos e outros compostos nitrogenados, ácidos graxos, antocianinas, flavonoides, compostos terpênicos, alcanos e álcoois, carboidratos, vitaminas e carotenoides.

2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS AgNPs

Os seres humanos são frequentemente infectados por bactérias, bolores, leveduras e vírus. Para minimização destas infecções, ocorre uma intensa busca por materiais com ação antimicrobiana (SHAHVERDI et al., 2007).

As bactérias são classificadas de acordo com a estrutura de sua membrana, de modo que as Gram-negativas apresentam estrutura mais complexa, com dupla camada sendo uma fina camada de peptidoglicano (2-3nm) entre a membrana citoplasmática e o exterior da membrana, enquanto as Gram-positivas não possuem a camada externa, mas possuem uma espessa camada de peptidoglicano (30nm) (SHARMA et al., 2008).

Bactérias Gram-negativas, como *E. coli* e *P. aeruginosa* e Gram-positivas como *B. cereus* e *S. aureus*, são frequentemente registradas por promoverem surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs). Um levantamento de dados epidemiológicos realizado por Amson et al. (2006) no período de 1978-2000 no estado do Paraná, apontam que os agentes etiológicos mais frequentes de origem bacteriana são *Staphylococcus aureus* e *Salmonella sp.*, sendo os alimentos de origem animal os mais associados aos surtos, e os domicílios o local de maior incidência. No período pesquisado, os surtos associados com *S. aureus* representaram 41,6%, *B. cereus* 6,3% e *E. coli* 5,5%.

Dentre os materiais com ação antimicrobiana a prata metálica pode ser destacada, pois é conhecida por possuir atividade antimicrobiana e quando disponível em nanoescala sua superfície de contato é aumentada, promovendo maior eficiência. Para o mecanismo de ação, alguns estudos propõem que as AgNPs se aderem à superfície da membrana celular perturbando a permeabilidade e funções de respiração das células, outros estudos, propõem que as AgNPs podem além de interagir com a membrana, penetrar no interior das bactérias (SHARMA et al., 2008).

Assim, as AgNPs podem ser uma alternativa na substituição de alguns antibióticos, uma vez que estes vêm mostrando ineficiência ao combate de microrganismos, devido ao aparecimento de novas estirpes de bactérias resistentes. As AgNPs são altamente eficientes contra doenças causadas por bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e fungos que causam infecções de *ringworm* (micose de pele) e *Candida albicans* (RAI, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral obter por síntese verde pelo método biológico e caracterização de nanopartículas de prata (AgNPs) empregando extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*), bem como estabelecer a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*);
- Produzir AgNPs variando as concentrações do extrato e pH de acordo com um planejamento experimental;
- Caracterizar as AgNPs pelos métodos de:
 - Espectrofotometria UV-Visível;
 - Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS);
 - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR);
- Estabelecer a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) das AgNPs sintetizadas para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SOLUÇÃO DE NITRATO DE PRATA

Foram solubilizados 0,34g de nitrato de prata em bequer contendo 100mL de água ultrapura, em seguida foi transferido para balão volumétrico de 1000mL e ajustado seu volume com água ultrapura, obtendo assim, uma solução de nitrato de prata com concentração 0,34g/L ou 2mM (Morita & Assumpção, 2007)

4.2 EXTRATO DE ERVA MATE

O extrato aquoso de erva-mate foi obtido pela metodologia apresentada por Filip (2000). Inicialmente em 10 g de erva-mate foram adicionados 70 mL de água ultra pura e mantidos em ebulição por 20 min, então foi realizada filtração a vácuo. O volume do filtrado foi ajustado para 100mL em balão volumétrico.

4.3 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

O estudo da síntese das AgNPs foi realizado seguindo a metodologia adaptada de Albernaz (2014), e utilizando planejamento experimental do tipo fatorial 2^2 completo com triplicata no ponto central. Foram analisados dois fatores (concentração de extrato (%) e pH) em dois níveis e um ponto central. A abordagem envolvendo um planejamento multivariável de experimentos permite avaliar os efeitos de interação entre fatores que afetam o desempenho do tratamento, favorecendo os estudos de otimização a partir de um número reduzido de ensaios.

Foram avaliadas as respostas de diâmetro médio e intensidade, índice de polidispersão (*Polidispertion Index*, PDI) e do cálculo da largura à meia altura (*Full-Width at Half Maximum*, FWHM). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Statística 7.0 (Statsoft).

Então para a realização dos experimentos apresentados nos Quadros 1 e 2, inicialmente foram preparadas as soluções de nitrato de prata (2mM), e do extrato aquoso de erva mate (*Ilex paraguariensis*), que foi adicionado de água ultrapura até alcançar a concentração proposta no experimento. Então, tanto o extrato aquoso de erva mate quanto a solução de nitrato de prata sofreram ajuste de pH, separadamente, conforme proposto nos planejamentos experimentais. Posteriormente, a solução de nitrato de prata foi gotejada na solução de extrato aquoso de erva mate sob agitação magnética e em temperatura ambiente.

Para cada concentração de extrato vegetal foi preparada uma amostra em branco, contendo apenas extrato vegetal e água ultrapura. Os valores de pH foram ajustados com auxílio de pHmetro e solução de HCl 0,1N ou NaOH 0,1M conforme a necessidade.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS AgNPs

O tamanho das AgNPs foi analisado e determinado realizando varredura utilizando espectrofotômetro no UV-visível (OCEAN OPTICS, USB650UV) de 200 a 800nm, e o PDI pela técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS, MALVERN – Zetasizer Nano S) (BECHTOLD, 2011), análise realizada no Laboratório de Controle de Processos da UFSC. Para seguintes análises foram utilizadas cubetas de quartzo, realizando-se diluição prévia nas amostras para a análise de UV-Vis e sem diluição para DLS.

Os resultados obtidos nas análises por espectrofotometria UV-Vis (cálculos da largura à meia altura - FWHM) e por DLS (Dz e PDI) foram avaliados através de superfície de resposta. Como análises complementares, os experimentos foram avaliados por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), bem como Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).

4.6 CARACTERIZAÇÃO QUANTO AOS GRUPOS FUNCIONAIS

Para a caracterização dos grupos funcionais presente na superfície das NPs foi utilizada a Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (IR AFFINITY-1, Shimadzu) (GHASEMINEZHAD, HAMEDI e SHOJAOSADATI, 2012). As AgNP's foram secas em estufa e pesadas (10 mg) e, então trituradas com KBr (100 mg). As pastilhas de KBr foram produzidas em um pastilhador submetido a 7 kgf/cm² de pressão em prensa hidráulica (Bovenau, P15 ST). Finalmente os espectros foram obtidos na faixa de 4000-400 cm⁻¹ utilizando 32 acumulações e resolução de 4 cm⁻¹.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA E GRÁFICOS

Os dados obtidos por FWHM no UV-visível, Dz e PDI, por DLS foram correlacionados com concentração de extrato e pH, e avaliados por ANOVA com significância de 5%, por meio do software Statística 7.0. Os gráficos foram plotados pelo programa Origin® 8.

4.8 ATIVIDADE INIBITÓRIA E BACTERICIDA DE AgNPs

A CIM e CBM das AgNPs foram avaliadas frente a bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). As cepas foram obtidas do acervo da UTFPR – Câmpus Campo Mourão.

4.8.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM das AgNPs sintetizadas foi avaliada utilizando o método de microdiluição padrão seguindo metodologia do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), documento M07-A9 (2012).

Para os testes foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, onde foram pipetados 100µL de caldo Müller-Hinton estéril (MHB) em todos os poços,

então em cada primeiro poço foi pipetado 100µL das AgNPs obtidas em cada experimento, seguindo-se sucessivas diluições, transferindo sempre 100µL ao poço subsequente.

Cada inóculo bacteriano, após incubação a 37°C por 24h, foi diluído e comparado com a escala Mc Farland (suspensão padronizada, 10⁸ UFC/mL), a suspensão obtida sofreu diluição 1:10 com água salina 0,85%, para obtenção de inóculo contendo 10⁷ UFC/mL.

Seguido o preparo do inóculo pipetou-se 5 µL deste em cada poço contendo caldo e amostra, preparados conforme parágrafo anterior. Então a concentração de bactéria em cada poço foi de aproximadamente 5x10⁵ UFC/mL. Como controle foram utilizadas duas colunas da microplaca, uma coluna como controle bacteriano (sem adição de AgNPs) e outra como controle do caldo (sem adição de AgNPs e inóculo). Então as microplacas foram incubadas à 37°C por 24h, em estufa de cultura bacteriológica (TE-392/2, Tecnal).

Após este período as microplacas foram analisadas e a CIM foi determinada como a menor concentração das AgNPs capaz de causar inibição total do crescimento microbiano. As análises foram realizadas em triplicata para cada uma das bactérias analisadas.

4.8.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada pela transferência de uma alíquota de 5 µL do conteúdo dos poços onde não houve crescimento bacteriano visível no teste de CIM e do poço subsequente, para a superfície de placas contendo ágar Müller-Hinton estéril. Após 24h de incubação a 37°C em estufa de cultura bacteriológica (TE-392/2, Tecnal), definiu-se a concentração bactericida mínima, que foi a menor concentração capaz de causar a morte do inóculo, conforme metodologia de *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), documento M07-A9 (2012).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 SÍNTESE VERDE

A síntese verde das AgNPs foi realizada em única etapa e seguindo o planejamento experimental 1 (PE1, Quadro 1), baseando-se em concentrações e pH propostos por Albernaz (2010), por não haver relatos de pesquisa usando a erva-mate como agente redutor. As reações foram acompanhadas através de varredura por espectrofotometria UV-Vis de 200 a 800nm. No entanto não foi possível obter dados de absorbância devido a “estouro” dos picos. Na Figura 2 podem ser observadas as fotografias dos experimentos após 6 dias do início das reações.

Experimento	Extrato de erva-mate (%)	pH
1	5	5
2	5	9
3	50	5
4	50	9
5	22,5	7

Quadro 1. PE1 para síntese de AgNPs

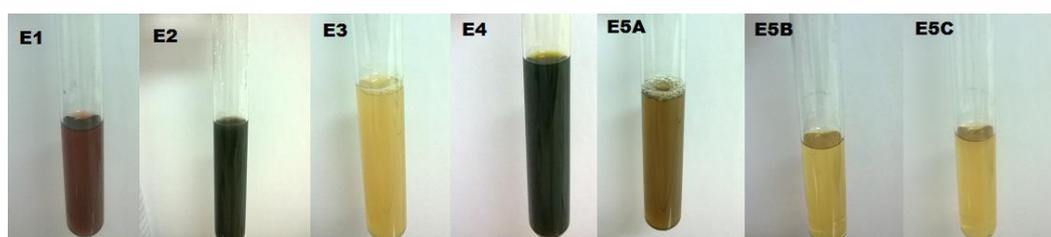


Figura 2. Fotos dos experimentos realizados no PE1

Devido a ressonância plasmônica de superfície, para AgNPs o pico de absorção ocorre entre 400 e 500nm, e então observa-se alteração na coloração de marrom avermelhado a marrom escuro, como pode ser observado nos experimentos E1, E2, E4 e E5A.

Nas análises de DLS, apenas os experimentos E1, E2 e E5A apresentaram qualidade nos resultados, apresentados na Tabela 1, por este motivo os dados dos demais experimentos foram descartados.

Tabela 1. Resultados experimentais de DLS para o PE1

Experimento	Diâmetro da partícula (nm)	PDI
E1	230	0,24
E2	96	0,46
E5A	568	0,44

Analisando a Tabela 1 pode-se observar que apenas o experimento E2 conseguiu permanecer com dimensão inferior a 100nm, os experimentos E1 e E2 possuem a mesma concentração, no entanto, diferem entre si pelo pH, 5 e 9 respectivamente.

O pH é um fator importante a ser considerado para avaliar tamanho e forma das nanopartículas sintetizadas, sendo que meio ácido tende a favorecer a agregação das NPs enquanto o meio alcalino favorece a nucleação (AKHTAR et al., 2013). Por esta razão, o E1 (pH 5) tendeu a agregação, resultando em partículas de dimensões maiores, enquanto E2 (pH 9) tendeu a nucleação, obtendo partículas menores. Tendo em vista estes resultados, foi realizado um novo planejamento experimental, tomando a concentração de 5% do extrato como ponto central e variando $\pm 2,5\%$ nos pontos de máximo e mínimo.

Albernaz (2014) mostra que pH acima de 9 e abaixo de 5 promovem deslocamento do pico de absorvância para a faixa de 500nm, demonstrando agregação de partículas. Então no planejamento experimental 2 (PE2) foram selecionados os valores de pH 5; 6,8 e 8,5, seguindo a síntese da mesma forma que em PE1.

Experimento	Extrato de erva-mate (%)	pH
6	2,5	5
7	2,5	8,5
8	7,5	5
9	7,5	8,5
10	5	6,8

Quadro 2. PE2 para síntese de AgNPs

A Figura 3 apresenta as soluções resultantes dos experimentos referentes ao PE2, onde todos os experimentos apresentaram coloração marrom devido à

ressonância plasmônica de superfície, no entanto o experimento E8 apresentou coloração tendendo ao vermelho, enquanto E9 tendendo ao cinza ou negro.

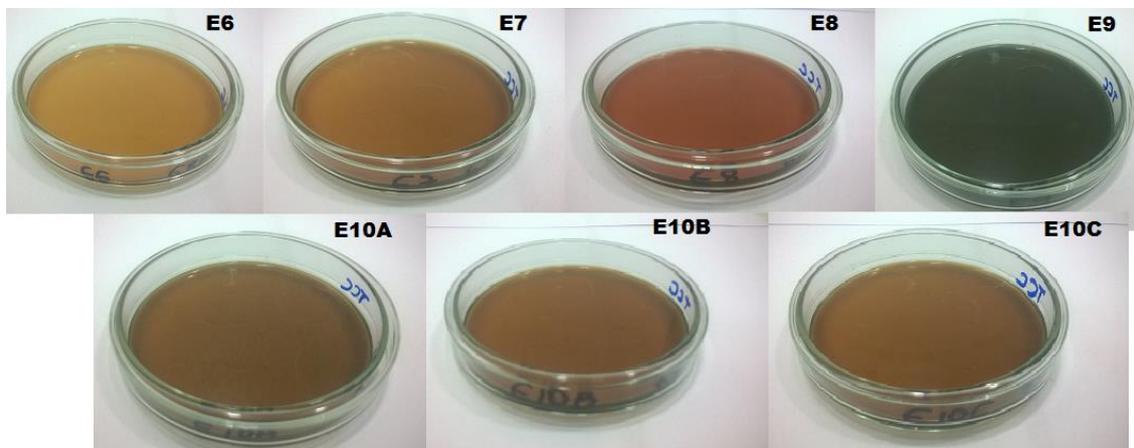


Figura 3. Fotografias dos experimentos do PE2

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AgNPs

5.2.1 ANÁLISE POR UV-VIS

O resultado das análises por espectrofotometria UV-Vis é apresentado na Figura 4 que mostra que os experimentos obtidos no PE2, os quais apresentaram picos de absorbância inferiores a 450nm, caracterizando a síntese de NPs. As AgNPs apresentam pico de absorção de radiação eletromagnética no comprimento de onda entre 400-500nm devido à sua ressonância plasmônica de superfície (fenômeno que envolve a excitação coletiva de elétrons em um metal). Neste pico ocorre uma variação de cor característica que varia de marrom avermelhado para marrom escuro, de acordo com o tamanho das NPs formadas (ALBERNAZ, 2014). Loo *et al.*, (2012) mostraram que usando *Camellia sinensis* como agente redutor o pico foi obtido em 436nm, enquanto Vilchis-Nestor *et al.*, (2008) também utilizando *C. sinensis* o pico foi em 430nm. No presente trabalho os picos variaram de 423nm a 449nm.

A coloração dos experimentos E8 e E9 estão relacionadas ao pico de absorbância, onde apresentaram pico em 443 e 449nm respectivamente. De acordo

com Sharma et al. (2009), picos que variam de 380 a 400nm apresentam coloração amarelo ouro e caracteriza partículas menores, enquanto Albernaz (2014) comenta que a coloração que varia de marrom avermelhado a marrom escuro varia de acordo com o tamanho das AgNPs.

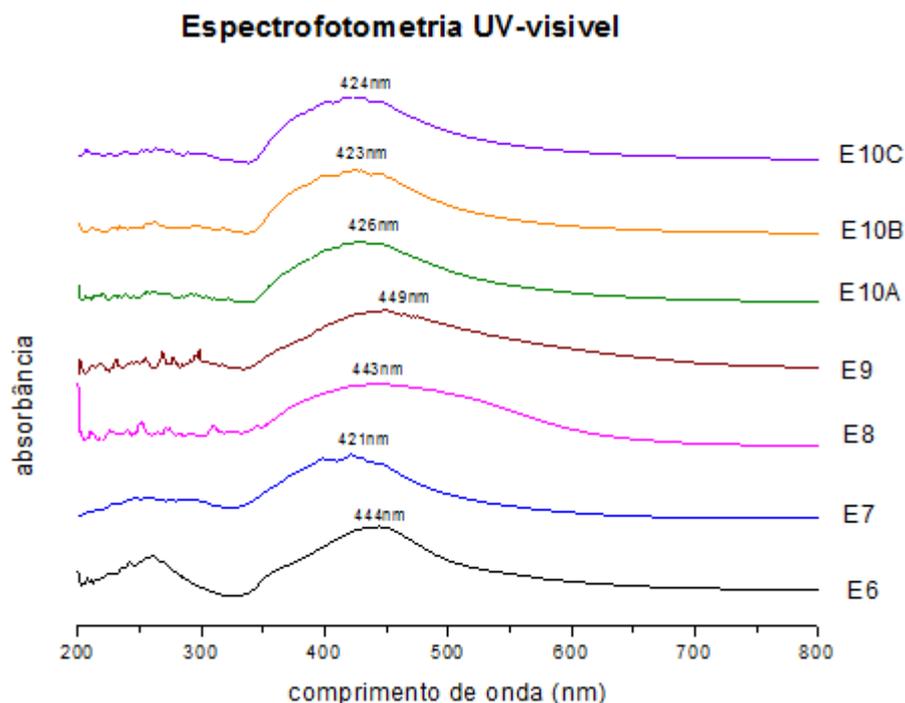


Figura 4. Resultado de espectrofotometria Uv-visível para PE2

A partir dos espectros obtidos, conforme Figura 4, foi realizado o cálculo da largura a meia altura (FWHM), representado pela Figura 5 e os resultados podem ser observados na Tabela 2.

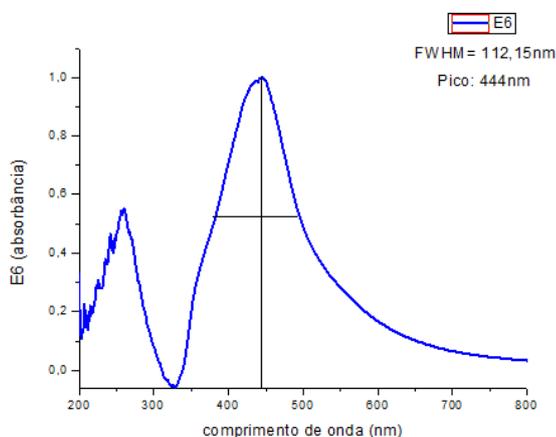


Figura 5. Esquema representativo do cálculo de FWHM.

Tabela 2. Resultado do cálculo do diâmetro das AgNPs por FWHM para PE2

Experimento	FWHM (nm)
E6	112
E7	119
E8	280
E9	188
E10A	138
E10B	128
E10C	128

Analisando a Tabela 2 observa-se que o experimento E8 apresentou banda mais larga com um diâmetro médio de 280nm, enquanto o E6 apresentou o menor diâmetro médio, 112nm, embora ambos tenham apresentado picos de absorvância próximos, sendo 443nm e 444nm respectivamente; como ambos experimentos foram realizados com o mesmo valor de pH 5, pode-se sugerir que provavelmente se deve ao fato de E8 ter concentração de extrato, agente redutor, maior que no E6, assim houve maior intensidade na reação de oxirredução, fazendo com que as partículas tivessem uma tendência maior à aglomeração, afetando a homogeneidade do tamanho das partículas, como pode ser confirmado pelos resultados de DLS. A mesma tendência é percebida ao comparar os experimentos E7 e E9, realizados em pH 8,5, mas com concentrações diferentes de extrato, menor para E7 e maior para E9. Além disso, o experimento E10 tem uma média de FWHM que está entre os valores obtidos para os extremos E6 e E9, mostrando uma coerência nos resultados.

5.2.2 ANÁLISE DE ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICA (DLS)

Foram realizadas medidas de DLS para determinação da diferença entre o tamanho das partículas obtidas nos experimentos, bem como sua dispersão na solução coloidal, como pode ser observado na Tabela 3. Os experimentos apresentaram uma distribuição bimodal, visto que, as populações de NPs apresentaram dois picos um de maior e outro de menor intensidade, como apresentado pela Figura 6.

Tabela 3. Dados obtidos por DLS para o PE2

Experimento	Tamanho hidrodinâmico médio Dz (d.nm)	PDI
E6	70	0,37
E7	34	0,51
E8	154	0,39
E9	67	0,29
E10A	54	0,41

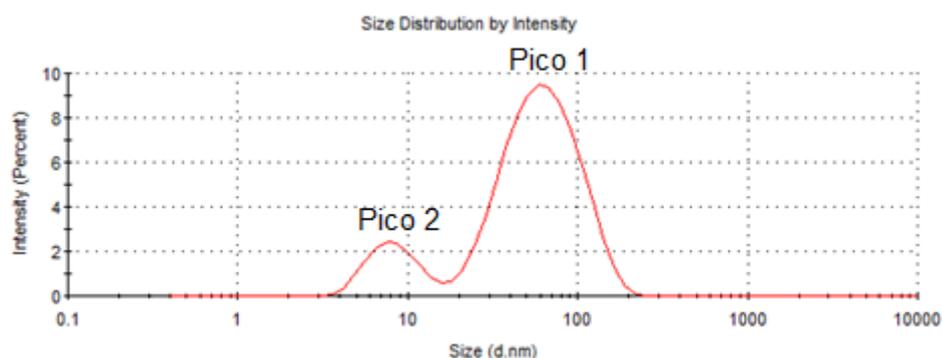


Figura 6. Representação de distribuição bimodal

Analisando os resultados apresentados na Tabela 3, observa-se que o experimento E7 apresentou menor tamanho hidrodinâmico (Dz) (34nm), no entanto seu PDI foi de 0,51, conferindo menor homogeneidade quanto ao tamanho das AgNPs, enquanto o E9, mesmo pH e maior concentração de extrato, apresentou Dz de 67nm e PDI de 0,29. O E6 foi realizado com a menor concentração de extrato que contribuiu para uma reação gradual e controlada, resultando em partículas com dimensões menores, enquanto E8, mesmo pH que E6, foi realizado na maior concentração, que por apresentar maior quantidade de agente redutor, as partículas tenderam à aglomeração e dimensões maiores, fato intensificado pelo pH ácido.

Analisando a influência do pH a partir dos dados de DLS, nota-se que para a menor concentração de extrato de erva mate (*Ilex paraguariensis*) presente nos experimentos E6 e E7, em meio ácido as AgNPs apresentaram dimensões maiores, enquanto o meio alcalino favoreceu a formação de AgNPs com dimensões menores. A mesma tendência pode ser observada para os experimento E8 e E9, logo os experimentos são coerentes e se complementam. Como dito anteriormente, em pH em torno de 5 as NPs tendem a agregação, enquanto no pH 8,5 as NPs tendem a

nucleação, assim, conferindo NPs de menores dimensões, enquanto as NPs do E10A apresentaram Dz intermediário.

5.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Foi realizada a análise estatística, dos resultados a partir dos dados compilados na Tabela 4. Para tanto, foi utilizado o software Statistica 7.0 para realização da análise de variância (ANOVA).

Tabela 4. Dados experimentais de FWHM, Dz e PDI

Experimento	Concentração de extrato (%)	pH	FWHM(nm)	Dz(d.nm)	PDI
	Variáveis				
E6	2,5	5	112	70	0,37
E7	2,5	8,5	119	34	0,51
E8	7,5	5	280	154	0,39
E9	7,5	8,5	188	67	0,29
E10A	5	6,8	138	54	0,41
E10B*	5	6,8	128	36	0,49
E10C*	5	6,8	128	38	0,48

*Estes experimentos não apresentaram resultados de boa qualidade no DLS, mas os resultados de Dz e PDI foram utilizados para o teste estatístico.

O resultado da análise estatística para a influência da concentração de extrato e pH no diâmetro médio utilizando o método FWHM apresentou um coeficiente de determinação R^2 de 0,85 e apenas o extrato influenciou significativamente, conferindo p-valor menor que 0,05 conforme mostra Figura 7, e o modelo, equação 1, como resultado da estimativa de efeitos das variáveis por FWHM (Figura 8).

ANOVA; Var.:FWHM; R-sqr=.85149; Adj.:.70299 (Spreadsheet1) 2 factors at two levels; MS Residual=1069,088 DV: FWHM					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Extrato	14042,25	1	14042,25	13,13480	0,036141
(2)pH	1897,09	1	1897,09	1,77450	0,274982
1 by 2	2450,25	1	2450,25	2,29191	0,227273
Error	3207,26	3	1069,09		
Total SS	21596,86	6			

Figura 7. ANOVA para FWHM

$$FWHM = 156,41 + (E * 118,50) - (49,50 * pH * E) \quad (1)$$

Onde:

E= concentração de extrato

pH= potencial hidrogeniônico

O objetivo para aplicação de NPs é que estas apresentes valores de FWHM menores, então analisando o modelo, Equação 1, pode-se verificar que isto pode ser obtido quando a concentração de extrato for menor, e interação positiva entre ação conjunta de pH e concentração de extrato.

Effect Estimates; Var.:FWHM; R-sqr=.85149; Adj.:.70299 (Spreadsheet1)										
2 factors at two levels; MS Residual=1069,088										
DV: FWHM										
Factor	Effect	Std.Err.	t(3)	p	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt
Mean/Interc.	156,4095	12,35989	12,65460	0,001064	117,075	195,7442	156,4095	12,35989	117,0748	195,7442
(1)Extrato	118,5000	32,69690	3,62420	0,036141	14,444	222,5561	59,2500	16,34845	7,2219	111,2781
(2)pH	-43,5480	32,69119	-1,33210	0,274982	-147,586	60,4899	-21,7740	16,34559	-73,7930	30,2450
1 by 2	-49,5000	32,69690	-1,51390	0,227273	-153,556	54,5561	-24,7500	16,34845	-76,7781	27,2781

Figura 8. Estimativa de efeitos para FWHM

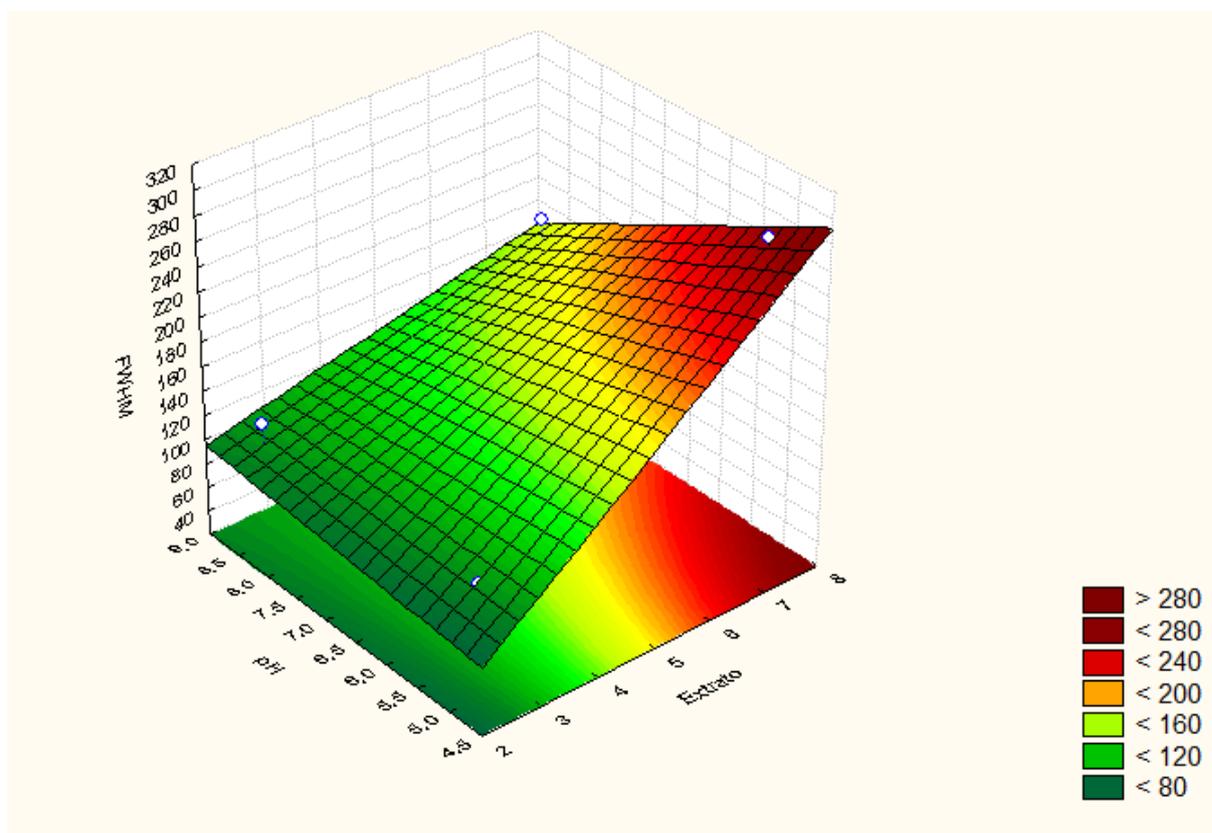


Figura 9. Superfície de resposta da influência da concentração de extrato e pH no FWHM

A Figura 9 apresenta o gráfico de superfície de resposta construído a partir da análise estatística

Os resultados da análise estatística avaliando a influência da concentração de extrato e pH, Dz apresentou coeficiente de determinação R^2 de 0,75 (Figura 10) e PDI R^2 de 0,67 (Figura 11), para ambos a significância foi maior que 0,05, portanto não houve diferença significativa para as variáveis independentes (pH e concentração de extrato).

ANOVA; Var.:Dz; R-sqr=,75183; Adj:,50367 (Spreadsheet1) 2 factors at two levels; MS Residual=876,9757 DV: Dz						
Factor	SS	df	MS	F	p	
(1)Extrato	3422,25	1	3422,250	3,902332	0,142690	
(2)pH	3898,00	1	3898,002	4,444823	0,125573	
1 by 2	650,25	1	650,250	0,741469	0,452514	
Error	2630,93	3	876,976			
Total SS	10601,43	6				

Figura 10. ANOVA para Dz

ANOVA; Var.:PDI; R-sqr=,6722; Adj:,3444 (Spreadsheet1) 2 factors at two levels; MS Residual=,0040429 DV: PDI						
Factor	SS	df	MS	F	p	
(1)Extrato	0,010000	1	0,010000	2,473481	0,213833	
(2)pH	0,000471	1	0,000471	0,116586	0,755284	
1 by 2	0,014400	1	0,014400	3,561813	0,155572	
Error	0,012129	3	0,004043			
Total SS	0,037000	6				

Figura 111. ANOVA para PDI

5.3 ANÁLISE POR INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

O extrato de erva mate possivelmente apresenta muitas biomoléculas capazes de promover a síntese verde, estes podem ser fenóis e ácidos fenólicos metilxantinas, aminoácidos e outros compostos nitrogenados, ácidos graxos, antocianinas, flavonoides, compostos terpênicos, alcanos e álcoois, carboidratos (ALIKARIDIS, 1987). Foram realizadas análises no FTIR para o extrato e para os experimentos a fim de investigar a possível presença/ausência de grupos funcionais.

As Figuras 16 e 17 apresentam os resultados das medidas por FTIR realizados.

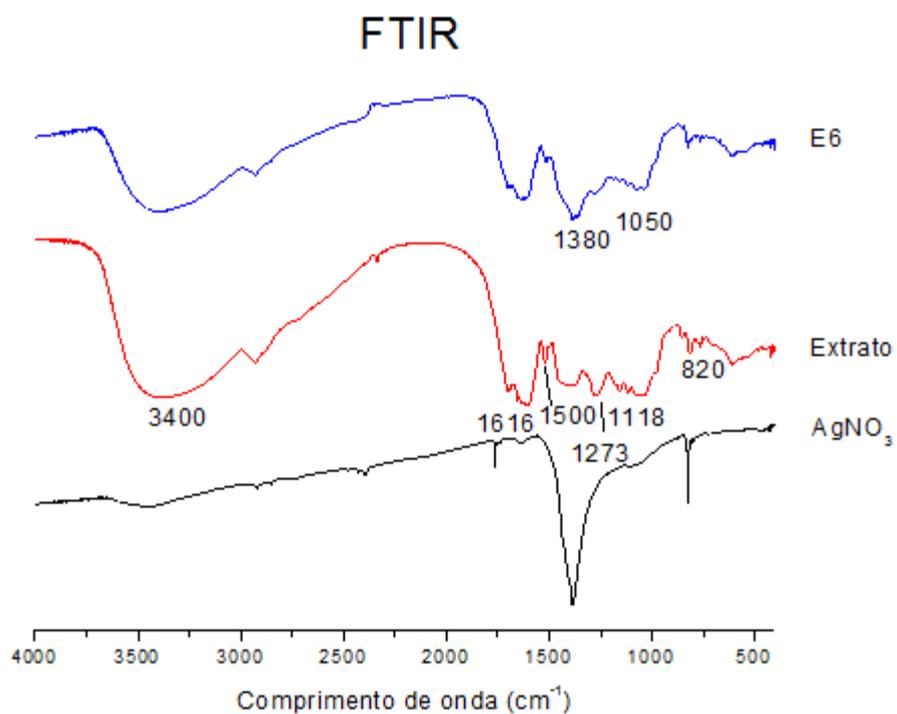


Figura 122. FTIR para AgNPs do experimento E6 obtidas por síntese verde pelo método biológico

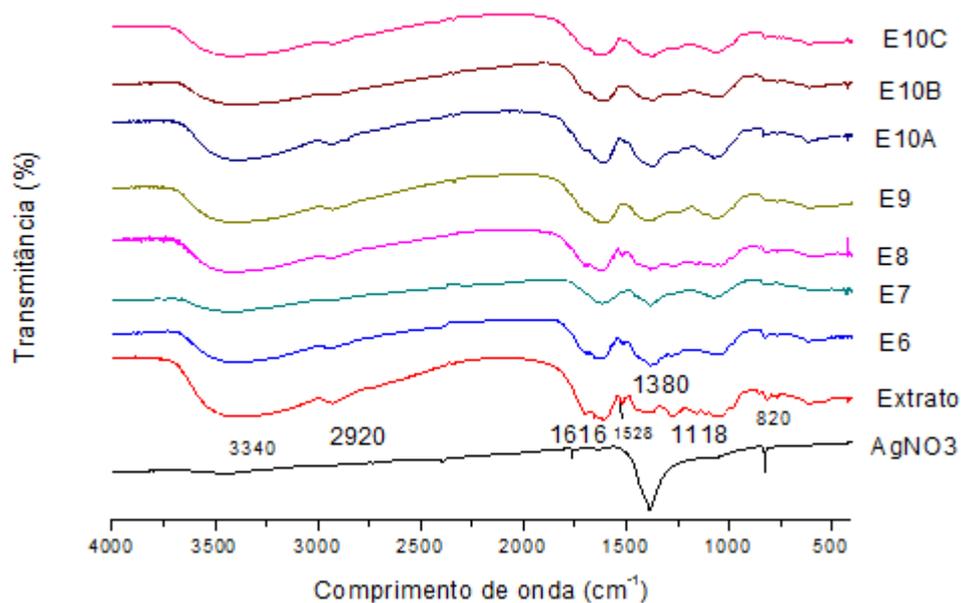


Figura 133. FTIR para AgNPs de todos os experimentos obtidos por síntese verde pelo método biológico

Analisando a Figura 16 observa-se que a banda larga a 3340cm^{-1} é característica do grupo funcional hidróxi, presente em água, álcoois e compostos fenólicos. A Figura 17 mostra que em todos os experimentos os espectros se apresentaram de forma similar. O pico em 820cm^{-1} representa as vibrações de C-H em anéis aromáticos, aparecendo com menor intensidade nas NPs, podendo ser o resultado da interação destes compostos com as NPs ou com outro componente do próprio extrato. O pico a 1616cm^{-1} refere-se ao grupo carbonila, possivelmente aos polifenóis ou carboidratos. As bandas entre $1070-1118\text{cm}^{-1}$ podem ser atribuídas ao estiramento vibracional de C-O-C e C-O em compostos fenólicos. Nas AgNPs houve diminuição do estiramento a 3340cm^{-1} , 1500cm^{-1} e 820cm^{-1} quando comparados ao espectro do extrato, isto indica que estes grupamentos podem estar diretamente relacionados com a redução do íon metálico. Notou-se aumento no pico a 1380cm^{-1} , que pode estar correlacionado ao grupo NO_3 residual da solução de AgNO_3 , que também pode ser observado na amostra contendo apenas nitrato de prata. Para análise destes dados foi utilizado o trabalho de Albernaz (2014) como base, por ter obtido picos próximos ao do presente trabalho.

5.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA E BACTERICIDA MÍNIMA

A concentração teórica de prata presente em cada pocinho é apresentada no Quadro 3. Os ensaios foram realizados em triplicata, para CIM e CBM sendo a médias destes resultados, mostrados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Quadro 3. Correlação entre poço e concentração de prata (teórica)

Nº do pocinho	Concentração de prata teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
1	17,0
2	8,5
3	4,3
4	2,1
5	1,1
6	0,5
7	0,3

Tabela 5. Concentração de prata ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) Inibitória Mínima (CIM)

Experimento	E6	E7	E8	E9	E10A	E10B	E10C
Bactéria							
<i>P. aeruginosa</i>	17	17	17	-	17	-	-
<i>S. aureus</i>	7,1	7,1	5,7	5,7	7,1	7,1	7,1
<i>B. cereus</i>	1,2	1,6	4,3	-	4,3	4,3	4,3

(-) não houve inibição

Tabela 6. Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Experimento	E6	E7	E8	E9	E10A	E10B	E10C
Bactéria							
<i>P. aeruginosa</i>	17	17	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	17	+	17	+	+	+	+
<i>B. cereus</i>	14,2	17	+	+	+	+	+

(+) houve crescimento microbiano

Analisando os resultados das Tabelas 5 e 6, pode-se observar que a *P. aeruginosa*, devido à sua estrutura Gram negativa apresentando camada peptídica mais espessa, precisou de uma concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de prata maior para sofrer inibição quando comparado com as bactérias Gram positivas, *S. aureus* e *B. cereus*.

Sharma et al., (2009) trabalhou com a síntese verde por polissacarídeos e obteve AgNPs que variaram de 25 a 50nm, sendo que as de 35nm obtiveram CIM e CBM para *S. aureus* de $6,75 \mu\text{m.mL}^{-1}$. Resultado semelhante foi observado neste trabalho para o experimento E7 com partículas de tamanho médio 34nm que apresentou CIM de $7,1 \mu\text{m.mL}^{-1}$, não apresentando CBM. Frente a bactéria *P. aeruginosa*, Sharma et al. (2009) obteve CIM e CBM de $13,5 \mu\text{m.mL}^{-1}$, enquanto neste trabalho o experimento E7 apresentou CIM de $7,1 \mu\text{m.mL}^{-1}$ e CBM $17 \mu\text{m.mL}^{-1}$. Para as partículas de 50nm, o autor obteve para *S. aureus* e *P. aeruginosa* (CIM e CBM) de $54 \mu\text{m.mL}^{-1}$ e $27 \mu\text{m.mL}^{-1}$, em ambas, enquanto neste trabalho o experimento E10A resultou em CIM de $7,1 \mu\text{m.mL}^{-1}$ e $17 \mu\text{m.mL}^{-1}$ respectivamente. Estes dados podem ser melhor visualizados na Tabela 7.

Tabela 7. Correlação de CIM e CBM da literatura e experimental

Tamanho das partículas	35nm (Sharma et al., 2009)	34nm (E7)	50nm (Sharma et al., 2009)	54nm (E10A)
Bactéria	CIM/CBM($\mu\text{m.mL}^{-1}$)			
<i>P. aeruginosa</i>	13,5/13,5	7,1/17	17/17	7,1/-
<i>S. aureus</i>	6,75/6,75	7,1/-	54/54	17/-

(-) não apresentou CBM

Assim pode-se dizer que as AgNPs obtidas por síntese verde usando extrato aquoso de erva mate apresentaram efeito bacteriostático e bactericida frente as bactérias *P. aeruginosa*, *B. cereus* e *S. aureus*.

6 CONCLUSÃO

Foi possível obter AgNPs por síntese verde em temperatura ambiente, a partir de AgNO_3 utilizando extrato aquoso de erva mate (*Ilex paraguariensis*) como agente redutor, e registrando assim seu primeiro relato.

Na análise de UV-Vis, foram observados picos de absorbância que variaram de 423 a 449nm, que caracteriza a síntese de AgNPs, e a partir destes picos foram calculados os diâmetros médios pelo método FWHM.

Por DLS, os experimentos apresentaram distribuição bimodal. Verificou-se que em pH mais alto as NPs tendem à nucleação, proporcionando menores dimensões, enquanto pH mais baixo tende a aglomeração, conferindo AgNPs de dimensões maiores. A concentração do extrato também influenciou na dimensão das AgNPs, onde concentrações mais altas proporcionam AgNPs maiores e concentrações mais baixas, AgNPs menores.

A análise estatística relativa ao planejamento experimental 2 (PE2) mostrou que existe influência da concentração de extrato no tamanho médio das partículas pelo método FWHM.

As biomoléculas presentes no extrato aquoso de erva mate foram responsáveis pela biorredução e possível recobrimento das AgNPs, conferindo estabilidade. Isso pode ser observado por infravermelho (FTIR), onde sugere que compostos de cadeia aromática, bem como polifenóis ou carboidratos, presentes com maior intensidade nas AgNPs, foram responsáveis pela formação de NPs. Então, pode-se sugerir que o processo de síntese apresentou reprodutibilidade e baixo custo.

As AgNPs sintetizadas apresentaram atividade bacteriostática e bactericida para *P. aeruginosa*, *B. cereus* e *S. aureus*, no entanto para *P. aeruginosa* por ser Gram-negativa necessitou de maior concentração de AgNPs para a inibição bacteriana. Enquanto o *B. cereus* necessitou de menor concentração de AgNPs, comparando os experimentos E7 foi mais eficaz como bacteriostático e bactericida, pois E9 não apresentou CIM ou CBM.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Determinar a cinética da reação de síntese verde com monitoramento da mesma;
- Avaliar o comportamento e estabilidade das AgNPs quando submetidas a síntese com maior concentração de extrato e pH acima de 8,5 e abaixo de 5;
- Avaliar a estabilidade e manutenção das características das AgNPs durante um tempo de estocagem;
- Determinar a CIM e CBM para outras bactérias promotoras de DTAs;
- Aplicar em alimentos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERNAZ, V. L. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico.** Dissertação (Mestrado). Pós-graduação em nanociência e nanotecnologia. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de Brasília. Brasília, 2014.

ALBRECHT, M. A.; EVANS, C. W.; RASTON, C. L. Green chemistry and the health implications of nanoparticles. **Green Chemistry**, v. 8, n. 5, p. 417, 2006.

ALIKARIDIS, F. Natural Constituents of *Ilex* Species. **Journal of Ethnopharmacology**, V. 20, p.121-144, 1987.

AKHTAR, M. S.; PANWAR, J.; YUN, Y. Biogenic Synthesis of Metallic Nanoparticles by Plant Extracts. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**. Vol. 1. P 591-602, 2013.

AMSON, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. C. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná – Brasil, No período de 1978 a 2000. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, nov./dez., 2006

BECHTOLD, M. **Síntese e caracterização de nanopartículas de prata e aplicação como agente biocida em tinta poliuretânica hidrossolúvel.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC. 2011.

BRACESCO, N; SANCHEZ, A. G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, V. 136, p. 378-384, 2011.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (CVE). Manual de doenças transmitidas por alimentos: *Bacillus cereus*/ intoxicação alimentar. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e alimentar, 2002. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/bacillus_cereus.pdf.> Acesso em: 14 nov. 2015.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

FILIP, R.; SILVINIA, M. S.; LOTITO, B.; FERRARO, G.; FRAGA, C.G. Antioxidant activity of *Ilex Paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, Buenos Aires, Argentina, V. 20, N. 10, p. 1437-1446, 2000.

GHASEMINEZHAD, S. M.; HAMED, S.; SHOJAOSADATI, S. A. Green synthesis of silver nanoparticles by a novel method: Comparative study of their properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 467– 472, 2012.

LI, S. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annum* L. extract. **Green Chemistry**. Vol. 9. P 852-858, 2007.

LOO, Y. Y.; CHIENG, B. W.; NISHIBUCHI, M.; RADU, S. Synthesis of silver nanoparticles by using tea leaf extract from *Camellia Sinensis*. **International Journal of Medicine**. Vol. 2. P 4263-4267, 2012.

MITTAL, A. K.; CHRISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances** Volume 31, Issue 2, March–April 2013, 346–356p. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975013000050>>. Acesso em: 29 mar. 2015.

MORITA, T; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de Soluções, Reagentes e Solventes: Padronização, preparação, purificação, indicadores de segurança e descarte de produtos químicos**. Editora Blucher. 2ª Ed. 2007.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P.S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**. Vol. 33, Nº 2. P 421-430, 2010.

PHILIP, D. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus rosa sinensis*. **Physica E**. Volume 42. P 1417-1424, 2010.

PRATHNA, T. C.; CHANDRASEKARAN, N.; RAICHUR, A. M.; MUKHERJEE, A. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by *Citrus limon* (lemon) aqueous extract and theoretical prediction of particle size. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. Vol. 82. P 152-159, 2011.

RAI, M. Nanobiotecnologia verde: biossínteses de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos. **Ciência e Cultura**, São Paulo (SP), vol. 65 nº 3, julho 2013. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=S0009-67252013000300014&script=sci_arttext>. Acesso em: 28 mar. 2015.

SAXENA, A.; TRIPATHI, R. M.; SINGH, R. P. BIOLOGICAL SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES BY USING ONION (*ALLIUM CEPA*) EXTRACT AND THEIR ANTIBACTERIAL ACTIVITY. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**. Vol. 5, Nº 2. P 427-432, 2010.

SILVA, L. P. Nanopartículas verdes: Plantas do cerrado são usadas na produção de nanossistemas para controle de patógenos e pragas da agricultura, entre outras aplicações. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo (SP), edição 223, 70-73p, setembro 2014. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2014/09/070-073_Nanoverde_223.pdf?7ba38f>. Acesso em : 29 mar. 2015.

SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**. Vol. 145. P 83-96, 2009.

SHAHVERDI, A. R. et al. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. Vol 3. P 168-171, 2007.

VILCHIS-NESTOR, A. R. et al. Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camellia sinensis* extract. **Materials Letters**. Vol. 62. P 3103-3105, 2008.