

SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS MEDIADA POR EXTRATOS DE *Paullinia cupana* (GUARANÁ)

Carolyne Rodrigues Ribeiro – UFAM - ICET
Prof.Dr. Gustavo Frigi Perotti – UFAM - ICET

E-mail para contato: carolynerodriguesribeiro@gmail.com

Eixo Temático: 2.1.1 Ciências Exatas e da Terra

Categoria: comunicação oral

RESUMO

Pesquisas na área de nanotecnologia que envolvem a preparação de nanopartículas metálicas por métodos alternativos vem sendo difundidas pela abordagem da Química Verde, e, em vista das diversas problemáticas que permeiam os métodos convencionais, novas mediações menos nocivas ao meio ambiente permitem explorar procedimentos que utilizam recursos naturais como o uso de extratos vegetais para a síntese de nanopartículas metálicas. O guaraná (*Paullinia cupana*) dispõe de substâncias que indicam potencial para a síntese de nanopartículas de prata (AgNPs). O presente trabalho procurou investigar parâmetros com o auxílio do espectro de absorção na região do UV-vis para compreender a formação das AgNPs utilizando diferentes concentrações de extrato de guaraná, além de monitorar a síntese em diferentes temperaturas e verificar por meio de testes antibacterianos a ação biocida das nanopartículas formadas. Dentre as metodologias estudadas, a condição com maior concentração de extrato de guaraná exibiu maior produção de AgNPs em relação às outras condições a temperatura ambiente, evidenciada pela maior absorbância referente à banda de ressonância de *plasmon* de superfície da prata nanoparticulada. Destaca-se a capacidade de estabilização e aumento na velocidade de formação das AgNPs em função do aumento de temperatura. As nanopartículas de prata foram submetidas a testes antibacterianos, proporcionando resultados eficientes contra *Staphylococcus aureus*, atestando efeito microbicida contra bactérias Gram-positivas.

Palavras-chave: Guaraná (*Paullinia cupana*). Ensaios microbiológicos. Rotas sintéticas alternativas.

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia emprega a manipulação da matéria a nível atômico, molecular e macromolecular, objetivando a criação de diversos dispositivos, materiais e sistemas que apresentam propriedades melhoradas, novas propriedades e aplicações variadas (FERREIRA; VARELA, 2009). Adicionalmente, as propriedades antibacterianas que as nanopartículas metálicas dispõem são consideradas promissoras (NETCHAREONSIRISUK et al., 2016). As nanopartículas de prata apresentam efeitos inibitórios e/ou bactericidas (GEOPRINCY et al., 2013). Alguns estudos relatam que as nanopartículas de prata não interagem somente com a superfície da membrana, mas são capazes de penetrar no interior das bactérias (SHARMA; YNGARD; LIN, 2009).

A síntese verde é uma abordagem simples, que possibilita a produção de novas estruturas a baixo custo e rejeita a possibilidade de risco ecológico. Dentro desse contexto, pesquisas que envolvem a produção de nanopartículas metálicas mediadas por extratos vegetais se destacam no campo da nanotecnologia (BEYENE et al., 2017). A síntese de nanopartículas metálicas utilizando extratos de plantas é vista como alternativa adequada para métodos tradicionais de síntese de materiais em nanoescala por se tratar de uma rota economicamente viável e poder ser utilizada para produção em grande escala de nanopartículas. Os componentes dos extratos das plantas, como enzimas, proteínas, aminoácidos e vitaminas podem atuar como agentes redutores e agentes de recobrimento de síntese de nanopartículas (IRAVANI, 2011).

Dentre as substâncias químicas que compõe o guaraná (*Paullinia cupana*), ressaltam-se os taninos condensados, sendo estes flavonoides compostos por unidades monoméricas interligadas, sendo as catequinas uma das principais substâncias presentes (SOUSA et al., 2010). As catequinas são constituídas por um anel floroglucinol, um anel pirânico e um anel catecol. A eficiência antioxidante das catequinas é comprovada, mesmo em pequenas quantidades, e a presença da unidade catecol proporciona estabilidade à forma oxidada do polifenol, de modo que este anel permite a complexação de determinados íons de metais de transição (PORTO, 2002).

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo obter nanopartículas de prata através da síntese mediada por extratos de guaraná em diferentes condições de síntese e verificar a atividade microbocida dos coloides metálicos preparados, além de realizar a caracterização dos extratos vegetais e dos produtos de síntese pela espectroscopia eletrônica UV-vis.

2. METODOLOGIA

Coleta do pó e dos extratos: O pó de guaraná foi obtido do comércio local do município de Maués-AM. Inicialmente foram realizados testes de dissolução do pó em diferentes proporções com água destilada para investigação de parâmetros de solubilidade e presença de material sólido após dispersão em água. Como foi detectada a presença de material insolúvel, a mistura foi centrifugada em uma centrífuga de marca Centribio modelo 80 - 2B por 10 minutos a 3000 rpm e a fração sólida descartada. Os extratos de guaraná usados na mediação da formação das nanopartículas foram preparados com auxílio das leituras obtidas por espectrofotômetro visível da Quimis modelo Q798DRM. Através de processos de diluição foi monitorada a banda de máximo de absorção em 200 nm, atribuída a catequina (ANDERSEN; MARKHAM, 2005), de forma a garantir absorvância do extrato igual ou próxima de 1,0 u.a.

Testes dos extratos para síntese de nanopartículas: Uma solução de nitrato de prata $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ da marca Laderquímica foi preparada e então uma quantidade determinada de extrato padronizado de guaraná foi adicionada na solução, e a mistura foi acondicionada em um béquer revestido por papel alumínio para minimizar a fotoativação do nitrato de prata com a luz (AZIZI et al., 2017), e permaneceu sob agitação constante e temperatura ambiente no agitador magnético da marca Fisatom modelo 753A. Os testes iniciais usaram 5 mL de extrato de guaraná e 50 mL de solução de nitrato de prata, de modo a totalizar sempre um volume de mistura de 55 mL. Para realizar novos testes para síntese de nanopartículas de prata, elaborou-se 3 condições com concentrações distintas de extrato vegetal (1:1, 1:2 e 1:4) sob agitação constante e temperatura ambiente. Adicionalmente, foram realizados mais dois procedimentos distintos para a condição 1:1, de forma a monitorar a produção das nanopartículas em temperatura de $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em diferentes intervalos de tempo.

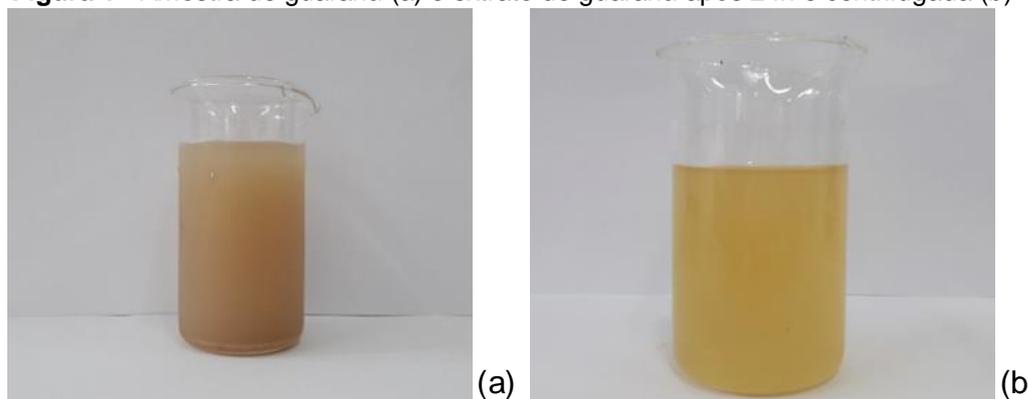
A produção das nanopartículas de prata foi acompanhada pela técnica da espectroscopia eletrônica no UV-vis, através do monitoramento da banda associada à ressonância de *plasmon* de superfície, localizada entre 400 e 500 nm. Após o início do contato entre as soluções, foram retiradas alíquotas de 5 em 5 minutos até os primeiros 30 min para acompanhamento na evolução da reação por um período de até 4 h. Na sequência, as leituras foram realizadas no tempo 12 h, 36 h, 24 h, 48 h e em 7 dias.

Teste antimicrobiano: Utilizou-se 3 microrganismos distintos para testes antimicrobianos, sendo estes *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Inicialmente, preparou-se o meio de cultura na proporção de 36 g de ágar Mueller-Hinton da marca Kasvi para 1 L de água destilada e posteriormente o meio foi difundido nas placas de Petri estéreis e acondicionado na estufa da marca Nova Ética modelo 402 - 3D a 37 °C. Na segunda etapa ocorreu o repique das bactérias, no qual estas foram adicionadas em placas de Petri de forma estriada para o crescimento isolado e inoculadas por 24 h na estufa a 37 °C. Logo em seguida, a terceira etapa se concretizou por verter as bactérias no meio de cultura. A etapa final consistiu em introduzir de forma organizada alíquotas das condições de nanopartículas que são 1:1, 1:2, 1:4 - temperatura ambiente, extrato de guaraná e solução de nitrato de prata (controle negativo) nas placas de Petri, para então serem incubadas por 24 h a 37 °C. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um parâmetro foi definido acerca da concentração e condições no qual o extrato foi preparado. Deste modo, 1g do pó de guaraná foi disposto em 100 mL de água destilada e com o auxílio de um liquidificador, a solubilização ocorreu por 10 minutos com finalidade de aumentar a área superficial para melhor extração dos constituintes químicos do guaraná, conforme mostrado na Figura 1 (a). A amostra foi armazenada por 24 horas e posteriormente centrifugada para que o material sólido em suspensão fosse retirado, conforme observado na Figura 1(b).

Figura 1 - Amostra de guaraná (a) e extrato de guaraná após 24h e centrifugada (b)

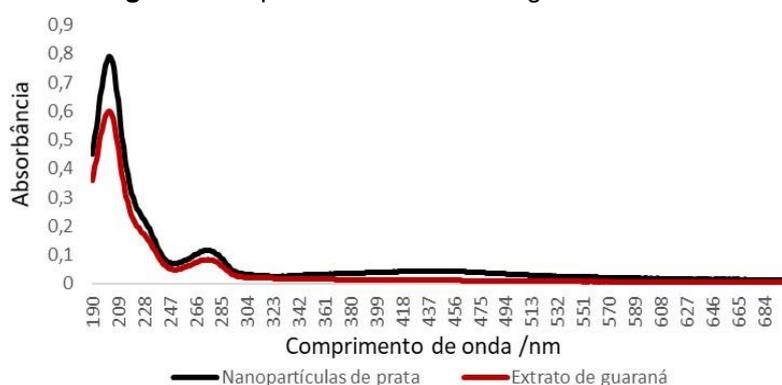


Fonte: A autora, 2019.

Nas varreduras do extrato de guaraná e do teste inicial para síntese de nanopartículas metálicas feitas pela espectroscopia eletrônica UV-vis para se determinar

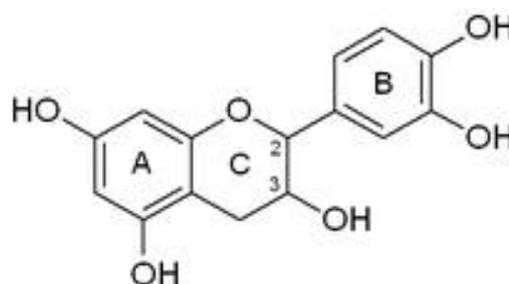
os comprimentos de onda referente à ressonância dos *plasmons* de superfície, foi possível obter o espectro mostrado na Figura 2, possibilitando a identificação do comprimento de onda para a realização dos testes posteriores. No espectro eletrônico do extrato de guaraná, os flavonoides presentes são verificáveis em uma faixa correspondente aos primeiros sinais presentes em menores comprimentos de onda, fazendo-se notável pelo sinal do anel catecol (anel A) na catequina (Figura 3) entre 250 e 300 nm (SOUZA; PERALTA-ZAMORA, 2001; MAOELA et al., 2009). Já a banda em 200 nm está associada a outro grupo presente na catequina, o cinamoil (anel B) (MAOELA et al., 2009). A evolução da formação das AgNPs em meio reacional é verificada em uma faixa de 380 a 500 nm, apresentando uma banda plasmônica alargada, indicando uma polidispersão no tamanho das partículas produzidas (JAIN et al., 2009).

Figura 2 - Espectro eletrônico na região do UV-vis.



Fonte: A autora, 2019.

Figura 3 - Estrutura da catequina.



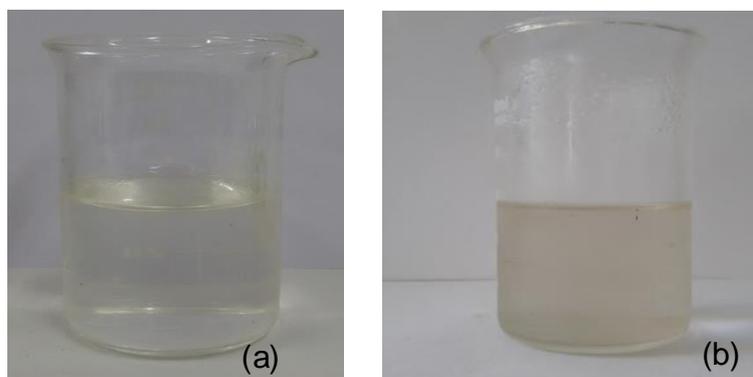
Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com>.

À medida que a reação avança em função do tempo, a absorvância gradativamente se eleva, o que indica um aumento na quantidade de espécies absorventes presentes no meio reacional (ŠILEIKAITĖ et al., 2009). A coloração amarelo amarronzada observada pelas dispersões coloidais oriundas da mistura entre nitrato de prata e o extrato de guaraná é devido ao efeito de ressonância plasmônica de superfície nas nanopartículas metálicas formadas (DUBEY et al., 2009), podendo ser visualizado na Figura 4.

Na verificação da influência da concentração dos reagentes na cinética de formação das nanopartículas através do acompanhamento da absorvância do comprimento de onda de 440 nm, obteve-se o espectro da Figura 5, onde se mediu inicialmente o valor de referência para cada condição substituindo pelo mesmo volume a solução inicial de nitrato de prata por água destilada na mistura com o extrato vegetal nas diferentes condições de síntese. Os valores de absorvância obtidos durante o

procedimento de síntese de nanopartículas de prata foram subtraídos do valor de referência, 1:1 (2,5 mL de água + 2,5 mL de extrato + 50 mL de H₂O), 1:2 (3,4 mL de água + 1,6 mL de extrato + 50 mL de H₂O) e 1:4 (4 mL de água + 1 mL de extrato + 50 mL de H₂O).

Figura 4 – Imagens das dispersões coloidais na condição 1:1 (extrato:água) para o tempo de reação de 5 min (a) 24 h (b).



Fonte: A autora, 2019.

Observa-se na condição 1:1 que, por volta de 24 h, a mistura reacional apresentou um crescimento gradual em sua absorbância até o tempo 36 h. Após esse intervalo de tempo, a absorbância do meio apresentou um declínio até o período investigado de 7 dias do progresso de reação. Uma queda no valor de absorbância, conforme mostrado para a condição de extrato 1:1 pode estar associada à coalescência das nanopartículas em virtude da maior quantidade de partículas produzidas em comparação as condições 1:2 e 1:4. Tal fato pode estar relacionado com o total de biomoléculas disponíveis para atuar como agentes de recobrimento estar em quantidades insuficiente e/ou não tiveram tempo suficiente para se ligarem à superfície das nanopartículas para promoverem a sua estabilização.

Figura 5 – Evolução da absorbância em 440 nm em função do tempo a temperatura ambiente do meio de reação para as proporções de guaraná:água 1:1 (azul), 1:2 (vermelho) e 1:4 (cinza).

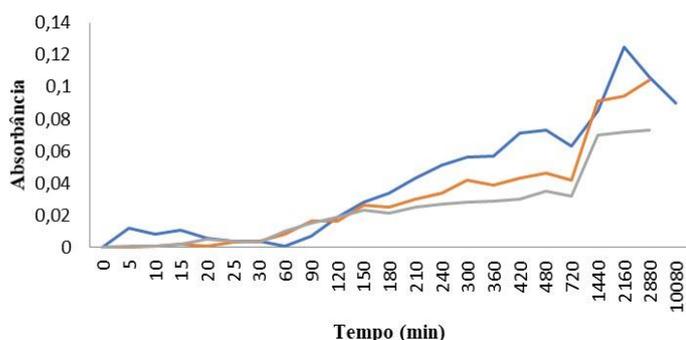
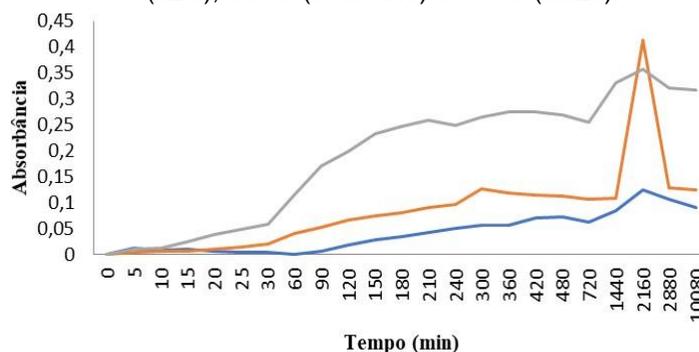


Figura 6 – Evolução da absorbância dos meios de reação em 440 nm na condição 1:1 (extrato: água) em função do tempo e nas temperaturas ambiente (azul), 40 °C (vermelho) e 50 °C (cinza).



Fonte: A autora, 2019.

Outro parâmetro que pode influenciar a velocidade de formação das AgNPs é a variação de temperatura, que pode atuar aumentando a energia cinética dos reagentes, e logo, aumenta a velocidade da reação. Contudo, um aumento nesse parâmetro pode acarretar a degradação das biomoléculas presentes no extrato vegetal. Adicionalmente, o processo de degradação do extrato pode ocorrer por outros fatores, como por exposição à luz, a ambientes oxidantes (contato com ar atmosférico) e contato com microorganismos (BIESAGA, 2011). Como o produto final do guaraná disponível para consumo é oriundo do processo de torrefação, há a transformação de diversas biomoléculas inicialmente presentes nessa estrutura vegetal (ANTUNES, 2011). Logo, um pequeno aumento na temperatura do meio de reação para a produção das nanopartículas de prata é insuficiente para induzir transformações profundas na capacidade antioxidante dos polifenóis e outras moléculas presentes no extrato do guaraná. Ao observar os dados contidos na Figura 6, nota-se um efeito positivo do aumento de temperatura na cinética de reação e na quantidade de partículas formadas, especialmente a 50 °C, onde a absorbância medida foi mais elevada do que nas outras condições de temperatura, além do aumento expressivo na absorbância entre os tempos de reação de até 60 min.

Figura 7 – Imagem do meio de reação da condição 1:1 (extrato:água) de síntese de nanopartícula de prata a 50 °C após 24h

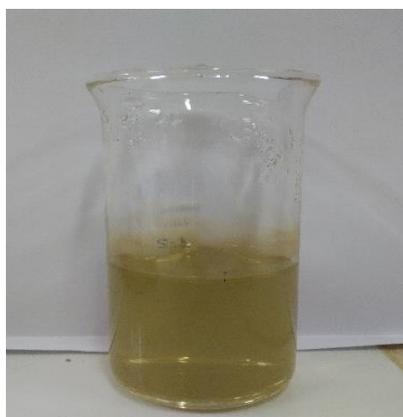
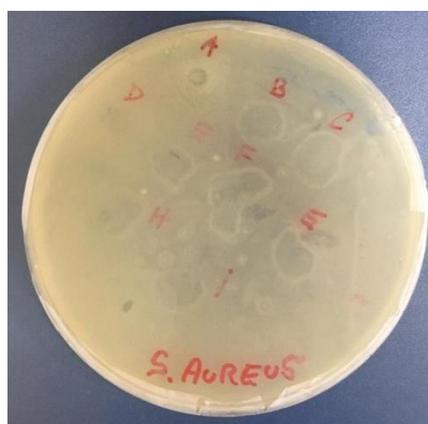


Figura 8 – Teste antimicrobiano para *S. aureus* - B) Extrato de guaraná, C) AgNP condição 1:1, D) AgNP condição 1:2, E) AgNP condição 1:4, I) Controle negativo – AgNO₃.



Fonte: A autora, 2019.

Ao verificar a condição 1:1 sob síntese realizada em 50 °C por 4 h e monitorada através do espectro UV-vis em intervalos estabelecidos até completar 7 dias, é perceptível a mudança na coloração em comparação à mesma condição em temperatura ambiente. Essa mudança de coloração é verificável nas primeiras 3 h de experimento, intensificando o tom verde com passar do tempo como pode ser visualizado na Figura 7. É expressiva a relação entre cinética de reação e morfologia/ tamanho das nanopartículas, de forma que reações conduzidas mais rapidamente por conta do consumo acelerado dos reagentes

geram nanoestruturas com maior tamanho e formato mais irregular (CHAUHAN; UPADHYAY, 2012). Estudos que investigaram as condições de formação de nanopartículas em temperaturas elevadas demonstraram que a taxa de reação aumentou e resultaram em partículas maiores em comparação com temperaturas de reação mais baixas (NATSUKI; NATSUKI; HASHIMOTO, 2015). O teste antimicrobiano foi realizado para todas as condições de diluição de extratos vegetais empregadas na produção das AgNPs a temperatura ambiente. Nesses estudos, as atividades antibacterianas foram maiores contra as bactérias Gram-positivas em relação às Gram-negativas. As bactérias Gram-positivas são menos susceptíveis a prata do que as Gram-negativas devido à parede celular das bactérias Gram-positivas possuírem uma camada espessa de peptidoglicano ao redor da célula (AHMED et al., 2016). Mesmo apresentando determinada resistência à ação antimicrobiana, o extrato de guaraná e as nanopartículas apresentaram halo de inibição mais significativo para *S. aureus* (Gram-positiva).

Os testes realizados com extrato de guaraná demonstraram eficiência em relação à zona de inibição para *S. aureus* (Figura 8), sendo que este efeito antibacteriano é proporcionado pelos componentes bioativos antioxidantes que estão incorporados no extrato, como fenóis, proantocianidinas, cafeínas e catequinas (BONILLA; SOBRAL, 2017). Estudos relatam que a propriedade antibacteriana para estirpes de bactérias é dependente da concentração dos componentes envolvidos na reação (PANDEY et al., 2014), essa afirmação foi comprovada ao verificar que a condição 1:1 demonstrou um halo de inibição maior em relação às outras condições que são mais diluídas não apenas em função da quantidade de extrato, mas também pela maior quantidade de nanopartículas de prata formadas nessa condição. Para o controle negativo foi utilizado a solução de nitrato de prata em concentração de $0,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, de forma que apresentou uma pequena inibição e atividade antimicrobiana foi potencializada quando a prata estava na forma de nanopartículas. Os testes que utilizaram os microrganismos *E. coli* e *Salmonella spp.* (bactérias Gram-negativas) apresentaram resultados inibitórios pouco expressivos ao se comparar com os testes realizados para *S. aureus*, indicando melhor aplicabilidade das nanopartículas de prata produzidas nas condições utilizadas nesse estudo para o controle microbiológico de bactérias Gram-positivas.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados da caracterização dos extratos vegetais do guaraná pela espectroscopia UV-vis demonstraram a existência em abundância da catequina, um

composto de reconhecida capacidade antioxidante que foi capaz de reduzir os íons prata em solução. Verificou-se ainda que outros constituintes do extrato vegetal são capazes de atuar como agentes estabilizantes das nanoestruturas produzidas, uma vez que a evidência de formação de precipitado ocorre apenas para períodos de tempo mais extensos. Além da concentração do extrato vegetal influenciar diretamente a quantidade de AgNP formada, a temperatura favorece adicionalmente a aceleração da reação, embora haja indícios de que haja um impacto no aumento do tamanho da prata coloidal. Os testes realizados com extrato de guaraná demonstraram eficiência em relação à zona de inibição para *S. aureus* e que foi potencializado na presença das AgNPs.

REFERÊNCIAS

- AHMED, S. et al. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. **Journal of Advanced Research**, v.7, n.1, p.17-28, 2016.
- ANDERSEN, O.M.; MARKHAM, K.R. **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. 1ª ed., editora CRC Press Taylor & Francis Group, vol.1, cap.1, p.17, 2005.
- ANTUNES, P.B. **Análise comparativa das frações polpa, casca, semente e pó comercial do guaraná (*Paullinia cupana*): caracterização química e atividade antioxidante in vitro**. 2011. Tese de Doutorado. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. 114f.
- 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.
- BIESAGA, Magdalena. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v.1218, n.18, p.2505-2512, 2011.
- BONILLA, J.; SOBRAL, P.J.A. Antioxidant and antimicrobial properties of ethanolic extracts of guarana, boldo, rosemary and cinnamon. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, e2016024, 2017.
- CHAUHAN, S.; UPADHYAY, M.K. Fruit based synthesis of silver nanoparticles-an effect of temperature on the size of particles. **Recent Research in Science and Technology**, v. 4, n. 5, p. 41-44, 2012.
- DUBEY, M. et al. Green synthesis of nanosilver particles from extract of eucalyptus hybrida (safeda) leaf. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 4, n.3, p. 537-543, 2009.

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.

GEOPRINCY, G. et al. A Review On Green Synthesis Of Silver Nanoparticles. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v.6, n.1, p.8-12, 2013.

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

JAIN, D. et al. Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using papaya fruit extract and evaluation of their antimicrobial activities. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v.4, p. 557-563, 2009.

MAOELA, M.S. et al. Electroanalytical determination of catechin flavonoid in ethyl acetate extracts of medicinal plants. **International Journal of Electrochemical Science**, v.4, p. 1497-1510, 2009.

NETCHAREONSIRISUK, P. et al. Effect of capping agents on the cytotoxicity of silver nanoparticles in human normal and cancer skin cell lines. **Journal of Nanoparticle Research**, v.18, n.11, 322, 2016.

PANDEY, J.K. et al. Silver nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation: as a potent antibacterial agent for human enteropathogenic gram-positive and gram-negative bacterial strains. **Applied biochemistry and biotechnology**, v.174, n.3, p.1021-1031, 2014.

PORTO, P.A.L.S. **Estudo da Actividade Antioxidante de Catequinas e Procianidinas Oligoméricas**. 2002. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade do Porto. 136f.

ŠILEIKAITĖ, A. et al. Investigation of Silver Nanoparticles Formation Kinetics During Reduction of Silver Nitrate with Sodium Citrate. **Materials science (medžiagotyra)**, v.15, n.9, p.21-27, 2009.

SHARMA, V.K.; YNGARD, R.A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in colloid and interface science**, v. 145, n. 1-2, p. 83-96, 2009.

SOUSA, S.A. et al. Determinação de taninos no guaraná em pó (*Paullinia cupana kunth, sapindaceae*) por cromatografia líquida de alta eficiência. **Brazilian journal of pharmacognosy**, v.20, n.6, p.866-870, 2010.

SOUZA, K.V.; PERALTA-ZAMORA, P. Spectrophotometric determination of phenol in the presence of congeners by multivariate calibration. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.73, n.4, p.519-524, 2001.