

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA DE ITACOATIARA – ICET  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA  
RECURSOS AMAZÔNICOS – PPGCTRA

GABRIELE SIMAS RIBEIRO

**Síntese de nanopartículas de prata mediada por extratos aquosos de açaí (*Euterpe  
oleracea*)**

ORIENTADOR: PROF. DR. GUSTAVO FRIGI PEROTTI

Itacoatiara – AM

2022

GABRIELE SIMAS RIBEIRO

**Síntese de nanopartículas de prata mediada por extratos aquosos de açaí (*Euterpe oleracea*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos (PPGCTRA) do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

ORIENTADOR: PROF.DR.GUSTAVO FRIGI PEROTTI

Itacoatiara – AM

2022

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R484s      Ribeiro, Gabriele Simas  
Síntese de nanopartículas de prata mediada por extratos aquosos  
de açaí (*Euterpe oleracea*) / Gabriele Simas Ribeiro . 2022  
64 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Gustavo Frigi Perotti  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos  
Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Rotas alternativas. 2. Química verde. 3. Extrato vegetal. 4.  
Frutas da Amazônia. 5. Microbicida. I. Perotti, Gustavo Frigi. II.  
Universidade Federal do Amazonas III. Título

## **Agradecimentos**

Agradeço ao Prof. Dr. Gustavo Frigi Perotti por me orientar nessa jornada, dando suporte e auxiliando na construção deste trabalho.

Agradeço a colaboração do Prof. Dr. Luiz Pereira da Costa, do Departamento de Química (DQI) da Universidade Federal de Sergipe (UFS) pela realização dos experimentos de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e na discussão dos resultados deste trabalho.

Agradeço a Profa. Dra. Vera Regina Leopoldo Constantino e seu grupo de pesquisa, do Instituto de Química (IQ) da Universidade de São Paulo (USP) por realizar os experimentos de Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta.

Agradeço a Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti, da Faculdade de Odontologia (FOAr) da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) e seu grupo de pesquisa por realizarem os ensaios microbiológicos.

Agradeço ao Prof.Dr. Hernane da Silva Barud, do Laboratório de Biopolímeros e Biomateriais (BioPolMat) da Universidade de Araraquara (UNIARA) em conjunto com seu grupo de pesquisa realizaram os ensaios de citotoxicidade.

Agradeço a equipe de pesquisa LEMAv, especialmente ao Sidney Souza, que contribuíram para a realização dos experimentos e deram suporte sempre que necessário.

Agradeço a minha mãe Iris Simas por sempre apoiar e incentivar meus estudos, mais essa conquista dedico a senhora, obrigada por tudo. Agradeço ao seu marido Paulo Roberto que me acolheu como filha e sempre incentiva meu trabalho, dividimos o amor por café e cachorrinhos, obrigada.

Agradeço a minha mãe-avó Esmeralda Simas por me apoiar, assim como toda a família Simas, e por celebrarem minhas conquistas.

Agradeço a minha amiga Carolyne Rodrigues por estar presente em mais essa etapa de minha vida, auxiliando meus dias em laboratório, assim como o apoio e incentivo a minhas empreitadas.

Agradeço a minha irmã Wilo Cristina e minha amiga Rafaela Cavalcante por estarem comigo, mesmo que apenas de forma remota, ouvindo minhas teorias e apoiando minha pesquisa.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio ao PPGCTRA e Fundação à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela bolsa de pesquisa concedida para a realização deste trabalho.

Obrigada a todos que contribuíram de forma direta e indireta para a conclusão deste trabalho.

## RESUMO

A produção de nanopartículas metálicas (NPMs) por rotas verdes destaca-se por implementar conceitos referentes à Química Verde, de modo a minimizar impactos ao meio ambiente causados ao utilizar metodologias tradicionais de síntese. O uso de extratos vegetais para mediar a síntese de NPMs apresenta-se como uma alternativa por conter metabólitos secundários capazes de auxiliar na formação e estabilização de nanopartículas (NPs). Na floresta amazônica encontramos uma grande biodiversidade de espécies vegetais, e dentre elas destaca-se o açaí, um fruto nativo da região que contém metabólitos secundários com propriedades antioxidantes que exibem potencial para mediar a síntese de NPMs. Consequentemente, este trabalho investigou a produção de nanopartículas de prata (AgNPs) mediada por extrato aquoso de açaí, investigando diferentes parâmetros reacionais (concentração do extrato, pH e temperatura). As AgNPs foram obtidas após 1 dia para todas as condições, com sinal da banda plasmon entre 350-450 nm, com destaques para as condições de extrato mais diluídas, em meio neutro/alcalino em temperatura de 25° C. Para as condições investigadas foram obtidos AgNPs esféricos com diâmetro hidrodinâmico de  $21,0 \pm 0,8$  nm (25 °C);  $9,0 \pm 0,5$  nm (40 °C) e  $129,3 \pm 5,6$  nm (50 °C) e índices de polidispersividade (PdIs) de  $0,283 \pm 0,004$  (25 °C),  $0,452 \pm 0,023$  (40 °C) e  $0,191 \pm 0,017$  (50 °C), com potencial Zeta próximo a -30 mV. As AgNPs apresentaram menor citotoxicidade frente a solução de  $\text{AgNO}_3$ , e não exibiram atividade microbiológica indicando uma forte capacidade complexante/redutora dos metabólitos secundários presentes no extrato de açaí.

**Palavras-chaves:** rotas alternativas; química verde; frutas da Amazônia, microbicida, citotoxicidade.

## ABSTRACT

The production of metallic nanoparticles (MNs) by green routes stands out for implementing concepts related to Green Chemistry in order to minimize impacts to the environment caused by using traditional synthetic methodologies. The use of plant extracts to mediate the synthesis of MNs is presented as an alternative because it contains secondary metabolites that can participate in the formation and stabilization of nanoparticles (NPs). In this scenario, açai, a fruit native to the Amazon region that contains biomolecules with antioxidant properties, exhibits the potential to mediate the synthesis of NPs. The present study investigated the production of silver nanoparticles (AgNPs) mediated by aqueous extracts of açai, assessing different reaction parameters (açai extract concentration, pH and temperature). AgNPs were obtained after 1 day of reaction for all conditions tested, with plasmon band signal detected at the 350-450 nm range, especially when using more diluted extract conditions, and in neutral/alkaline medium at 25° C. These spheroidal AgNPs exhibited hydrodynamic diameters of  $21.0 \pm 0.8$  nm (25°C);  $9.0 \pm 0.5$  nm (40 °C) and  $129.3 \pm 5.6$  nm (50 °C) and polydispersity indices (PdIs) of  $0.283 \pm 0.004$  (25 °C),  $0.452 \pm 0.023$  (40 °C) C) and  $0.191 \pm 0.017$  (50 °C), with Zeta potential values close to -30 mV. The AgNPs showed lower cytotoxicity to fibroblasts than the AgNO<sub>3</sub> solution, and did not exhibit microbiological activity, indicating a strong complexing capacity of the secondary metabolites present in the açai extract.

**Keywords:** alternative synthetic routes; green chemistry; plant extract; Amazon fruits; microbicide; cytotoxicity.

## Lista de Siglas e Abreviaturas

Ag<sup>+</sup> – Cátion prata.

Ag<sup>0</sup> – Prata zero.

a.C. – Antes de Cristo.

AgNO<sub>3</sub> – Nitrato de prata.

AgNPs – Nanopartículas de prata.

AM – Amazonas.

ATCC – American Type Culture Collection.

°C – Celsius.

C=O – Função carbonila.

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono.

Cu – Cobre.

DLS – Espalhamento de luz dinâmico.

DNA – Ácido desoxirribonucleico.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz.

HNO<sub>3</sub> – Ácido nítrico.

Kg – Quilograma.

kW – Quilowatt.

mg – Miligrama.

mL – Mililitro.

mm – Milímetro.

mV – Milivolt.

NaOH – Hidróxido de sódio.

*n* – Par de elétrons não-ligante.

nm – Nanômetro.

NPMs – Nanopartículas metálicas.

NPs – Nanopartículas.

OH – Grupo hidroxila.

PdI – Índice de polidispersividade.

pH – Potencial hidrogeniônico.

RPS – Ressonância de *plasmon* de superfície.

TEM – Microscopia eletrônica de transmissão.

u.a. – Unidade adimensional.

UV-Vis – Espectroscopia eletrônica de absorção molecular na região do ultravioleta-visível.

μL – microlitro.

π – Orbital pi-ligante.

π\* – Orbital pi-antiligante.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Diferentes mecanismos de inibição bacteriana por AgNPs.....	17
<b>Figura 2</b> - Estruturas moleculares dos principais flavonoides encontrados no açaí. ....	22
<b>Figura 3</b> - a) higienização do fruto açaí. b) maceração do açaí. c) centrifugação do extrato de açaí. d) armazenamento do extrato de açaí. ....	25
<b>Figura 4</b> - Espectros eletrônico UV-Vis do extrato de açaí em pH 6,0 (linha preta), pH 7,0 (linha vermelha), pH 8,0 (linha azul). ....	30
<b>Figura 5</b> - Imagens do meio de reação de produção das AgNPs em pH 6,0 nas diferentes condições de extrato de açaí após 1 hora ( $\Delta$ ) e 1 dia ( $\square$ ) de reação: a) condição 1; b) condição 2; c) condição 3. ....	31
<b>Figura 6</b> - Espectros eletrônicos UV-Vis dos meios de reação em pH 6,0 para a formação das AgNPs em diferentes tempos de reação, na condição 1 de extrato de açaí.....	32
<b>Figura 7</b> - Espectros eletrônicos UV-Vis dos meios de reação em pH 6,0 para a formação das AgNPs em diferentes tempos de reação, na condição 2 de extrato de açaí.....	33
<b>Figura 8</b> - Espectros eletrônicos UV-Vis dos meios de reação em pH 6,0 para a formação das AgNPs em diferentes tempos de reação, na condição 3 de extrato de açaí.....	33
<b>Figura 9</b> - Absorbância máxima da banda RPS dos meios de reação em pH 6,0 e em diferentes condições de extrato de açaí em função do tempo.....	34
<b>Figura 10</b> - Estrutura química representativa dos flavonoides e os seus sítios quelantes (A = íon metálico) ao lado das estruturas químicas do extrato de açaí. ....	35
<b>Figura 11</b> - Imagens do meio de reação em diferentes valores de pH após 1 dia empregando a condição 2 de extrato de açaí: a) pH = 6,0 b) pH = 7,0 e c) pH = 8,0. ...	36
<b>Figura 12</b> - Espectros UV-Vis dos meios reacionais em pH 7,0 para: A) condição 2 de extrato e B) condição 3 de extrato. ....	38
<b>Figura 13</b> - Espectros UV-Vis dos meios reacionais em pH 8,0 para: A) condição 2 de extrato e B) condição 3 de extrato. ....	39
<b>Figura 14</b> - Absorbância máxima da banda RPS das diferentes condições de extrato de açaí em função do tempo. A) pH 7,0; B) pH 8,0. ....	41
<b>Figura 15</b> - Representação das estruturas das antocianinas encontradas em função de diferentes pHs. ....	42
<b>Figura 16</b> - Imagens do meio de reação em diferentes valores de temperatura após 1 dia empregando a condição 2 de extrato de açaí: a) 25 °C, b) 40 °C, c) 50 °C.....	43

<b>Figura 17</b> - Espectros UV-Vis dos meios reacionais em pH 7,0 para a condição 2 de extrato de açaí. A) Temperatura 40 °C e B) Temperatura 50 °C. ....	44
<b>Figura 18</b> - Absorbância máxima da banda RPS da condição 2 de extrato de açaí em pH 7,0 em diferentes temperaturas em função do tempo. ....	45
<b>Figura 19</b> - Imagens TEM da reação de AgNPs obtidas em pH 7,0 e diluição do extrato de açaí da condição 2 a 25 °C.....	46
<b>Figura 20</b> - Histograma de distribuição de diâmetro hidrodinâmico das AgNPs produzidas empregando a condição 2 de extrato de açaí em pH 7,0 para diferentes temperaturas.....	47
<b>Figura 21</b> - Mecanismo proposto para compostos fenólicos encontrados no extrato da folha do marmeleiro da Índia.....	50
<b>Figura 22</b> - Mecanismo de síntese de AgNPs para compostos flavonoides do extrato da fruta <i>Syzygium c.</i> .....	51
<b>Figura 23</b> - Representação do possível mecanismo de reação para sintetizar AgNPs mediado por extrato aquoso de açaí. ....	52
<b>Figura 24</b> - Resultado das AgNPs em diferentes condições submetidas a <i>E.coli.</i> ....	53
<b>Figura 25</b> - Viabilidade celular de fibroblastos L929 avaliada pelo ensaio MTT na diluição 1:1 do extrato utilizando diferentes dispersões de AgNPs e amostras de solução de AgNO <sub>3</sub> . ....	54

## **Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1</b> - Lista de equipamentos utilizados no presente estudo.....	24
<b>Tabela 2</b> - Lista de reagentes utilizados na produção das AgNPs. ....	24
<b>Tabela 3</b> - Lista de reagentes microrganismos utilizados no presente estudo. ....	24
<b>Tabela 4</b> - Cepas microbianas e condições de crescimento. ....	27

## Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
3. OBJETIVOS	23
3.1. <i>Objetivo geral</i>	23
3.2. <i>Objetivos específicos</i>	23
4. MATERIAIS	23
5. METODOLOGIA	25
5.1. <i>Obtenção dos extratos aquosos de açaí</i>	25
5.2. <i>Síntese das nanopartículas de prata (AgNPs)</i>	26
5.3. <i>Monitoramento da síntese das AgNPs</i>	26
5.4. <i>Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)</i>	26
5.5. <i>Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e análise de potencial Zeta</i>	27
5.6. <i>Ensaio microbiológicos</i>	27
5.7. <i>Cultura celular, preparação de amostras e avaliação de viabilidade celular</i>	28
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
6.1. <i>Caracterização do extrato de açaí pela espectroscopia eletrônica UV-Vis</i>	29
6.2. <i>Síntese de AgNPs em diferentes concentrações de extrato de açaí</i>	30
6.3. <i>Síntese de AgNPs em valores diferentes de pH</i>	35
6.4. <i>Síntese de AgNPs em valores diferentes de temperatura</i>	42
6.5. <i>Microscopia eletrônica de transmissão TEM</i>	46
6.6. <i>Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta (mV)</i>	46
6.7. <i>Provável mecanismo de síntese de AgNPs mediada por extrato de açaí</i>	49
6.8. <i>Avaliação do ensaio microbiológico</i>	52
6.9. <i>Avaliação de viabilidade celular AgNPs</i>	54
7. CONCLUSÕES	54
8. REFERÊNCIAS	56

## 1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia pode ser definida como uma área interdisciplinar capaz de englobar ciência e tecnologia para produzir novos materiais funcionais, proporcionando maior qualidade de vida aos seres vivos (YADI *et al.*, 2018). Os estudos voltados para nanociência, âmbito que lida com a manipulação de materiais em nível nanométrico, investigam formas de manusear estruturas em nanoescala para diferentes finalidades, por exemplo, a minimização de danos ambientais causados por interferência humana (DISNER; CESTARI, 2016). O campo voltado para nanossíntese vem emergindo nas últimas décadas, destacando-se pela produção de nanopartículas metálicas (NPMs) que apresentam propriedades novas e/ou melhoradas quando comparadas aos sistemas micro e macroparticulados, de modo a possuírem vantagens interessantes quando empregadas em áreas como catálise, microbiológica, ciência espacial e ciências biomédicas (DUAN; WANG; LI, 2015; YADI *et al.*, 2018).

Embora a nanossíntese seja um campo com destaques recentes, relatos do seu emprego já foram reportados no decorrer da história da humanidade. Em diferentes culturas as nanopartículas metálicas eram utilizadas para produzir efeitos coloridos em vidros e cerâmicas, por exemplo, na Europa os vitrais das igrejas exibiam cores vibrantes e vivas devido a presença de nanopartículas de ouro (ADIL *et al.*, 2015), outro exemplo é encontrado na Roma do século IV a.C, o vidro do cálice de Licurgo (*Lycurgus cup*), no qual combina nanopartículas de prata (AgNPs) e ouro para proporcionar efeitos coloridos quando a luz incide por diferentes ângulos (LOOS, 2015). Na China, desde o século XIX, as nanopartículas de prata são empregadas como agentes antimicrobianos em locais públicos, como ferrovias e praças, dispersas em soluções aquosas sobre a superfície dos materiais (PRABHU; POULOSE, 2012).

Atualmente, na nanossíntese há um crescente número de estudos voltados para investigar as propriedades de nanopartículas metálicas como agentes antimicrobianos como um meio alternativo para tratar microrganismos patógenos (GONZÁLEZ-VARGAS *et al.*, 2017), principalmente considerando o seu uso externo como revestimentos de superfícies. Desde o século XX são utilizadas drogas antibióticas para inibir doenças causadas por bactérias, fungos e vírus (MARIA, 2014), no entanto, o uso indiscriminado desses medicamentos ocasionou a evolução/resistência destes microrganismos resultando na ineficiência dos tratamentos convencionais (RAI *et al.*, 2014; SIRELKHATIM *et al.*, 2015). Desse modo, há a necessidade de busca por novos agentes antimicrobianos e nesse cenário, as nanopartículas metálicas surgem como uma

alternativa interessante por exibirem atividade inibitória microbiana e baixa probabilidade de resistência por parte dos microrganismos (GAILLET; ROUANET, 2015). Entre elas, destacam-se as nanopartículas de prata (AgNPs), pois quando comparadas aos outros metais, a prata e seus compostos dispõem de maior efeito antimicrobiano, maior toxicidade para os microrganismos e ao mesmo tempo menor toxicidade às células de seres multicelulares (ALMEIDA *et al.*, 2017; GE *et al.*, 2014).

Estudos revelam que as AgNPs desenvolvidas por diferentes métodos possuem habilidade de inibir o crescimento microbiano devido ao seu tamanho, desse modo, interagindo amplamente com a superfície do microrganismo, o que acarreta em alterações morfológicas e celulares que induzem a morte celular em um curto período de tempo (GE *et al.*, 2014; GONZÁLEZ-VARGAS *et al.*, 2017; RAI *et al.*, 2014). Diante disso, as nanopartículas de prata apresentam atualmente uso como revestimentos para reduzir infecções em diferentes produtos hospitalares como curativos, dispositivos médicos, equipamentos cirúrgicos e nos sistemas de purificação hospitalar, tornando-se a nova geração de agentes antimicrobianos (BARKAT *et al.*, 2018; OGUNDONA *et al.*, 2020; SIM *et al.*, 2018).

Os principais métodos para produção de NPMs fundamentam-se em técnicas físicas e químicas que são capazes de liberar em seu processo resíduos com potencial nocivo ao meio ambiente (GEBRU *et al.*, 2013) e como consequência, expõe a necessidade de desenvolver metodologias alternativas viáveis e favoráveis do ponto de vista ecológico (HYEON; MANNA; WONG, 2015). Com a finalidade de obter rotas mais sustentáveis, conceitos referentes a Química Verde são adotados para a produção de AgNPs, como a utilização de extratos vegetais para a mediação da síntese dessas estruturas (DUAN; WANG; LI, 2015; GHAEDI *et al.*, 2015). A síntese de NPMs mediada por extratos vegetais tem como vantagens menor impacto ambiental e pode ser economicamente competitiva, proporcionando aplicações em uma gama de setores que não seriam permitidos ao utilizar precursores que apresentam toxicidade aos seres humanos e animais (BEYENE *et al.*, 2017).

A região amazônica dispõe de uma rica biodiversidade vegetal e sua abundante matéria-prima exhibe características propícias para a mediação na síntese de nanopartículas metálicas, como o fruto açaí (*Euterpe oleracea*), muito utilizado no setor alimentício. O açaí possui metabólitos secundários que apresentam propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (YAMAGUCHI *et al.*, 2015), em especial os compostos fenólicos (SOOD; CHOPRA, 2018), com destaque para o grupo dos

flavonoides, que possui como seu principal representante no açaí as antocianinas (YAMAGUCHI *et al.*, 2015) responsáveis pela coloração escura do fruto. Estas substâncias exibem potencial de atuação como agentes redutores dos íons de prata, permitindo a produção de nanopartículas de prata (SARANYA *et al.*, 2017) por uma abordagem alternativa e ecologicamente mais correta.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

A nanotecnologia juntamente com a nanociência busca investigar a aplicação de materiais nanométricos em diferentes áreas da ciência, como química, biologia e medicina, devido a sua capacidade única de amplificar a eficiência do material em comparação aos micro e macromateriais (KEÇILI; BÜYÜKTIRYAKI; HUSSAIN, 2019). Os conceitos que envolvem a nanotecnologia são considerados recentes, sendo este relatado pela primeira vez por Richard Feynman em 1959, em sua palestra intitulada “*There’s Plenty of Room at the Bottom*” e somente 28 anos depois o engenheiro Kim Eric Drexler em seu livro “*Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology*” introduziu e definiu o termo “nanotecnologia” ao propor a ideia de produzir materiais em nanoescala (BERA; BELHAJ, 2016).

Na nanotecnologia trabalha-se principalmente com nanopartículas (NPs), frequentemente denominada como “*engineered nanomaterial*” (BERA; BELHAJ, 2016), tratando-se de estruturas com dimensões entre 1 a 100 nm (ADIL *et al.*, 2015). Tais materiais apresentam uma alta proporção de área de superfície em relação ao volume ocupado, sua característica mais importante, propiciando maior interação com outras estruturas (PANTIDOS; HORSFALL, 2014), o que leva a diferenças químicas e físicas em suas propriedades com relação à micro e macroestruturas (IRAVANI, 2011).

As nanopartículas metálicas se destacam como materiais eficientes na nanociência por exibirem na escala nanométrica propriedades específicas, como por exemplo, maior tolerância a temperatura e condutividade elétrica, variedade de coloração, aumento da reatividade química e atividade catalítica, maior estabilidade, maior capacidade de ligação com outros compostos, propriedades ópticas, entre outros (IRAVANI, 2011; MARSLIN *et al.*, 2018). Por apresentar características únicas, dispõem de diversas empregabilidades em áreas como a óptica para o desenvolvimento de biossensores, nas ciências biomédicas para o tratamento de câncer, no setor farmacêutico com agentes antimicrobianos e na catálise como nanocatalisadores (IRAVANI, 2011; NASROLLAHZADEH *et al.*, 2019; PANTIDOS; HORSFALL, 2014).

As nanopartículas metálicas podem ser sintetizadas por diferentes métodos físicos e químicos tradicionais (KUPPUSAMY *et al.*, 2016). No entanto, sua maioria envolve custos elevados e/ou a utilização de produtos químicos com potencial de gerar resíduos nocivos ao meio ambiente (HYEON; MANNA; WONG, 2015). Em contrapartida há os métodos biossintéticos, que surgem como alternativas simples e viáveis aos métodos tradicionais de obtenção de NPMs capazes de suceder os meios tradicionais ao empregar microrganismos ou extratos vegetais na produção das nanopartículas (GHAEDI *et al.*, 2015).

Todos os métodos disponíveis para a produção de nanoestruturas podem seguir duas abordagens distintas denominadas “*top-down*” e “*bottom-up*”, onde sua aplicação é permitida em qualquer campo de pesquisa em nanoescala (YADI *et al.*, 2018). A abordagem *bottom-up* consiste na auto-organização dos materiais nanoestruturados em correspondência aos constituintes iniciais em tamanho atômico ou molecular e envolve uma redução química ou biológica. De maneira antagônica, a abordagem *top-down* se baseia na fragmentação da matéria a partir de estruturas maiores (macro e microestruturas) para adquirir a nanoestrutura idealizada, sendo que nesta abordagem ocorre a quebra de um metal em escalas maiores para a formação do nanomaterial (COURA *et al.*, 2018; KEÇILI; BÜYÜKTIRYAKI; HUSSAIN, 2019). Os métodos e abordagens implementados para produzir as nanopartículas são importantes para obtenção de diferentes nanoestruturas. No entanto, características e propriedades como estabilidade e tamanho dependem também de condições experimentais, por exemplo, o tempo de reação, a temperatura e o uso ou não de agentes estabilizantes (BEYENE *et al.*, 2017).

As nanopartículas metálicas obtidas por meios biossintéticos são conceituadas como colóides dispersos em solventes aquosos com aplicações interessantes na indústria farmacológica para supressão de enfermidade causadas por bactérias, fungos e vírus (KUPPUSAMY *et al.*, 2016). As nanopartículas de prata destacam-se entre os sistemas nanoparticulados, principalmente por atuarem como agentes antimicrobianos (OGUNDONA *et al.*, 2020), mesmo que estejam em estado sólido (SIDDIQI; HUSEN; RAO, 2018) e em micro/macroescala (LEE; JUN, 2019). Nesse sentido, estima-se que aproximadamente 320 toneladas de AgNPs são fabricadas por ano e empregadas nas áreas de nanomedicina, biossensoriamento e no revestimento superficial de embalagens alimentícias (SIDDIQI; HUSEN; RAO, 2018).

Os compostos de prata, tradicionalmente desempenham papel de agentes antimicrobianos capazes de controlar infecções corporais, evitam a deterioração de alimentos e são capazes de tratar úlceras (BEYENE *et al.*, 2017; KUPPUSAMY *et al.*, 2016; YADI *et al.*, 2018). Seu uso foi amplamente difundido antes da descoberta dos antibióticos, especialmente na Primeira Guerra Mundial, ao utilizá-la para tratamento de infecções e feridas de soldados (VAID *et al.*, 2020).

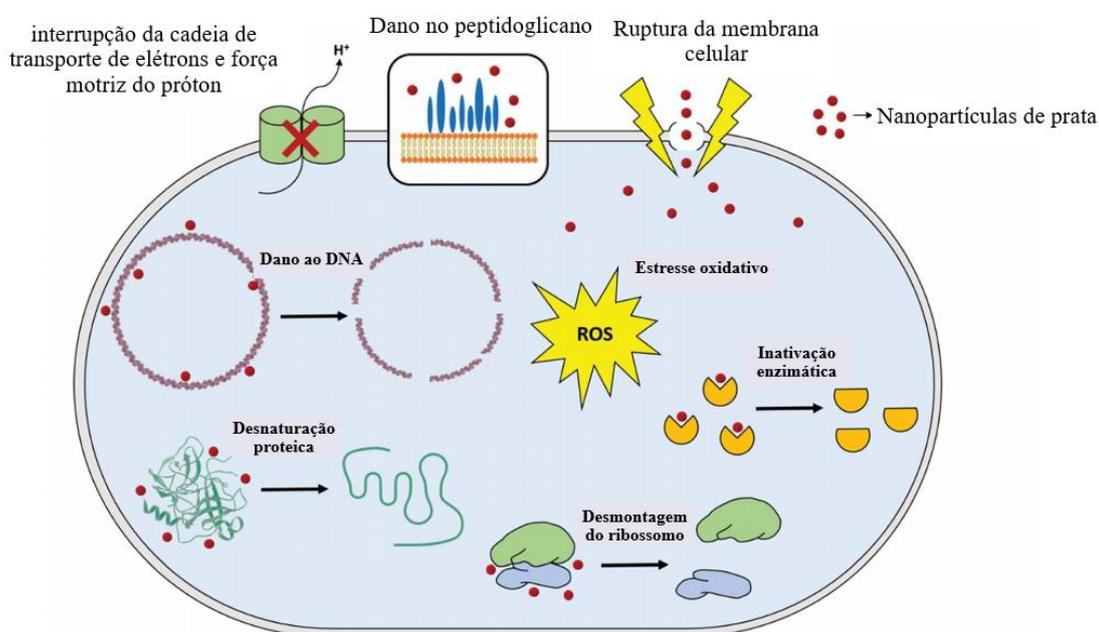
As propriedades antibacterianas da prata foram comprovadas e regulamentadas inicialmente em 1920 pela *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos para o tratamento de ferimentos, permitindo a aceleração do processo de cura (DURÁN *et al.*, 2016), visto que são descritas em estudos como não-tóxicas aos humanos e não apresentarem danos colaterais aos indivíduos quando utilizadas em concentrações baixas, juntamente com a capacidade de inibir o crescimento de uma gama de bactérias no sistema humano (SIDDIQI; HUSEN; RAO, 2018). No entanto, segundo Bocate *et al.* (2019), indícios sobre a toxicidade dos compostos de prata como as nanopartículas a saúde humana ainda não é clara.

As nanopartículas de prata exibem alto potencial biocida para diferentes grupos de microrganismos e estudos recentes estão voltados para o emprego de AgNPs na área médica, principalmente por demonstrarem maior eficácia em comparação às drogas antibióticas, ao inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (PANTIDOS; HORSFALL, 2014). Adicionalmente, também são capazes de inibir a proliferação de diferentes fungos patógenos (KHATAMI *et al.*, 2016), tornando-se um potencial antifúngico com menor toxicidade e custo em relação aos antifúngicos sintéticos encontrados atualmente (BOCATE *et al.*, 2019). As AgNPs detêm como vantagem maior atividade citotóxica em relação aos materiais em maior escala de tamanho, agindo em níveis celulares, subcelulares e biomoleculares (SIDDIQI; HUSEN; RAO, 2018). Suas interações com os meios biológicos são relatadas por dispor de um conjunto de atividades dependendo de sua forma química (nanométrica, como um metal reduzido ou iônica, na forma de um sal de prata) e propriedades físicas (tamanho, forma, cristalinidade) capazes de impactar em sua ação antimicrobiana (PAREEK; GUPTA; PANWAR, 2018).

Diversos mecanismos de interação entre as nanopartículas e bactérias foram relatados nos últimos anos. Em uma dessas possibilidades, há a interação das nanopartículas de prata com a parede celular bacteriana, permitindo que haja o ancoramento das AgNPs e posterior penetração nas células. Nesse processo ocorre uma

alteração da estrutura na membrana, causando a formação de “poços” em sua superfície, ocasionando a inviabilidade celular (KUPPUSAMY *et al.*, 2016; ROY *et al.*, 2019). Outro mecanismo proposto é a dissociação parcial das nanopartículas de prata em cátions prata, espécie capaz de induzir dano à superfície celular e acarretando na morte do microrganismo (YANG *et al.*, 2021). Também é descrito na literatura o mecanismo de interação de AgNPs com o DNA bacteriano, no qual as nanopartículas interagem fortemente com grupos fosfatos presentes no DNA nessa estrutura, impedindo sua replicação e conseqüentemente, encerrando a viabilidade celular (DAUTHAL; MUKHOPADHYAY, 2016). Alguns desses mecanismos estão ilustrados na Figura 1.

**Figura 1** - Diferentes mecanismos de inibição bacteriana por AgNPs.



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

Assim como é de interesse compreender os mecanismos de ação antibacteriano das AgNPs e pesquisas buscam investigar os possíveis mecanismos de inibição das nanopartículas para os fungos. É proposto atualmente que assim como nas bactérias, as AgNPs interagem com compostos no DNA fúngico, impossibilitando sua replicação e ocasionando a morte celular (BOCATE *et al.*, 2019; GUERRA *et al.*, 2020). Outro mecanismo proposto para a interação das AgNPs com a membrana plasmática fúngica ocorre pelo bloqueio das bombas de prótons, causando a desnaturação proteica da superfície fúngica e proporcionando a sua morte (NISAR *et al.*, 2019). As nanopartículas de prata podem ainda inibir a proliferação de microrganismo de inúmeras outras formas,

tornando a probabilidade de patógenos desenvolverem resistência a prata virtualmente impossível (GAILLET; ROUANET, 2015), e conseqüentemente, possibilitando o emprego de AgNPs como um agente de controle microbiológico.

Com o aumento na investigação da aplicação de nanopartículas para fins biomédicos, é de interesse adotar meios de produção com menor toxicidade aos seres vivos. Desse modo, os métodos de biossíntese incorporam os 12 princípios da química verde, em especial a síntese química menos perigosa, a utilização de solventes mais seguros e o uso de matérias-primas renováveis (KADZIŃSKI *et al.*, 2018; NAYAK *et al.*, 2016) para serem empregados na mediação do processo de formação de nanopartículas.

As NPs sintetizadas a partir dos métodos verdes podem exibir maior toxicidade aos microrganismos que as obtidas por métodos tradicionais (SIDDIQI; HUSEN; RAO, 2018; SINGH *et al.*, 2018). Por exemplo, na revisão de AGARWAL *et al.* (2018) foi relatado a obtenção de nanopartículas por extrato vegetal com melhor atividade antibacteriana que nanoestruturas derivadas de rotas tradicionais, consequência do recobrimento de sua superfície por distintas biomoléculas que exibem atividade farmacológica inibitória, permitindo maior interação das NPs com a membrana bacteriana.

Dessa forma, uma das principais abordagens investigadas para a síntese de nanopartículas no campo da biossíntese é a adoção de reagentes de origem vegetal, por exemplo, o uso de diferentes partes de plantas (folhas, caules, cascas, flores, frutas, etc.). Isso ocorre devido à presença de metabólitos secundários (proteínas, compostos fenólicos, flavonoides, aminoácidos e vitaminas) capazes de desempenhar papel de agentes redutores e estabilizantes das estruturas metálicas, conseqüentemente, produzindo nanopartículas de diferentes tamanhos e formas (ADIL *et al.*, 2015; SIDDIQI; HUSEN; RAO, 2018). Os diferentes metabólitos secundário encontrados no extrato vegetal podem interagir com sais de prata, em especial na forma de nitrato, levando a formação de nanopartículas de prata. A seguir é proposto o mecanismo geral de reação para biossíntese de AgNPs (KUPPUSAMY *et al.*, 2016).



Vale ressaltar que a síntese de nanopartículas de prata produzidas por extratos vegetais possui diversas vantagens sobre outros procedimentos tradicionais ou biológicos devido à rica biodiversidade vegetal e os metabólitos secundários presentes nos extratos agirem como redutores e estabilizantes naturais. Além disso, os extratos vegetais são de fácil manuseio, apresentam maior segurança na manipulação, possuem menor custo energético para obtenção, são amplamente disponíveis e resultam em grande rendimento de nanopartículas (BEYENE *et al.*, 2017; KUPPUSAMY *et al.*, 2016; YADI *et al.*, 2018). A biossíntese de AgNPs por extratos vegetais é realizada considerando parâmetros de reação como a concentração dos reagentes (extrato vegetal e nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ )), tempo de reação, pH e temperatura, de forma a serem otimizados visto que são fatores capazes de influenciar o tamanho, morfologia e taxa de reação dessas nanoestruturas, independentemente do método de síntese (DADA *et al.*, 2018).

Diferentes estudos estão voltados para a investigação do efeito que a concentração do extrato vegetal, em relação à disponibilidade de seus metabólitos secundários, influencia no formato das nanopartículas produzidas. A revisão de Srikar *et al.* (2016) descreve que o tamanho e morfologia das nanopartículas são afetadas diretamente pela fração de extrato disposto no meio reacional, por exemplo, aumentando a concentração do extrato vegetal há maior possibilidade de obtenção de nanopartículas com tamanhos reduzidos. Do mesmo modo, diferentes concentrações de íons  $\text{Ag}^+$  acarretam em alterações no tamanho das nanopartículas, à medida em que se eleva as concentrações de  $\text{Ag}^+$  partículas maiores são sintetizadas (DADA *et al.*, 2019). Deve-se considerar também o tempo de contato entre o extrato vegetal e os íons de  $\text{Ag}^+$  como um parâmetro que influencia a redução dos íons metálicos em AgNPs, assim, a disposição dos agentes redutores em relação ao tempo possibilita investigar a taxa de formação das nanoestruturas (DADA *et al.*, 2019; MAHIUDDIN; SAHA; OCHIAI, 2020).

Um parâmetro físico-químico fundamental durante o processo de biossíntese de AgNPs é o pH, consistindo em um fator determinante para seu tamanho, forma e rendimento da reação (JAVED *et al.*, 2020). O pH é capaz de influenciar a forma e o tamanho das nanopartículas pois modifica os estados eletrostáticos das biomoléculas presentes no extrato, alterando o seu potencial de redução, assim como suas habilidades de estabilização e conseqüentemente o crescimento das nanopartículas (JAIN; MEHATA, 2017). Estudos como de Mahiuddin, Saha e Ochiai, (2020) e Srikar *et al.* (2016) sugerem que em um meio reacional básico são obtidas AgNPs com maior estabilidade, elevada taxa de formação pelo tempo e maior rendimento de reação, além de formar

nanopartículas menores, uniformes e geralmente esféricas. Em contrapartida, o meio ácido pode propiciar a agregação das AgNPs e impedir a formação de novas partículas. Desse modo, os meios reacionais básicos mostram-se mais favoráveis para a biossíntese de AgNPs que os meios ácidos (MAHIUDDIN; SAHA; OCHIAI, 2020).

A temperatura é outro parâmetro com capacidade de exercer grande influência na produção de AgNPs por extrato vegetal, visto que controla a cinética da reação alterando a taxa de síntese, morfologia e tamanho das partículas (DADA *et al.*, 2019; JAVED *et al.*, 2020). No estudo de Jain e Mehata (2017) é descrito a obtenção de nanopartículas com tamanho reduzido em temperaturas mais altas, relacionando o tamanho das partículas produzidas com a temperatura. Com uma temperatura maior, há o aumento da energia cinética das biomoléculas presentes no extrato vegetal, acarretando em uma maior taxa de conversão dos íons  $\text{Ag}^+$  em  $\text{Ag}^0$  por intervalo de tempo no meio reacional, impossibilitando o crescimento do tamanho da partícula. Dessa forma, partículas menores, uniformes e com maiores rendimentos são sintetizadas em temperaturas mais elevadas (RAO; TANG, 2017). O aumento de temperatura é favorável para otimização da síntese de nanopartículas até certo ponto, pois temperaturas extremamente altas podem causar degradação dos metabólitos secundários encontrados nos extratos, inviabilizando a redução da prata metálica em AgNPs (JAVED *et al.*, 2020).

Atualmente, as nanopartículas podem ser caracterizadas principalmente por seu tamanho, morfologia e área superficial utilizando diferentes técnicas (SANTHOSHKUMAR; RAJESHKUMAR; KUMAR, 2017). A técnica de espectroscopia eletrônica de absorção molecular na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) é um dos principais métodos aplicados para caracterizar as estruturas eletrônicas e propriedades ópticas das nanopartículas metálicas, consistindo no estudo da resposta às ondas eletromagnéticas pela amostra (MENON; RAJESHKUMAR; KUMAR, 2017). As propriedades ópticas apresentadas pelas nanopartículas metálicas são características das oscilações coletivas dos elétrons da banda de condução, denominada ressonância de *plasmon* de superfície (RPS), no qual há uma interação das NPMs com o campo eletromagnético da luz (KOBYLINSKA *et al.*, 2020). No espectro eletromagnético que compreende a faixa do visível, os metais nobres nanoparticulados como prata, cobre e ouro exibem uma banda *plasmon* bem definida, podendo ser identificada com o auxílio da espectroscopia UV-Vis, variando a sua posição de máximo na faixa entre 190 nm a 700 nm (SHUKLA; IRAVANI, 2017; WANG *et al.*, 2017). A técnica contribui também para o monitoramento do progresso da reação avaliando diferentes parâmetros, como

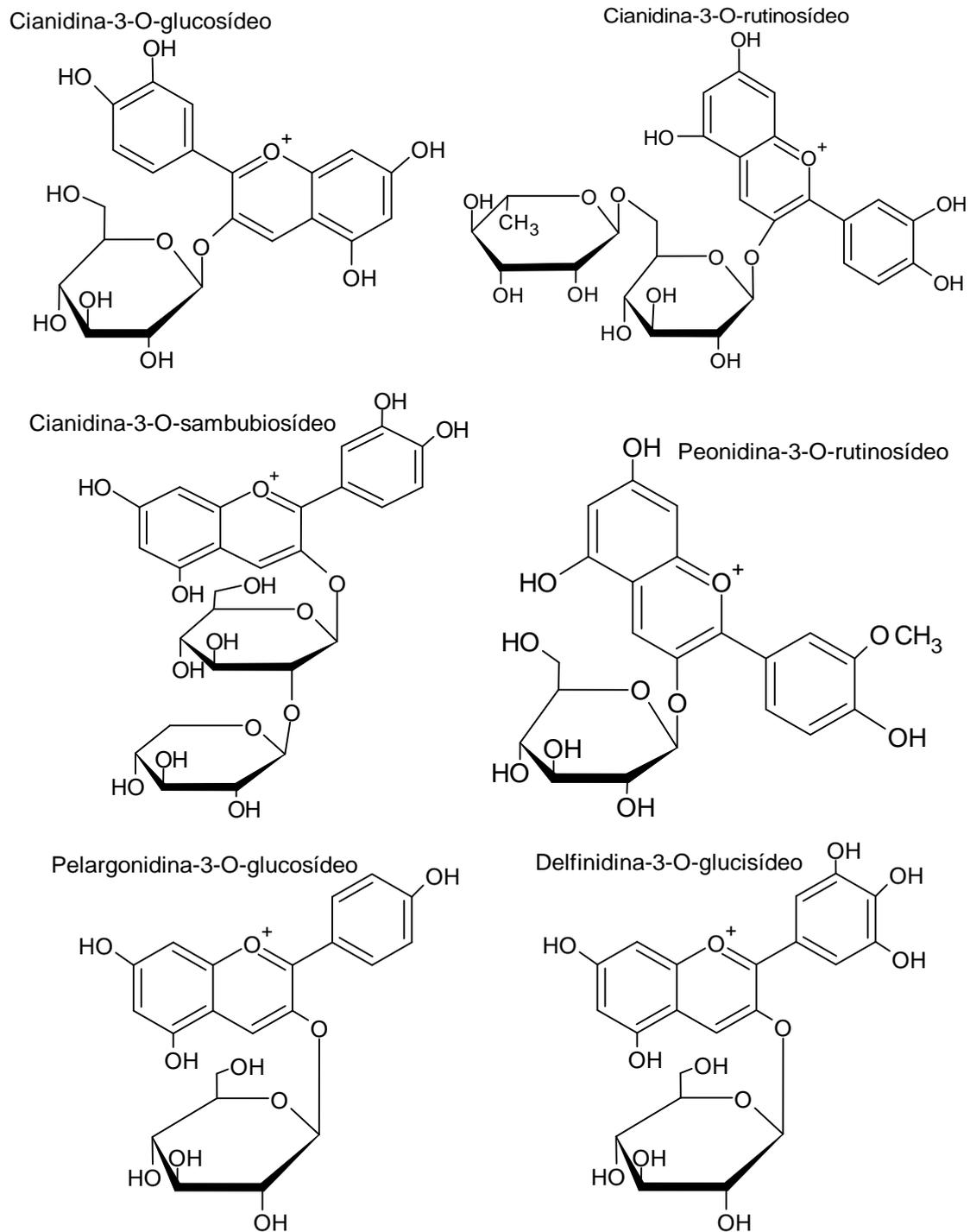
concentração, pH e temperatura na estabilidade dos coloides produzidos, além da obtenção de dados que permitem inferir sobre dimensões e formas dessas nanoestruturas produzidas (WANG *et al.*, 2017).

No campo da biossíntese, o emprego de extratos de frutas para produzir nanopartículas metálicas mostra-se uma abordagem promissora, uma vez que na literatura diversos exemplos são expostos, como o uso de espécies de amoras, uvas, graviolas, entre outros (ATHITHAN *et al.*, 2020; KUMAR *et al.*, 2020; RAZAVI *et al.*, 2020). Na floresta amazônica encontra-se uma vasta diversidade de frutos nativos, no qual o açaí (*Euterpe oleracea*) destaca-se por ser difundido como bebida energética, exibindo propriedades benéficas à saúde e que são vinculadas à sua composição química (DE OLIVEIRA; SCHWARTZ, 2018) apresentando potencial para sintetizar nanopartículas de prata.

O açaí é encontrado particularmente em terrenos de várzea e igapó, sendo o seu período de frutificação ao longo de todo o ano, em especial se obtém maior safra no verão (DA SILVA *et al.*, 2020b). A polpa de açaí não é somente utilizada como bebida energética, uma vez que na indústria alimentícia são produzidos sorvetes, xaropes, açaí em pó, doces, geleias, licores, corantes naturais, entre outros (COSTA; SILVA; VIEIRA, 2018). Na região Norte do Brasil é consumido principalmente na forma de suco, obtido através do processo de despulpamento em máquinas mecânicas de compressão com adição de água (DA SILVA *et al.*, 2020a). Sua produção movimenta a economia local, gerando emprego para mais de 50.000 famílias e arrecadando mais de US\$ 150 milhões por ano (CARVALHO *et al.*, 2017).

A composição química do açaí possui diversas substâncias bioativas responsáveis por propriedades antioxidantes, bactericidas, antivirais, anti-inflamatórias e antifúngicas (BOEIRA *et al.*, 2020; YAMAGUCHI *et al.*, 2015). Os principais metabólitos secundários identificados são os flavonoides, principalmente os compostos fenólicos da classe das antocianinas, com predominância da cianidina 3-O-glicosídeo (26 a 30%) e cianidina 3-O-rutinosídeo (60 a 67%) (CARVALHO *et al.*, 2017; DA SILVEIRA *et al.*, 2019; PORTINHO; ZIMMERMANN; BRUCK, 2012). Além destes, são encontrados em menor quantidade a cianidina 3-O-sambubiosídeo, peonidina 3-O-rutinosídeo, pelargonidina 3-O-glucosídeo e delfinidina 3-O-glucosídeo, sendo suas estruturas mostradas na Figura 2 (CEDRIM; BARROS; NASCIMENTO, 2018).

**Figura 2** - Estruturas moleculares dos principais flavonoides encontrados no açaí.



Fonte: Adaptado de CEDRIM; BARROS; NASCIMENTO, 2018.

As antocianinas encontradas nos extratos de açaí se diferenciam pela quantidade de grupos hidroxilas, juntamente com o seu grau de metilação, o número de açúcares ligados a estrutura e ácidos alifáticos/aromáticos ligados aos açúcares (FREITAS, 2019). De forma a otimizar sua estabilidade, as antocianinas buscam se associar a outras estruturas (copigmentos) como outros flavonoides, proteínas, ácidos orgânicos e íons

metálicos como a prata através de reações de auto-associação, resultando em complexos. Essas reações ocorrem de forma espontânea, preferencialmente em condições ácidas, onde há maior concentração de compostos fenólicos (PORTINHO; ZIMMERMANN; BRUCK, 2012). Desse modo, as antocianinas possuem potencial de atuar não somente como agentes redutores de íons de prata em solução, por meio das reações de auto-associação, mas também como agentes de cobertura nas superfícies das nanoestruturas, permitindo a síntese de dispersões coloidais de nanopartículas de prata em meio aquoso.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. *Objetivo geral***

O objetivo geral do presente trabalho foi obter nanopartículas de prata através da síntese mediada por extratos aquosos de açaí em diferentes condições de síntese e verificar a atividade microbocida dos coloides metálicos formados.

#### **3.2. *Objetivos específicos***

Os objetivos específicos são os seguintes:

- a) Obter os extratos aquosos de açaí em diferentes concentrações;
- b) Caracterizar os extratos vegetais pela espectroscopia eletrônica UV-Vis;
- c) Monitorar o progresso de síntese das nanopartículas pela espectroscopia eletrônica UV-Vis;
- d) Estudar os parâmetros de reação (tempo de reação, relação entre quantidade de Ag<sup>+</sup> e extratos vegetais, temperatura e pH) pela espectroscopia eletrônica UV-Vis;
- e) Caracterizar as AgNPs pelas técnicas de espalhamento de luz dinâmico (DLS), potencial Zeta e microscopia eletrônica de transmissão;
- f) Verificar o potencial microbocida e citotóxico dos materiais preparados mediante ensaios microbiológicos e de citotoxicidade.

### **4. MATERIAIS**

Para execução do presente trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos (Tabela 1), produtos químicos (Tabela 2) e microrganismos (Tabela 3).

**Tabela 1** - Lista de equipamentos utilizados no presente estudo.

<b>Equipamentos</b>		
<b>Especificação</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
Agitador magnético	Cienlab	CE-1540/A-15
Agitador vórtex	Biomixer	VTX-F-110
Autoclave	Prismatec	CS - 30L
Balança analítica	Shimadzu	AUY220
Centrífuga	Centribio	80-2B
Espectrofotômetro UV-Vis	BEL	UVM-51
Espectrofotômetro visível	Biospectro	SP-22
Estufa bacteriológica	Ethik	410-TD
Microscópio	Jeol	JEM-1400
pHmetro	Hanna	HI8424

Fonte: a autora.

**Tabela 2** - Lista de reagentes utilizados na produção das AgNPs.

<b>Reagentes</b>		
<b>Nome</b>	<b>Fórmula química</b>	<b>Procedência</b>
<b>Açaí</b>	-	Itacoatiara/AM
<b>Ácido nítrico 65% (P.A.)</b>	HNO <sub>3</sub>	Vetec
<b>Hidróxido de sódio (P.A.)</b>	NaOH	Biotec
<b>Nitrato de prata (P.A.)</b>	AgNO <sub>3</sub>	Laderquímica

Fonte: a autora.

**Tabela 3** - Lista de reagentes microrganismos utilizados no presente estudo.

<b>Microrganismo</b>	<b>Código ATCC</b>
<i>Escherichia coli</i>	25922
<i>Candida albicans</i>	90028
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
<i>Streptococcus mutans</i>	35688

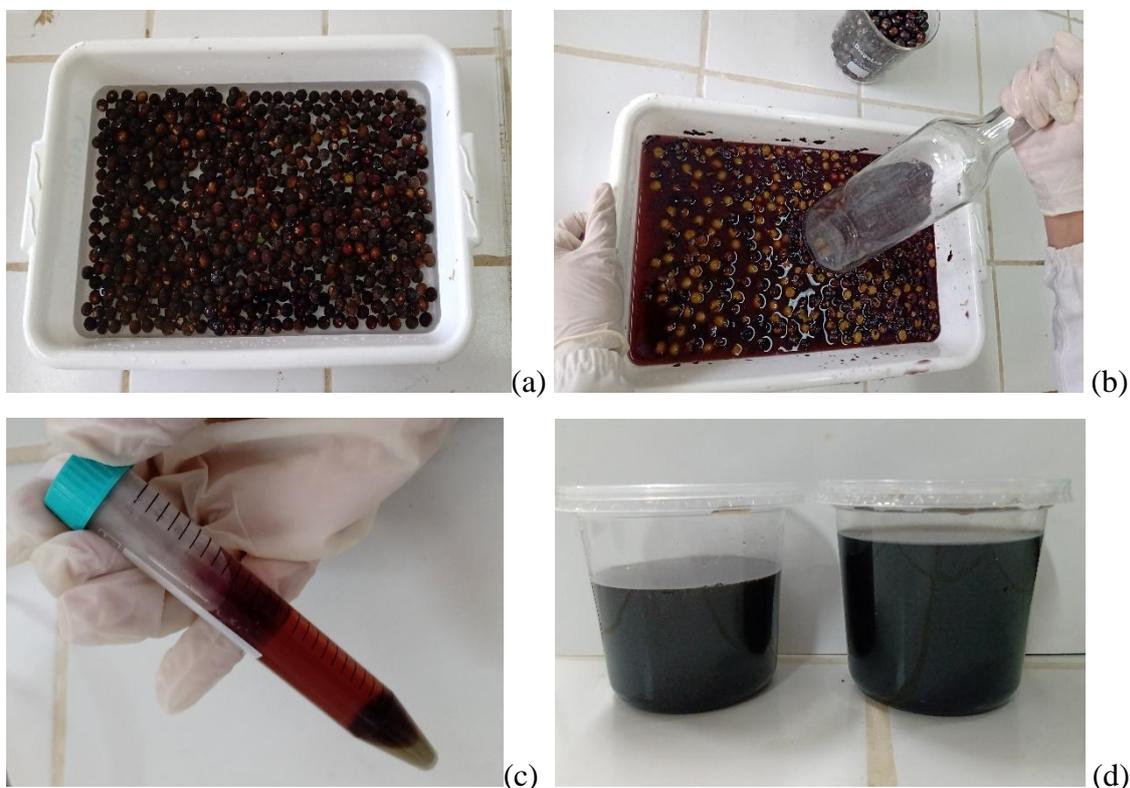
Fonte: a autora.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. Obtenção dos extratos aquosos de açaí

Os extratos de açaí foram obtidos através do despulpamento manual das frutas adquiridas de comércio local no município de Itacoatiara-AM. O primeiro passo foi a realização do procedimento de higienização dos frutos, de acordo com as recomendações da EMBRAPA (2020), consistindo na lavagem em água corrente e imersão do açaí em hipoclorito de sódio (2,0% m/m) durante 15 minutos. Os frutos então foram lavados novamente para remoção de hipoclorito para iniciar o processo de maceração do açaí em água destilada em temperatura moderada por 30 minutos, nas proporções 1:1 (1 kg do fruto + 1 litro de água destilada) obtendo o extrato bruto. Posteriormente foi realizada a centrifugação do extrato bruto para remoção de sólidos presentes, sendo posteriormente armazenados em recipientes e acondicionado no freezer. As etapas desse processo estão representadas na Figura 3. Para a utilização do extrato na síntese de nanopartícula, o extrato de açaí bruto foi diluído na proporção de 10 mL de extrato bruto : 40 mL de água destilada, obtendo-se o extrato purificado.

**Figura 3** - a) higienização do fruto açaí. b) maceração do açaí. c) centrifugação do extrato de açaí. d) armazenamento do extrato de açaí.



Fonte: a autora.

### 5.2. Síntese das nanopartículas de prata (AgNPs)

Em três béqueres revestidos com papel alumínio foram adicionados a cada um 50 mL de solução de  $\text{AgNO}_3$   $0,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e posteriormente 5 mL de extrato de açaí, a partir do extrato purificado, nas diluições **1:1** (2,5 mL de extrato purificado + 2,5 mL de água destilada – condição 1 de extrato de açaí), **1:2** (1,4 mL de extrato purificado + 3,6 mL de água destilada – condição 2 de extrato de açaí) e **1:4** (1,0 mL de extrato purificado + 4,0 mL de água destilada – condição 3 de extrato de açaí), de modo a totalizar sempre um volume de mistura de 55 mL.

A etapa seguinte consistiu na síntese de AgNPs nas diferentes condições de diluição do extrato de açaí variando o pH do meio reacional em 6,0, 7,0 e 8,0. Para ajustar o meio reacional aos valores de pH 6,0 foi utilizado uma solução de  $\text{HNO}_3$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  e para os valores de pH 7,0 e 8,0 utilizou-se uma solução de  $\text{NaOH}$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ .

Posteriormente, foi realizado o monitoramento de síntese de nanopartículas de prata para a condição 2 de extrato vegetal em pH 7,0 que apresentou maiores valores de absorvância após 24 horas de síntese e menor quantidade de partículas sólidas no meio reacional, para as temperaturas de  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . Para realização dos testes em temperatura elevada, foi acondicionado em um agitador magnético um béquer de 500 mL com uma quantidade de areia necessária para encobrir um béquer de 100 mL, calibrando o equipamento para a temperatura desejada. Em seguida, com o auxílio de um suporte universal, foi acoplado ao sistema um termômetro para monitorar a temperatura do meio reacional e o progresso da síntese das AgNPs.

### 5.3. Monitoramento da síntese das AgNPs

A evolução na produção das nanopartículas de prata foi acompanhada pela espectroscopia eletrônica no UV-Vis, através do monitoramento da banda associada à ressonância de *plasmon* de superfície, localizada entre 380-450 nm (MOHAGHEGH *et al.*, 2020). Após o início do contato entre as soluções, foram retiradas alíquotas a cada hora nas primeiras 4 horas de síntese e depois nos tempos de 8, 24, 36 e 48 horas e diariamente no período entre 3-21 dias.

### 5.4. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A análise das imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foram registradas em um microscópio JEOL modelo JEM 1400 operando a 120 kV. As amostras

foram previamente diluídas em água deionizada e colocadas em grades de Cu cobertas com carbono e deixadas à temperatura ambiente por 1 hora.

### 5.5. *Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e análise de potencial Zeta*

O diâmetro hidrodinâmico e a análise do potencial Zeta das dispersões de AgNPs foram realizados pelo equipamento Malvern Zetasizer NanoZS usando um laser de hélio-neônio (4 mW) a 633 nm com ângulo de feixe de 173 °. As medições foram registradas em triplicata no modo automático a 25 °C. O potencial Zeta foi medido manualmente em triplicata com uma célula de eletroforese capilar DTS-1070.

### 5.6. *Ensaio microbiológicos*

As cepas foram obtidas na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e foram mantidas em caldo TSB a -80 °C. A reativação das cepas foi realizada de acordo com as condições de crescimento descritas na Tabela 4. Um inóculo de cada microrganismo estudado foi preparado, ajustando-se a leitura da densidade óptica em 630 nm para 0,08 - 0,10 ( $\sim 1 \times 10^8$  células/mL).

**Tabela 4** - Cepas microbianas e condições de crescimento.

<b>Cepa</b>	<b>Meio de cultura (sólido/líquido)</b>	<b>Condições de incubação</b>
<i>C. albicans</i>	Ágar e caldo Sabouraud Dextrose	Aerobiose a 37 °C
<i>E. coli</i>	Ágar e caldo TSB	Aerobiose a 37 °C
<i>S. mutans</i>	Ágar e caldo BHI	Anaerobiose a 37 °C
<i>S. aureus</i>	Ágar e caldo TSB	Aerobiose a 37 °C

TSB: triptona de soja. BHI: infuso de cérebro e coração.

Fonte: a autora.

A determinação da atividade antibacteriana pela técnica do poço, a qual consiste na utilização de placas com camada dupla (camada base e camada *seed* de meios adequados ao microrganismo testado). Após o meio de cultura ágar ser esterilizado e resfriado a cerca de 50 °C, foram distribuídos 25 mL em placas de Petri de 25 x 150 mm esterilizadas (Pleion). A camada *seed* foi obtida colocando-se em um tubo 12,5 mL de meio de cultura adequado para cada micro-organismos (Tabela 4) esterilizado e resfriado a 50 °C, ao qual foi incorporado 2,5 mL de meio de líquido adequado para micro-organismo, com o inóculo já preparado. Imediatamente a camada *seed* foi vertida sobre a

camada base. Após a solidificação da camada *seed*, os poços foram confeccionados com o auxílio de canudos de plástico esterilizados de 4,0 mm de diâmetro. A seguir, os poços foram completamente preenchidos com 50 µL dos extratos a serem testados, além do controle positivo (digluconato de clorexidina a 0,12%) e o controle negativo. Em seguida foi colocado papel de filtro (Whatman) esterilizado na tampa de cada placa para reter a água de condensação. Após um período de pré-incubação de 2 horas à temperatura ambiente, que permite a difusão dos extratos antes do início do desenvolvimento dos microrganismos, como preconizado por Möller, as placas foram incubadas em aerobiose a 36 °C por 18 horas. Depois do tempo de incubação, o halo de inibição (mm) foi medido. A bioatividade foi considerada positiva quando os halos de inibição foram superiores a 11 mm (Brighenti *et al.*, 2014).

### **5.7. Cultura celular, preparação de amostras e avaliação de viabilidade celular**

Os fibroblastos murinos L929 obtidos da American Type Culture Collection (ATCC) foram cultivados em frasco de cultura contendo meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich) com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos contendo 10.000 UI de penicilina, 10 mg mL<sup>-1</sup> de estreptomicina e 25 µg mL<sup>-1</sup> de anfotericina B e mantidos a 37 °C em atmosfera umidificada de 5% de CO<sub>2</sub>. Após atingir a semiconfluência, as células foram tripsinizadas com Tripsina-EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich) e contadas em uma câmara de Neubauer. Em seguida, os fibroblastos L929 foram semeados em uma placa de 96 poços (KASVI) a uma densidade de 1x10<sup>4</sup> células/poço em DMEM + 10% FBS por 24 horas a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as células foram expostas às amostras A (AgNPs obtidas empregando condição 2 de extrato de açaí, pH 7,0, 25 °C), B (AgNPs obtidas empregando condição 3 de extrato de açaí, pH 7,0, 25 °C), C (AgNPs obtidas empregando condição 2 de extrato de açaí, pH 7,0, 40 °C), D (AgNPs obtidas empregando condição 2 de extrato de açaí, pH 8,0, 25 °C), E (AgNPs obtidas empregando condição 2 de extrato de açaí, pH 8,0, 40 °C) e F (solução AgNO<sub>3</sub> 0,1 x 10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup>) substituindo 100 uL do meio em cada poço por 100 uL de extratos de amostras e depois incubadas por 24 horas. Os extratos foram preparados em duas condições diferentes: 1:1 (v/v) e 1:2 (v/v) usando amostra : meio DMEM. Em seguida, as amostras dos extratos foram removidas e os poços foram lavados duas vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4. Em seguida, 0,1 mL de solução 1 mg/mL de brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich) recém-preparada, foi adicionado a cada poço por 3 horas em a incubadora de CO<sub>2</sub>. O

produto formazan roxo foi completamente solubilizado usando 50  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Os valores de absorbância foram medidos a 570 nm e usando um leitor de microplacas (SoftMax Pro 5). Células mantidas em meio DMEM foram usadas como controle negativo e células tratadas com DMSO na concentração final de 40% (v/v) foram usadas como controle positivo. Todas as amostras foram ensaiadas em três réplicas. A viabilidade celular foi estimada de acordo com Riss *et al.* (2004).

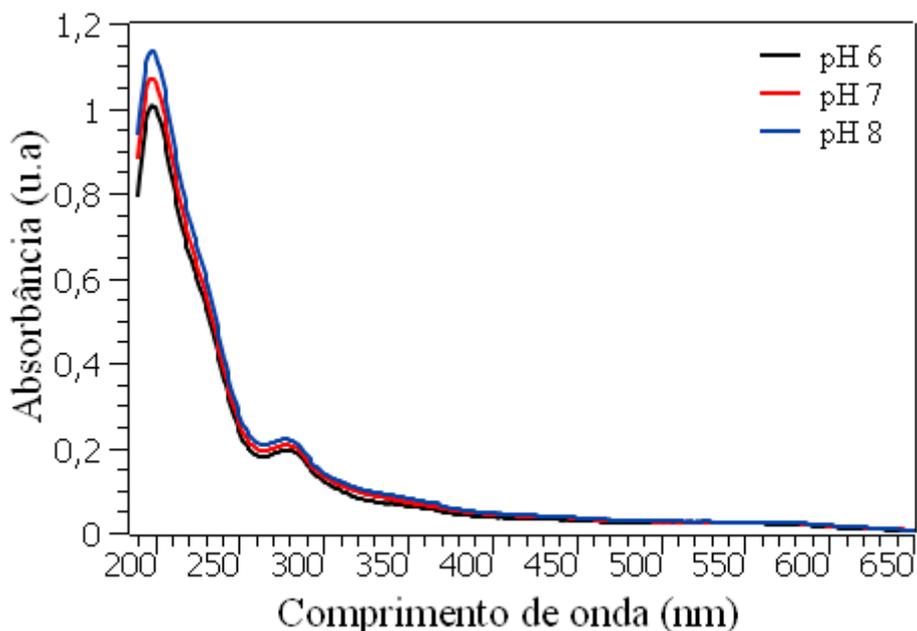
## 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1. Caracterização do extrato de açaí pela espectroscopia eletrônica UV-Vis

O primeiro passo para a realização da síntese das AgNPs foi a análise do extrato de açaí concentrado através da espectroscopia eletrônica UV-Vis para averiguação da posição e da quantidade de sinais presentes em seu espectro, exibido na Figura 4. Nessa varredura foram localizadas duas bandas intensas na faixa de 200 a 300 nm. A primeira banda detectada apresentou um valor máximo de absorção próximo de 200 nm, referente a transições eletrônicas entre orbitais moleculares  $\pi \rightarrow \pi^*$  associados a sistemas ressonantes, como anéis aromáticos. A segunda banda, com máximo próximo de 280 nm, corresponde a transições eletrônicas entre os orbitais moleculares  $n \rightarrow \pi^*$  no qual pares de elétrons não ligantes ( $n$ ) do heteroátomo (principalmente oxigênio) são promovidos para orbitais pi-antiligantes ( $\pi^*$ ) (EL-GAMEL; ZAYED, 2011; PAVIA *et al.*, 2010).

No açaí há diferentes biomoléculas da classe das antocianinas, como a cianidina 3-O-glicosídeo e cianidina 3-O-rutinosídeo e em suas estruturas são observados grupos ressonantes (anéis aromáticos) (ALIAÑO-GONZALEZ, *et al.*, 2020) que podem estar relacionados ao sinal próximo à 200 nm. A banda próxima à 280 nm (com menor intensidade) provavelmente é atribuída a outros compostos como os ácidos graxos (DE OLIVEIRA; SCHWARTZ, 2018) que contém grupos carbonila (C=O) e que também são encontrados no extrato de açaí, visto que não há apenas flavonoides em sua composição. Cabe ressaltar que a técnica isoladamente não é capaz de identificar a composição individual dos metabólitos secundários em uma amostra de composição complexa como o açaí e sim apontar os grupos químicos responsáveis por transições eletrônicas que podem estar associados a uma grande quantidade de biomoléculas distintas simultaneamente.

**Figura 4** - Espectros eletrônico UV-Vis do extrato de açaí em pH 6,0 (linha preta), pH 7,0 (linha vermelha), pH 8,0 (linha azul).

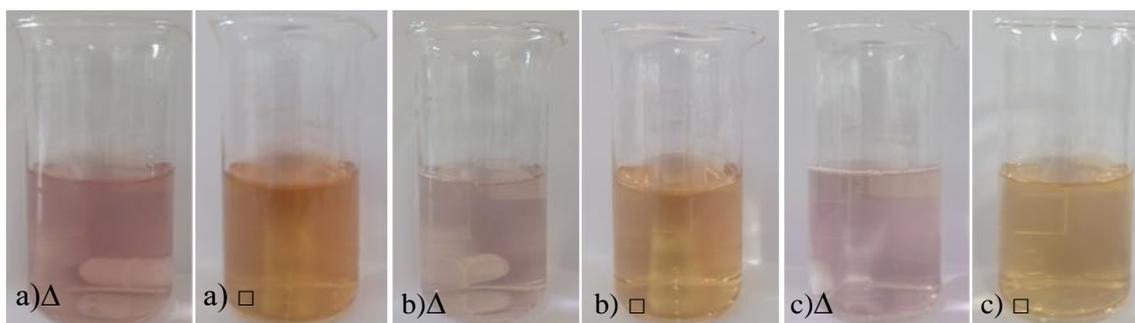


Fonte: a autora.

## 6.2. Síntese de AgNPs em diferentes concentrações de extrato de açaí

O teste inicial para produção das AgNPs foi realizado em pH 6,0. A primeira mudança identificada nos meios reacionais nas condições de diluição do extrato vegetal foi a mudança de coloração com o progresso da reação, com o decorrer do tempo tornaram-se castanho claro, como apresentado na Figura 5. Adicionalmente, a intensidade da cor do meio reacional aumentou gradativamente com tempo à medida que ocorria o processo de redução de íons  $\text{Ag}^+$  e sua posterior conversão em AgNPs. A mudança de coloração é associada a formação de um sistema nanoparticulado, uma vez que as dispersões de nanopartículas de prata exibem como característica cores do amarelo ao castanho claro referente à ressonância de *plasmon* de superfície (RPS) da prata nanoparticulada (ROLIM *et al.*, 2019).

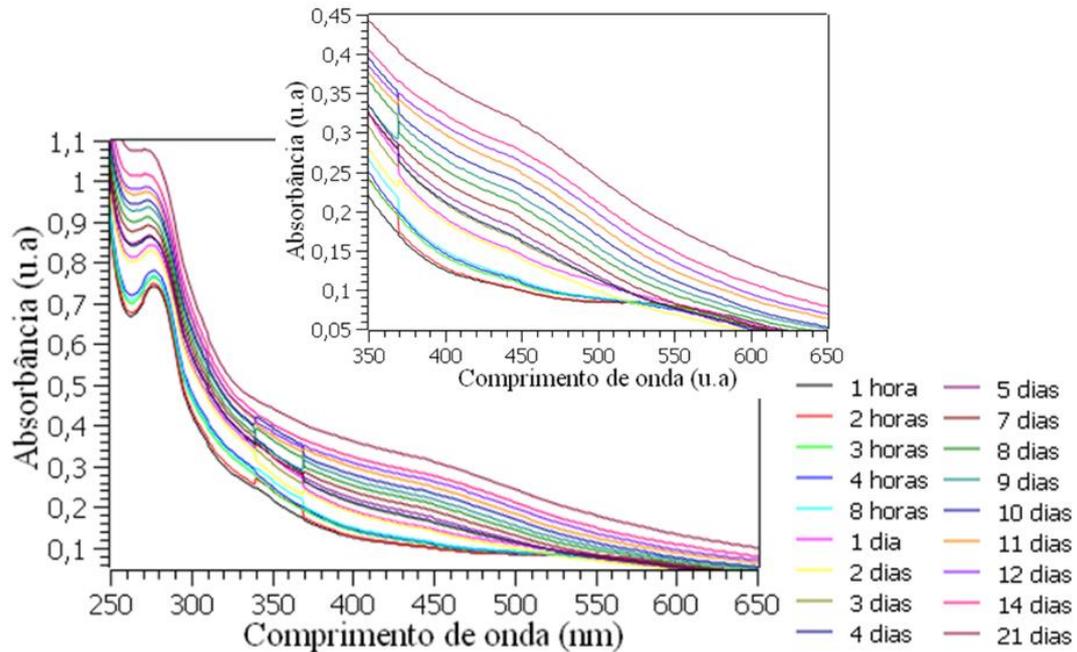
**Figura 5** - Imagens do meio de reação de produção das AgNPs em pH 6,0 nas diferentes condições de extrato de açaí após 1 hora ( $\Delta$ ) e 1 dia ( $\square$ ) de reação: a) condição 1; b) condição 2; c) condição 3.



Fonte: a autora.

Na Figura 6 é apresentado o progresso da síntese de AgNPs empregando o extrato de açaí da condição 1. Nota-se que com o decorrer dos dias de monitoramento não há definição na banda de condução de ressonância *plasmon* de superfície próximo da faixa entre 380-450 nm (KOBYLINSKA *et al.*, 2020), característico das nanopartículas de prata, no entanto, houve alteração na coloração do sistema e aumento nos valores de absorbância, indicando a formação de NPs. Nota-se um aumento no máximo de absorção na banda próximo da faixa de 280 nm, possivelmente devido a oxidação dos compostos fenólicos presentes no extrato de açaí para a formação de grupos carbonilas (C=O) em suas estruturas que exibem as transições eletrônicas entre orbitais moleculares  $n \rightarrow \pi^*$  (PAVIA *et al.*, 2010) nessa região de comprimento de onda. O aumento de intensidade da banda em 280 nm pode ocorrer de forma proporcional à oxidação dos flavonoides (formando carbonilas), ou seja, quanto mais carbonilas forem formadas, maior será a intensidade da banda.

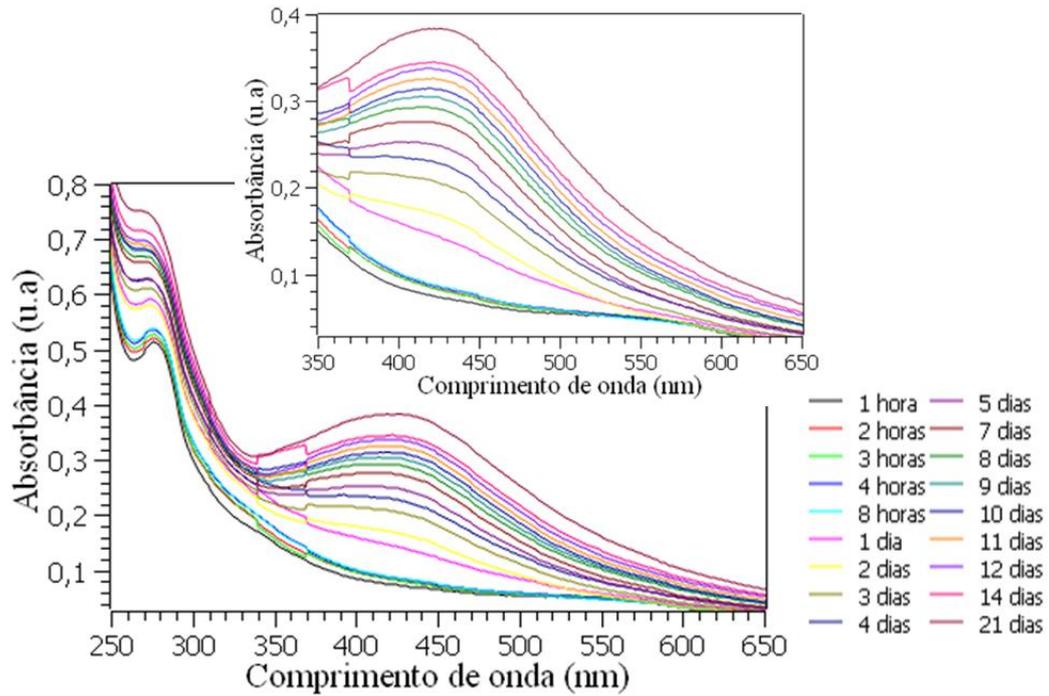
**Figura 6** - Espectros eletrônicos UV-Vis dos meios de reação em pH 6,0 para a formação das AgNPs em diferentes tempos de reação, na condição 1 de extrato de açaí.



Fonte: a autora.

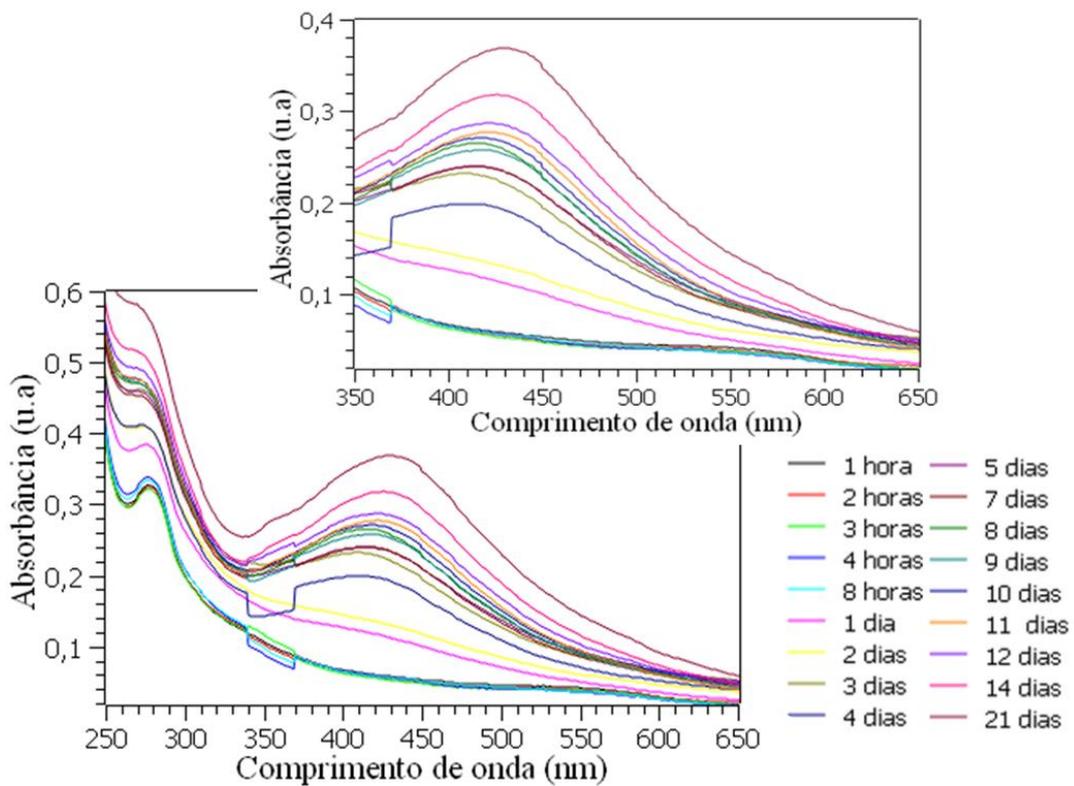
Os espectros UV-Vis dos meios de reação para as condições 2 e 3 de extrato de açaí são exibidos nas Figuras 7 e 8. Observa-se o surgimento da banda RPS de AgNPs na faixa de 380-450 nm após 1 dia de reação, com a absorvância máxima registrada em torno de 430 nm. O sinal RPS também é mais estreito para a condição 3, indicando a formação de AgNPs mais uniformes (MOSAVINIYA *et al.*, 2019). Com o surgimento da banda RPS houve também o aumento no máximo de absorção do sinal próximo da faixa de 280 nm, associado a oxidação dos compostos fenólicos encontrados no extrato de açaí formando grupos carbonilas que exibem transições eletrônicas entre orbitais moleculares  $n \rightarrow \pi^*$  nessa faixa de comprimento de onda.

**Figura 7** - Espectros eletrônicos UV-Vis dos meios de reação em pH 6,0 para a formação das AgNPs em diferentes tempos de reação, na condição 2 de extrato de açaí.



Fonte: a autora.

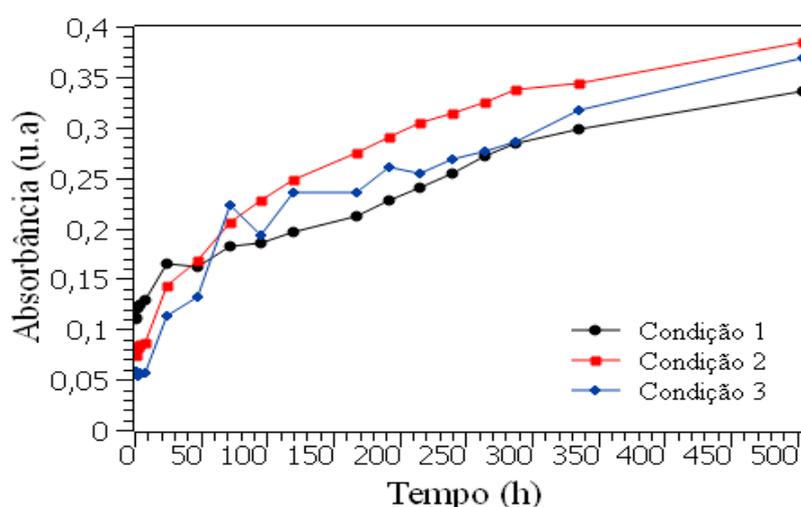
**Figura 8** - Espectros eletrônicos UV-Vis dos meios de reação em pH 6,0 para a formação das AgNPs em diferentes tempos de reação, na condição 3 de extrato de açaí.



Fonte: a autora.

Na Figura 9 é disposto o gráfico com os dados de absorvância em função do tempo para diferentes concentrações de extrato de açaí investigadas. Estudos como o de Saratale *et al.* (2018) associaram o aumento de absorvância em relação ao tempo a maiores concentrações de nanopartículas em sistemas coloidais. Desse modo, nota-se que as três condições investigadas apresentaram aumentos nos seus valores de absorvância com o tempo, mesmo em tempos reacionais longos, indicando que a taxa de formação de AgNPs nessas condições experimentais é baixa.

**Figura 9** - Absorvância máxima da banda RPS dos meios de reação em pH 6,0 e em diferentes condições de extrato de açaí em função do tempo.

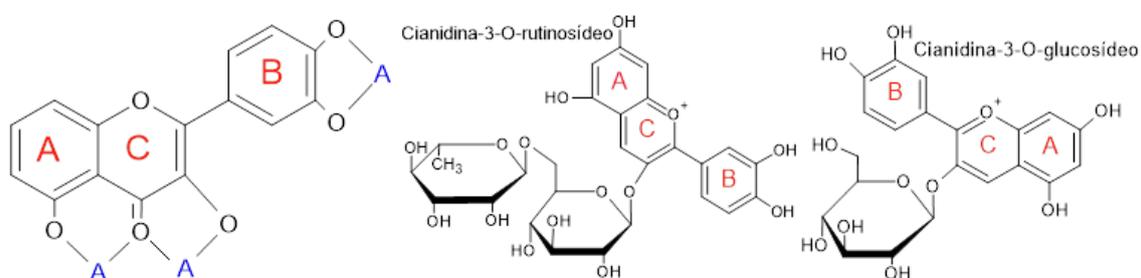


Fonte: a autora.

Para a condição com elevada concentração de biomoléculas (condição 1) foi observado nas primeiras 24 horas de monitoramento valores de absorvância superiores as condições mais diluídas (condições 2 e 3), associados a presença de maiores parcelas de extrato de açaí, de modo a favorecer uma maior taxa de formação de nanoestruturas. Em 48 horas de reação, a formação de AgNPs em função do tempo diminui, assim foram observados menores valores de absorvância em relação às condições mais diluídas, ou seja, houve a produção de menores parcelas de AgNPs. Estes resultados diferem de estudos publicados, como por exemplo o trabalho de Kalaki, Safaeijavan e Faraji (2018) que ao investigar a síntese de AgNPs mediada por extratos de hortelã-silvestre (*Mentha longifolia* L.) obtiveram um maior rendimento de nanopartículas com diferentes tamanhos ao utilizar maiores concentrações de extrato vegetal em diferentes tempos reacionais.

Uma possível explicação para esse fenômeno está na característica composicional do extrato de açaí. Nele, os principais metabólitos secundários encontrados são flavonoides, principalmente as antocianinas (cianidina-3-O-glucosídeo e a cianidina-3-O-rutinosídeo em maiores concentrações), que exibem grupos hidroxilas nos anéis B de suas respectivas estruturas (Figura 10), capazes de complexar íons metálicos, como a prata (DE SOUZA; DE GIOVANI, 2004). Dessa forma, vislumbra-se a existência de uma competição entre o efeito quelante e a redução dos íons prata quando a concentração de metabólitos secundários do extrato de açaí é alta, prejudicando o processo de formação do sistema nanoparticulado.

**Figura 10** - Estrutura química representativa dos flavonoides e os seus sítios quelantes (A = íon metálico) ao lado das estruturas químicas do extrato de açaí.



Fonte: Adaptado de UIVAROSI; MUNTEANU, 2017; CEDRIM; BARROS; NASCIMENTO, 2018.

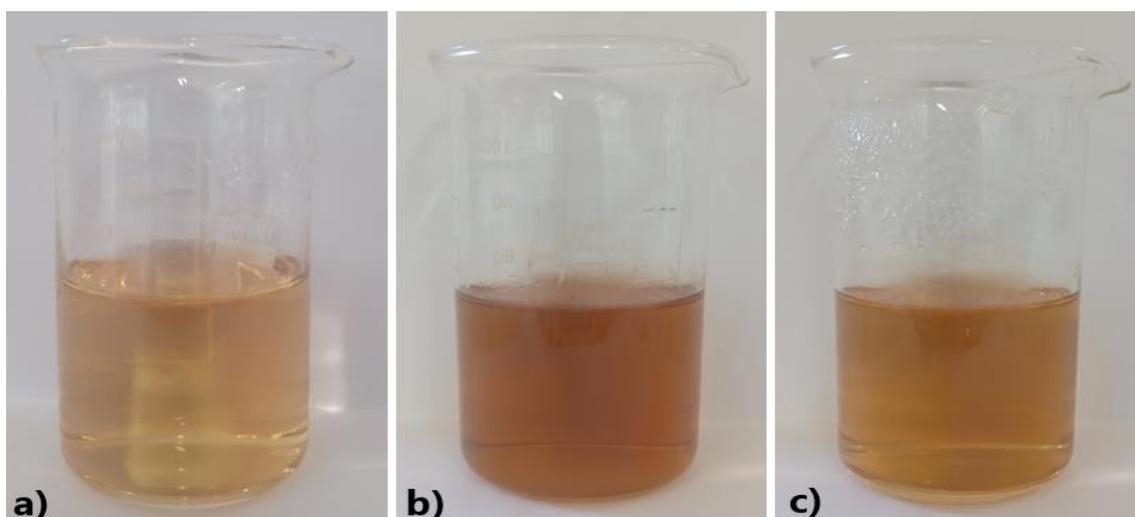
Ao verificar os valores de absorvância para as condições mais diluídas (condição 2 e 3 de extrato de açaí), nota-se que a produção de AgNPs é inferior apenas no início da síntese, com o progresso da reação a taxa de formação das nanoestruturas é similar, sem variações significativas. De forma geral, os resultados demonstram que condições mais diluídas de extrato de açaí proporcionam maior formação de AgNPs para tempos reacionais acima de 4 dias. Nessa perspectiva, as condições 2 e 3 apresentam-se adequadas para investigar os parâmetros de reação pH e temperatura.

### 6.3. Síntese de AgNPs em valores diferentes de pH

O pH é um parâmetro físico-químico importante na produção de nanoestruturas, uma vez que a acidez ou basicidade do meio reacional pode afetar o tamanho e forma das partículas produzidas (ANIGOL; CHARANTIMATH; GURUBASAVARAJ, 2017). A Figura 11 exibe as imagens da condição 2 de extrato de açaí nos diferentes valores de pH para o mesmo tempo de síntese (1 dia). É possível notar a diferença de coloração de

acordo com os valores de pH adotados em cada uma das reações. Para os valores de pH 7,0 (Figura 10B) e 8,0 (Figura 10C) observa-se uma cor mais intensa e próximo do castanho claro, indicando a formação de AgNPs (MOHAGHEGH *et al.*, 2020). Por outro lado, para o pH de reação 6,0 (Figura 11A) a alteração da coloração do meio reacional é notada de forma menos intensa, podendo ser o indicativo da presença de menores quantidades de nanopartículas formadas.

**Figura 11** - Imagens do meio de reação em diferentes valores de pH após 1 dia empregando a condição 2 de extrato de açaí: a) pH = 6,0 b) pH = 7,0 e c) pH = 8,0.



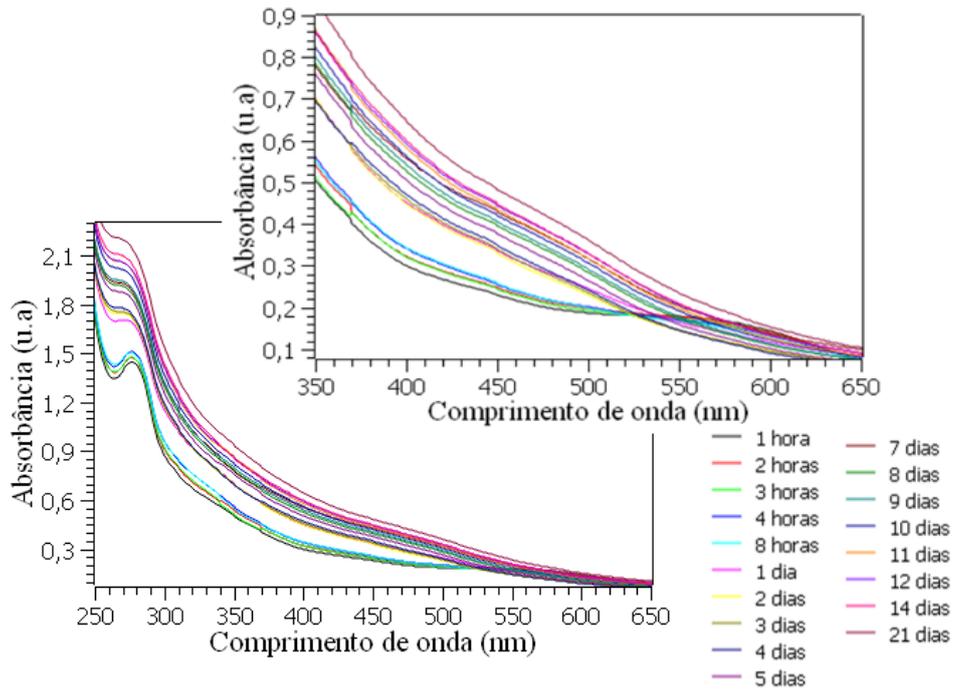
Fonte: a autora.

Nas Figuras 12 e 13 são apresentados os espectros UV-Vis dos meios de reação para a produção de AgNPs em pHs 7,0 e 8,0. Nota-se para as condições com pH 7,0 pôde-se identificar a banda RPS com baixa definição na região de comprimento de onda entre 380-450 nm referente à formação de AgNPs após 1 dia de monitoramento. No meio reacional com pH 8,0 foi possível identificar claramente a formação da banda RPS após o 1 dia de síntese das AgNPs, assim como nos meios reacionais de pHs 6,0. Contudo, dentre as condições estudadas nos diferentes meios reacionais, a partir das leituras dos valores máximos de absorbância (Figura 14), observou-se uma maior quantidade de nanopartículas formadas utilizando pH 7,0. Os resultados obtidos convergem com a literatura, no qual é relatado uma produção otimizada de nanoestruturas em meios reacionais neutros e alcalinos. Dentre eles, ressalta-se o estudo de Guimarães *et al.* (2020) sobre a obtenção de AgNPs mediadas por extrato de folha do juazeiro (*Ziziphus joazeiro*) que encontrou melhores rendimentos para a formação de nanoestruturas empregando pH

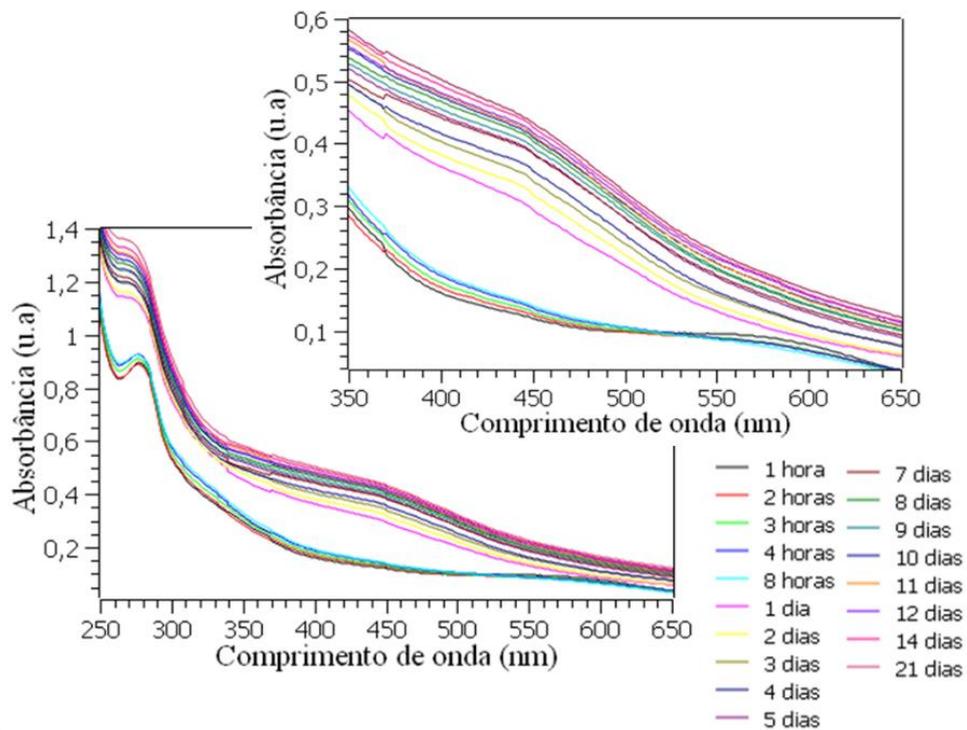
em 7 e 11 em detrimento de meios ácidos. Também de acordo com o estudo de Handayani, Ningrum e Imawan (2020), AgNPs com tamanhos menores, monodispersas e uniformes quanto à forma foram obtidas em condições alcalinas.

É importante salientar que embora as condições em meio neutro sintetizaram quantias elevadas de AgNPs, houve baixa resolução da banda RPS e ao analisar os espectros UV-Vis pode-se identificar dois sinais alargados e possivelmente associados à banda RPS, uma banda com menor intensidade na faixa de 450 nm e outra mais intensa próximo de 380 nm, em especial para condição 3 de extrato de açaí. Desse modo, a indefinição da banda RPS nos parâmetros investigado pode apresentar duas origens: o efeito do espalhamento de luz acarretado pela agregação e/ou precipitação de biomoléculas do extrato de açaí e/ou a existência de sistemas particulados com diferentes tamanhos, visto que NPs com formas distintas tem potencial de formar dois ou mais sinais de RPS no espectro UV-Vis (ROLIM *et al.*, 2019). Os sinais de RPS em menores comprimentos de onda estão associados a nanoestruturas de pequenos tamanhos (RAJKUMAR *et al.*, 2020), sendo um indicativo de que embora o pH 7,0 favoreça a presença de espécies com maior eficácia de redução dos íons  $\text{Ag}^+$ , as biomoléculas em meio neutro expõem menor capacidade de controlar o tamanho das AgNPs sintetizadas.

**Figura 12** - Espectros UV-Vis dos meios reacionais em pH 7,0 para: A) condição 2 de extrato e B) condição 3 de extrato.



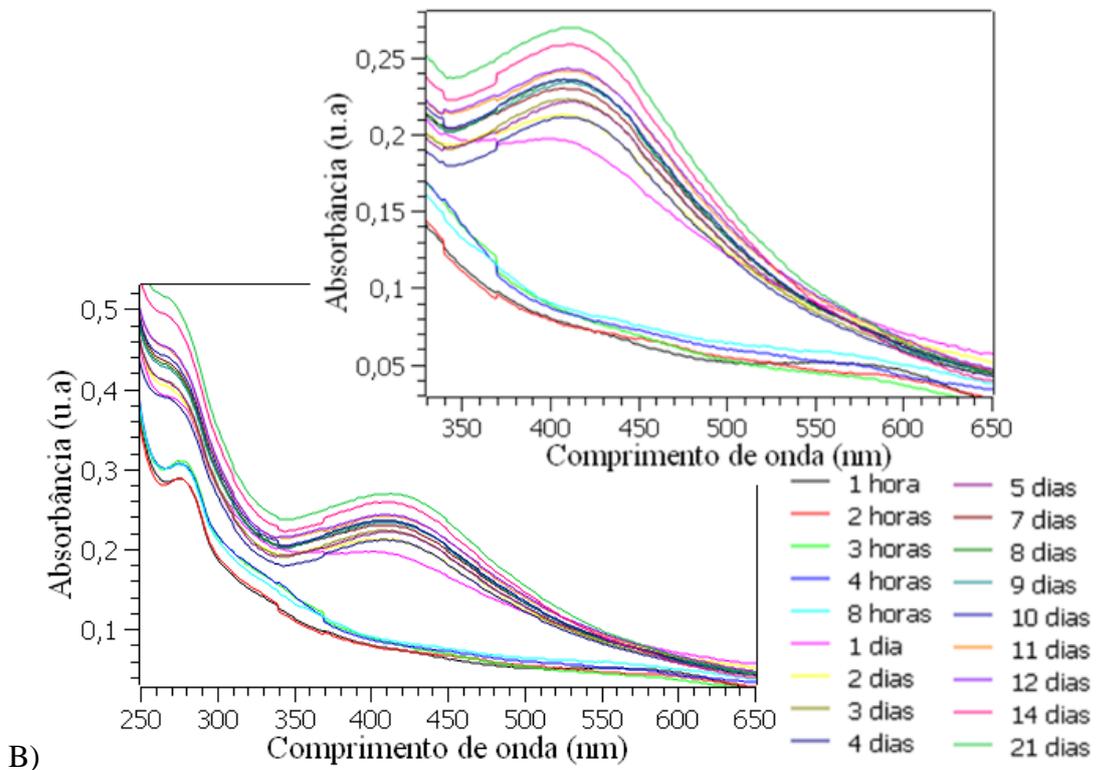
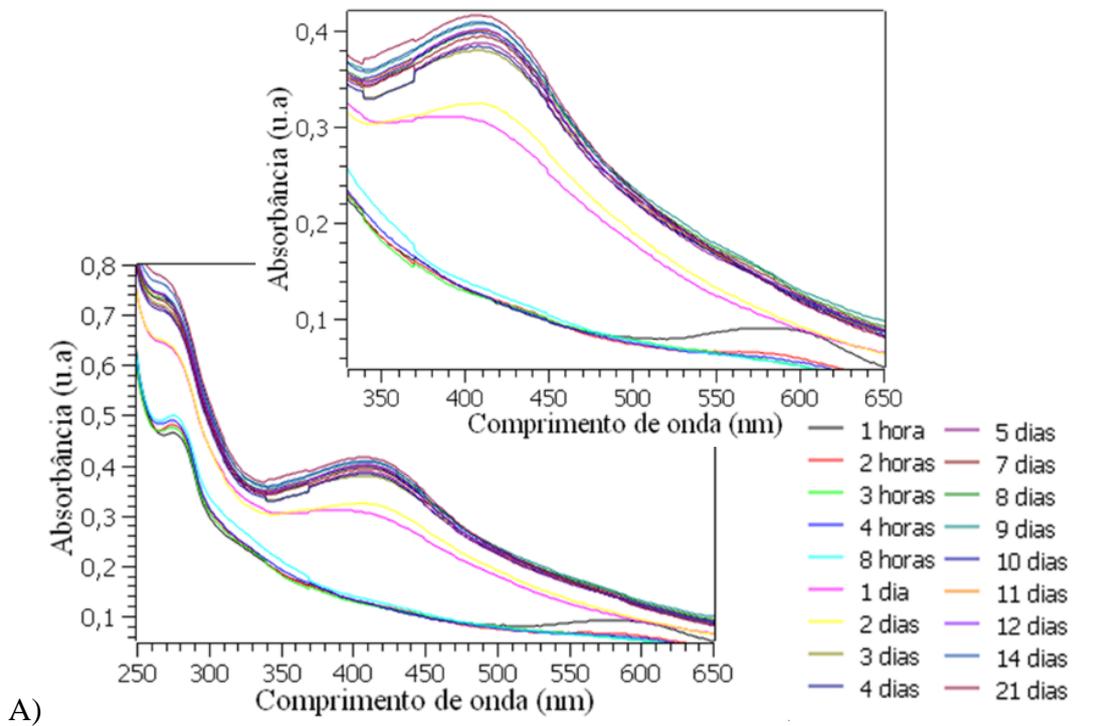
A)



B)

Fonte: a autora.

**Figura 13** - Espectros UV-Vis dos meios reacionais em pH 8,0 para: A) condição 2 de extrato e B) condição 3 de extrato.

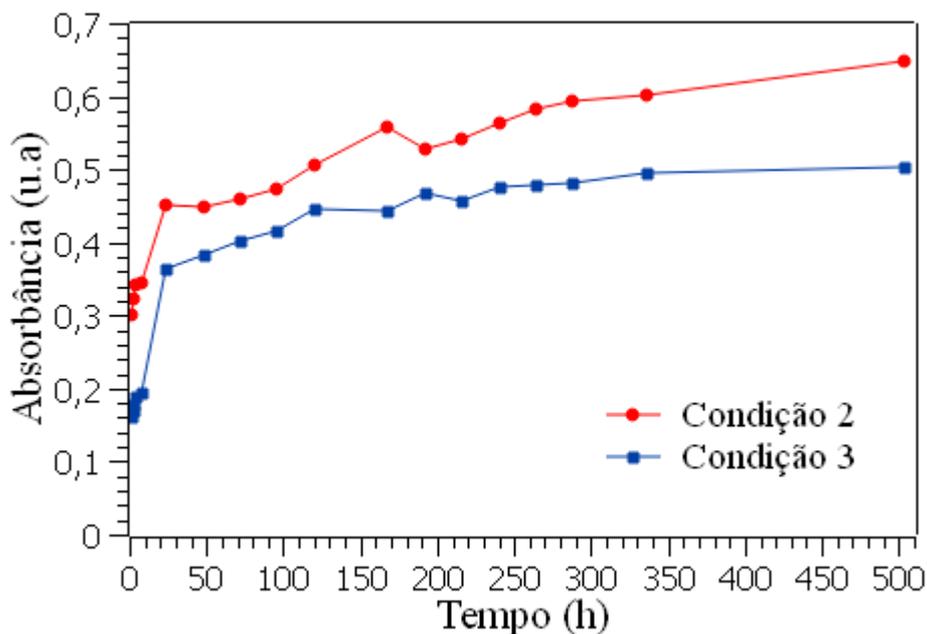


Fonte: a autora.

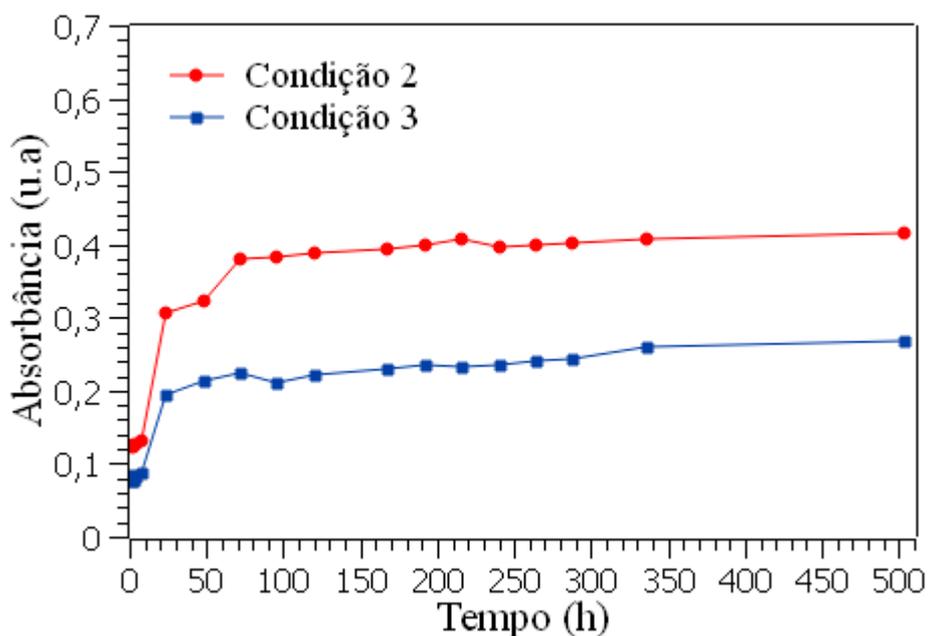
A seguir são apresentados os dados de absorvância máxima em função ao tempo (Figura 14) para os meios neutros (pH 7,0) e alcalinos (pH 8,0). Constata-se que para os diferentes valores de pH há uma maior taxa de formação de AgNPs nas primeiras 24 horas de síntese. Posteriormente, com o decorrer do tempo a reação torna-se mais lenta, no qual os valores de absorvância máxima da banda RPS exibem um aumento pouco significativo. Após o primeiro dia de síntese, ao analisar os dados obtidos para as condições em meio neutro, verifica-se uma maior produção de AgNPs frente aos meios reacionais ácidos ou básicos em virtude dos valores de absorvância da banda RPS coletados no intervalo de tempo (1-21 dias).

Dessa forma, identifica-se uma maior variação do máximo de absorvância para o pH 7,0 do que para o pH 8,0, podendo indicar uma maior reatividade das biomoléculas presentes no açaí para os meios reacionais neutros que para meios alcalinos. Em meio básico nota-se uma competição entre o aumento da velocidade de reação (quebra da ligação O-H) e a redução de reatividade das biomoléculas, acarretando nos valores de absorvância mais baixos. Em contrapartida, o inverso ocorre para os meios neutros, sendo que as biomoléculas do açaí exibem maior reatividade, porém a quebra da ligação O-H dessas estruturas é menos favorecida. O efeito da reatividade do extrato nos distintos meios reacionais não pode ser atribuído apenas às antocianinas e suas distintas estruturas, visto que o açaí possui uma complexa composição química e outras biomoléculas que também podem contribuir para produzir as nanopartículas em meio aquoso.

**Figura 14** - Absorbância máxima da banda RPS das diferentes condições de extrato de açaí em função do tempo. A) pH 7,0; B) pH 8,0.



A)



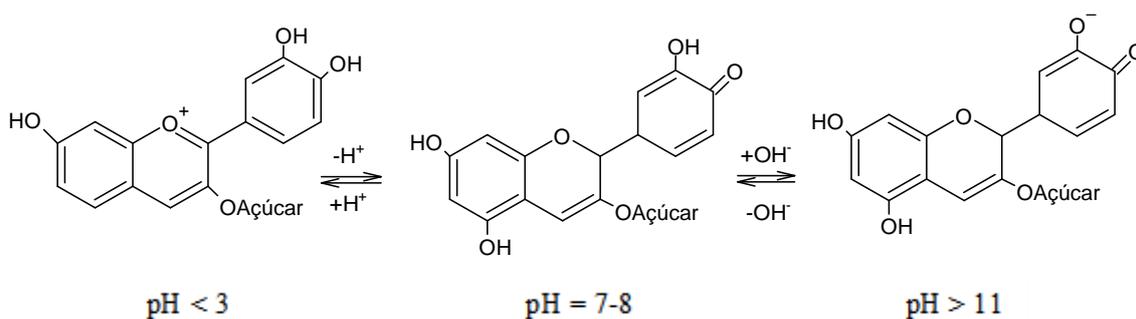
B)

Fonte: a autora.

Os resultados obtidos pela técnica de espectroscopia eletrônica UV-Vis para os meios de reação neutro e alcalino indicam que o pH influencia diretamente na reatividade das biomoléculas encontradas no extrato de açaí. Isto ocorre porque as antocianinas, principais espécies presentes nesse extrato vegetal e que possuem alta capacidade antioxidante, apresentam diferentes estabilidades químicas em meios básicos (JIANG *et*

*al.*, 2019; KHOO *et al.*, 2017). As antocianinas exibem estruturas químicas complexas, como as encontradas no açaí (Figura 2) e o grau de complexidade é superior em meios aquosos por estarem em diferentes equilíbrios químicos dependendo do pH do meio reacional (FREITAS, 2019). De modo geral, os equilíbrios encontrados para as antocianinas em função do pH são descritos na Figura 15, onde em meios ácidos ocorre a predominância da forma do cátion flavílio, em meios neutros são encontradas as formas de hemiacetal e em meios alcalinos surgem as bases quinoidais (FREITAS, 2019; WAHYUNINGSIH *et al.*, 2017) que possuem menor capacidade antioxidante que o cátion flavílio (FREITAS, 2019). Desse modo, as diferentes estruturas encontradas nos meios reacionais em função do pH acarretam na formação de nanopartículas com tamanhos distintos.

**Figura 15** - Representação das estruturas das antocianinas encontradas em função de diferentes pHs.

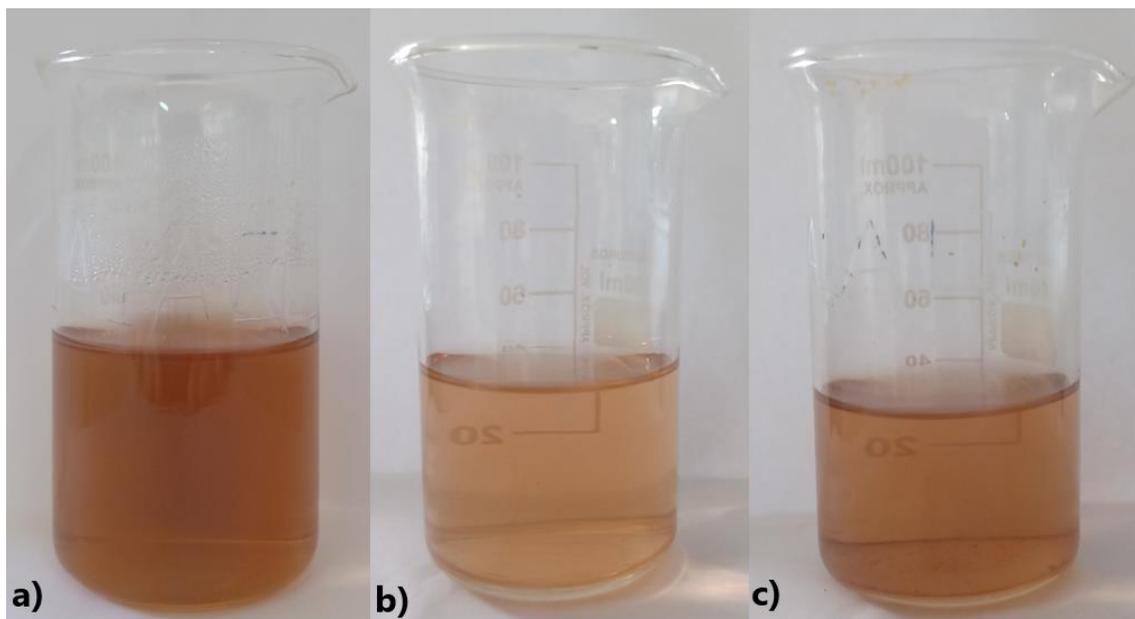


Fonte: Adaptado de WAHYUNINGSIH *et al.*, 2017.

#### 6.4. Síntese de AgNPs em valores diferentes de temperatura

A temperatura empregada para produzir nanoestruturas mediada por extratos vegetais é um parâmetro físico-químico importante a ser investigado, principalmente por ter capacidade de alterar a cinética de reação, influenciando a taxa de formação e tamanho das AgNPs (DADA *et al.*, 2019). Na Figura 16 é disposto imagens do meio reacional após 1 dia de síntese para a condição 2 de extrato de açaí em pH 7,0 nas temperaturas de 25 °C, 40 °C e 50 °C. Nota-se que para ambas as temperaturas houve a alteração de coloração do meio reacional para um tom de castanho claro, característica associada a síntese de nanopartículas de prata (MOHAGHEGH *et al.*, 2020). A mudança de coloração é observada em intensidades diferentes, no qual as condições em temperatura elevada (40 °C e 50 °C) exibem uma menor intensidade, ou seja, um possível indicativo de menores quantidades de AgNPs no meio reacional.

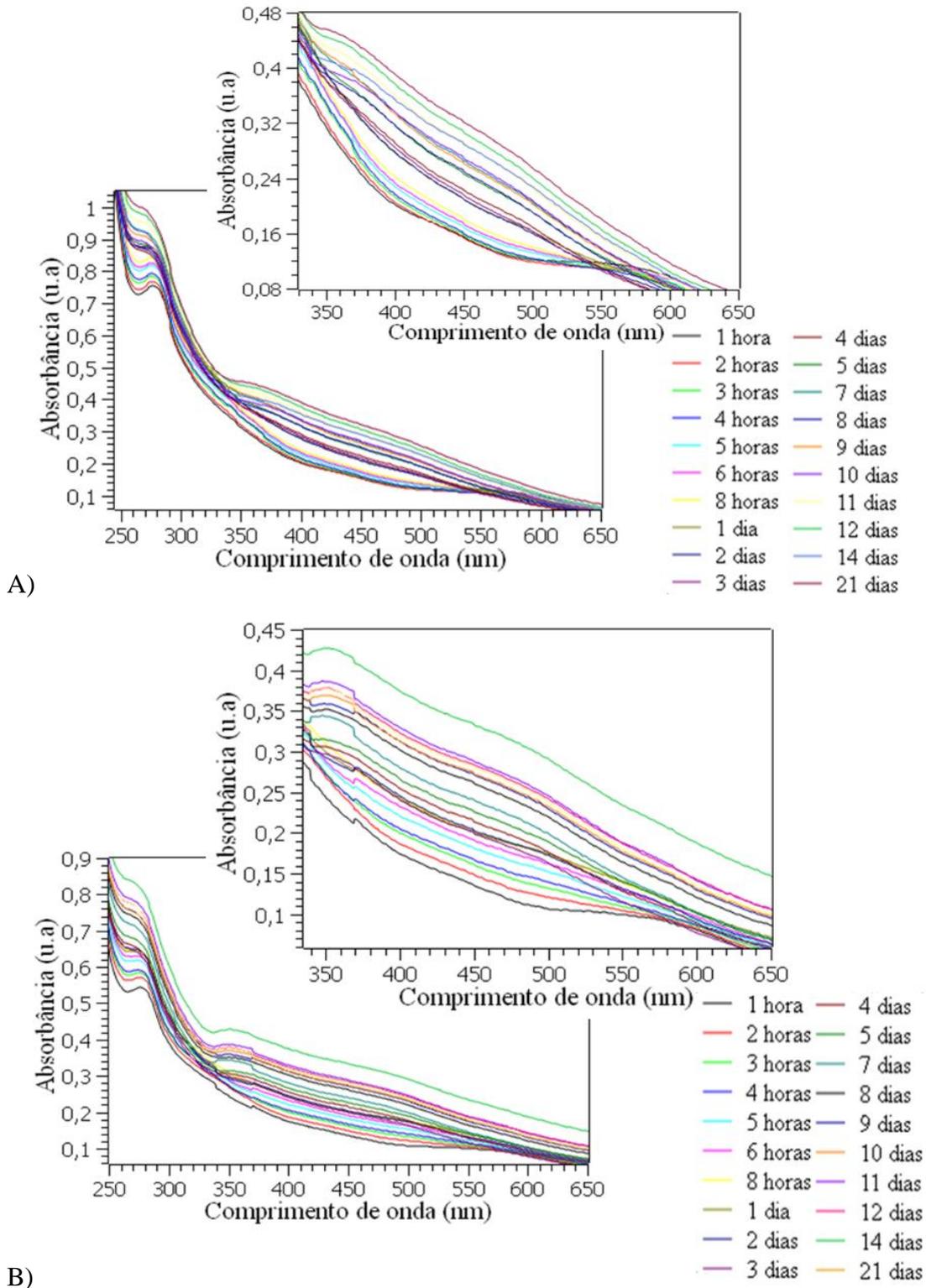
**Figura 16** - Imagens do meio de reação em diferentes valores de temperatura após 1 dia empregando a condição 2 de extrato de açaí: a) 25 °C, b) 40 °C, c) 50 °C.



Fonte: a autora.

A seguir (Figura 17) são expostos os espectros UV-Vis dos meios reacionais em temperatura de 40 °C e 50 °C para a condição 2 de extrato de açaí em pH 7,0. Observa-se a formação da banda RPS entre os comprimentos de onda de 380-450 nm, associado à produção de AgNPs, com baixa definição após 1 dia de síntese para ambas as temperaturas. Com o progresso da reação o sinal da banda RPS se intensifica, havendo um aumento nos valores de absorbância, como consequência de mais nanoestruturas formadas em meio aquoso. Ao realizar um comparativo dos dados obtidos em diferentes temperaturas, nota-se que as condições em temperatura elevada (40 °C e 50 °C) expõem valores de absorbância da banda RPS inferiores aos de temperatura ambiente (25 °C), um indicativo de menores quantias de AgNPs formadas. Desse modo, ao aumentar a temperatura do meio reacional esperava-se um acréscimo na velocidade de reação produzindo mais AgNPs, no entanto, houve uma provável degradação dos metabólitos secundários (JAVED *et al.*, 2020) presentes no extrato de açaí, como as antocianinas, dificultando a transformação de cátions prata em AgNPs.

**Figura 17** - Espectros UV-Vis dos meios reacionais em pH 7,0 para a condição 2 de extrato de açaí. A) Temperatura 40 °C e B) Temperatura 50 °C.



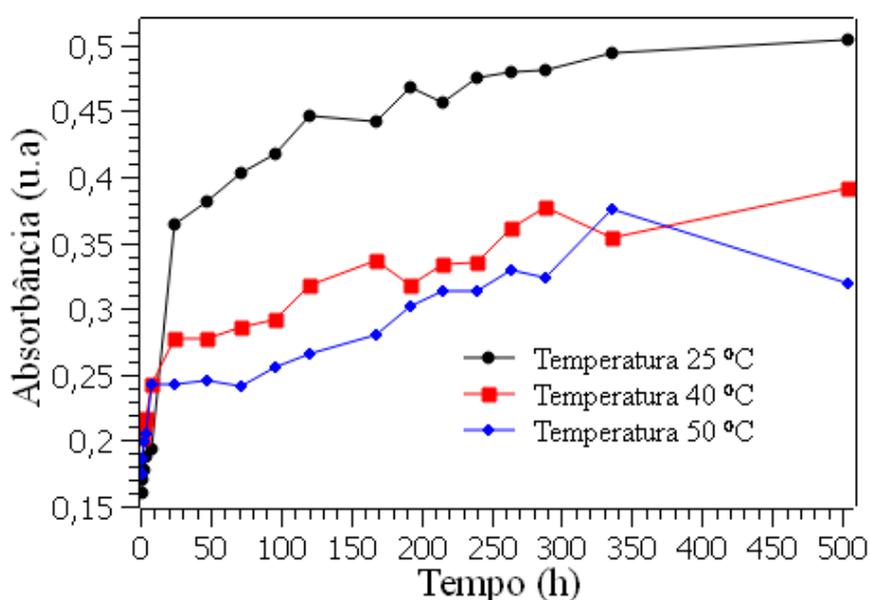
Fonte: a autora.

Na Figura 18 são apresentados os valores de absorvância máxima da banda RPS para a condição 2 de extrato de açaí em pH 7,0 para os diferentes valores de temperatura

investigados. Observa-se para as primeiras 24 horas de síntese uma menor variação do máximo de absorvância com aumento de temperatura, sugerindo uma produção de AgNPs menor do que a 25 °C. Após 48 horas de monitoramento, nota-se os valores de absorvância para as temperaturas elevadas (40 °C e 50 °C) se mantêm inferiores ao obtidos em temperatura ambiente, ou seja, com progressão da síntese há menores quantidades de nanoestruturas formadas no meio reacional aquecido em função do tempo em comparação com o meio de reação sem aquecimento.

Ao se elevar a temperatura, esperava-se incrementar a taxa de formação de produtos na reação estudada pelo aumento da energia cinética dos reagentes para reduzir os íons  $\text{Ag}^+$  em  $\text{Ag}^0$ , obtendo maiores rendimentos e nanoestruturas de menores tamanhos. Contudo, o aumento de temperatura proporcionou a degradação dos diferentes metabólitos secundários presentes no açaí, como as antocianinas (cianidina 3-O-glicosídeo e cianidina 3-O-rutinosídeo), biomoléculas capazes de auxiliar na redução da prata e formar AgNPs. Estudos como de Costa, Silva e Vieira (2018) e López de Dicastillo *et al.*, (2019) evidenciaram a sensibilidade à temperatura de metabólitos secundários como as antocianinas, no qual sofrem degradação ao serem expostos a temperaturas acima de 40 °C. Portanto, altas temperaturas podem contribuir de forma desfavorável a síntese de AgNPs, afetando os metabólitos secundários do extrato de açaí.

**Figura 18** - Absorvância máxima da banda RPS da condição 2 de extrato de açaí em pH 7,0 em diferentes temperaturas em função do tempo.

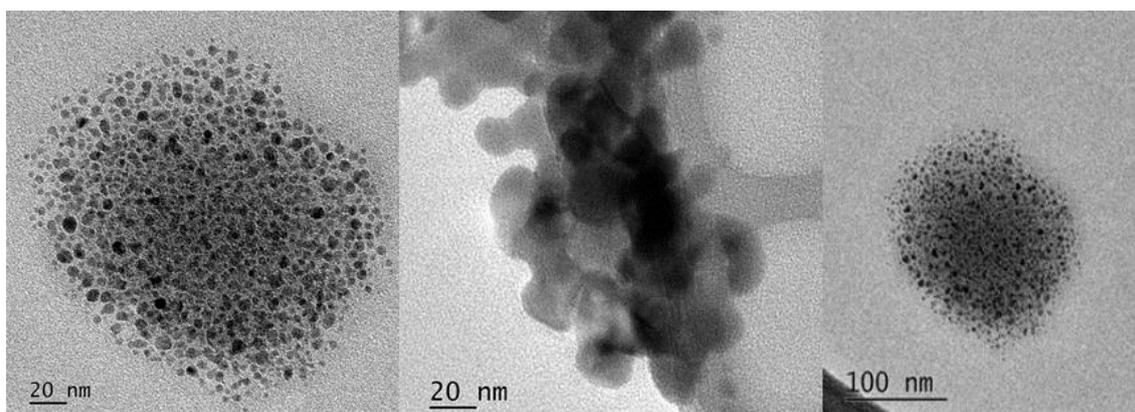


Fonte: a autora.

### 6.5. Microscopia eletrônica de transmissão TEM

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) é empregada para identificar tamanhos e formas de partículas, fornecendo imagens com alta resolução (GOMATHI *et al.*, 2020). Na Figura 19 estão as imagens das AgNPs em pH 7, temperatura de 25 °C e condição 2 de extrato de açaí. Observa-se a predominância de populações de nanopartículas esféricas de diferentes tamanhos, principalmente na faixa de 10-50 nm de diâmetro. A ausência de morfologias e tamanhos bem definidos indicam que os metabólitos secundários presentes no extrato de açaí não são capazes de realizar um controle rigoroso sobre tais parâmetros, como é observado para reações químicas usuais derivadas do método de Turkevich (PEROTTI; DA COSTA, 2021). Além disso, uma fina camada de material orgânico foi observada nas imagens gravadas formando regiões mais densamente esféricas das AgNPs. Esse efeito pode estar relacionado à presença de diferentes carboidratos no meio de reação, como pectina e amido, além de outras biomoléculas, que envolvem AgNPs uma vez que a água é retirada do sistema. Estudos como de Khan *et al.*, (2013) e Tummalapalli *et al.*, (2015) relataram obtenção de nanopartículas de prata envolvidas com uma camada de amido solúvel e pectina oxidada.

**Figura 19** - Imagens TEM da reação de AgNPs obtidas em pH 7,0 e diluição do extrato de açaí da condição 2 a 25 °C.



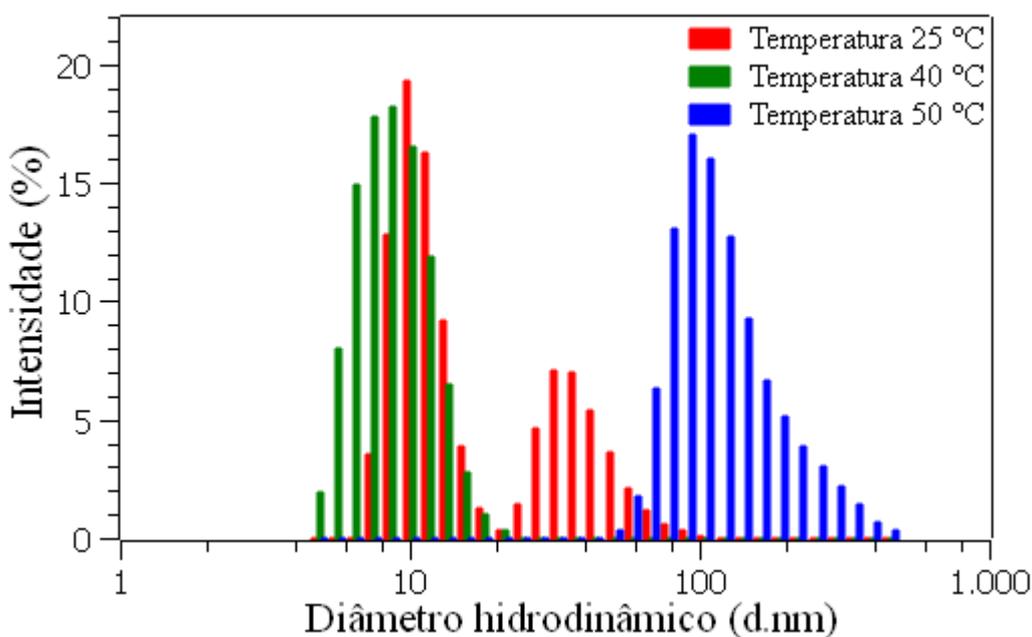
Fonte: a autora.

### 6.6. Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta (mV)

A técnica de Espalhamento de luz dinâmico (DLS) é um método empregado para determinar o tamanho hidrodinâmico de nanopartículas metálicas, no qual uma suspensão de NPs é submetida a um feixe de luz, e as partículas em suspensão são capazes de de

espalhar a luz incidente, causando flutuações na medição da intensidade do feixe detectado após a sua passagem pela amostra. Este método dispõe como principal vantagem o tempo de análise curto e automatizado, não sendo destrutivo para a amostra (MEVA *et al.*, 2019). Na Figura 20 é disposto os dados de distribuição de tamanho de partícula obtidos pela técnica DLS para a condição 2 de extrato de açaí em pH 7, para os diferentes valores de temperatura (25 °C, 40 °C e 50 °C). Foram obtidos os raios hidrodinâmicos de  $21,0 \pm 0,8$  nm para temperatura de 25 °C, para temperatura de 40 °C o tamanho médio obtido foi de  $9,0 \pm 0,5$  nm e para condição em temperatura de 50 °C temos o tamanho médio de  $129,3 \pm 5,6$  nm.

**Figura 20** - Histograma de distribuição de diâmetro hidrodinâmico das AgNPs produzidas empregando a condição 2 de extrato de açaí em pH 7,0 para diferentes temperaturas.



Fonte: a autora.

É possível observar para a condição em temperatura ambiente (25 °C) uma distribuição bimodal, em razão dos dois sinais com intensidade diferentes, significando a formação de populações de nanopartículas com tamanhos distintos. Ao analisar a condição em temperatura de 40 °C, pôde-se identificar uma distribuição de nanopartículas com diâmetro médio menor, ou seja, ao elevar moderadamente a temperatura foi possível sintetizar AgNPs de menores tamanhos, mesmo com valores máximos de absorbância da banda RPS (Figura 18) inferiores aos de temperatura ambiente. Já para a condição em

temperatura de 50 °C, houve a obtenção de NPs com maior diâmetro médio e os menores valores de máximo de absorvância da banda RPS.

Os dados obtidos por DLS corroboram a hipótese que ao elevar a temperatura é possível obter AgNPs com menores tamanhos, devido ao aumento da energia cinética das biomoléculas do meio reacional acelerando a redução da prata catiônica. Estudos como de Biswal e Misra (2020) relataram a síntese de AgNPs em menores tamanhos ao aumentar a temperatura utilizando o extrato aquoso da torta de óleo Mahua (MOC) da espécie *Madhuca latifolia L.* Ao trabalhar com temperaturas de 50 °C nota-se populações AgNPs com maiores diâmetros, ou seja, com o aumento de temperatura as nanopartículas têm menor controle sobre seu tamanho. Há duas causas prováveis para esse resultado: a possibilidade de aglomeração das nanoestruturas produzidas, devido ao recobrimento parcial das biomoléculas presentes na superfície que auxiliam na estabilização das partículas. A segunda está relacionada com a degradação dos metabólitos secundários que atuam como redutores da prata dificultando a formação de NPs menores, visto que as biomoléculas presentes no açaí já exibem uma tendência a se degradar ao serem expostas a temperaturas médias/altas.

Através da análise DLS foram obtidos valores de índice de polidispersividade (PdI), um indicador de distribuição de tamanhos de nanoestruturas, variando na faixa de 1 a 0 (GAVAMUKULYA *et al.*, 2020). Segundo Brito *et al.*, (2020), valores de PdI inferiores a 0,1 sugerem a presença de NPs monodispersas, índices entre  $0,1 \leq 0,2$  indicam um sistema com distribuição mediana, enquanto índices na faixa de  $0,2 \leq 0,5$  propõem uma maior variabilidade na distribuição de tamanho das nanopartículas. Para as condições investigadas foram obtidos PdIs de  $0,283 \pm 0.004$  para a temperatura de 25 °C, para a temperatura de 40 °C o PdI foi de  $0,452 \pm 0.023$  e para temperatura de 50 °C o PdI foi de  $0,191 \pm 0.017$ . De acordo com os índices de PdI, para as condições em 25 °C e 40 °C, houve a formação heterogênea de AgNPs, enquanto para a maior temperatura (50 °C) houve a obtenção de NPs com distribuição mediana. Esses valores podem estar diretamente relacionados com a taxa de formação de AgNPs e/ou degradação das biomoléculas do extrato em função da temperatura utilizada, conforme previamente mencionado.

O potencial Zeta é um parâmetro utilizado para calcular valores de cargas líquidas de partículas em movimento sob o campo elétrico, medindo o potencial de atração e repulsão no meio em solução (MAT YUSUF *et al.*, 2020). A estabilidade das AgNPs pode ser investigada pela análise dos valores de potencial Zeta, uma vez que valores

maiores que +30 mV e menores que -30 mV são associados a obtenção de nanopartículas mais estáveis (MANOSALVA *et al.*, 2019). Foram obtidos os seguintes valores médios de potenciais Zetas para as diferentes temperaturas:  $-25,7 \pm 5,98$  mV (25 °C),  $-29,0 \pm 7,3$  mV (40 °C) e  $-37,2 \pm 5,92$  mV (50 °C).

Para as nanoestruturas em temperaturas médias (25 °C e 40 °C) os valores de potencial Zeta, embora fora da faixa considerada de maior estabilidade, podem ser atribuídos como sistemas moderadamente estáveis, com relativa tendência a agregação, visto que após 7 dias são identificados precipitados no meio reacional. Estudos como de Botcha e Prattipati (2020) sintetizaram AgNPs com extrato aquoso de calo de *Hypitys suaveolense* e obtiveram valores próximos de  $\pm 30$  mV, considerando o sistema nanoparticulado moderadamente estável. Para a temperatura de 50 °C, o valor de potencial Zeta é o menor em comparação aos de temperatura média (25 °C e 40 °C), no qual está na faixa de valor menor que -30 mV, um indicativo de estabilidade no sistema coloidal. Ainda que o sistema em maior temperatura tenha apresentado um ganho de estabilidade na síntese de AgNPs, nesta condição foram obtidas partículas maiores e um menor rendimento em função do tempo.

Os dados obtidos com sinal negativo podem ser referentes a adsorção de compostos bioativos recobrando as nanoestruturas (MAT YUSUF *et al.*, 2020; KHOSH NAMVAND; HUO; LIU, 2019), como as antocianinas e ácidos fenólicos que possuem grupos com carga negativa (carboxilatos), criando forças repelentes entre as partículas, dificultando sua agregação (KHOSH NAMVAND; HUO; LIU, 2019). Os valores de potencial Zeta negativos também sugerem a presença de AgNPs estáveis, uma vez que estudos como de Mani *et al.*, (2021) obtiveram valores negativos de potencial zeta ao sintetizar AgNPs por extrato de folhas de cebola (*Allium cepa*).

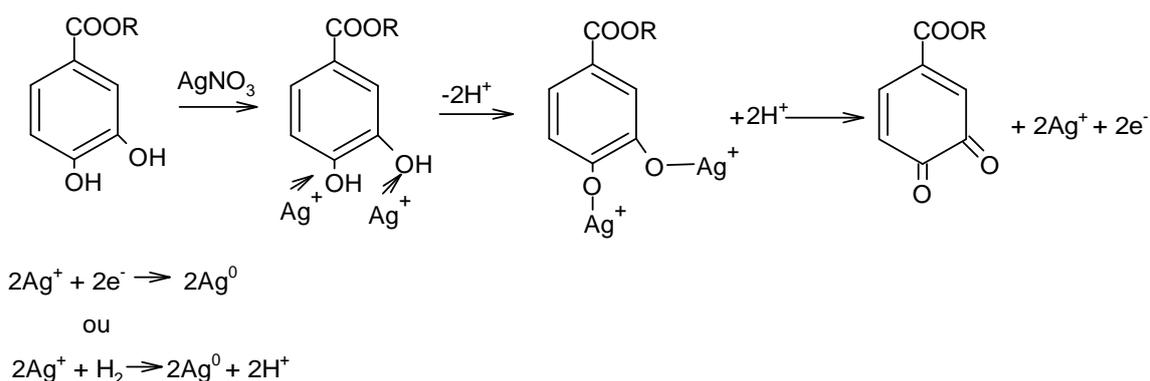
#### **6.7. Provável mecanismo de síntese de AgNPs mediada por extrato de açaí**

Atualmente, o mecanismo de biossíntese de nanopartículas metálicas mediada por extratos vegetais ainda não é totalmente compreendido (MITTAL *et al.*, 2014) devido à infinidade de biomoléculas presentes nos diferentes extratos vegetais e que podem ser mais ou menos reativas dependendo de inúmeros fatores, como método de extração, funções químicas presentes, associação à outras biomoléculas, entre diversas outras. De forma geral, pode-se generalizar o processo de formação de AgNPs em três etapas distintas, sendo a primeira etapa denominada como processo de nucleação, consistindo na redução dos íons  $\text{Ag}^+$  para  $\text{Ag}^0$  para formação de pequenos germens. Posteriormente é

iniciada a etapa de crescimento, onde ocorre agregação dos gérmenes e/ou incorporação de mais átomos de prata reduzidos a eles, formando as AgNPs. A última etapa consiste no recobrimento da superfície das nanoestruturas formadas por biomoléculas do extrato vegetal, dificultando o processo de agregação e crescimento exacerbado das partículas (KOBYLINSKA *et al.*, 2020).

O estudo de Rao e Paria (2013) propôs um mecanismo de síntese de AgNPs para os compostos fenólicos (taninos) encontrados no extrato da folha de *Aegle marmelos* (marmeleiro da Índia), através de uma reação de complexação e redução da prata (Figura 21). Foi proposto que os grupos hidroxila presentes no anel benzênico de compostos fenólicos, mais especificamente o átomo de hidrogênio, são os contribuintes para redução da prata catiônica. O mecanismo ocorre nas seguintes etapas: primeiro o composto fenólico reage com o íon  $\text{Ag}^+$  e forma um intermediário contendo prata através do compartilhamento um par de elétrons não-ligantes dos átomos de oxigênio dos grupos hidroxilas. Com isso, há o enfraquecimento da ligação O-H que se rompe heteroliticamente, formando íons  $\text{H}^+$  no meio reacional. Na sequência ocorre a ruptura na ligação do O- $\text{Ag}^+$  e a liberação de um elétron para haver a formação de um sistema de composto enonas/dicarbonila. Posteriormente, pressupõe-se duas rotas distintas para o processo de redução da prata catiônica, sendo que em ambos os casos a espécie final formada é o  $\text{Ag}^0$ .

**Figura 21** - Mecanismo proposto para compostos fenólicos encontrados no extrato da folha do marmeleiro da Índia.

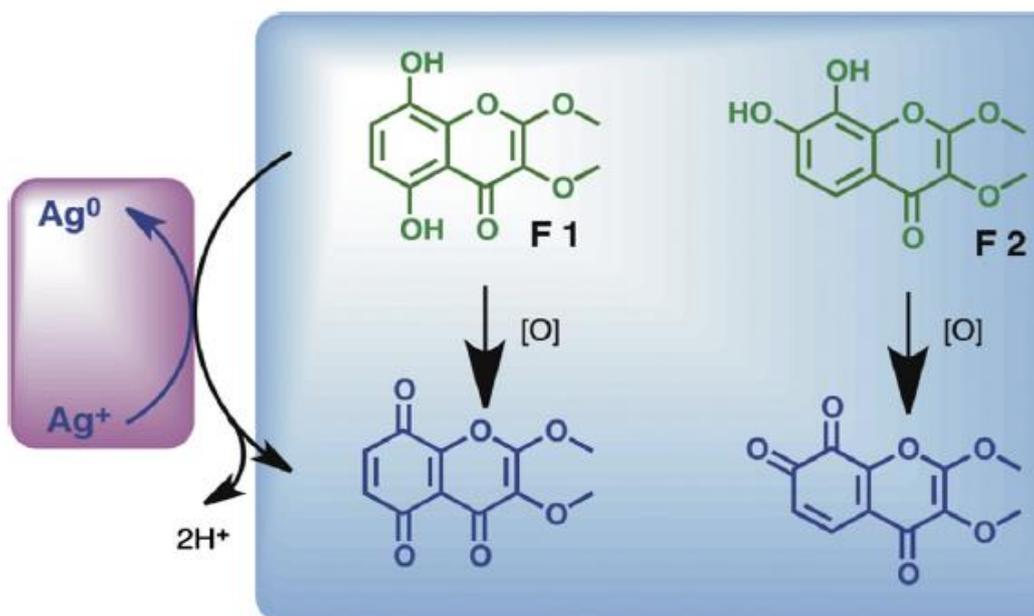


Fonte: Adaptado de RAO; PARIÁ, 2013.

De modo similar, Mittal *et al.* (2014) investigou um mecanismo para síntese de AgNPs mediada por extrato da fruta jamelão (*Syzygium cumini*), no qual propôs que dois

membros dos compostos flavonoides (com polaridades diferentes) presentes no extrato vegetal reduzem a prata catiônica para prata de valência zero também por meio de uma reação redox (Figura 22), através oxidação dos átomos de H encontrados nos grupos OH das estruturas para a formação de enonas/dicarbonilas.

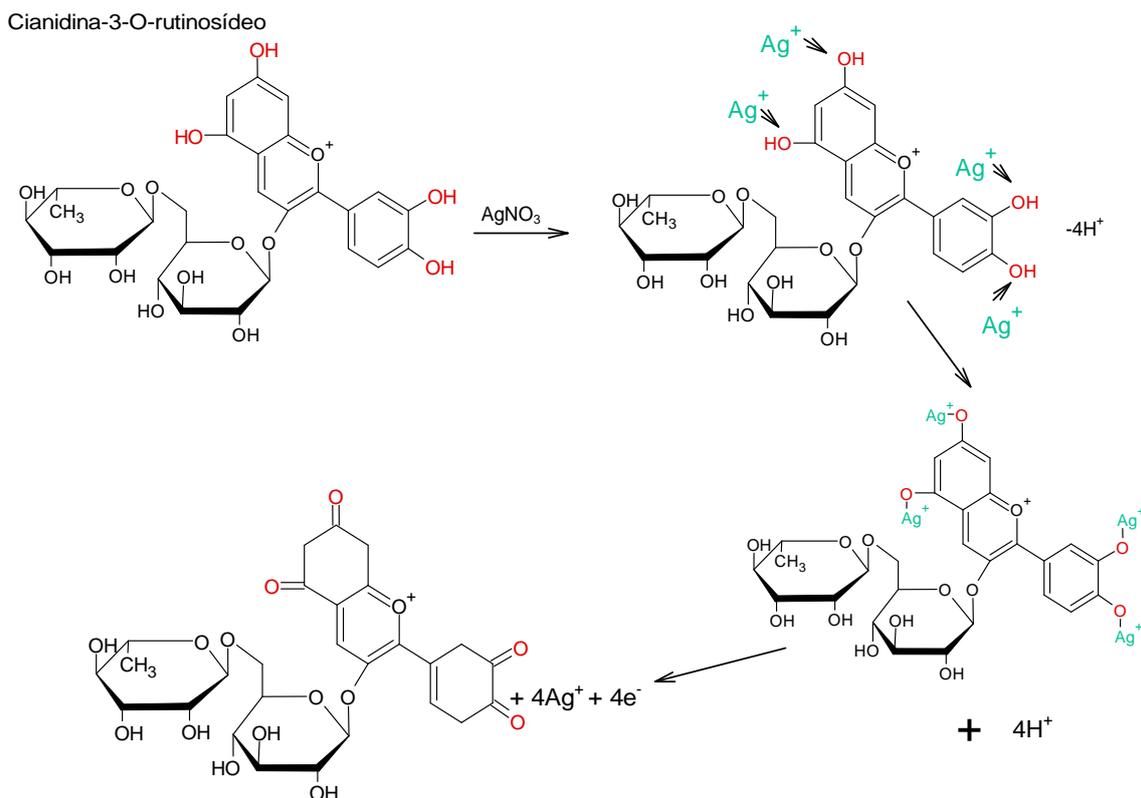
**Figura 22** - Mecanismo de síntese de AgNPs para compostos flavonoides do extrato da fruta *Syzygium c.*



Fonte: Adaptado de MITTAL *et al.*, 2014.

Ao realizar um comparativo dos mecanismos propostos acima com os dados obtidos na síntese de AgNPs mediada pelo extrato de açaí é possível sugerir que as antocianinas (cianidina-3-O-glucosídeo e cianidina-3-O-rutinosídeo) com os grupos 3',4'-dihidróxi presente no anel B (sítio quelante dos flavonoides) e os grupos 5,7 – dihidróxi do anel A podem ser grandes contribuintes para a redução da prata e formação das NPs, na Figura 23 é ilustrado a possível interação das antocianinas com a prata. Essa suposição pode ser considerada visto que as estruturas das antocianinas, quando dispostas em soluções aquosas, estão em diferentes equilíbrios químicos (Figura 15, página 41) com distintas estruturas e sua predominância é determinada pelo pH do meio. Analisando as estruturas em meios ácidos, neutros e alcalinos, há uma alteração de posição dos grupos hidroxilas nos anéis A e B quando ocorre o aumento do pH. Desse modo, afeta-se a capacidade redutora do íon  $Ag^+$  para  $Ag^0$  e posteriormente a formação de AgNPs, justificando a baixa quantidade de nanopartículas sintetizadas com os meios ácidos e básicos.

**Figura 23** - Representação do possível mecanismo de reação para sintetizar AgNPs mediado por extrato aquoso de açaí (*cianidina-3-O-glucosídeo*).

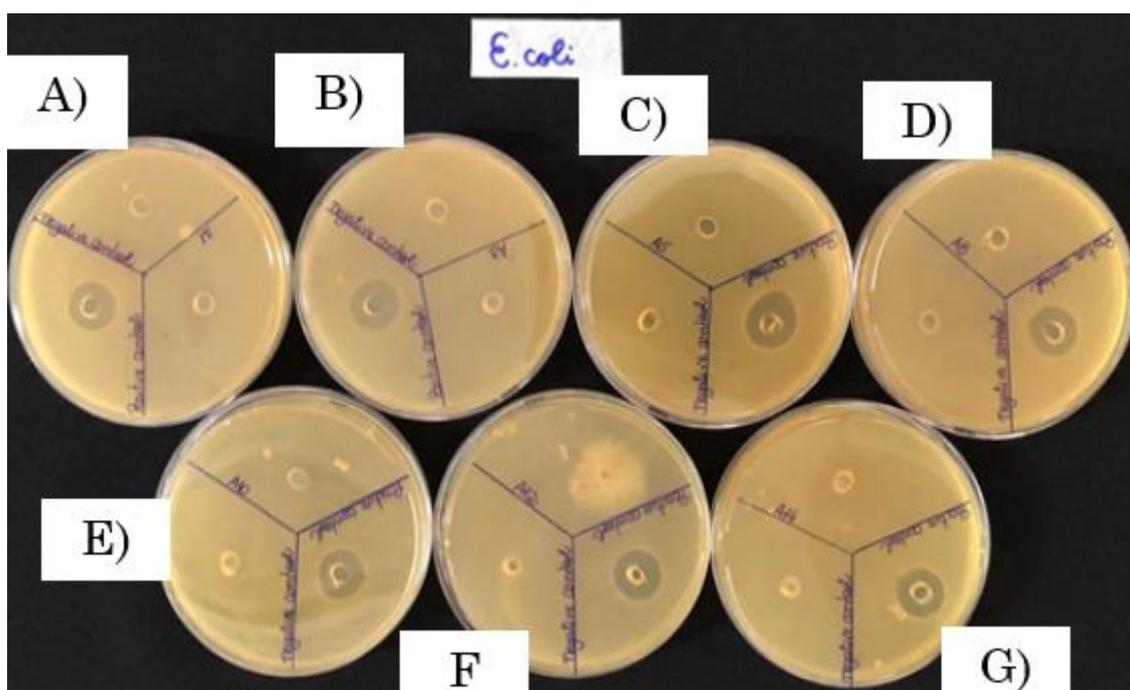


Fonte: a autora.

### 6.8. Avaliação do ensaio microbiológico

Os resultados obtidos de halo de inibição das AgNPs produzidas estão dispostos na Figura 24 para a bactéria *E.coli*. Observa-se que para as diferentes amostras investigadas não foi possível identificar atividade inibitória frente aos diferentes microrganismos investigados, sendo observado que o extrato F (extrato de açaí diluído) proporcionou o favorecimento da proliferação das bactérias *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

**Figura 24** - Resultado das AgNPs em diferentes condições submetidas a *E.coli*.



Fonte: a autora.

Uma possível explicação para a ausência microbicida das AgNPs está na composição do açaí, principalmente devido a presença das antocianinas (cianidina 3-O-glicosídeo e cianidina 3-O-rutinosídeo). Como relatado, essas substâncias possuem tendência a complexar metais (DE SOUZA; DE GIOVANI, 2004) e são encontradas em meio aquoso em diferentes equilíbrios químicos dependendo do pH, o que acarreta na competição do efeito quelante e redução da prata catiônica. Desse modo, o efeito de complexação dos íons prata pode ocorrer mesmo com concentrações de extrato de açaí mais diluídas, reduzindo a capacidade das AgNPs para interagir com o ambiente celular. Estudos como de Al-Thabaiti e Khan (2020) observaram o efeito de complexação de antocianinas ao mediar a síntese de AgNPs, assim como o trabalho de Fedenko, Shemet e Struzhko (2004) que investigou a tendência de complexação de metais das antocianinas estudando sua interação com íons cádmio.

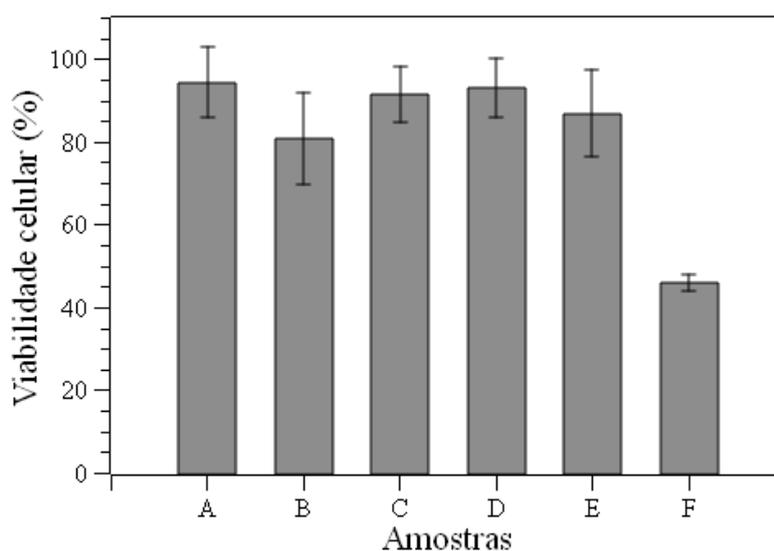
É importante salientar que essa avaliação microbicida empregada é influenciada por diversos fatores como o número, tamanho e forma das partículas, carga elétrica e polaridade da substância. Partículas maiores e mais numerosas, e também o uso de solventes apolares para a preparação da substância são decisivos na capacidade de se difundir pelo ágar e, portanto, podem mascarar sua atividade antimicrobiana (Girondi *et al.*, 2017).

### 6.9. Avaliação de viabilidade celular AgNPs

Ensaio de viabilidade celular são utilizados para monitorar uma resposta de células contra um agente químico ou fármaco, sendo empregada para avaliar agentes desenvolvidos nas células, desse modo a viabilidade celular traz dados sobre a qualidade de células em determinadas amostras (KAMILOGLU *et al.*, 2020).

As amostras A, B, C, D, E, e F foram submetidas ao teste de viabilidade celular (Figura 25), sendo citotóxica apenas para a amostra F (solução de AgNO<sub>3</sub>) na diluição 1:1 (v/v) para fibroblastos L929 pelo ensaio MTT. Materiais que promovem a diminuição da viabilidade celular abaixo de 70% são definidos como citotóxicos. As demais amostras não exibiram toxicidade, indicando que as dispersões de AgNPs produzidas empregando o extrato de açaí são menos citotóxicas que a solução de AgNO<sub>3</sub>. Tal fato pode estar relacionado com a capacidade de alguns metabólitos secundários presentes no extrato vegetal de açaí complexar com íons Ag<sup>+</sup> formados a partir das AgNPs em processos de oxirredução, reduzindo assim a capacidade desse íon de causar dano celular, conforme corroborado pelos ensaios microbiológicos realizados neste estudo.

**Figura 25** - Viabilidade celular de fibroblastos L929 avaliada pelo ensaio MTT na diluição 1:1 do extrato utilizando diferentes dispersões de AgNPs e amostras de solução de AgNO<sub>3</sub>.



Fonte: a autora.

## 7. CONCLUSÕES

Ao estudar a síntese de nanopartículas de prata mediada por extrato aquoso de açaí (*Euterpe oleracea*), investigou-se os efeitos de alguns parâmetros físico-químicos, tais

como a influência da concentração do extrato vegetal, pH e temperatura do meio de reação. Foi observado que ao trabalhar com extratos em diferentes concentrações, a taxa de formação das AgNPs não diferiu significativamente com o progresso da reação, apenas nas horas iniciais a condição mais concentrada exibe uma maior quantidade de nanoestruturas produzidas. No entanto, notou-se que com maiores concentrações de extrato de açaí no meio reacional houve dificuldades na identificação do sinal de RPS ao acompanhar a síntese com a técnica de espectroscopia eletrônica UV-Vis. Desse modo, as condições de extrato mais diluídas proporcionaram uma melhor visualização do sinal RPS e obtenção de nanopartículas mais estáveis.

Ao avaliar a influência do pH na produção das NPs, trabalhou-se com as condições diluídas do extrato de açaí em meio reacional ácido (pH 6,0), neutro (pH 7,0) e alcalino (pH 8,0). Nota-se que em meio neutro houve uma maior taxa de formação de NPs em comparação aos outros meios, neste pH os sinais de RPS foram identificados em menores comprimentos de onda. No entanto, mesmo com o favorecimento da redução dos íons  $\text{Ag}^+$  para sintetizar as NPs, as biomoléculas exibiram baixa capacidade de controlar o tamanho das nanoestruturas. Posteriormente, o efeito da temperatura na síntese das AgNPs foi investigado considerando como um parâmetro fundamental para controle da cinética da reação, podendo exercer influência na taxa de formação e controle do tamanho das NPs. Notou-se que o aumento de temperatura afeta a síntese de forma desfavorável, pois acarreta na degradação dos metabólitos secundários do extrato de açaí, obtendo menores quantidades de AgNPs.

A ausência de atividade microbiológica das AgNPs obtidas pode estar associada à presença de metabólitos secundários do extrato de açaí que impedem a ação microbiana dos íons de prata através da formação de complexos. Este fato também foi evidenciado pela maior viabilidade celular das dispersões de AgNPs em relação à solução de  $\text{AgNO}_3$ .

De forma geral, considerando os resultados obtidos no trabalho, a síntese de AgNPs pode ser produzida em diferentes parâmetros reacionais (concentração de extrato, pH e temperatura), principalmente utilizando condições de extratos mais diluídas (condição 2) em pH 7, resultando em nanoestruturas mais estáveis e com maior produção de nanopartículas em função do tempo.

## 8. REFERÊNCIAS

ADIL, S.F. *et al.* Biogenic synthesis of metallic nanoparticles and prospects toward green chemistry. **Dalton Transactions**, v.44, n.21, p.9709-9717, 2015.

AGARWAL, H. *et al.* Mechanistic study on antibacterial action of zinc oxide nanoparticles synthesized using green route. **Chemico-Biological Interactions**, v.286, p.60-70, 2018.

ALIAÑO-GONZÁLEZ, M.J. *et al.* Extraction of anthocyanins and total phenolic compounds from açai (*Euterpe oleracea Mart.*) using an experimental design methodology. Part 1: Pressurized liquid extraction. **Agronomy**, v.10, n.2, p.183-200, 2020.

ALMEIDA, C.I. *et al.* A utilização das nanopartículas no combate à resistência bacteriana. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v.19, n.2, p.125-132, 2017.

AL-THABAITI, S.A; KHAN, Z. Biogenic synthesis of silver nanoparticles, sensing and photo catalytic activities for bromothymol blue. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.3, p.100010, 2020.

ANIGOL, L.B.; CHARANTIMATH, J.S.; GURUBASAVARAJ, P.M. Effect of concentration and ph on the size of silver nanoparticles synthesized by green chemistry. **Organic and Medicinal Chemistry International Journal**, v.3, p.1-5, 2017.

ATHITHAN, A.S.S. *et al.* *Annona muricata* fruit mediated biosynthesis, physicochemical characterization of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles and assessment of its *in vitro* antidiabetic activity. **Rasayan Journal Chemical**, v.13, n.3, p.1759-1766, 2020.

BARKAT, Md.A. *et al.* Silver nanoparticles and their antimicrobial applications. **Current Nanomedicine (Formerly: Recent Patents on Nanomedicine)**, v.8, n.3, p.215-224, 2018.

BERA, A; BELHAJ, H. Application of nanotechnology by means of nanoparticles and nanodispersions in oil recovery - A comprehensive review. **Journal of Natural Gas Science and Engineering**, v.34, p.1284-1309, 2016.

BEYENE, H.D *et al.* Synthesis Paradigm and Applications of Silver Nanoparticles (AgNPs), A Review. **Sustainable Materials and Technologies**, v.13, p.18-23, 2017.

BISWAL, A.K.; MISRA, P.K. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles for prospective application in food packaging and biomedical fields. **Materials Chemistry and Physics**, v.250, p.123014, 2020.

BOCATE, K.P *et al.* Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.291, p.79-86, 2019.

BOEIRA, L.S *et al.* Chemical and sensorial characterization of a novel alcoholic beverage produced with native acai (*Euterpe precatoria*) from different regions of the Amazonas state. **LWT**, v.117, artigo 108632, 2020.

BOTCHA, S.; PRATTIPATI, S.D. Callus extract mediated green synthesis of silver nanoparticles, their characterization and cytotoxicity evaluation against MDA-MB-231 and PC-3 Cells. **BioNanoScience**, v.10, n.1, p.11-22, 2020.

BRIGHENTI, F.L. *et al.* Systematic screening of plant extracts from the Brazilian Pantanal with antimicrobial activity against bacteria with cariogenic relevance. **Caries Research**, v.48, n.5, p.353-360, 2014.

BRITO, T.K. *et al.* Synthesis of silver nanoparticle employing corn cob xylan as a reducing agent with anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **International Journal of Nanomedicine**, v.15, p.965, 2020.

CARVALHO, A.V *et al.* Chemical composition and antioxidant capacity of açai (*Euterpe oleracea*) genotypes and commercial pulps. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.97, n.5, p.1467-1474, 2017.

CEDRIM, P.C.A.S; BARROS, E.M.A; NASCIMENTO, T.G. Propriedades antioxidantes do açai (*Euterpe oleracea*) na síndrome metabólica. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, artigo e2017092, 2018.

COSTA, H.C.B; SILVA, D.O; VIEIRA, L.G.M. Physical properties of açai-berry pulp and kinetics study of its anthocyanin thermal degradation. **Journal of Food Engineering**, v.239, p.104-113, 2018.

COURA, M.F *et al.* How To Obtain Gold Nanoparticles From Lemon Juice?. **Química Nova**, v.41, n.5, p.533-539, 2018.

DADA, A.O *et al.* Effect of operational parameters, characterization and antibacterial studies of green synthesis of silver nanoparticles using *Tithonia diversifolia*. **PeerJ**, v.6, artigo e5865, 2018.

DADA, A.O *et al.* Silver nanoparticle synthesis by *Acalypha wilkesiana* extract: phytochemical screening, characterization, influence of operational parameters, and preliminary antibacterial testing. **Heliyon**, v.5, n.10, artigo e02517, 2019.

DAUTHAL, P.; MUKHOPADHYAY, M. Noble metal nanoparticles: plant-mediated synthesis, mechanistic aspects of synthesis, and applications. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.55, n.36, p.9557-9577, 2016.

DA SILVA, A.O *et al.* Estudo da produção de açai (*Euterpe oleracea* Mart.): aspectos econômicos e produtivos baseados nos anos de 2015 a 2017. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.1, p.1629-1641, 2020a.

DA SILVA, M.P *et al.* Avaliação da estrutura morfológica, química elementar, parâmetros de cor e composição em minerais da polpa de açai (*Euterpe oleracea* Mart.)

de três diferentes localidades da região Amazônica. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.4, p.18793-18803, 2020b.

DA SILVEIRA, T.F.F *et al.* Anthocyanins, non-anthocyanin phenolics, tocopherols and antioxidant capacity of açai juice (*Euterpe oleracea*) as affected by high pressure processing and thermal pasteurization. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.55, p.88-96, 2019.

DE OLIVEIRA, M.S.P; SCHWARTZ, G. Açai - *Euterpe oleracea*. In: **Exotic Fruits**. Céara: Academic Press, Editores: Sueli Rodrigues; Ebenezer de Oliveira Silva e Edy Sousa de Brito, cap.1, p.1-5, 2018.

DE SOUZA, R.F.V; DE GIOVANI, W.F. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. **Redox Report**, v.9, n.2, p.97-104, 2004.

DISNER, G.R; CESTARI, M.M. Nanociência & Nanotecnologia. **Evidência, Joaçaba**, v.16, n.1, p.71-76, 2016.

DUAN, H; WANG, D; LI, Y. Green chemistry for nanoparticle synthesis. **Chemical Society Reviews**, v.44, n.16, p.5778-5792, 2015.

DURÁN, N. *et al.* Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v.12, n.3, p.789-799, 2016.

EMBRAPA - Agroindústria de Alimentos Amazônia Oriental. Práticas adequadas no manuseio de açai. Disponível em [https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/BoasPraticas\\_Batedores\\_000gchwkf5i02wx5ok0rofsmqf30glpk.pdf](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/BoasPraticas_Batedores_000gchwkf5i02wx5ok0rofsmqf30glpk.pdf). Acesso em 01 de março de 2021.

EL-GAMEL, N.E.A; ZAYED, M. A. Synthesis, structural characterization and antimicrobial activity evaluation of metal complexes of sparfloxacin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.82, n.1, p.414-423, 2011.

FEDENKO, V.S.; SHEMET, S.A.; STRUZHKO, V.S. Complexation of cyanidin with cadmium ions in solution. **Ukrainian Biochem. J**, v.77, p.104-109, 2005.

FREITAS, V. O mundo colorido das antocianinas. **Revista de Ciência Elementar**, v.7, n.2, p.1-6, 2019.

GAILLET, S; ROUANET, J.M. Silver nanoparticles: their potential toxic effects after oral exposure and underlying mechanisms – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.77, p.58-63, 2015.

GAVAMUKULYA, Y. *et al.* Green synthesis and characterization of highly stable silver nanoparticles from ethanolic extracts of fruits of *Annona muricata*. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, v.30, n.4, p.1231-1242, 2020.

GE, L. *et al.* Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. **International Journal of Nanomedicine**, v.9, p.2399-2407, 2014.

GEBRU, H. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles and their antibacterial activity. **Journal of Surface Science and Technology**, v.29, n.1-2, p.47-66, 2013.

GHAEDI, M. *et al.* *Rosmarinus officinalis* leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles and investigation of its antimicrobial properties. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.31, p.167-172, 2015.

GIRONDI, C.M. *et al.* Screening of plants with antimicrobial activity against enterobacteria, *Pseudomonas spp.* and *Staphylococcus spp.* **Future Microbiology**, v.12, n.8, p.671-681, 2017.

GOMATHI, A.C. *et al.* Anticancer activity of silver nanoparticles synthesized using aqueous fruit shell extract of *Tamarindus indica* on MCF-7 human breast cancer cell line. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.55, p.101376, 2020.

GONZÁLEZ-VARGAS, N.C. *et al.* Actividad antibacteriana de nanopartículas metálicas sobre bacterias resistentes a antibióticos convencionales. **Jóvenes en la Ciência**, v.3, n.2, p.913-917, 2017.

GUERRA, J.D *et al.* Selective antifungal activity of silver nanoparticles: A comparative study between *Candida tropicalis* and *Saccharomyces boulardii*. **Colloid and Interface Science Communications**, v.37, artigo 100280, 2020.

GUIMARÃES, M.L *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using *Ziziphus joazeiro* leaf extract for production of antibacterial agents. **Applied Nanoscience**, v.10, n.4, p.1073-1081, 2020.

HANDAYANI, W; NINGRUM, A. S; IMAWAN, C. The Role of pH in Synthesis Silver Nanoparticles Using *Pometia pinnata* (*Matoa*) Leaves Extract as Bioreductor. **Journal of Physics: Conference Series**, v.1428, p.012021, 2020

HYEON, T; MANNA, L; WONG, S.S. Sustainable nanotechnology. **Chemical Society Reviews**, v.44, n.16, p.5755-5757, 2015.

IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chemistry**, v.13, p.2638-2650, 2011.

JAIN, S.; MEHATA, M.S. Medicinal plant leaf extract and pure flavonoid mediated green synthesis of silver nanoparticles and their enhanced antibacterial property. **Scientific Reports**, v.7, n.1, p.1-13, 2017.

JAVED, B. *et al.* Optimization, characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles against plant bacterial pathogens phyto-synthesized by *Mentha longifolia*. **Materials Research Express**, v.7, n.8, artigo 085406, 2020.

JIANG, T. *et al.* Degradation of anthocyanins and polymeric color formation during heat treatment of purple sweet potato extract at different pH. **Food Chemistry**, v.274, p.460-470, 2019.

KADZIŃSKI, M. *et al.* Co-constructive development of a green chemistry-based model for the assessment of nanoparticles synthesis. **European Journal of Operational Research**, v.264, n.2, p.472-490, 2018.

KALAKI, Z.A; SAFAEIJAVAN, R; FARAJI, H. Procedure optimisation for green synthesis of silver nanoparticles by Taguchi method. **Micro & Nano Letters**, v.13, n.4, p.558-561, 2018.

KAMILOGLU, S. *et al.* Guidelines for cell viability assays. **Food Frontiers**, v.1, n.3, p.332-349, 2020.

KEÇILI, R; BÜYÜKTIRYAKI, S; HUSSAIN, C.M. Advancement in bioanalytical science through nanotechnology: Past, present and future. **Trends in Analytical Chemistry**, v.110, p.259-276, 2019.

KHAN, Z. *et al.* Starch-directed green synthesis, characterization and morphology of silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.102, p.578-584, 2013.

KHATAMI, M. *et al.* Facile biosynthesis of silver nanoparticles using *Descurainia sophia* and evaluation of their antibacterial and antifungal properties. **Journal of Cluster Science**, v.27, n.5, p.1601-1612, 2016.

KHOO, H.E. *et al.* Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. **Food & Nutrition Research**, v.61, n.1, p.1361779, 2017.

KHOSHNAMVAND, M.; HUO, C.; LIU, J.. Silver nanoparticles synthesized using *Allium ampeloprasum* L. leaf extract: characterization and performance in catalytic reduction of 4-nitrophenol and antioxidant activity. **Journal of Molecular Structure**, v.1175, p.90-96, 2019.

KOBYLINSKA, N. *et al.* 'Hairy' root extracts as source for 'green' synthesis of silver nanoparticles and medical applications. **RSC Advances**, v.10, n.65, p.39434-39446, 2020.

KUMAR, H. *et al.* Fruit extract mediated green synthesis of metallic nanoparticles: A new avenue in pomology applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8458, 2020.

KUPPUSAMY, P. *et al.* Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications – An updated report. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v.24, n.4, p.473-484, 2016.

LEE, S.H; JUN, B-H. Silver nanoparticles: synthesis and application for nanomedicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, n.4, p.865-888, 2019.

LOOS, M. **Carbon nanotube reinforced composites: CNT Polymer Science and Technology**. 1<sup>st</sup> ed. Oxford: William Andrew Publishing, cap.1, p.1-36. 2014.

LÓPEZ DE DICASTILLO, C. *et al.* Enhancing thermal stability and bioaccessibility of açai fruit polyphenols through electrohydrodynamic encapsulation into zein electrosprayed particles. **Antioxidants**, v.8, n.10, p.464, 2019.

MAHIUDDIN, M; SAHA, P; OCHIAI, B. Green Synthesis and Catalytic Activity of Silver Nanoparticles Based on *Piper chaba* Stem Extracts. **Nanomaterials**, v.10, n.9, p.1777-1791, 2020.

MANI, M. *et al.* A novel biogenic *Allium cepa* leaf mediated silver nanoparticles for antimicrobial, antioxidant, and anticancer effects on MCF-7 cell line. **Environmental Research**, v.198, p.111199, 2021.

MANOSALVA, N. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles: effect of synthesis reaction parameters on antimicrobial activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.35, n.6, p. 1-9, 2019.

MARIA, F.C.S. Resistencia antibiótica en la infección urinaria: la historia sin fin. **Boletín Médico del Hospital Infantil de México**, v.71, n.6, p.329-331, 2014.

MARSLIN, G. *et al.* Secondary metabolites in the green synthesis of metallic nanoparticles. **Materials**, v.11, n.6, p.940-964, 2018.

MAT YUSUF, S.N.A. *et al.* Optimization of biogenic synthesis of silver nanoparticles from flavonoid-rich *Clinacanthus nutans* leaf and stem aqueous extracts. **Royal Society open science**, v.7, n.7, p. 200065, 2020.

MENON, S; RAJESHKUMAR, S; KUMAR, V. A review on biogenic synthesis of gold nanoparticles, characterization, and its applications. **Resource-Efficient Technologies**, v.3, n.4, p.516-527, 2017.

MEVA, F.E. *et al.* Silver and palladium nanoparticles produced using a plant extract as reducing agent, stabilized with an ionic liquid: sizing by X-ray powder diffraction and dynamic light scattering. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 8, n. 2, p. 1991-2000, 2019.

MITTAL, A.K *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles: elucidation of prospective mechanism and therapeutic potential. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.415, p.39-47, 2014.

MOHAGHEGH, S. *et al.* A comparative study of eco-friendly silver nanoparticles synthesis using *Prunus domestica* plum extract and sodium citrate as reducing agents. **Advanced Powder Technology**, v.31, n.3, p.1169-1180, 2020.

MOSAVINIYA, M. *et al.* Facile green synthesis of silver nanoparticles using *Crocus haussknechtii* Bois bulb extract: Catalytic activity and antibacterial properties. **Colloid and Interface Science Communications**, v.33, p.100211-100222, 2019.

NASROLLAHZADEH, M. *et al.* An Introduction to Nanotechnology. *In: An Introduction to Green Nanotechnology (Interface Science and Technology book series)*. NASROLLAHZADEH, M.; MOHAMMAD SAJADI, S.; SAJJADI,

M.; ISSAABADI, Z.; ATAROD, M. (eds.). Londres: Academic Press, v.28, p.1-27, 2019.

NAYAK, D. *et al.* Bark extract mediated green synthesis of silver nanoparticles: evaluation of antimicrobial activity and antiproliferative response against osteosarcoma. **Materials Science and Engineering: C**, v.58, p.44-52, 2016.

NISAR, P. *et al.* Antimicrobial activities of biologically synthesized metal nanoparticles: an insight into the mechanism of action. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v.24, n.7, p. 929-941, 2019.

OGUNSONA, E.O. *et al.* Engineered nanomaterials for antimicrobial applications: A review. **Applied Materials Today**, v.18, p. 100473-100504, 2020.

PANTIDOS, N.; HORSFALL, L.E. Biological synthesis of metallic nanoparticles by bacteria, fungi and plants. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v.5, n.5, p.1-10, 2014.

PAREEK, V; GUPTA, R; PANWAR, J. Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and bactericidal action? A review. **Materials Science and Engineering: C**, v.90, p.739-749, 2018.

PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução à espectroscopia**. Tradução da 4ª edição norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, capítulo 7, 2010.

PEROTTI, G.F. & DA COSTA, L.P. Biological Materials. *In: Reducing Agents in Colloidal Nanoparticle Synthesis*. Mourdikoudis, S. (editor). Croydon (UK): Royal Society of Chemistry. Cap.12, 2021.

PORTINHO, J.A; ZIMMERMANN, L.M; BRUCK, M.R. Efeitos benéficos do açaí. **International Journal of Nutrology**, v.5, n.1, p.015-020, 2012.

PRABHU, S.; POULOSE, E.K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. **International Nano Letters**, v.2, artigo 32, 2012.

RAI, M. *et al.* Broad-spectrum bioactivities of silver nanoparticles: the emerging trends and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.98, n.5, p.1951-1961, 2014.

RAJKUMAR, P.V. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using *Gymnema sylvestre* leaf extract and evaluation of its antibacterial activity. **South African Journal of Chemical Engineering**, v.32, n.1, p.1-4, 2020.

RAO, B.; TANG, R-C. Green synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activities using aqueous *Eriobotrya japonica* leaf extract. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v.8, n.1, artigo 015014, 2017.

RAO, K.J.; PARIA, S. Green synthesis of silver nanoparticles from aqueous *Aegle marmelos* leaf extract. **Materials Research Bulletin**, v.48, n.2, p.628-634, 2013.

RAZAVI, R. *et al.* Biosynthesis of metallic nanoparticles using mulberry fruit (*Morus alba L.*) extract for the preparation of antimicrobial nanocellulose film. **Applied Nanoscience**, v.10, n.2, p.465-476, 2020.

RISS, T.L. *et al.* Cell Viability Assays. In: **Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, et al., Editores: Assay Guidance Manual. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences**, 2004.

ROLIM, W.R. *et al.* Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity. **Applied Surface Science**, v.463, p.66-74, 2019.

ROY, A. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. **RSC Advances**, v.9, n.5, p.2673-2702, 2019.

SANTHOSHKUMAR, J.; RAJESHKUMAR, S.; KUMAR, S.V. Phyto-assisted synthesis, characterization and applications of gold nanoparticles—a review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v.11, p.46-57, 2017.

SARANYA, S. *et al.* Green synthesis of metallic nanoparticles using aqueous plant extract and their antibacterial activity. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.6, n.6, p.1834-1845, 2017.

SARATALE, R.G. *et al.* Exploiting fruit byproducts for eco-friendly nanosynthesis: *Citrus × clementina* peel extract mediated fabrication of silver nanoparticles with high efficacy against microbial pathogens and rat glial tumor C6 cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v.25, n.11, p.10250-10263, 2018.

SIDDIQI, K.S.; HUSEN, A.; RAO, R.A.K. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. **Journal of Nanobiotechnology**, v.16, n.1, artigo 14, 2018.

SIM, W. *et al.* Antimicrobial silver in medicinal and consumer applications: a patent review of the past decade (2007–2017). **Antibiotics**, v.7, n.4, p.93-107, 2018.

SINGH, J. *et al.* ‘Green’ synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation. **Journal of Nanobiotechnology**, v.16, n.1, p.1-24, 2018.

SIRELKHATIM, A. *et al.* Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. **Nano-Micro Letters**, v.7, n.3, p.219-242, 2015.

SHUKLA, A.K.; IRAVANI, S. Metallic nanoparticles: green synthesis and spectroscopic characterization. **Environmental Chemistry Letters**, v.15, n.2, p.223-231, 2017.

SOOD, R.; CHOPRA, D.S. Metal–plant frameworks in nanotechnology: an overview. **Phytomedicine**, v.50, p.148-156, 2018.

SRIKAR, S.K. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles: a review. **Green and Sustainable Chemistry**, v.6, n.1, p.34-56, 2016.

TUMMALAPALLI, M. *et al.* Facile and green synthesis of silver nanoparticles using oxidized pectin. **Materials Science and Engineering: C**, v.50, p.31-36, 2015.

UIVAROSI, V.; MUNTEANU, A.C. Flavonoid complexes as promising anticancer metallodrugs. *In: Flavonoids: From Biosynthesis to Human Health*. Justino, G.C. (ed.), London: IntechOpen, cap.14, p.305-333, 2017.

VAID, P. *et al.* Biogenic silver, gold and copper nanoparticles - A sustainable green chemistry approach for cancer therapy. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v.16, artigo 100247, 2020.

WAHYUNINGSIH, S. *et al.* The effect of pH and color stability of anthocyanin on food colorant. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v.193, n.1, artigo 012047, 2017.

WANG, C. *et al.* Preparation, characterization and application of polysaccharide-based metallic nanoparticles: a review. **Polymers**, v.9, n.12, p.689-721, 2017.

YADI, M. *et al.* Current developments in green synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts: a review. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v.46, n.3, p.S336-S343, 2018.

YAMAGUCHI, K.K. *et al.* Amazon Acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, v.179, p.137-151, 2015.

YANG, C. *et al.* Antibacterial mechanism for inactivation of *E. coli* by AgNPs@ polydoamine/titania nanotubes via speciation analysis of silver ions and silver nanoparticles by cation exchange reaction. **Microchemical Journal**, v.160, artigo 105636, 2021.