

SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA MEDIADA POR EXTRATOS AQUOSOS DE *EUTERPE OLERACEA* (AÇAÍ)

Gabriele Simas Ribeiro – UFAM - ICET
Prof. Dr. Gustavo Frigi Perotti – UFAM - ICET

E-mail para contato: gaby15simas@gmail.com

Eixo Temático: 2.1.1 Ciências Exatas e da Terra.

Categoria: Comunicação oral

RESUMO

A pesquisa envolvendo a síntese verde para a formação de nanopartículas metálicas vem se destacando na área nanotecnológica por seguir uma rota diferente da convencional cujas substâncias utilizadas se tornam responsáveis por apresentar potenciais riscos ao meio ambiente e a sistemas biológicos. Desta forma, procedimentos que utilizam compostos fitoquímicos se mostram como alternativas eficientes de formação de nanopartículas metálicas através da utilização de extratos vegetais. O açaí, típico da região amazônica, possui substâncias que apresentam potencialidade na mediação de formação de sistemas nanoparticulados, deste modo, este trabalho tem como objetivo investigar a produção de nanopartículas de prata (AgNPs) mediada por açaí e sua eficiência microbicida. As sínteses das AgNPs foram realizadas em três condições distintas de concentração de extrato, com procedimentos em temperatura ambiente e elevadas, avaliando parâmetros de velocidade de reação, estabilidade das AgNPs formadas e concentração do extrato. As nanopartículas produzidas em temperatura ambiente foram submetidas a testes antimicrobianos, apresentando resultados eficientes contra a espécie *Staphylococcus aureus*, comprovando seu efeito microbicida especialmente frente a bactérias Gram-positivas.

Palavras-chave: Nanopartícula. Química Verde. Ensaio antimicrobianos.

1. INTRODUÇÃO

Diante da integração entre ciência e tecnologia, a nanotecnologia proporciona a geração de novos produtos que melhoram a qualidade de vida dos seres humanos. As pesquisas que envolvem essa área buscam manipular estruturas em nanoescala, por exemplo, para minimização de impactos que diversos materiais causam ao meio ambiente (DISNER; CESTARI, 2016). Os investimentos acerca da nanociência abrangem todas as áreas de conhecimento, resultando na produção de materiais que apresentam propriedades novas e/ou intensificadas em comparação aos sistemas micro e macroparticulados e, por consequência, são empregados em diferentes áreas, como a microbiologia, catálise, eletrônica e ciências biomédicas. Na escala nanométrica, 1-100nm, são observadas propriedades, como por exemplo, tolerância à temperatura, variedade de cores, alteração da reatividade química, e algumas nanopartículas de prata e ouro exibem

Anais da XIII Semana Nacional de Ciência e Tecnologia ICET/UFAM e IFAM
21 a 26 de outubro de 2019 – Itacoatiara/Amazonas

propriedades antibacterianas interessantes, sendo amplamente investigada sua eficácia bactericida (FERREIRA; VARELA, 2009)

Atualmente investiga-se a possibilidade de utilizar rotas sintéticas alternativas para a produção de nanopartículas metálicas em detrimento às rotas químicas usuais (THAKKAR; MHATRE; PARIKH, 2010). Em busca de processos favoráveis ao meio ambiente e de aplicações em sistemas biológicos, conceitos da Química Verde são empregados em nanotecnologia, propiciando vantagens em relação aos métodos físicos e químicos que empregam compostos potencialmente nocivos para a síntetização de nanopartículas metálicas (RAFIQUE et al., 2017). O uso de extratos vegetais na produção de nanopartículas de prata (AgNPs) tem um impacto muito significativo sobre a viabilidade ambiental e econômica, além de propiciar aplicações que não são possíveis ao se utilizar precursores potencialmente tóxicos (BEYENE et al., 2017).

Na região amazônica há uma grande biodiversidade de plantas e frutas que possuem características favoráveis à síntese de nanopartículas metálicas, como o açaí (*Euterpe oleracea*), um fruto amplamente utilizado no ramo alimentício. O açaí tem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, devido à sua composição química, principalmente por conter substâncias bioativas, tais como polifenóis e entre eles destacam-se os flavonoides, tendo como principal representante dessa classe as antocianinas, com acentuado caráter antioxidantes. Tais substâncias podem atuar como agentes estabilizantes e redutores de íons prata em solução, produzindo dispersões coloidais de nanopartículas. Há quantidade significativa de estudos relacionados aos valores nutricionais do açaí em aplicações cosméticas, farmacêuticas e alimentícias (YAMAGUCHI et al., 2015), no entanto, quase não se encontra trabalhos relacionados a aplicações tecnológicas e desse modo, esse trabalho busca difundir conhecimento tecnológico e agregar valor a essa matéria-prima através da obtenção de nanopartículas de prata auxiliada por extratos aquosos de açaí, juntamente com investigação do potencial microbiocida das AgNPs produzidas. O presente trabalho visa a obtenção nanopartículas de prata através da síntese mediada por extratos de açaí em diferentes condições de síntese e a verificação da atividade microbiocida dos coloides metálicos preparados.

2. METODOLOGIA

MATERIAIS

Açaí do comercio Casa do Açaí, Itacoatiara-AM.; Agar Mueller Hinton Kasvi; Agitador Magnético SPLabor; Autoclave; Balança Analítica Shimadzu AUY220; Barra

magnética; Béqueres de 25, 50 e 100 mL; Centrifuga Centrobio; Espectrofotômetro Visível Digital Microprocessador Quimis ISO 8001; Espectrofotômetro Visível SP-22 Biospectro; Estufa - Nova Ética; Microrganismos: *Salmonella spp.*; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; Nitrato de prata Laderquímica; Placas de Petri estéreis de poliestireno; Pipeta graduada de 2 mL, 5 mL; Pipeta volumétrica de 50 mL; Tubos de ensaio.

MÉTODOS

Os extratos de açaí foram obtidos através do despulpamento manual das frutas adquiridas no município de Itacoatiara-AM. O procedimento de higienização dos frutos de açaí que antecede a etapa de despulpamento consistiu na lavagem em água corrente e imersão do fruto em uma solução de hipoclorito de sódio (2,5% m/m) durante 15 min. Os frutos de açaí foram lavados para remoção do cloro, em seguida iniciou-se o processo de maceração do açaí em água morna por 30 min, obtendo o extrato concentrado do fruto. Posteriormente realizou-se a centrifugação do extrato para remoção de sólidos presentes, e então o extrato foi acondicionado em um recipiente e disposto no freezer.

Os extratos de açaí usados na mediação da formação das AgNPs foram preparados com auxílio das leituras obtidas por espectrofotômetro. Através de processos de diluição foi monitorada a banda de máximo de absorção entre 200 e 285 nm (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008) de forma que a solução produzida tenha sempre inicialmente absorvância igual ou próxima de 1,0 u.a. Na sequência, a solução de nitrato de prata (AgNO_3) 0.1×10^{-3} mol/L foi preparada, acondicionada em béqueres revertidos com papel alumínio para minimizar a foto-ativação do AgNO_3 com a luz (AZIZI et al., 2017) e então quantidades de extrato de açaí nas proporções 1:1 (2,5 mL de extrato + 2,5 mL de H_2O destilada), 1:2 (1,4 mL de extrato + 3,6 mL de H_2O destilada) e 1:4 (1 mL de extrato + 4 mL de H_2O destilada) foram adicionadas na solução, sob agitação constante por 24h e temperatura ambiente. Os testes usaram 5 mL de extrato de açaí e 50 mL de solução de nitrato de prata, de modo a totalizar sempre um volume de mistura de 55 mL. Posteriormente, realizou-se um procedimento de monitoramento de síntese de nanopartículas de prata para a condição 1:1, em temperaturas de 40 °C e 50 °C pelo período de 7 dias.

A evolução na produção das AgNPs foi acompanhada pela técnica da espectroscopia eletrônica no UV-vis, através do monitoramento da banda associada à ressonância de plasmon de superfície, localizada em 440 nm (PRATHNA et al., 2011). Após o início do contato entre as soluções, foram retiradas alíquotas de 5 em 5 minutos

nos primeiros 30 min, após cada meia hora para acompanhamento na evolução da reação por um período de 4 h, posteriormente em 12 h, 24 h, 36 h, 48 h e 7 dias.

Para os testes antimicrobianos foram utilizados três microrganismos distintos, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O procedimento ocorreu em quatro etapas: Na primeira etapa houve o preparado do meio de cultura nas proporções de 36 g de ágar para 1 L de água destilada, em seguida o meio foi disseminado em placas de Petri estéreis e acondicionado na estufa à 37 °C. Na segunda etapa houve o procedimento denominado de repique das bactérias, no qual estas foram adicionadas em placas de Petri de forma estriada para o crescimento isolado, cultivadas e incubadas por um período de 24 h em temperatura de 37 °C na estufa. Na terceira etapa verteram-se as bactérias no meio de cultura, no qual a solução contendo-as apresentou absorvância de 0,03. Na última etapa foram introduzidas em sequência alíquotas das AgNPs (1:1, 1:2 e 1:4 à temperatura ambiente) produzidas no tempo de 24 h, do extrato de açaí e da solução de nitrato de prata nas placas de Petri, para serem incubadas a 37 °C por 24 h; os experimentos foram realizados em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o auxílio do espectrofotômetro foram realizadas leituras no espectro UV-vis de amostras do extrato de açaí e do teste inicial de síntese das nanopartículas de prata (5mL de extrato + 50 mL de AgNO₃). Os dados obtidos no procedimento foram dispostos na Figura 1 para serem analisados, permitindo a determinação de um comprimento de onda na faixa de 440 nm no qual novos testes foram realizados. Os polifenóis presentes no açaí são identificados em uma faixa condizente aos picos dispostos na Figura 1, particularmente os flavonoides das classes flavonas, flavonóis e flavanonas que possuem uma intensa absorção na faixa de 240 e 285 nm (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008; CEDRIM; BARROS; NASCIMENTO, 2018). É explícita a dificuldade em visualizar a banda associada à formação de nanopartículas de prata pela técnica de espectroscopia eletrônica no UV-vis que é identificada próximo a 440 nm (PRATHNA et al., 2011). Este comportamento pode ser justificado devido a baixos níveis de formação de nanopartículas no meio reacional em tempos de reação baixos.

Os dados obtidos nas novas condições de extrato (1:1, 1:2 e 1:4) com a finalidade de se observar fatores como velocidade de reação e estabilização na síntese das nanopartículas, foram apresentados na Figura 2. Com o progresso da reação é notável um crescimento nos valores de absorvância nas diferentes condições em relação ao

tempo, este aumento pode ser relacionado com a quantidade de espécies absorventes (nanopartículas) no sistema, e, portanto havendo uma mudança de coloração (KOUVARIS et al., 2012). As nanopartículas de prata apresentam uma coloração marrom amarelada característica, devido às excitações de vibrações dos *plasmons* de superfície (SONG; KIM, 2009), podendo ser observado na Figura 3. Nas dimensões nanométricas, a nuvem de elétrons oscila em sua superfície e absorvem radiação eletromagnética a uma determinada energia, essa ressonância é denominada como ressonância de plasmons, uma consequência do seu pequeno tamanho (SMITHA et al., 2008).

Figura 1 - Espectro UV-vis do extrato de açaí 1:1 (azul) e das AgNPs produzidas (1:1) (vermelho).

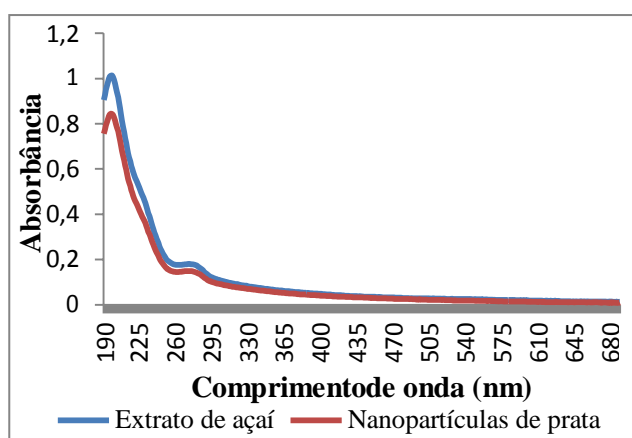
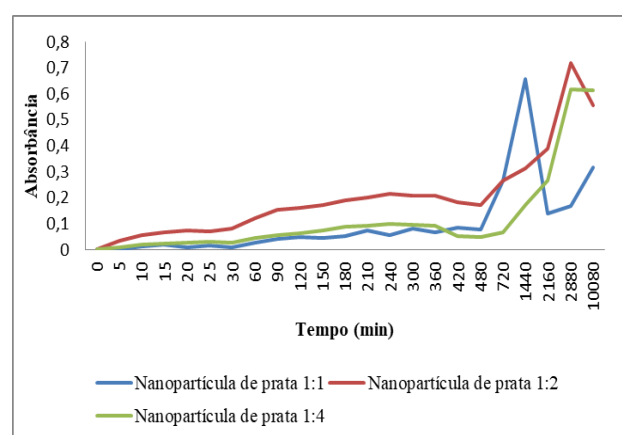


Figura 2 - Absorbância em 440 nm em função do tempo do meio reacional a T_{ambiente} .



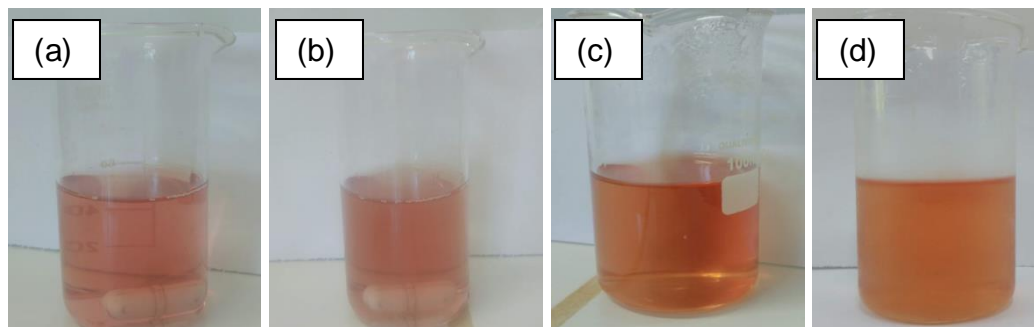
Após diferentes períodos de tempo foi observado que o comportamento do meio reacional apresentou alterações, como a alteração de coloração na solução de nanopartícula de prata, podendo ser verificado na condição 1:1 (Figura 3).

Na Figura 2 é observado um declínio/estabilização na absorvância registrada no tempo de 2 dias (2880 min), sendo que esse fenômeno pode estar relacionado à diminuição da concentração dos componentes do extrato que reduzem os íons prata e auxiliam na formação e concentração das nanopartículas, acarretando na coalescência destas.

As reações que ocorrem em temperatura ambiente expõem o mesmo comportamento até 4h de análise, observando que somente após esse período aumenta-se a absorvância dos coloides que estão em produção. A quantidade de extrato que cada condição apresenta influência no máximo de absorvância detectado, de modo que a condição de maior concentração atinge o máximo de absorvância em menor tempo, este comportamento pode ser visualizado na Figura 2. A redução dos íons Ag^+ no meio reacional não acontece instantaneamente, do mesmo modo, a estabilização das nanopartículas formadas requer um tempo mínimo. Portanto, se for acelerada a redução

dos íons Ag^+ , as AgNPs formadas estarão revestidas parcialmente pelas biomoléculas do extrato que auxiliarão na estabilização dos coloides e conseqüentemente haverá a sua precipitação, acarretando na redução na absorvância no extrato 1:1 em intervalos reduzidos de tempo.

Figura 3 - Coloide de nanopartícula de prata na condição de extrato 1:1 (a) 5 minutos de reação, (b) 4h de reação e (c) 24h de reação e (d) 48h de reação.



Fonte: a Autora, 2019.

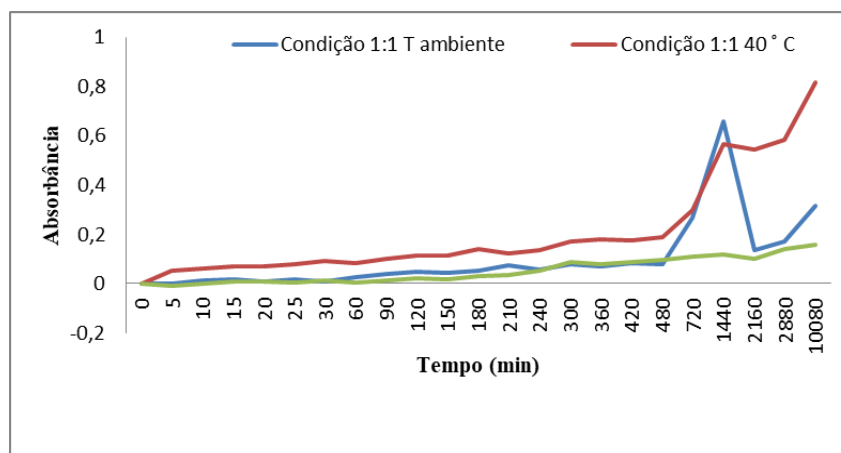
Para as AgNPs produzidas com extrato vegetal na proporção 1:1, após 7 dias (10080 min) os valores de absorvância apresentaram um aumento expressivo frente à medição de 2880 min, sendo que esse fenômeno pode estar ligado a presença de micropartículas precipitadas que foram ressuspensas no momento da medição, acarretando em um bloqueio/espalhamento do feixe luminoso e acaba sendo interpretado pelo equipamento como um aumento na absorvância.

Outro parâmetro que pode influenciar a velocidade de formação das AgNPs é a variação de temperatura. Essa variável pode atuar de duas maneiras antagônicas: a primeira é aumentando a energia cinética dos reagentes, e logo, pode-se aumentar a velocidade da reação (NATSUKI; HASHIMOTO, 2015) e a segunda afeta de modo desfavorável, acarretando na degradação das biomoléculas, como as antocianinas presentes no extrato vegetal (SPRENGER et al., 2016). Adicionalmente, o processo de degradação do extrato pode ocorrer por outros fatores, como luz, a exposição a ambientes oxidantes (contato com ar atmosférico) e contato com microrganismos (BIESAGA, 2011). O efeito da degradação pode ser visualizado na condição de síntese de nanopartículas 1:1 à temperatura de 50 °C como pode ser observado na Figura 4, sendo a condição 1:1 escolhida por apresentar primeiro o máximo de absorvância em comparação as outras condições em temperatura ambiente, havendo uma maior quantidade de nanopartículas formadas. Nas condições de síntese estudadas, utilizando o extrato de açaí, observa-se um aumento pouco expressivo na absorvância do coloide metálico produzido, indicando uma diminuição na velocidade de reação para produção

das AgNPs. O processo de síntese das nanopartículas quando conduzidas em temperaturas elevadas promovem alterações que podem estar ligadas a mudanças no perfil fenólico (PAEPE et al., 2014) e/ou de outras biomoléculas capazes de atuar como agentes redutores na reação de transformação da prata catiônica.

A produção de nanopartículas metálicas à temperatura de 40 °C ocorreu de forma mais acelerada, notando-se alterações da coloração para um tom amarronzado intenso em menor tempo, além de não apresentar precipitação de sólidos após 24 h de monitoramento quando comparada a síntese em temperatura ambiente. Na Figura 4 é observado um expressivo aumento nos valores de absorbância na condição 1:1 em 40 °C, sem variações significativas destes valores no período de 8 h (480 min) de análise. A velocidade de redução dos íons Ag^+ em Ag^0 parece não ser influenciada pelo aumento de temperatura, no entanto auxilia na etapa de estabilização das AgNPs com as biomoléculas do extrato, formando coloides mais estáveis e que não coalescem no intervalo de tempo investigado.

Figura 4 - Evolução da absorbância em 440 nm em função do tempo para a síntese das nanopartículas de prata em diferentes valores de temperatura com o extrato de açaí na condição 1:1.

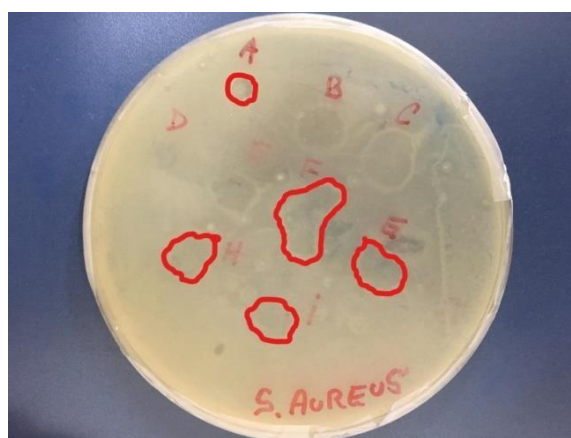


A etapa seguinte aos testes de temperatura consistiu em avaliar a capacidade antimicrobiana das nanopartículas sintetizadas em temperatura ambiente, com as bactérias *Salmonella spp.*; *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Na Figura 5 é apresentado o resultado antimicrobiano para a bactéria *S.aureus*, sendo esta uma bactéria Gram-positiva.

Existem fatores que afetam a atividade antibacteriana das nanopartículas, como por exemplo, o tipo de bactéria empregada no estudo, existindo diferença de susceptibilidade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas a compostos devido às estruturas de parede celular serem distintas. As bactérias Gram-positivas são menos

susceptíveis em relação aos agentes antibacterianos de prata do que as Gram-negativas, por conter uma camada de peptidoglicano mais espessa, essa parede bacteriana é projetada para fornecer força, rigidez e proteger a célula de mecanismos que possam danificá-la (DAKAL et al., 2016). O peptidoglicano é um polímero composto por açúcares e aminoácidos que atua contra agentes bacterianos, tais como antibióticos. As AgNPs podem atacar a membrana bacteriana, de forma que os íons Ag^+ produzidos pelas nanopartículas interagem com a camada de peptidoglicano induzindo a fragmentação das células bacterianas (YUN et al., 2013).

Figura 5 - Teste antimicrobiano para *S.aureus* - A) Extrato de açaí; F) Nanopartícula em condição 1:1; G) Nanopartícula em condição 1:2; H) Nanopartícula em condição 1:4; I) Controle negativo.



Fonte: a Autora, 2019.

Os testes realizados com o extrato de açaí demonstraram maior eficácia em relação ao halo de inibição para *S.aureus*, no qual compostos bioativos como polifenóis e antocianinas podem atuar tanto como agentes antioxidantes ou espécies antimicrobianas (SPRENGER et al., 2016). É notável na Figura 5 que o maior halo de inibição se caracteriza pela AgNPs produzida na condição 1:1 representado pela letra F, devido a maior concentração de extrato, e também por apresentar uma maior quantidade de prata nanoparticulada, como revelaram os ensaios de absorvância para o tempo de 1440 min. Com há redução na quantidade do extrato disponível para reduzir o cátion prata (condições 1:2 e 1:4), formou-se uma menor quantidade de AgNPs e esses halos de inibição foram significativamente menores que na condição de extrato 1:1. Para os testes foi utilizado o nitrato de prata $0,1 \times 10^{-3}$ mol/L como controle negativo, no qual essa solução demonstrou uma leve efeito inibitório no crescimento das bactérias, sendo que a conversão do cátion Ag^+ em AgNPs potencializou seu efeito microbicida, possivelmente associado à maior capacidade que as AgNPs têm de induzir a formação de espécies reativas de oxigênio nesses microrganismos (KĘDZIORA et al., 2018). Os testes antibacterianos para

Salmonella spp. e *E. coli*. apresentaram um resultado pouco expressivo em comparação com a bactéria *S. aureus*, podendo ser associado ao método utilizado ou às características da parede celular mencionadas anteriormente.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do conhecimento das substâncias antioxidantes que estão presentes no açaí (*Euterpe oleracea*) pode-se compreender a viabilidade da produção das nanopartículas metálicas. Diante dos testes realizados, os coloides de nanopartículas obtidos mediados pelo extrato de açaí exibiram potencial antimicrobiano interessante, principalmente para o microrganismo *Staphylococcus aureus*, de modo que é notável uma maior eficiência quando se utilizam extratos em concentrações menores. Observou-se também que a temperatura afeta as características das nanopartículas produzidas, de modo que sistemas mais estáveis foram produzidos com um leve aumento nesse parâmetro. Dessa forma, sugere-se que novos estudos possam ser realizados, principalmente relacionados com a averiguação da atividade microbicida das nanopartículas de prata produzidas em condições de temperatura distintas.

5. REFERÊNCIAS

- AZIZI, M. et al. Synthesis of silver nanoparticles using *Peganum harmala* extract as a green route. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v.10, n.4, p.420-427, 2017.
- 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.
- DISNER, G.R.; CESTARI, M.M. Nanociência & Nanotecnologia. **Evidência, Joaçaba**, v.16, n.1, p.71-76, 2016.
- BIESAGA, M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v.1218, n.18, p.2505-2512, 2011.
- CEDRIM, P.C.A.S.; BARROS, E.M.A.; NASCIMENTO, T.G. Antioxidant properties of acai (*Euterpe oleracea*) in the metabolic syndrome. **Brazilian Journal Of Food Technology**, v.2, e2017092, 2018.
- FERREIRA, H.S.; VARELA, M.C.R.S Nanotecnologia: Aspectos Gerais e Potencial de Aplicação em Catalise. **Química Nova**, v.32, n.7, p.1860-1870, 2009.
- HUBER, L.S; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Flavonóis e Flavonas: Fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Câncer**, v.19, n.1, p.97-108, 2008.

- KĘDZIORA, A. et al. Similarities and differences between silver ions and silver in nanoforms as antibacterial agents. **International Journal Of Molecular Sciences**, v.19, n.2, E444, 2018.
- KOUVARIS, P. et al. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles produced using *Arbutus Unedo* leaf extract. **Materials Letters**, v.76, p.18-20, 2012.
- NATSUKI, J.; HASHIMOTO, Y. A review of silver nanoparticles: synthesis methods, properties and applications. **International Journal of Materials Science and Applications**, v.4, n.5, p.325-332, 2015.
- PRATHNA, T.C. et al. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by *Citrus limon* (lemon) aqueous extract and theoretical prediction of particle size. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.82, n.1, p.152-159, 2011.
- PAEPE, D.D. et al. Thermal degradation of cloudy apple juice phenolic constituents. **Food chemistry**, v.162, p.176-185, 2014.
- RAFIQUE, M. et al. A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v.45, n.7, p.1272-1291, 2017.
- SMITHA, S.L. et al. Studies on surface plasmon resonance and photoluminescence of silver nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.71, n.1, p.186-190, 2008.
- SONG, J.Y.; KIM, B.S. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.32, n.1, p.79-84, 2009.
- SPRENGER, L.K. et al. In vitro antibacterial effect of *Euterpe oleracea* Mart. and *Theobroma grandiflorum* hydroalcoholic extracts. **Archives of Veterinary Science**, v.21, n.2, p.21-32, 2016.
- THAKKAR, K.N.; MHATRE, S.S; PARIKH, R.Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.6, n.2, p.257-262, 2010.
- YAMAGUCHI, K.K. et al. Amazon Acai: Chemistry and biological activities: a review. **Food Chemistry**, v.179, p. 137-151, 2015.
- YUN, H. et al. Antibacterial activity of CNT-Ag and GO-Ag nanocomposites against Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v.34, n.11, p.3261-3264, 2013.