



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

Dissertação de Mestrado

Produção e modulação de características físico-químicas de nanopartículas de prata via síntese verde utilizando extratos aquosos de tecidos naturais e obtidos por propagação vegetativa a partir de diferentes espécies de Ipês

Tatiane de Melo Pereira

Brasília/DF

2019

Tatiane de Melo Pereira

Dissertação de Mestrado

Produção e modulação de características físico-químicas de nanopartículas de prata via síntese verde utilizando extratos aquosos de tecidos naturais e obtidos por propagação vegetativa a partir de diferentes espécies de Ipês

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Linha de pesquisa: Síntese e caracterização de complexos nanoestruturados.

Brasília/DF

2019

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter me guiado nesse novo caminho e ter dado forças e sabedoria para continuar todo trabalho com alegria. Agradeço a minha mãe, Rossilda Silva Melo Pereira, que me proporcionou a oportunidade de estar em uma nova cidade, ao meu irmão, Gustavo Coutinho C. M. Pereira, que sempre me motivou com muita alegria. Ao meu marido, Bruno Pimentel Gomes, que esteve ao meu lado, pelo companheirismo, apoio e amor dedicados a cada instante. A minha família materna e paterna que sempre foram meu porto seguro ao voltar para a casa e me renovavam as energias para outro período de trabalho. As minhas amigas de Minas Gerais, Kênia, Maria Clara, Caroline e Ana Luiza, de longa data que sempre compartilharam suas vidas e alegrias comigo mesmo de longe e me incentivaram na minha caminhada, e amigos de Brasília que fazem dos meus dias mais leves, lembraram do real propósito de fazer tudo com excelência e sempre estiveram comigo.

Agradeço a todos amigos e colegas do Laboratório de Nanobiotecnologia da Embrapa (Lucio, Beatriz, Cíntia, Thalita, Júlia, Ariane, Rodrigo, Gabriela e Liana), que me motivaram, ofereceram ideias, apoiaram e estiveram, literalmente, ao meu lado em todos os momentos do mestrado, não só por trabalharmos juntos e sim por termos formado um grupo unido e leal que faz do meu trabalho minha alegria diária. Agradeço a todos os professores que tive nesta jornada, os quais colaboraram com a construção do meu conhecimento, crescimento pessoal e profissional neste período.

Agradeço aos colaboradores diretos deste trabalho, que me ajudaram em alguns experimentos realizados (Dra. Vera Lúcia Perussi Polez, Dr. Marcelo Henrique Sousa, Dr. Breno Régis Santos, Gabriel Chiari e Brena Gomes Souza). Agradeço ao Dr. Thales Rocha, que sempre teve palavras de força e incentivo para oferecer.

Agradeço ao meu orientador Dr. Luciano Paulino da Silva, que sempre teve compreensão e foi realmente um orientador dedicado e engajado. Agradeço a Universidade de Brasília pelo ensino que me proporcionou. E também à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo espaço físico, que foi onde eu realizei meu trabalho pela infraestrutura e apoio oferecidos.

Resumo

Nanopartículas de prata (AgNPs) têm inúmeras aplicações, sendo sua principal utilização como agentes antimicrobianos de amplo espectro. Para a utilização em larga escala, a indústria utiliza de síntese química, que produz AgNPs com características físico-químicas conhecidas, mas também gera resíduos potencialmente tóxicos ao meio ambiente. Uma alternativa ecoamigável é a biossíntese utilizando extratos aquosos de plantas como agentes redutores e estabilizantes. Porém, esse tipo de síntese em um âmbito industrial tem uma série de barreiras a serem ultrapassadas, a primeira delas é que as principais características físico-químicas dessas AgNPs podem ser alteradas de acordo com os fatores os quais a planta está exposta; a segunda é que, se a produção em larga escala for iniciada, haverá uma demanda muito alta por plantas podendo levar a um extrativismo exagerado. Para encontrar uma maneira de ultrapassar essas barreiras com a síntese verde e torná-la mais adequada a ser utilizada na produção de AgNPs em escala, foram escolhidos extratos aquosos de quatro espécies de Ipês (*Handroanthus heptaphyllus*, *Tabebuia roseoalba*, *Handroanthus impetiginosus* e *Handroanthus serratifolius*) como as fontes de metabólitos para síntese verde. Para verificar os possíveis efeitos da sazonalidade nas características físico-químicas das AgNPs foram coletadas mensalmente folhas de três espécies ao longo de um ano e desenvolvidas reações de sínteses de AgNPs utilizando extrato aquoso de cada uma delas. Além disso, no intuito de modular as características físico-químicas, foram realizadas sínteses alterando a origem do material botânico, temperatura, concentração e equipamentos utilizados no momento das reações. Por fim, para uma futura utilização em larga escala, foram realizadas rotas de síntese utilizando extrato aquoso de calos obtidos por cultivo *in vitro* de *H. impetiginosus*. Para avaliar as características físico-químicas foram utilizados espectrofotometria, espalhamento de luz dinâmico, potencial Zeta, microscopia de força atômica e difração de raios X, além de ensaios de atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus*. Com as sínteses com folhas coletadas de três espécies durante todo o ano, os resultados demonstraram que há alteração nas características físico-químicas das AgNPs de acordo com as estações do ano, sendo que a variação de diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas está diretamente relacionada com a precipitação chuvosa. Alterando a origem do material botânico observou-se um aumento da produção de AgNPs utilizando extrato aquoso das partes reprodutivas (flor e botão floral), apresentando características físico-químicas mais desejáveis, porém sem atividade antimicrobiana. Entretanto, as AgNPs biossintetizadas a partir de alguns folíolos, apresentaram atividade antibacteriana. Adicionalmente, foi observado que a variação da temperatura reacional em banho-maria (25, 50 e 75°C) influenciou na modulação do diâmetro hidrodinâmico das AgNPs biossintetizadas a partir de *T. roseoalba*. Alterando a concentração final de agente redutor (0, 5, 1, 2, 4, 8 e 16 mg/mL), conseguiu-se modular o diâmetro hidrodinâmico das AgNPs produzidas com extrato de *H. serratifolius*. Para as AgNPs produzidas com *H. impetiginosus* foi observado que a modulação do diâmetro hidrodinâmico se deu a partir da fonte de energia utilizada durante a síntese (banho-maria, luz UV, radiação fotossinteticamente ativa (PAR), banho de ultrassom, micro-ondas e autoclave) Por fim, foram produzidos calos, cujos extratos possibilitaram a síntese de AgNPs com atividade antibacteriana. Com esse estudo conseguiu-se superar duas barreiras para que a síntese verde chegue até a indústria, primeiramente modulando as características físico-químicas e segundo produzindo AgNPs a partir de material botânico obtido por propagação vegetativa.

Palavras-chave: Síntese verde de AgNPs, Ipês, modulação características físico-químicas.

Abstract

Silver nanoparticles (AgNPs) have numerous applications, being their main use as broad spectrum antimicrobial agents. For large-scale use, the industry uses chemical synthesis, which produces AgNPs with known physico-chemical characteristics, but also generates potentially toxic wastes to the environment. An eco-friendly alternative is biosynthesis using aqueous plant extracts as reducing and stabilizing agents. However, this type of synthesis in an industrial environment has a number of barriers to be overcome, the first of which is that the main physicochemical characteristics of these AgNPs can be altered according to the factors in which the plant is exposed; the second is that if large-scale production is initiated, there will be a very high demand for plants, which could lead to an exaggerated extraction. To find a way to overcome these barriers with green synthesis and make it more suitable to be used in the production of scale AgNPs, aqueous extracts of four species of Ipês (*Handroanthus heptaphyllus*, *Tabebuia roseoalba*, *Handroanthus impetiginosus* and *Handroanthus serratifolius*) as the sources of metabolites for green synthesis. To verify the possible effects of seasonality on the physical-chemical characteristics of AgNPs, leaves of three species were collected monthly over a year and AgNP synthesis reactions were developed using aqueous extract of each one. In addition, in order to modulate the physico-chemical characteristics, syntheses were made altering the origin of the botanical material, temperature, concentration and equipment used at the moment of the reactions. Finally, for future large-scale use, synthetic routes were performed using aqueous extract of calluses obtained by *in vitro* culture of *H. impetiginosus*. Spectrophotometry, dynamic light scattering, Zeta potential, atomic force microscopy and X-ray diffraction, as well as anti-bacterial activity against *E. coli* and *S. aureus* were used to evaluate the physico-chemical characteristics. With the syntheses with leaves collected from three species throughout the year, the results showed that there is a change in the physical-chemical characteristics of the AgNPs according to the seasons, and the hydrodynamic diameter variation of the nanoparticles is directly related to the precipitation rainy. Altering the origin of the botanical material, an increase in the production of AgNPs using aqueous extract of the reproductive parts (flower and floral bud) was observed, presenting physicochemical characteristics more desirable, but without antimicrobial activity. However, the AgNPs biosynthesized from some leaflets showed antibacterial activity. In addition, it was observed that the variation of the reaction temperature in the water bath (25, 50 and 75 ° C) influenced the modulation of the hydrodynamic diameter of the biosynthesized AgNPs from *T. roseoalba*. Altering the final concentration of reducing agent (0, 5, 1, 2, 4, 8 and 16 mg / mL), the hydrodynamic diameter of AgNPs produced with *H. serratifolius* extract was modulated. For the AgNPs produced with *H. impetiginosus*, it was observed that the modulation of the hydrodynamic diameter occurred from the energy source used during the synthesis (water bath, UV light, photosynthetically active radiation (PAR), ultrasonic bath, microwave and autoclave). Finally, callus was produced, extracts of which allowed the synthesis of AgNPs with antibacterial activity. This study was able to overcome two barriers for the green synthesis to reach the industry, first modulating the physical-chemical characteristics and secondly producing AgNPs from botanical material obtained by vegetative propagation.

Keywords: Green synthesis of AgNPs, Ipês, modulation physico-chemical characteristics.

Lista de Figuras

- Figura 1** – Demonstração das fórmulas estruturais das principais classes de metabólitos secundários envolvidos na síntese verde de AgNPs utilizando extrato de plantas. a) Flavonóides; b) Alcalóides; c) isopreno (unidade básica formadora de terpenos); d) Saponinas; e) Taninos; e) Quinona.....20
- Figura 2** – Fotos das espécies de ipês utilizadas no presente estudo. A cor indicada no círculo demonstra a coloração das florações de cada espécie. a) *Tabebuia roseoalba*; b) *Handroanthus serratifolius*; c) *Handroanthus impetiginosus*; d) *Handroanthus heptaphyllus*.
Fonte: do autor.....22
- Figura 3** – Fluxograma metodológico de todas as etapas. Os losangulos em verde representam as etapas de decisão embasados nas etapas de caracterização. As cores nos nomes científicos representam a coloração das flores de cada espécie. O círculo com a indicação de X, demonstra que se essa etapa falhar a hipótese do trabalho não é coerente.....29
- Figura 4** - Fotografias das partes vegetais de *H. heptaphyllus* que foram utilizadas para síntese de AgNPs. Da esquerda para a direita: botões florais (B), segmentos de pecíolos (P), flores (L) e folhas compostas. O folíolo 1 é o inferior esquerdo e o folíolo 5 é o inferior direito, seguindo em ordem (F1, F2, F3, F4 e F5). A barra preta tem exatamente 10 cm.....32
- Figura 5** – Esquema ilustrativo da nomenclatura utilizada para descrever as amostras contendo suspensões aquosas de AgNPs formadas a partir de diferentes rotas de síntese durante o desenvolvimento do estudo.....34
- Figura 6** - Resultados de absorbância por espectrofotometria das reações de biossíntese de AgNPs com diferentes extratos aquosos das partes vegetais da espécie *H. heptaphyllus* em função do tempo de reação, sendo: FL: extrato aquoso de flor; BFL: extrato aquoso de botão floral; P: extrato aquoso de pecíolo; F1 a F5: extrato aquoso dos cinco diferentes folíolos; NP: controle negativo de formação apenas com nitrato de prata.....39
- Figura 7** – Avaliação realizada por espectrofotometria das AgNPs formadas após um dia das reações de síntese e com diluição de 10 vezes em água ultrapura. Curva de absorção obtida de 350 a 550 nm. As diferentes siglas demonstram as AgNPs formadas a partir de extrato aquoso de diferentes partes da espécie *H. heptaphyllus* (FL: extrato aquoso de flor; BFL: extrato aquoso de botão floral; P: extrato aquoso de pecíolo; F1 a F5: extrato aquoso dos cinco diferentes folíolos; NP: controle negativo de formação apenas com nitrato de prata).....41
- Figura 8** – Demonstração do diâmetro hidrodinâmico, em número (%), das AgNPs formadas após um dia das reações de síntese e diluição de 10 vezes em água ultrapura. Avaliação realizada

em equipamento ZetaSizer Nano ZS em espalhamento de luz dinâmico, em modo automático com três leituras. As diferentes siglas demonstram as AgNPs formadas utilizando extratos aquosos de diferentes partes da espécie *H. heptaphyllus* (FL: extrato aquoso de flor; BFL: extrato aquoso de botão floral; P: extrato aquoso de pecíolo; F1 a F5: extrato aquoso dos cinco diferentes folíolos).....42

Figura 9 – Imagens obtidas por microscopia de força atômica de AgNPs sintetizadas com extratos aquosos de partes reprodutivas (flor) de *H. heptaphyllus*. As imagens topográficas de altura (esquerda) e fase (direita) apresentadas em pares correspondentes foram adquiridas em modo dinâmico-viscoelástico, com resolução de 512×512 linhas e taxa de varredura de 1 Hz. Cada imagem representativa refere-se a uma das aquisições, totalizando aproximadamente 250 AgNPs medidas, das quais o valor da altura é representado pelo histograma. a) e b) Imagens mostrando AgNPs com diferentes tamanhos e formas sintetizadas utilizando o extrato aquoso de flores (L). c) Imagem mostrando AgNPs com várias formas e tamanhos, sendo recobertas por uma camada de componentes presentes no extrato aquoso de flor. d) Histograma com número relativo de partículas distribuídas em classes e que foram formadas por extrato aquoso de flores, ajustadas à função gaussiana.....45

Figura 10 - Imagens obtidas por microscopia de força atômica de AgNPs sintetizadas com extrato aquoso de parte vegetativa (folíolo 4) de *H. heptaphyllus*. As imagens topográficas de altura (esquerda) e fase (direita) apresentadas em pares correspondentes foram adquiridas em modo dinâmico-viscoelástico, com resolução de 512×512 linhas e taxa de varredura de 1 Hz. Cada imagem representativa refere-se a uma aquisição, totalizando aproximadamente 250 AgNPs medidas, das quais o valor da altura é representado pelo histograma. a) -b) -c) Imagens mostrando AgNPs com diferentes tamanhos e formas sintetizadas utilizando o extrato aquoso do folíolo 4 (F4). d) Histograma com número relativo de partículas formadas com o extrato aquoso de F4, ajustado à função gaussiana.....47

Figura 11 – Difrátogramas de raios X das AgNPs formadas por síntese verde utilizando extratos aquosos de diferentes partes de *H. heptaphyllus*. a) Todos os picos obtidos a partir do escaneamento 2θ de 25° a 80° demonstrando fase de AgCl. b) Picos obtidos no escaneamento 2θ de 32° a 80° , a fim de dar enfoque e demonstrar a presença dos picos de prata (Ag) obtidos. As diferentes siglas demonstram as AgNPs formadas com extrato aquoso de diferentes partes da espécie *H. heptaphyllus*.....48

Figura 12 - Atividade antimicrobiana de AgNPs produzidas por síntese verde com extratos aquosos de *H. heptaphyllus* oriundos de folíolos (F1, F2, F3, F4 e F5), botão floral (B), flor (L),

pecíolo (P) e controle de solução de nitrato de prata (CM). Para controle negativo foi utilizada água e para controle positivo penicilina e estreptomicina. Barras marcadas com o mesmo símbolo representam ação igual ou menor que o controle positivo no tempo de 72h. Análise estatística ANOVA com $p < 0,05$. O mesmo símbolo indica resultados estatisticamente semelhantes de acordo com o teste Tukey. a) Resultados da concentração inibitória mínima de AgNPs em *E. coli*. b) Resultados da concentração inibitória mínima de AgNPs em *S. aureus*.....49

Figura 13 – Fotografia das AgNPs biossintetizadas a partir de folhas coletadas ao longo de um ano com extrato aquoso de a) *Tabebuia roseoalba*; b) *Handroanthus impetiginosus*; c) *Handroanthus serratifolius*.....51

Figura 14 – Resultados da caracterização espectrofotométrica em leitora de microplacas a 450 nm durante as reações de biossíntese de AgNPs com extratos aquosos de folhas das espécies, sendo: (a) *T. roseoalba*; (b) *H. impetiginosus* e (c) *H. serratifolius*. As reações de síntese foram realizadas com diferentes extratos aquosos provenientes de folhas coletadas em diferentes meses e utilizando a mesma planta. O aumento da absorbância medida indica a formação de AgNPs. Para *T. roseoalba*, *H. impetiginosus* e *H. serratifolius* não existem informações referentes aos meses de setembro, outubro e junho, respectivamente, por causa da caducifolia das plantas. NP: controle negativo de formação apenas com nitrato de prata.....51

Figura 15 – Diâmetro hidrodinâmico médio de AgNPs sintetizadas com extratos aquosos das folhas de ipês que foram coletadas em diferentes meses ao longo de um ano. a) *Tabebuia roseoalba*; b) *Handroanthus impetiginosus*; c) *Handroanthus serratifolius*.....53

Figura 16 – Índices de polidispersividade médio de AgNPs sintetizadas com os extratos aquosos das folhas coletadas em diferentes meses durante um ano. a) *T. roseoalba*, b) *H. impetiginosus* e c) *H. serratifolius*.....54

Figura 17 – Dados de precipitação chuvosa em Brasília obtidos pelo Instituto de Meteorologia (INMET) demonstrando a precipitação mensal acumulada.....56

Figura 18 – Atividade biológica contra *E. coli* de AgNPs obtida da síntese verde de extratos aquosos a) *T. roseoalba*, b) *H. impetiginosus* e c) *H. serratifolius*. Além das AgNPs, como controles foi utilizada solução de nitrato de prata (CM), como controle negativo apenas água e como controle positivo estreptomicina e penicilina na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Com tempo de ensaio de 72h. Barras marcadas com o mesmo símbolo têm ação igual ou menor que o controle positivo. Análise estatística ANOVA com $p < 0,05$. O mesmo símbolo indica resultados estatisticamente semelhantes de acordo com o teste Tukey.....57

Figura 19 - Atividade biológica contra *S. aureus* de AgNPs produzidas por síntese verde com extratos aquosos das folhas de a) *T. roseoalba*, b) *H. impetiginosus* e c) *H. serratifolius*. Além das AgNPs, como controle foi utilizada solução de nitrato de prata (CM), como controle negativo apenas água e como controle positivo estreptomicina e penicilina na concentração de 100 µg/mL. Com tempo de ensaio de 72h. Barras marcadas com o mesmo símbolo têm ação igual ou menor que o controle positivo. Análise estatística ANOVA com $p < 0,05$. O mesmo símbolo indica resultados estatisticamente semelhantes de acordo com o teste Tukey.....58

Figura 20 – Curvas de formação de AgNPs obtidas por espectrofotometria em 450 nm durante a biossíntese de AgNPs com extratos aquosos de folhas das espécies a) *T. roseoalba*, b) *H. impetiginosus* e c) *H. serratifolius*. A síntese foi realizada com a mesma concentração de extratos aquosos das três espécies em três diferentes temperaturas em banho-maria (25°C, 50°C e 75°C). O aumento da absorbância indica a formação de AgNPs. NP: controle negativo de formação apenas com nitrato de prata.....59

Figura 21 - Avaliação espectrofotométrica das AgNPs formadas após um dia das reações de síntese e diluição de 10 vezes em água ultrapura. Curvas de absorção obtidas da biossíntese utilizando como agente redutor o extrato aquoso das folhas de (a) *T. roseoalba*; (b) *H. impetiginosus*; (c) *H. serratifolius*. As diferentes cores indicam a temperatura utilizada em banho-maria no momento da síntese. NP: controle negativo de formação apenas com nitrato de prata.....60

Figura 22 – Distribuições dos diâmetros hidrodinâmicos, em número (%), obtidos por espalhamento de luz dinâmico das AgNPs formadas com diferentes temperaturas em banho-maria, após um dia da síntese e diluição de 10 vezes em água ultrapura. Avaliações realizadas em equipamento ZetaSizer Nano ZS, em modo automático com três leituras. a) AgNPs sintetizadas com extrato aquoso de *T. roseoalba*. b) AgNPs sintetizadas com extrato aquoso de *H. impetiginosus*. c) AgNPs sintetizadas com extrato aquoso de *H. serratifolius*.....62

Figura 23 - Curvas de formação de AgNPs obtidas por espectrofotometria em 450 nm relativas à formação de AgNPs durante as reações de biossíntese de AgNPs com extrato aquoso das folhas das espécies a) *T. roseoalba*; b) *H. impetiginosus*; c) *H. serratifolius*. As reações de síntese foram realizadas em banho-maria a 50°C por 180 min com variação de concentração de extratos aquosos das três espécies (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 mg/mL). O aumento da absorbância indica a formação de AgNPs. NP: controle negativo de formação apenas com nitrato de prata.....64

Figura 24 – Curvas de absorção das AgNPs obtidas pela avaliação espectrofotométrica após um dia da síntese e diluição de 10 vezes em água ultrapura. a) Biossíntese utilizando extrato aquoso das folhas de *T. roseoalba* como agente redutor. b) Biossíntese utilizando extrato aquoso das folhas de *H. impetiginosus* como agente redutor. c) Biossíntese utilizando extrato aquoso das folhas de *H. serratifolius* como agente redutor. As diferentes cores indicam as diferentes concentrações de agentes redutores utilizados na forma de extratos vegetais. NP: controle negativo de formação apenas com nitrato de prata.....65

Figura 25 – Distribuições dos diâmetros hidrodinâmicos obtidos por espalhamento de luz dinâmico, em número (%), das AgNPs formadas com diferentes concentrações de extratos aquosos das folhas de ipês, após um dia da síntese e diluição de 10 vezes em água ultrapura. Avaliação realizada em equipamento ZetaSizer Nano ZS em, em modo automático com três leituras. a) AgNPs sintetizadas com extrato aquoso das folhas de *T. roseoalba*. b) AgNPs sintetizadas com extrato aquoso das folhas de *H. impetiginosus*. c) AgNPs sintetizadas com extrato aquoso das folhas de *H. serratifolius*.....67

Figura 26 – Curvas de formação (finais ou parciais) de AgNPs obtidas pela caracterização por espectrofotometria em 450 nm durante a biossíntese com extratos aquosos de folhas das espécies a) *T. roseoalba*. b) *H. impetiginosus*. c) *H. serratifolius*. As reações de síntese foram realizadas com diferentes fontes de energia e com diferentes equipamentos como é demonstrado na legenda. O aumento da absorbância indica a formação de AgNPs.....70

Figura 27 – Curvas de absorção das AgNPs obtidas por espectrofotometria após um dia da síntese e diluição de 10 vezes em água ultrapura. As curvas de absorção foram obtidas de 350 a 550 nm. a) Biossíntese utilizando extrato aquoso das folhas de *T. roseoalba*. b) Biossíntese utilizando extrato aquoso das folhas de *H. impetiginosu*. c) Biossíntese utilizando extrato aquoso das folhas de *H. serratifolius*. As diferentes cores indicam os diferentes métodos de síntese.....71

Figura 28 – Distribuição de diâmetros hidrodinâmicos obtidos por espalhamento de luz dinâmico, em número (%), das AgNPs formadas, com diferentes fontes de energia, após um dia da síntese e com diluição de 10 vezes em água ultrapura. As avaliações foram realizadas em equipamento ZetaSizer Nano ZS, em modo automático com três leituras. a) AgNPs sintetizadas com extrato aquoso das folhas de *T. roseoalba*. b) AgNPs sintetizadas com extrato aquoso das folhas de *H. impetiginosus*. c) AgNPs sintetizadas com extrato aquoso das folhas de *H. serratifolius*.....72

Figura 29 – Curvas de formação de AgNPs com extratos aquosos de calos e folhas da espécie <i>H. impetiginosus</i> . NP: controle negativo de formação apenas com nitrato de prata.....	75
Figura 30 – Distribuições de diâmetros hidrodinâmicos obtidos por espalhamento de luz dinâmico, em número (%), das AgNPs biossintetizadas com extrato aquoso de calos e folhas de <i>H. impetiginosus</i> , após um dia da reação de síntese e diluição de 10 vezes em água ultrapura. A avaliação foi realizada em equipamento ZetaSizer Nano ZS, em modo automático com três leituras.....	76
Figura 31 – Atividade antimicrobiana de AgNPs obtidas por síntese verde com extratos aquosos de calos de <i>H. impetiginosus</i> juntamente com controle de solução de nitrato de prata (CM), controle negativo com apenas água e controle positivo com estreptomicina e penicilina na concentração de 100 µg/mL. Com tempo de ensaio de 72h. Barras marcadas com o mesmo símbolo têm ação igual ou menor que o controle positivo. Análise estatística ANOVA com $p < 0,05$. O mesmo símbolo indica resultados estatisticamente semelhantes de acordo com o teste Tukey. a) Resultados das concentrações de AgNPs em <i>E. coli</i> . b) Resultados das concentrações de AgNPs em <i>S. aureus</i>	78
Figura 32 – Fluxograma conclusivo de todas as etapas elaboradas. Os losangulos representam as etapas de tomada de decisão embasados nas etapas de caracterização. E as respostas encontradas para este estudo estão em verde.....	80

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Extratos aquosos obtidos a partir de diferentes espécies e partes vegetais. O tempo de extração indica quanto tempo cada material botânico ficou em chapa de aquecimento com água ultrapura em ebulição antes de ser filtrado.....	30
Tabela 2 – Resumo de todas as rotas de síntese realizadas durante o estudo, demonstrando qual parte foi utilizada como material botânico e as variações de condições ocorridas em cada uma delas, indicando, ao final, o nome da suspensão aquosa de AgNPs produzida, de acordo com a forma de codificação descrita na Figura 4.....	34
Tabela 3 – Caracterização de AgNPs utilizando equipamento ZetaSizer Nano ZS demonstrando valores de índice de polidispersividade e potencial Zeta de superfície. AgNPs formadas após um dia da síntese e diluição de 10 vezes em água ultrapura. As diferentes siglas demonstram as AgNPs formadas com extratos aquosos de diferentes partes da espécie <i>H. heptaphyllus</i> (FL: extrato aquoso de flor; BFL: extrato aquoso de botão floral; P: extrato aquoso de pecíolo; F1 a F5: extrato aquoso dos cinco diferentes folíolos).....	43
Tabela 4 - Dados de potencial Zeta de AgNPs biossintetizadas a partir de extratos aquosos das folhas de plantas de ipês coletadas mensalmente ao longo de um ano.....	55
Tabela 5 – Dados de PdI e potencial Zeta de AgNPs biossintetizadas com extratos aquosos das folhas de espécies de ipês em meios reacionais submetidos a diferentes temperaturas.....	63
Tabela 6 – Dados de PdI e potencial Zeta de AgNPs biossintetizadas a partir de extratos aquosos de plantas de Ipê em meios reacionais de diferentes concentrações de agentes redutores.....	68
Tabela 7 – Dados de PdI e potencial Zeta de AgNPs biossintetizadas a partir de extratos aquosos das folhas de ipês em diferentes equipamentos com fontes de energia variadas.....	73
Tabela 8 – Dados de PdI e potencial Zeta de AgNPs biossintetizadas com extratos aquosos de calos e folhas de <i>H. impetiginosus</i>	78

Lista de Abreviaturas e Siglas

- μg – Micrograma
 μM – Micromolar
Abr – Abril
 Ag^+ - Prata iônica
 Ag^0 – Prata metálica
 AgNO_3 – Nitrato de prata
AgNPs – Nanopartículas de Prata
Ago – Agosto
ATCC – Coleção de cultura Americana (*American Type Culture Collection*)
AuNPs – Nanopartículas de Ouro
BIOGEN – Laboratório de Biotecnologia Ambiental & Genotoxicidade
CM – Controle de sal metálico (solução de nitrato de prata) 1 mM
d.C. – Depois de Cristo
Dez – Dezembro
DH – Diâmetro Hidrodinâmico
DLS – Espalhamento de Luz Dinâmico
DRX – Difração de Raios X
EUA – Estados Unidos da America
FCE – Faculdade de Ceilândia
Fev – Fevereiro
g – Grama
HIV – Vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus*)
Jan – Janeiro
JBB – Jardim Botânico de Brasília
Jul – Julho
Jun – Junho
KHz – Kilohertz
KV – Kilovolt
L – Litro
LB – Meio de cultura Luria-Bertani
mA – Miliampere

Mar – Março
MFA – Microscopia de Força Atômica
mg – Miligrama
min – Minutos
mL – Mililitros
mm – Milímetro
mM – Milimolar
MS – Meio Murashige e Skoog
mV – milivolt
nm – Nanômetro
Nov – Novembro
NPMs – Nanopartículas Metálicas
NPs – Nanopartículas
Out – Outubro
PAR – Luz fotossinteticamente ativa (*Photosynthetically active radiation*)
PdI – Índice de polidispersividade (*Polydispersity index*)
PtNPs – Nanopartículas de Platina
pZ – Potencial Zeta
rpm – rotações por minuto
RPS – Ressonância Plasmônica de Superfície
Set – Setembro
UV-Vis – Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA	24
1.2. HIPÓTESE.....	24
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. OBJETIVO GERAL	25
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. LISTA DE REAGENTES	25
3.2. LISTA DE MATERIAIS	26
3.3. LISTA DE EQUIPAMENTOS.....	27
3.4. COLETA DE MATERIAL BOTÂNICO	28
3.5. OBTENÇÃO DE CÉLULAS INDIFERENCIADAS (CALO) DE <i>Handroanthus</i> <u><i>impetiginosus</i></u>	30
3.6. PREPARO DE EXTRATO AQUOSO.....	30
3.7. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA	31
3.7.1. <i>Prospecção do material botânico para síntese de AgNPs</i>	31
3.7.2. <i>Síntese com folhas coletadas mensalmente ao longo de um ano</i>	32
3.7.3. <i>Síntese com variação de temperatura</i>	32
3.7.4. <i>Síntese com variação de concentração</i>	33
3.7.5. <i>Síntese com variação de fonte de energia</i>	33
3.7.6. <i>Síntese com material botânico obtido por propagação vegetativa</i>	33
3.8. CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	37
3.8.1. <i>Espectroscopia UV-Visível (UV-Vis)</i>	37
3.8.2. <i>Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersividade e potencial Zeta</i>	37
3.8.3. <i>Microscopia de força atômica</i>	37
3.8.4. <i>Difração de raios X (DRX)</i>	38
3.8.5. <i>Teste de atividade antibacteriana em <u>Escherichia coli</u> e <u>Staphylococcus aureus</u></i>	38
3.8.6. <i>Análises estatísticas</i>	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. ESTRATÉGIA PARA PROSPECÇÃO E SELEÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO PARA UTILIZAÇÃO NA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	39

4.2. SÍNTESE COM FOLHAS COLETADAS MENSALMENTE AO LONGO DE UM ANO.....	50
4.3. SÍNTESE COM VARIAÇÃO DE TEMPERATURA	58
4.4. SÍNTESE COM VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE EXTRATOS AQUOSOS	63
4.5. REAÇÕES DE SÍNTESE COM VARIAÇÃO DE FONTE DE ENERGIA.....	69
4.6. SÍNTESE COM MATERIAL BOTÂNICO OBTIDO POR PROPAGAÇÃO VEGETATIVA	74
5. CONCLUSÕES	78
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma área da ciência que produz, utiliza e/ou aplica materiais na escala nanométrica, sendo que essa grandeza é especificada como a bilionésima parte do metro (SILVA, 2014). Na história, materiais organizados em nanoescala já eram utilizados desde o tempo dos Romanos em 400 d.C. com a taça de Lycurgus, que mudava da cor verde e o para vermelho quando iluminada internamente. Atualmente, sabe-se que tal efeito estava relacionado à presença de nanopartículas de ouro (AuNPs) e prata (AgNPs) em sua composição (FREESTONE et al., 2007). Entretanto, a primeira síntese realizada intencionalmente, de conhecimento mundial, aconteceu apenas em 1857, quando foram produzidas AuNPs dispersas em suspensão coloidal. Posteriormente, os primeiros conceitos de nanotecnologia foram apresentados ao mundo pelo físico norte-americano Richard Philips Feynman, em 1959, embora não tenha utilizado especificamente esse termo naquela ocasião (SARGENTELLI, 2012).

Percebe-se que, ao longo da história, nanopartículas metálicas (NPMs), como AuNPs e AgNPs, tiveram um papel muito importante no desenvolvimento da nanotecnologia que se perpetua até hoje, devido a inúmeras aplicações desse tipo de material. As nanopartículas (NPs) que são constituídas por metais nobres, como ouro (AuNPs), platina (PtNPs) e prata (AgNPs), apresentam atividade catalítica, antibacteriana e antifúngica comprovada (MALLMANN et al., 2015). A síntese de NPMs, geralmente, acontece pela técnica de redução química, onde o precursor metálico na forma iônica recebe elétrons de um doador até chegar em sua forma metálica (DONG et al., 2012).

As AgNPs são consideradas as NPs mais produzidas e utilizadas nos dias de hoje. Elas são empregadas na fabricação de circuitos integrados, sensores, eletrodos, filtros, fibras, além de servirem como agentes antimicrobianos de amplo espectro (SILVA, 2014). De acordo com a empresa de consultoria Grand View Research, Inc., (2015) a previsão para o mercado global de AgNPs é de US\$ 2,45 bilhões em 2022. Em 2014, cerca de 30% dos investimentos realizados em AgNPs foi para a área de saúde, devido ao sucesso na aplicação como antimicrobiano.

Existe uma vasta gama de microrganismos susceptíveis a AgNPs, sendo que, o potencial antibacteriano de AgNPs já foi comprovado contra *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (ZHANG et al., 2016). As bactérias mais testadas são possivelmente a Gram negativa *E. coli* e a Gram positiva *S. aureus*. A bactéria *E. coli* causa

diarreias por infecções alimentares, colites hemorrágicas (BESSER et al., 1993) e também está associada a pacientes portadores da doença de Crohn (PALMELA et al., 2017). Esta bactéria apresenta uma maior vulnerabilidade quando expostas à prata em tamanho nanométrico do que em sua forma macroestruturada (*bulk*). Já a bactéria *S. aureus* faz parte da microbiota humana, mas também é um patógeno oportunista podendo causar sérias infecções agudas ou crônicas (BALDRY et al., 2018). Com a utilização da nanotecnologia foi possível que a prata tivesse efeito antibacteriano até sobre cepas *S. aureus* multirresistentes (CHIEN et al., 2018).

O potencial antifúngico de AgNPs também já foi comprovado contra patógenos de humanos (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*) e patógenos de plantas (*Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*) (BALASHANMUGAMA et al., 2016). AgNPs foram eficientes contra a levedura *Candida albicans* resistente a fluconazol (KELKAWI, KAJANI e BORDBAR, 2017). O potencial antiviral de AgNPs também já foi demonstrado com sucesso contra o vírus da imunodeficiência humana - HIV (LARA et al 2010), vírus da hepatite B (XIANG et al., 2011), herpes simplex 1 e 2 e parainfluenza tipo 3 humano (GAIKWAD et al., 2013). Como se pode perceber as aplicações antimicrobianas são inúmeras, principalmente no campo médico, fazendo necessária a produção industrial de AgNPs em larga escala.

Para a produção de grandes quantidades de AgNPs, a indústria comumente utiliza estratégias baseadas em síntese química. Esse tipo de síntese emprega compostos químicos, como uma base forte, que atua como fornecedora de elétrons. Essa técnica já é muito bem estabelecida, e com ela consegue-se obter AgNPs com características físico-químicas pré-determinadas (BEYENE et al., 2017). Todavia, essa técnica produz secundariamente compostos tóxicos que podem poluir o meio ambiente. Uma abordagem menos nociva é a síntese verde, que utiliza recursos biológicos, como extratos de plantas (SRIKAR et al., 2016), aminoácidos (SHANKAR e RHIM, 2015), vitaminas (RASHID, BHUIYAN, e QUAYUM, 2013), entre outros, e que são reconhecidamente agentes redutores, ao invés de reagentes químicos, para fazer com que o metal na forma iônica seja reduzido à sua forma metálica.

Entretanto, a maior dificuldade de utilização industrial da síntese verde ou até mesmo na escala laboratorial de bancada é a uniformização e reprodutibilidade das características físico-químicas das AgNPs. Quando se utiliza materiais vegetais que são coletados diretamente na natureza, para posterior extração (MOHAMMADLOU, MAGHSOUDI e JAFARIZADEH-MALMIRI, 2016), os compostos químicos presentes podem variar de acordo com os fatores bióticos (presença de microrganismos, ataque de insetos, etc) e abióticos (exposição à luz, umidade, solo, temperatura, estação do ano) (REGO e POSSAMAI, 2011).

Basicamente há dois grupos de compostos químicos que podem estar envolvidos na redução da prata iônica até a metálica quando se trata de síntese verde de AgNPs com a utilização de extratos de plantas (BEYENE et al., 2017). Esses compostos são os metabólitos primários e os metabólitos secundários, ambos são afetados de acordo com os fatores bióticos e abióticos aos quais as plantas estão expostas (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

De todo modo, as plantas são amplamente utilizadas na síntese verde pelo fácil acesso a esses compostos redutores. Para não gerar resíduos tóxicos e nem poluentes ao meio ambiente visando à extração desses metabólitos, geralmente, se utiliza como solvente a água. Cada parte da mesma planta pode sintetizar AgNPs com características físico-químicas diferentes devido a variação de metabólitos presentes, sobretudo os secundários (SILVA, PEREIRA e BONATTO 2019). Basicamente, toda parte do vegetal pode ser utilizada já que todas apresentam metabólitos primários e secundários em diferentes proporções e tipos (SRIKAR et al., 2016).

Os metabólitos secundários são compostos orgânicos que não estão diretamente envolvidos em processos primordiais de um vegetal como crescimento, desenvolvimento e reprodução e, sim, estão interligados à toxicidade para patógenos, a mecanismos de adaptação e ao potencial efeito medicinal para os seres humanos (VIZZOTTO, KROLOW E WEBER, 2010). Quando é produzido um extrato de planta, os principais compostos químicos redutores presentes são justamente os metabólitos secundários (NAMDEO, 2007). Se há a variação na concentração ou nas classes de metabólitos secundários presentes em uma planta, por causa da variação de fatores bióticos ou abióticos, tipicamente ocorre variação de concentração dos metabólitos secundários no extrato. As principais classes de metabólitos secundários, demonstrados na Figura 1, que estão envolvidas com a síntese verde de AgNPs e já relatadas na literatura são: flavonóides (TERENTEVA et al., 2015; SAHU et al., 2016, RAJARAM et al., 2014; LOKINA et al., 2014), alcaloides (CHEN e JESSEN, 2016; MEHMOOD et al., 2016; DEVI et al., 2017), terpenos, especificadamente triterpenos (PARLINSKA-WOJTAN et al., 2016), saponinas (CHOI et al., 2018; MUNIYAN et al., 2017) e taninos (YI et al., 2011). A presença desses compostos nas plantas e conseqüentemente nos extratos são importantes pois além de atuarem como agentes redutores eles tem a capacidade de conferir estabilidade a AgNPs fornecendo uma camada de cobertura. As sínteses a partir de extrato de planta já são reconhecidas e na maioria dos casos esses compostos atuam em conjunto podendo conferir uma estabilidade maior as AgNPs, porém fatores bióticos e abióticos que a planta está exposta

modificam as concentrações desses metabólitos e, conseqüentemente alteram as características físico-químicas das AgNPs produzidas (SILVA, PEREIRA e BONATTO 2019).

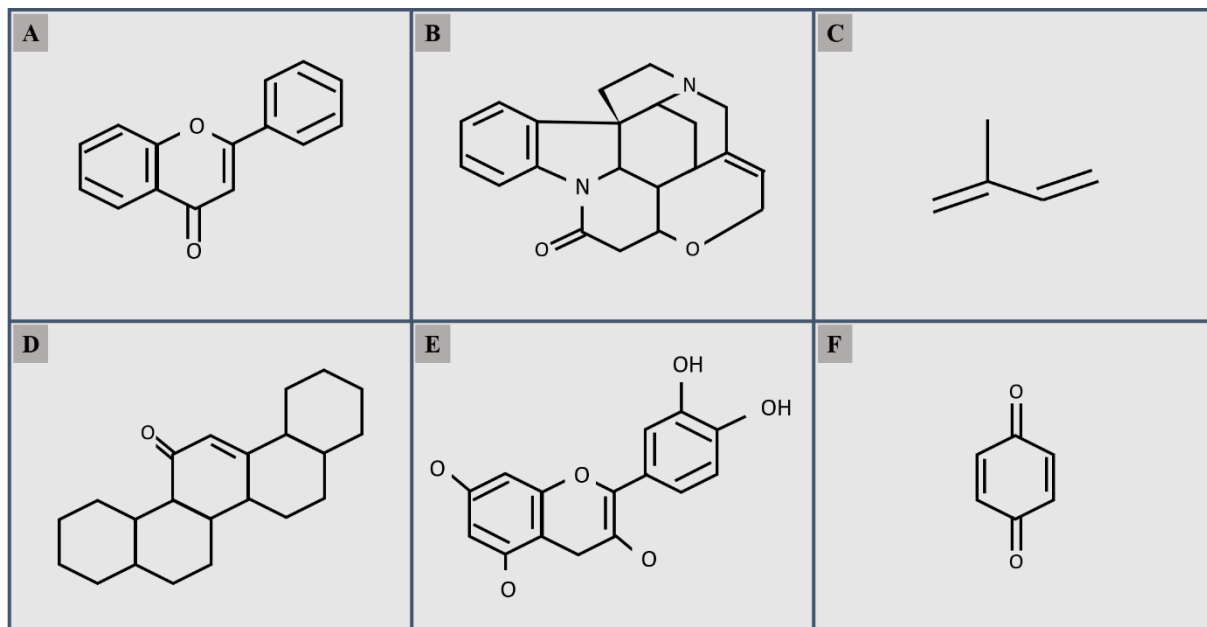


Figura 1 – Demonstração das fórmulas estruturais das principais classes de metabólitos secundários envolvidos na síntese verde de AgNPs utilizando extrato de plantas. a) Flavonóides; b) Alcalóides; c) isopreno (unidade básica formadora de terpenos); d) Saponinas; e) Taninos; e) Quinona.
Fonte: do autor.

Os fatores abióticos, além de mais numerosos, são mais difíceis de serem controlados em plantas encontradas na natureza e em plantações. Já os fatores bióticos, como infestações, o controle pode ser feito por meio da aplicação em larga escala de pesticidas ou até mesmo por meio de agentes de controle biológico. Fatores abióticos como a precipitação chuvosa e as características das estações do ano podem ser considerados algumas das variáveis mais importantes que regem a variação de metabólitos secundários em plantas. Particularmente, a água desempenha um papel importante em toda atividade metabólica, orquestrando quais reações químicas acontecerão no interior da planta (GERSHENZON, 1984). Adicionalmente, o tempo de luz incidida e a temperatura ambiente, que definem as estações do ano, influenciam vários processos da fisiologia vegetal, como época de floração, crescimento e produção de sementes e frutos (KERBAUY, 2004; DOUSSEAU et al., 2007; REGO e POSSAMAI 2011). Utilizar da existência desses dois fatores abióticos e conseguir modular as características físico-químicas de NPs produzidas com extratos de plantas constitui um grande desafio, mas que se superado poderá permitir a aplicação de rotas de síntese verde em processos industriais. Como

já dito, o investimento no mercado de síntese de AgNPs é alto, e a proposta de tornar a síntese mais sustentável torna essa área ainda mais atrativa para pesquisa e desenvolvimento.

O Cerrado é um bioma que apresenta organismos vivos, em particular plantas, com muitas características propensas a serem avaliadas do ponto de vista científico e tecnológico. Suas plantas apresentam metabólitos secundários que tem capacidade de atuar como agente redutor da prata iônica para a formação de AgNPs e a precipitação chuvosa é intensa no verão e no inverno existe um período de estiagem rigoroso. Deste modo, consegue-se definir de maneira mais nítida se há alguma possível influência de um fator abiótico, como os níveis de precipitação chuvosa, na produção de metabólitos e conseqüentemente na síntese de AgNPs utilizando extratos aquosos de plantas. Outra característica que faz do Cerrado um bom bioma para ser avaliado é sua grande biodiversidade, uma fonte rica e ainda pouco explorada de plantas que podem ser utilizadas como agentes biorredutores nas rotas de síntese verde (ALBERNAZ, 2014; SILVA, 2014; BONATTO, 2016; OLIVEIRA, 2018). Esse bioma está situado em uma das 25 áreas do mundo consideradas críticas no que diz respeito à conservação, pois tem uma riqueza biológica vasta e sofre com a rápida destruição de suas áreas (BRASIL, 2006).

Dentre as espécies mais conhecidas desse bioma estão os ipês, plantas da família Bignoniaceae que estão subdivididas em dois gêneros (*Tabebuia* e *Handroanthus*). Os ipês englobam aproximadamente 100 espécies, com ampla distribuição no território latino-americano (MARTINS, et al 2011) e seus extratos aquosos nunca foram avaliados frente seu potencial redutor e formador de AgNPs, apesar de apresentarem moléculas com alto potencial redutor como o lapachol. No Brasil, a área de ocorrência de ipês atinge desde o nordeste até o sul brasileiro abrangendo principalmente o cerrado. Além disso, as características ecológicas desses gêneros tornam seu estudo importante devido ao seu amplo aproveitamento econômico, ornamental e medicinal (OLIVEIRA, et al 2008). Sob o ponto de vista da aparência visual da floração, as espécies de ipês estão divididas em três grandes grupos: aquelas com florações amarelas, brancas e roxa/rosa, como demonstrado na Figura 2.

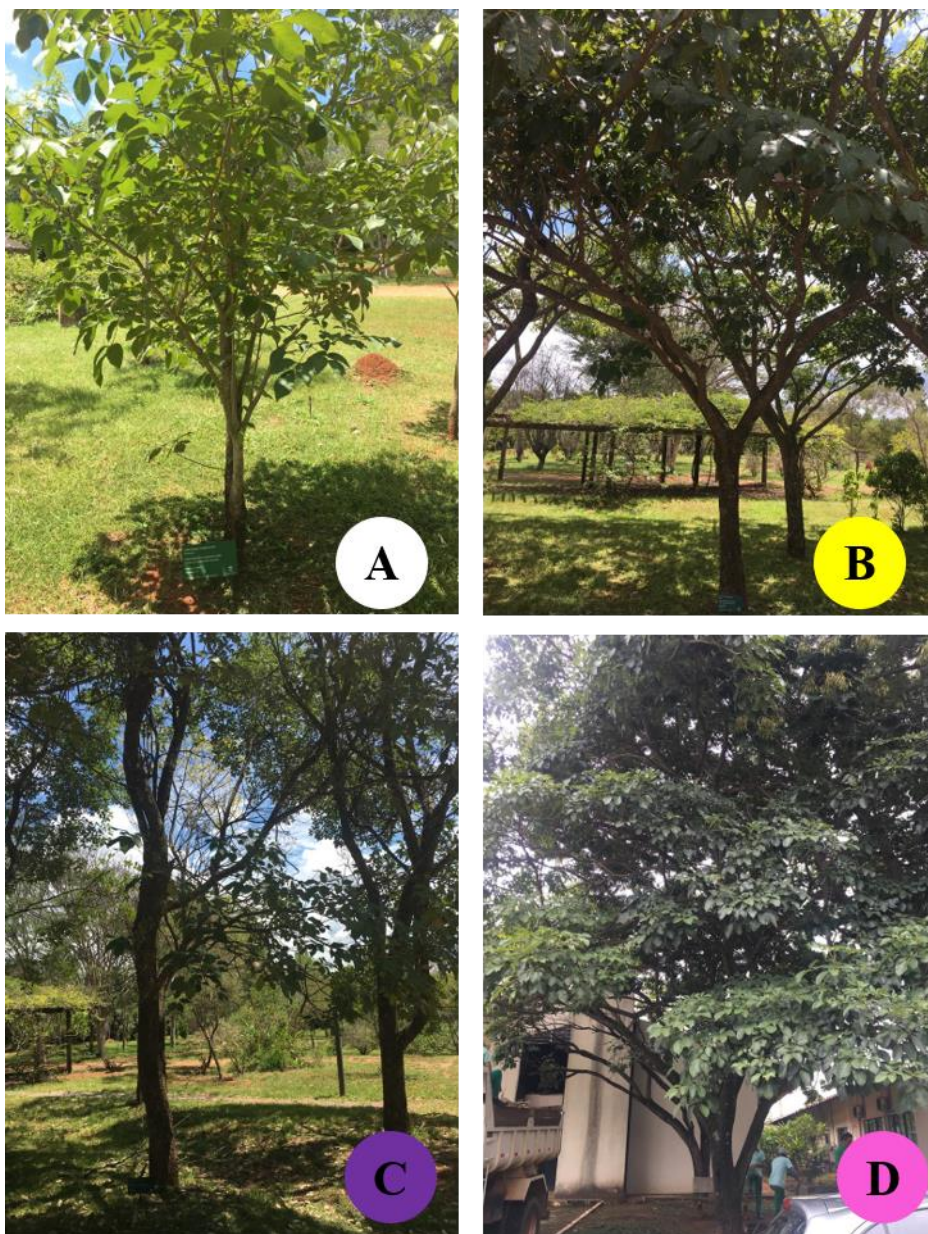


Figura 2 – Fotos das espécies de ipês utilizadas no presente estudo. A cor indicada no círculo demonstra a coloração das florações de cada espécie. a) *Tabebuia roseoalba*; b) *Handroanthus serratifolius*; c) *Handroanthus impetiginosus*; d) *Handroanthus heptaphyllus*.
Fonte: do autor.

Em análise fitoquímica de *Handroanthus serratifolius* (A. H. Gentry) S. Grose (Ipê-amarelo) foi observada a presença de alguns compostos, tais como: saponinas, fenois e taninos (DUARTE, et al 2014). Nas cascas foi determinada a presença de polifenóis em grandes quantidades. A cor vermelha e amarela da madeira está associada à presença de lapachol e dehidro- α -lapachona respectivamente (ROMAGNOLI et al., 2013).

A espécie *Handroanthus impetiginosus* Mattos (Ipê-roxo) apresenta propriedades anticancerígena (BEZERRA et al., 2008), antibacteriana (PARK et al., 2005; 2006),

antioxidante (LEE, PARK e YUM, 2012), antiviral, antifúngica (TANDON, SINGH e YADAV, 2004) e anti-inflamatória (SON et al., 2006; KUNG et al., 2008). Nas folhas de *H. impetiginosus* existem alcaloides, taninos e flavonóides (COLACITE, 2015); e nas cascas e caules foram isoladas naftoquinonas, dentre as quais, a que mais chama atenção é a 1,4-naftoquinona, que está estruturalmente relacionada ao lapachol (PARK et al., 2006). O lapachol, no âmbito da farmacologia, apresenta ampla atividade biocida contra diferentes organismos (HUSSAIN et al., 2007).

Já a espécie *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith (Ipê-branco) demonstrou em suas sementes a presença de compostos fenólicos e, durante a sua germinação, há o aumento da atividade da polifenoloxidase (ABBADE e TAKAKI, 2014). Como descrito, todas as espécies de ipês já caracterizadas quanto ao perfil fitoquímico possuem moléculas biorredutoras, podendo, assim, apresentar potencial aplicação para produção de AgNPs por meio de rotas de síntese verde.

Adicionalmente, no intuito de minimizar o eventual impacto ao meio ambiente e em busca de aumentar a reprodutibilidade do processo em uma posterior abordagem envolvendo a produção em larga escala de AgNPs por síntese verde, uma abordagem possível é o desenvolvimento de estratégias para a propagação e o cultivo *in vitro* dos tecidos vegetais.

O cultivo *in vitro* compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (qualquer parte da planta, como as folhas) é isolado e cultivado em condições assépticas em um meio artificial. Como um organismo vegetal tem a característica da totipotência, ou seja, é possível regenerar a planta completa a partir de qualquer célula, conseguem-se, teoricamente, os metabólitos presentes em plantas *in natura* por meio de abordagens de cultivo em condições controladas *in vitro* (ABBADE, 2008). Essa abordagem possibilita a obtenção de recursos biológicos mais reprodutíveis e uniformes, já que ao utilizar condições controladas específicas, a qualquer momento, consegue-se um perfil de compostos semelhante.

Nesse contexto, o presente estudo propõe a biossíntese de AgNPs a partir de extratos aquosos de partes vegetais de espécies de ipês coletados *in natura*, assim como realizar a avaliação de fatores abióticos aos quais a planta está exposta e correlacionar com o seu potencial formador de AgNPs. Também constitui proposta deste estudo modular as características físico-químicas das AgNPs alterando algumas condições no momento da biossíntese e, em seguida, avaliar o potencial do extrato aquoso de tecidos de ipê cultivados *in vitro* para síntese de AgNPs com vistas à possibilidade de seleção de um recurso biológico sustentável e padronizado para a realização desses processos.

1.1. MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA

AgNPs são nanomateriais largamente utilizados principalmente no campo biológico e farmacêutico devido às reconhecidas propriedades antimicrobianas (BEYENE et al., 2017). Há previsões de aplicação de recursos bilionários na utilização de AgNPs até 2022, o que torna essas NPs cada dia mais valorizadas (GRAND VIEW RESEARCH, 2015). Entretanto, a maioria das rotas de produção disponíveis atualmente são baseadas em processos químicos que, apesar de gerarem materiais com características físico-químicas pré-determinadas, produzem resíduos potencialmente nocivos ao meio ambiente. Assim, uma das propostas do presente estudo é apresentar uma alternativa que vise padronizar as características físico-químicas de AgNPs produzidas a partir de síntese verde com coleta de recursos biológicos *in natura*, além de tentar modular tais características por meio de mudança dos parâmetros reacionais no momento da síntese. Além disso, outra proposta é de tornar a síntese verde ainda mais ecoamigável, fazendo ser desnecessário a coleta extrativista para a síntese verde de AgNPs quando apresentado a possibilidade de utilização de plantas obtidas por meio de cultivo *in vitro*. Os ipês são espécies de ampla abrangência no Brasil, suas partes e extratos são utilizados na medicina tradicional como agente cicatrizante de feridas (COELHO, 2009), agente antioxidante (BUDNI et al., 2007), agente antimicrobiano e anti-inflamatório (CABRAL, 2014), sendo estas espécies de fácil acesso. Essas espécies apresentam uma série de metabólitos já descritos na literatura e a grande maioria deles apresentam a capacidade de ser bons doadores de elétrons, fazendo dos extratos aquosos de ipês potenciais formadores de AgNPs por síntese verde.

1.2. HIPÓTESE

Considerando a possibilidade de existirem modificações das características físico-químicas de AgNPs biossintetizadas a partir da mesma planta (espécie e espécime) resultantes de interferências de fatores abióticos sazonais, seria possível modular as características físico-químicas de AgNPs biossintetizadas pela alteração das condições reacionais?

É possível tornar a síntese verde ainda mais ecoamigável e fazer com que as características físico-químicas das AgNPs sejam mais reproduzíveis utilizando extrato aquoso de tecidos vegetais produzidos *in vitro*?

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Produzir AgNPs por síntese verde utilizando extratos aquosos de tecidos obtidos *in natura* e *in vitro* de espécies de Ipês.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Biossintetizar AgNPs utilizando extrato aquoso de diferentes partes da mesma planta (ipê);
- Biossintetizar AgNPs utilizando de extrato aquoso das folhas de três espécies de ipês, que foram coletadas mensalmente ao longo de 1 ano;
- Alterar as condições reacionais durante a síntese verde e averiguar as possíveis mudanças das características físico-químicas de AgNPs;
- Realizar cultivo *in vitro* de uma espécie de ipê;
- Biossintetizar AgNPs utilizando de extrato aquoso dos calos produzidos *in vitro*;
- Avaliar as características físico-químicas e estruturais das AgNPs biossintetizadas;
- Avaliar o potencial antimicrobiano de AgNPs biossintetizadas;
- Comparar a produção e características de AgNPs obtidas utilizando extratos aquosos de tecidos de plantas obtidas *in natura* e por cultivo *in vitro*.
- Avaliar a aplicabilidade de diferentes tecidos para produção de AgNPs.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LISTA DE REAGENTES

- Ácido naftaleno acético-ANA (Sigma-Aldrich, EUA);
- Água destilada tipo III (Gehaka, Brasil);
- Água ultrapura tipo I (Gehaka, Brasil);
- Água destilada tipo III (Millipore Corporation, EUA);
- Água ultrapura tipo I (Millipore Corporation, EUA);
- Álcool etílico hidratado 92,8° (Itajá, Brasil);
- Álcool isopropílico (Vetec, Brasil);
- Ágar-Ágar (Vetec, Brasil);
- Antibiótico Penicilina e Estreptomicina (Gibco, EUA);
- Extran[®] (Millipore Corporation, EUA);
- Meio de cultura básico Luria Bertani-LB (Sigma-Aldrich, EUA);

- Meio de cultura Murashige and Skoog (MS) (Sigma-Aldrich, EUA);
- Nitrato de prata (Plat-lab, Brasil);
- D (+) Sacarose (Dinâmica, Brasil)

3.2. LISTA DE MATERIAIS

- Bisturi (ABC instrumentos cirúrgicos, Brasil);
- Canetas permanentes coloridas (Pilot, Japão);
- Célula capilar descartável de policarbonato (modelo DTS1070, Malvern, Reino Unido);
- Cubeta de poliestireno descartável de 1,5 mL (modelo 1948, Kartell, Itália);
- Espátulas tipo canaletas e colher (Laborglas, Brasil);
- Filme de laboratório (Parafilm M[®], American National 26 Can, EUA);
- Fita adesiva crepe (Adelbras, Brasil);
- Fita autoclave para processo de esterilização a vapor (Eurocel, Brasil);
- Frasco de plástico tipo Béquer com capacidade para 100, 250 e 1000 mL (J.Prolab, Brasil);
- Frasco de vidro tipo Béquer com capacidade para 5, 50, 250 e 500 mL (Qualividros, Brasil);
- Frascos do tipo Erlenmeyer com capacidade de 10, 50, 100, 200 e 500 mL (Phox, Brasil);
- Funil de vidro (J.Prolab, Brasil);
- Lâmina de bisturi (Wiltex, China);
- Luva para procedimento não cirúrgico (Super Max, Malásia);
- Mica muscovita;
- Microtubos de polipropileno do tipo *ependorf* de 1,5 mL (Olen, China);
- Microtubos de polipropileno do tipo *ependorf* de 2,0 mL (Global trade, Brasil);
- Papel alumínio (Wyda pratic, Brasil);
- Papel branco (One, Brasil);
- Papel crepado tratado e adesivo à base de resina e borracha (3M, Brasil);
- Papel filtro qualitativo 80 g (Unifil, Alemanha);
- Papel universal indicador de pH (Qualividros, Brasil);
- Pinça clínica, anatômica dente de rato 12 cm (Laborglas, Brasil);
- Pinça invertida (LabSynth, Brasil);

- Placas de Petri descartáveis estéreis (J.Prolab, Brasil);
- Ponteiras de nitreto de silício para microscópio de força atômica (Nanosensors, EUA);
- Ponteiras de polipropileno brancas (0,1-10 µL) (Global trade, Brasil);
- Ponteiras de polipropileno amarelas (20-200 µL) (Global trade, Brasil);
- Ponteiras de polipropileno azuis (100-1000 µL) (Global trade, Brasil);
- Placa de microtitulação 96 poços (HS-YL-PM96C, Redplast, Brasil);
- Provetas de vidro com capacidade de 10, 100, 200 e 1000 mL (Pyrex, EUA);
- Tampa para placa de microtitulação (HS-YC-PTM, Redplast, Brasil);
- Tesoura cirúrgica 12 cm Reta Fina/Fina (LabSynth, Brasil);
- Tesoura Íris 12 cm Curva (ABC Instrumentos, Brasil);
- Tubo para centrífuga tipo Falcon 15 mL com tampa rosca graduado (Alfa, Brasil);
- Tubo 50 mL cônico tipo Falcon com tampa rosca graduado (Alfa, Brasil).

3.3. LISTA DE EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético com aquecimento (LUCA-01/09-E, Lucadema, Brasil);
- Agitador magnético com aquecimento (Q261, Quimis, Brasil);
- Ar condicionado (Carrier, EUA);
- Autoclave (Prismatec, Brasil);
- Autoclave de bancada (Idealclave 23 L, Brasil);
- Balança analítica (Ax200, Shimadzu, Japão);
- Balança eletrônica de precisão (Q520-3, Quimis, Brasil);
- Banho de ultrassom (Q335D, Quimis, Brasil);
- Banho-maria quatro bocas microprocessado (Q334M, Quimis, Brasil);
- Biofotômetro (6131, Eppendorf, Alemanha);
- Câmara escura com luz UV 365 nm (Q316CE, Quimis, Brasil);
- Difratorômetro de raios X de bancada (MiniFlex 600, Rigaku, Japão);
- Espectrofotômetro UV-Vis (Q898U, Quimis, Brasil);
- Estufa de secagem e esterilização (Luca-81/81, Lucadema, Brasil);
- Fluxo laminar unidirecional (FUH-18, Veco, Brasil);
- Forno microondas (MS3048GA, LG, Brasil);
- Freezer -20°C (Consul, Brasil); Freezer -40°C (Liotop, Brasil);
- Incubadora bacteriológica (Luca-81/81, Lucadema, Brasil);

- Incubadora de demanda bioquímica de oxigênio modificada com incidência de luz PAR - fotossintética ativa (Limatec, Brasil);
- Incubadora *shaker* de bancada (Luca-222, Lucadema, Brasil);
- Leitora de microplacas (ELx808 IU, Biotek, EUA);
- Liofilizador (AISI 304, Terroni, Brasil);
- Micropipeta multicanal de capacidade de 200 µL (Discovery Comfort, HTL, Polônia);
- Micropipetas monocanais de capacidade de 2 µL, 10 µL, 200 µL, 1000 µL, 5000 µL e 10000 µL (LabMate Soft, HTL, Polônia);
- Microscópio de força atômica (SPM-9600, Shimadzu, Japão);
- Nano ZetaSizer (Nano ZS, Malvern, UK);
- pHmetro (AD1000, Adwa, Hungria);
- Refrigerador (Bosch, Alemanha); Refrigerador compacto (Consul, Brasil);
- Sistema de purificação de água (Gehaka, Brasil);
- Sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore Corporation, EUA);
- Timer digital.

3.4. COLETA DE MATERIAL BOTÂNICO

Os materiais botânicos das espécies *Handroanthus serratifolius*, *Handroanthus impetiginosus* e *Tabebuia roseoalba* foram coletados em área protegida (Jardim Botânico de Brasília - JBB) e a espécie *Handroanthus heptaphyllus* em área urbana de Brasília-DF de acordo com as licenças do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético número 02001.007580/2014-95, SISBIO: 57671-1 e autorização de pesquisa do JBB: 008/2017. As folhas das espécies coletadas no JBB foram retiradas mês a mês (18/03/2017 a 18/02/2018) e folhas, caules, flores e botão floral da espécie *H. heptaphyllus* foram coletados de acordo com demanda espontânea em época adequada na qual havia disponibilidade de todos os tecidos. Os materiais botânicos foram sendo armazenados, separadamente, a -20°C até o momento da utilização, procedimento que projetos anteriores demonstraram assegurar as características do material. Foi feita exsiccata no JBB da espécie *T. roseoalba* a qual recebeu número de tombo de 33010. A espécie *H. impetiginosus* já constava no herbário com número de tombo: 32871; a *H. serratifolius* com o número de tombo: 32872. A figura 3, demonstra um fluxograma da metodologia utilizada.

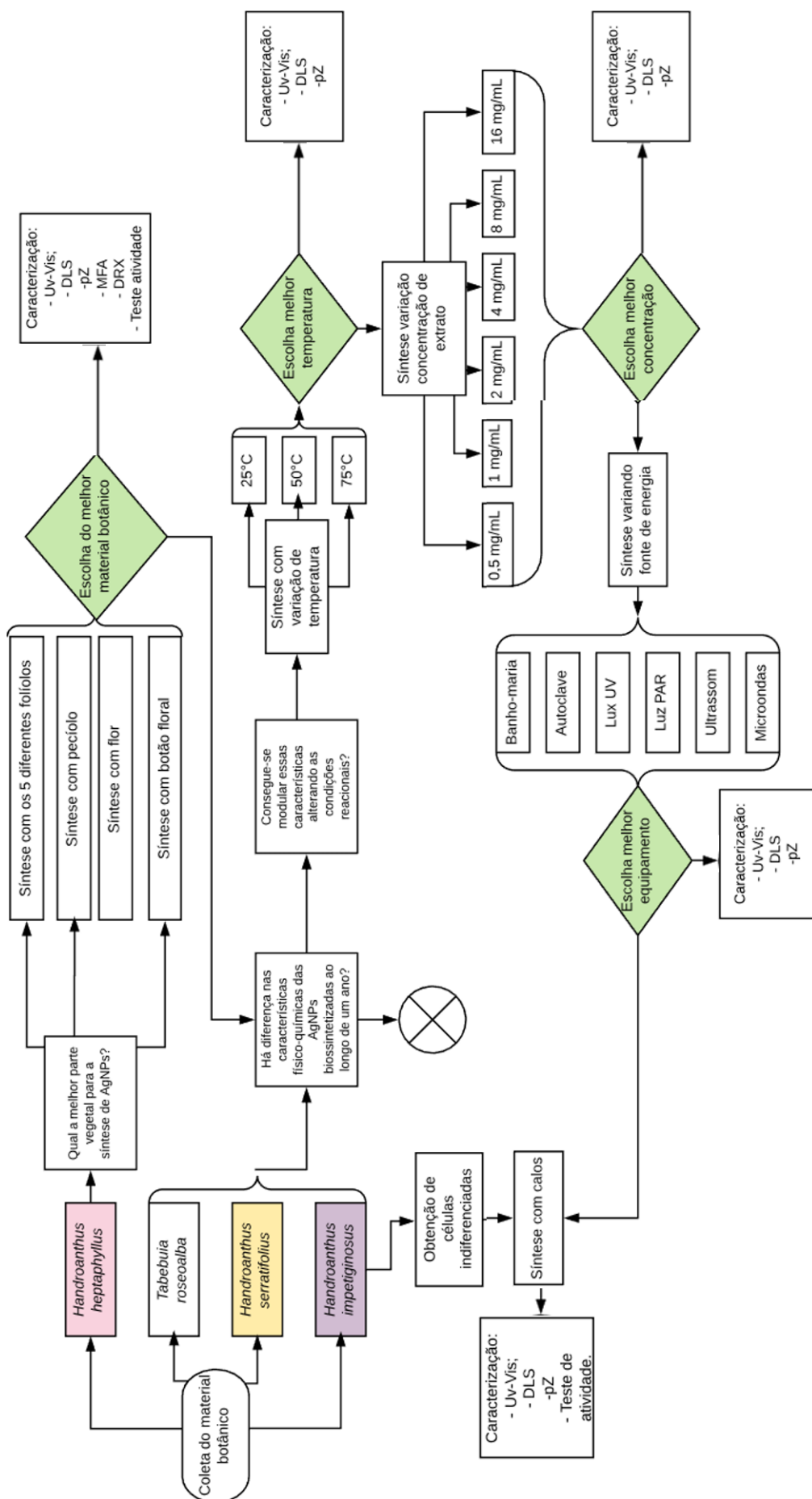


Figura 3 – Fluxograma metodológico de todas as etapas. Os losangulos em verde representam as etapas de decisão embasados nas etapas de caracterização. As cores nos nomes científicos representam a coloração das flores de cada espécie. O círculo com a indicação de X, demonstra que se essa etapa falhar a hipótese do trabalho não é coerente.
Fonte do autor.

3.5. OBTENÇÃO DE CÉLULAS INDIFERENCIADAS (CALO) DE *Handroanthus impetiginosus*

Esta etapa foi realizada no Laboratório de biologia ambiental e genotoxicidade (BIOGEN) pelos alunos Brena Gomes e Gabriel Chiari orientados pelo Dr. Breno Régis Santos. Para obtenção de calos da espécie *H. impetiginosus* foram preparados meios Murashige and Skoog (MS) suplementados com 30 g/L de sacarose, 2 µmol/L de ácido naftaleno acético, e solidificados com 6 g/L de Agar, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 min. Segmentos do hipocótilo extraídos de plântulas de *H. impetiginosus* foram utilizadas como explantes e inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS.

3.6. PREPARO DE EXTRATO AQUOSO

Os materiais botânicos que foram armazenados em freezer a -20°C (folhas, flores, pecíolo e botão floral) passaram pelo processo de descongelamento à temperatura ambiente, e posteriormente foram lavados em solução aquosa de Extran 1%. Para o preparo dos extratos, os materiais a serem utilizados foram cortados com tamanho médio de 4 × 2 mm. Foi adicionado a cada material recém-cortado água ultrapura em ebulição até a concentração inicial de 100 mg/mL (peso material botânico/volume de água). Essa suspensão foi mantida em chapa de aquecimento durante 2 a 5 min para extração de metabólitos e de acordo com a variação de cada experimento demonstrada na Tabela 1. Cada decocção foi filtrada e o extrato aquoso resultante obtido.

Tabela 1 - Extratos aquosos obtidos a partir de diferentes espécies e partes vegetais. O tempo de extração indica quanto tempo cada material botânico ficou em chapa de aquecimento com água ultrapura em ebulição antes de ser filtrado.

Extrato aquoso	Espécie utilizada	Parte utilizada	Tempo de extração (min)
A	<i>H. heptaphyllus</i>	Folíolo 1	2
B	<i>H. heptaphyllus</i>	Folíolo 2	2
C	<i>H. heptaphyllus</i>	Folíolo 3	2
D	<i>H. heptaphyllus</i>	Folíolo 4	2
E	<i>H. heptaphyllus</i>	Folíolo 5	2
F	<i>H. heptaphyllus</i>	Flor	2

(continua)

(conclusão)			
Extrato aquoso	Espécie utilizada	Parte utilizada	Tempo de extração (min)
G	<i>H. heptaphyllus</i>	Pecíolo	2
H	<i>H. heptaphyllus</i>	Botão floral	2
I	<i>T. roseoalba</i>	Folha	2
J	<i>H. serratifolius</i>	Folha	2
K	<i>H. impetiginosus</i>	Folha	2
L	<i>H. serratifolius</i>	Calo	2
M	<i>H. serratifolius</i>	Calo	3
N	<i>H. serratifolius</i>	Calo	4
O	<i>H. serratifolius</i>	Calo	5

Fonte: do autor.

3.7. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Todas as reações de síntese de AgNPs foram realizadas utilizando solução aquosa de nitrato de prata (AgNO_3) para uma concentração final de 1 mM e extrato aquoso do material botânico. O extrato aquoso foi obtido conforme o tópico acima, posteriormente o mesmo foi adicionado em solução de nitrato de prata em um volume final de 5 mL, como descrito nos subtópicos abaixo. Além disso, foram produzidos controles de extrato com água ultrapura e extrato aquoso do material botânico, e controle do sal metálico (CM) com água ultrapura e solução aquosa de nitrato de prata a 1 mM.

3.7.1. Prospecção do material botânico para síntese de AgNPs

Para essa rota de síntese foram utilizados os extratos aquosos A, B, C, D, E, F, G e H obtidos de folíolos (F1, F2, F3, F4 e F5), flores (L), pecíolo (P) e botão floral (B), respectivamente. A fim de compreender se existe diferença na formação de AgNPs, os materiais botânicos utilizados e a forma da divisão dos folíolos estão representados na Figura 4. Para cada extrato citado acima foi preparada uma solução de nitrato de prata com concentração de 1 mM e volume de 4,95 mL, na qual foi adicionado 0,05 mL de extrato com concentração final de 1 mg/mL para a formação de suspensão de AgNPs, com a possibilidade dos extratos atuarem como agentes redutores, convertendo íons Ag^+ em Ag^0 e também no crescimento e estabilização das AgNPs. As reações foram realizadas em banho-maria a 50°C com monitoramento em

espectrofotômetro ($\gamma = 450 \text{ nm}$) a cada 30 min por 180 min. A fim de facilitar a compreensão e evitar a repetição dos termos, criou-se uma denominação para as AgNPs produzidas, como indicada na Tabela 2 (Página 30).

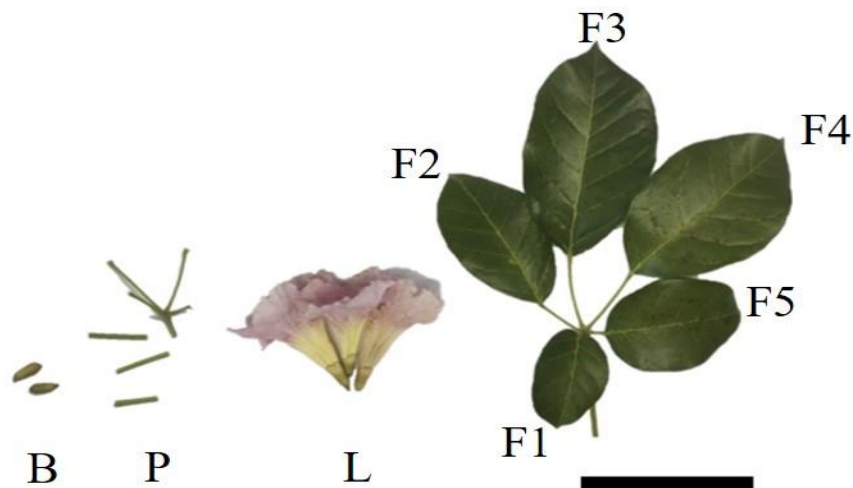


Figura 4 - Fotografias das partes vegetais de *H. heptaphyllus* que foram utilizadas para síntese de AgNPs. Da esquerda para a direita: botões florais (B), segmentos de pecíolos (P), flores (L) e folhas compostas. O folíolo 1 é o inferior esquerdo e o folíolo 5 é o inferior direito, seguindo em ordem (F1, F2, F3, F4 e F5). A barra preta tem exatamente 10 cm.
Fonte: do autor.

3.7.2. Síntese com folhas coletadas mensalmente ao longo de um ano

Para avaliar o possível efeito da sazonalidade na síntese de AgNPs e averiguar se há mudanças nas características físico-químicas das AgNPs biossintetizadas, foram coletadas folhas, de três espécies de ipês, mês a mês, durante um ano. Foram preparados no total 11 extratos aquosos de cada espécie (*T. roseoalba* – I, *H. serratifolius* – J e *H. impetiginosus* – K), pois cada espécie teve um mês em que não haviam folhas para serem coletadas. Assim, 0,05 mL dos extratos aquosos na concentração final de 1 mg/mL foram adicionados em 4,95 mL de solução de nitrato de prata a 1 mM. Para as reações de síntese, os extratos juntamente com a solução de nitrato de prata foram incubados em banho-maria a 50°C. Houve monitoramento em espectrofotômetro ($\gamma = 450 \text{ nm}$) a cada 30 min por 180 min.

3.7.3. Síntese com variação de temperatura

Para avaliar o possível efeito da variação de temperatura na síntese de AgNPs, os extratos aquosos I, J e K foram utilizados como possíveis agentes redutores em uma concentração final de 1 mg/mL, sendo 0,05 mL do extrato adicionado em 4,95 mL de solução aquosa de nitrato de prata a 1 mM. Para variação de temperatura os extratos com o nitrato de

prata foram incubados em banho-maria 75°C, 50°C e 25°C. Houve monitoramento em espectrofotômetro ($\gamma = 450$ nm) a cada 30 min por 180 min.

3.7.4. Síntese com variação de concentração

Para avaliar o efeito da concentração de extrato na síntese de AgNPs, os extratos aquosos das folhas de *T. roseoalba*, *H. serratifolius* e *H. impetiginosus*, extratos I, J e K respectivamente, foram utilizados como possíveis agentes redutores nas concentrações finais de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; e 16,0 mg/mL, sendo adicionado em uma solução aquosa de nitrato de prata a 1 mM. As variações de concentrações de extrato aplicados para formação de AgNPs e seus respectivos extratos foram incubados separadamente em banho-maria 50°C. Houve monitoramento em espectrofotômetro ($\gamma = 450$ nm) a cada 30 min por 180 min.

3.7.5. Síntese com variação de fonte de energia

Para avaliar o possível efeito da fonte de energia (térmica, luminosa e sonora) na síntese de AgNPs, os extratos aquosos I, J e K foram utilizados como agentes redutores em uma concentração final de 1 mg/mL, sendo 0,05 mL do extrato adicionado em 4,95 mL de solução aquosa de nitrato de prata a 1 mM. A solução precursora da formação de AgNPs e seus controles foram incubados por 180 min nos equipamentos: banho de ultrassom 50°C; incubadora modificada com incidência de luz PAR (fotossintética ativa) temperatura ambiente; banho-maria 50°C e exposição a radiação UV temperatura ambiente. O monitoramento se deu a cada 30 min em espectrofotômetro ($\gamma = 450$ nm). As suspensões de AgNPs e seus controles também foram incubados em autoclave por um ciclo completo (cerca de 1 hora) e em microondas por 1,5 min, sendo que nestes dois casos foram realizadas apenas as leituras iniciais e finais em espectrofotômetro.

3.7.6. Síntese com material botânico obtido por propagação vegetativa

Para avaliar o possível efeito do uso de plantas cultivadas *in vitro* na síntese de AgNPs, o extrato aquoso dos calos (L) foi utilizado como possível agente redutor e estabilizante. O extrato foi adicionado em uma solução de nitrato de prata com concentração de 1 mM até atingir duas concentrações finais diferentes a de 1 e 4 mg/mL com volume final de 5 mL. A solução precursora de formação de AgNPs e seus controles foram incubados em banho-maria a 50°C e 75°C. Houve monitoramento em 450 nm em leitora de microplacas a cada 30 min por 180 min.

Um resumo de todas as reações de síntese realizadas, materiais botânicos utilizados, concentrações de extratos produzidos, variações de fonte de energia empregada e designação dada a cada suspensão de AgNPs formada se encontram na Tabela 2. A partir deste momento as amostras serão relatadas de acordo com o nome atribuído. O nome da amostra é apresentado como um código como está demonstrado na Figura 5.

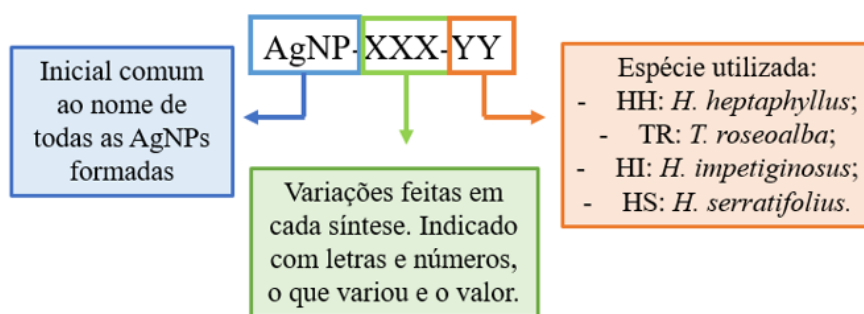


Figura 5 – Esquema ilustrativo da nomenclatura utilizada para descrever as amostras contendo suspensões aquosas de AgNPs formadas a partir de diferentes rotas de síntese durante o desenvolvimento do estudo.

Fonte: do autor.

Tabela 2 – Resumo de todas as rotas de síntese realizadas durante o estudo, demonstrando qual parte foi utilizada como material botânico e as variações de condições ocorridas em cada uma delas, indicando, ao final, o nome da suspensão aquosa de AgNPs produzida, de acordo com a forma de codificação descrita na Figura 4.

Parte vegetal utilizada	Extrato aquoso	Concentração de extrato (mg/mL)	Equipamento utilizado	Temperatura (°C)	Tempo de síntese (min)	Nome da amostra de AgNPs
Folículo 1	A	1	Banho-maria	50	180	AgNP-F1-HH
Folículo 2	B	1	Banho-maria	50	180	AgNP-F2-HH
Folículo 3	C	1	Banho-maria	50	180	AgNP-F3-HH
Folículo 4	D	1	Banho-maria	50	180	AgNP-F4-HH
Folículo 5	E	1	Banho-maria	50	180	AgNP-F5-HH
Flor	F	1	Banho-maria	50	180	AgNP-FL-HH
Pecíolo	G	1	Banho-maria	50	180	AgNP-P-HH
Botão floral	H	1	Banho-maria	50	180	AgNP-BFL-HH
Folha	I	1	Banho-maria	25	180	AgNP-T25-TR

(continua)

(continuação)

Parte vegetal utilizada	Extrato aquoso	Concentração de extrato (mg/mL)	Equipamento utilizado	Temperatura (°C)	Tempo de síntese (min)	Nome da amostra de AgNPs
Folha	I	1	Banho-maria	50	180	AgNP-T50-TR
Folha	I	1	Banho-maria	75	180	AgNP-T75-TR
Folha	J	1	Banho-maria	25	180	AgNP-T25-HS
Folha	J	1	Banho-maria	50	180	AgNP-T50-HS
Folha	J	1	Banho-maria	75	180	AgNP-T75-HS
Folha	K	1	Banho-maria	25	180	AgNP-T25-HI
Folha	K	1	Banho-maria	50	180	AgNP-T50-HI
Folha	K	1	Banho-maria	75	180	AgNP-T75-HI
Folha	I	0,5	Banho-maria	50	180	AgNP-C0,5-TR
Folha	I	1	Banho-maria	50	180	AgNP-C1-TR
Folha	I	2	Banho-maria	50	180	AgNP-C2-TR
Folha	I	4	Banho-maria	50	180	AgNP-C4-TR
Folha	I	8	Banho-maria	50	180	AgNP-C8-TR
Folha	I	16	Banho-maria	50	180	AgNP-C16-TR
Folha	J	0,5	Banho-maria	50	180	AgNP-C0,5-HS
Folha	J	1	Banho-maria	50	180	AgNP-C1-HS
Folha	J	2	Banho-maria	50	180	AgNP-C2-HS
Folha	J	4	Banho-maria	50	180	AgNP-C4-HS
Folha	J	8	Banho-maria	50	180	AgNP-C8-HS
Folha	J	16	Banho-maria	50	180	AgNP-C16-HS
Folha	K	0,5	Banho-maria	50	180	AgNP-C0,5-HI
Folha	K	1	Banho-maria	50	180	AgNP-C1-HI
Folha	K	2	Banho-maria	50	180	AgNP-C2-HI

(conclusão)

Parte vegetal utilizada	Extrato aquoso	Concentração de extrato (mg/mL)	Equipamento utilizado	Temperatura (°C)	Tempo de síntese (min)	Nome da amostra de AgNPs
Folha	K	4	Banho-maria	50	180	AgNP-C4-HI
Folha	K	8	Banho-maria	50	180	AgNP-C8-HI
Folha	K	16	Banho-maria	50	180	AgNP-C16-HI
Folha	I	1	Banho-maria	50	180	AgNP-BM-TR
Folha	I	1	Luz PAR	T.A.	180	AgNP-PAR-TR
Folha	I	1	Luz UV	T.A.	180	AgNP-UV-TR
Folha	I	1	Ultrassom	50	180	AgNP-US-TR
Folha	I	1	Autoclave	120	90	AgNP-A-TR
Folha	I	1	Microondas	▲	1,5	AgNP-M-TR
Folha	J	1	Banho-maria	50	180	AgNP-BM-HS
Folha	J	1	Luz PAR	T.A.	180	AgNP-PAR-HS
Folha	J	1	Luz UV	T.A.	180	AgNP-UV-HS
Folha	J	1	Ultrassom	50	180	AgNP-US-HS
Folha	J	1	Autoclave	120	90	AgNP-A-HS
Folha	J	1	Microondas	▲	1,5	AgNP-M-HS
Folha	K	1	Banho-maria	50	180	AgNP-BM-HI
Folha	K	1	Luz PAR	T.A.	180	AgNP-PAR-HI
Folha	K	1	Luz UV	T.A.	180	AgNP-UV-HI
Folha	K	1	Ultrassom	50	180	AgNP-US-HI
Folha	K	1	Autoclave	120	90	AgNP-A-HI
Folha	K	1	Microondas	▲	1,5	AgNP-M-HI
Calo	L	1	Banho-maria	75	180	AgNP-Cal2-HS

Legenda: T.A.: temperatura ambiente; ▲: aquecimento proporcionado pelo microondas, não quantificado.

Fonte: do autor.

3.8. CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

3.8.1. Espectroscopia UV-Visível (UV-Vis)

Para a análise do pico ou banda de absorção máxima, todas as amostras de AgNPs, controles de íons prata AgNO₃ e controles de extrato foram diluídos 10 vezes em água ultrapura. Foi escaneado com auxílio de um espectrofotômetro na faixa de 350 a 550 nm de comprimento de onda, utilizando uma cubeta de plástico de 1 cm de largura.

3.8.2. Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersividade e potencial Zeta

Amostras de AgNPs e seus respectivos controles foram diluídos 10 vezes em água ultrapura, separadamente. Utilizando o equipamento ZetaSizer Nano ZS com o módulo de espalhamento de luz dinâmico (DLS), o diâmetro hidrodinâmico, que inclui o diâmetro seco da nanopartícula mais a sua camada de solvatação, e o PDI, que oferece informações sobre a distribuição das subpopulações de tamanho das partículas foi analisado. Posteriormente, utilizando outro módulo do equipamento, o potencial Zeta, que demonstra um indicativo da estabilidade coloidal das nanopartículas.

Para análise de DLS o ângulo aplicado foi de 173° utilizando um laser de hélio-neônio (4 mW) operando em 633 nm de comprimento de onda. Foram obtidas três replicatas de cada amostra em modo automático a 25°C. Já para o potencial Zeta foram obtidas três aquisições em modo manual com 20 leituras em cada replicata.

3.8.3. Microscopia de força atômica (MFA)

A forma e o tamanho (altura) das AgNPs foram avaliados utilizando um equipamento SPM-9600. As amostras foram diluídas de 100 a 1000 vezes e aplicadas sobre uma camada de mica muscovita, recém-clivada. Para que as imagens fossem obtidas foram realizadas varreduras em orientação XY, que abrangiam áreas variando de $0,635 \times 0,635$ a $40 \times 40 \mu\text{m}^2$ com uma taxa de varredura de 1 Hz, com uma ponteira de silício cônica integrada a um cantilever retangular com frequência de ressonância de cerca de 250 kHz. Para o ajuste das imagens o *software* SPM-9600 em modo offline foi utilizado, com ajuste automático de plano no eixo X, correção de linhas no eixo X e *background*. Os diâmetros secos das AgNPs foram verificados, com avaliação de pelo menos 250 partículas para cada amostra. Os dados foram distribuídos em classes em porcentagem para ilustrar a população e obter curvas de distribuição.

A interpolação foi feita de acordo com a função gaussiana com o auxílio do software OriginPro 8.

3.8.4. Difração de raios X (DRX)

Cerca de 10 mL das amostras: AgNP-BFL-HH; AgNP-FL-HH; AgNP-F4-HH; e AgNP-P-HH, foram deixadas em freezer -40°C *overnight*. As amostras foram colocadas em um liofilizador por 32 horas até que toda a amostra se transformasse em pó. A análise foi realizada em laboratório da Faculdade de Ceilândia (FCE) sob supervisão do Dr. Marcelo Henrique Sousa. Para facilitar a aplicação das amostras em porta amostra de silício, as mesmas foram ressuspensas em álcool isopropílico. Após a aplicação, as mesmas foram deixadas em temperatura ambiente até a evaporação de todo o álcool. O equipamento utilizado foi o MiniFlex 600. A radiação utilizada foi selecionada por um monocromador de grafite com gerador de raios X operando a 40 kV/15 mA e radiação incidente de $\text{CuK}\alpha$. A varredura foi feita de 25° a 80° (2θ) com intervalos de $0,05^{\circ}$.

3.8.5. Teste de atividade antibacteriana em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Colônias isoladas de *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram inoculadas em meio Luria-Bertani (LB) líquido, separadamente, e mantidas a 37°C , 120 rpm *overnight* em incubadora *shaker* de bancada. Em seguida, os meios de cultura com as bactérias foram diluídos em meio líquido LB até a densidade óptica de 0,050. Para testar a possível citotoxicidade das AgNPs contra *E. coli* e *S. aureus*, as concentrações das amostras utilizadas foram de 256, 128, 64 e 32 μM . Como controle positivo, utilizou-se penicilina e estreptomicina na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e como controle negativo apenas água destilada autoclavada. Controles de todos os extratos vegetais foram utilizados na maior concentração e controles com nitrato de prata - AgNO_3 foram utilizados nas mesmas concentrações equivalentes às AgNPs. As leituras das densidades ópticas foram realizadas a 630 nm no momento em que as bactérias foram aplicadas à microplaca e assim incubadas a 37°C em incubadora bacteriológica, com ciclo de leituras de densidade óptica em 0 e 72 horas após o início da incubação.

3.8.6. Análises estatísticas

A fim de se comparar as médias e a significância estatística entre as características físico-químicas das AgNPs sintetizadas e atividade antimicrobiana testadas em triplicata, foram realizadas análises estatísticas por teste de normalidade em cada tratamento e Análise de Variância (ANOVA) com um posterior teste para comparação das médias, teste Tukey e teste T, onde as diferenças entre as médias foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. O software PAST 3 (HAMMER et al., 2001) foi utilizado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ESTRATÉGIA PARA PROSPECÇÃO E SELEÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO PARA UTILIZAÇÃO NA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Para a definição do material botânico mais adequado a ser utilizado nas etapas posteriores, foi realizada uma triagem com a espécie “*H. heptaphyllus*”, sendo que neste caso as reações de síntese foram produzidas com o botão floral, flor, pecíolo e os 5 diferentes folíolos, separadamente. Houve mudança de coloração dos tubos em todos os extratos avaliados, característica visual da formação de AgNPs. Pelo monitoramento das reações por leitura em espectrofotômetro a 450 nm houve a confirmação do aumento de absorbância em função do tempo de reação, corroborando a formação de AgNPs com todos os tipos de materiais botânicos provenientes de extratos aquosos de *H. heptaphyllus*.

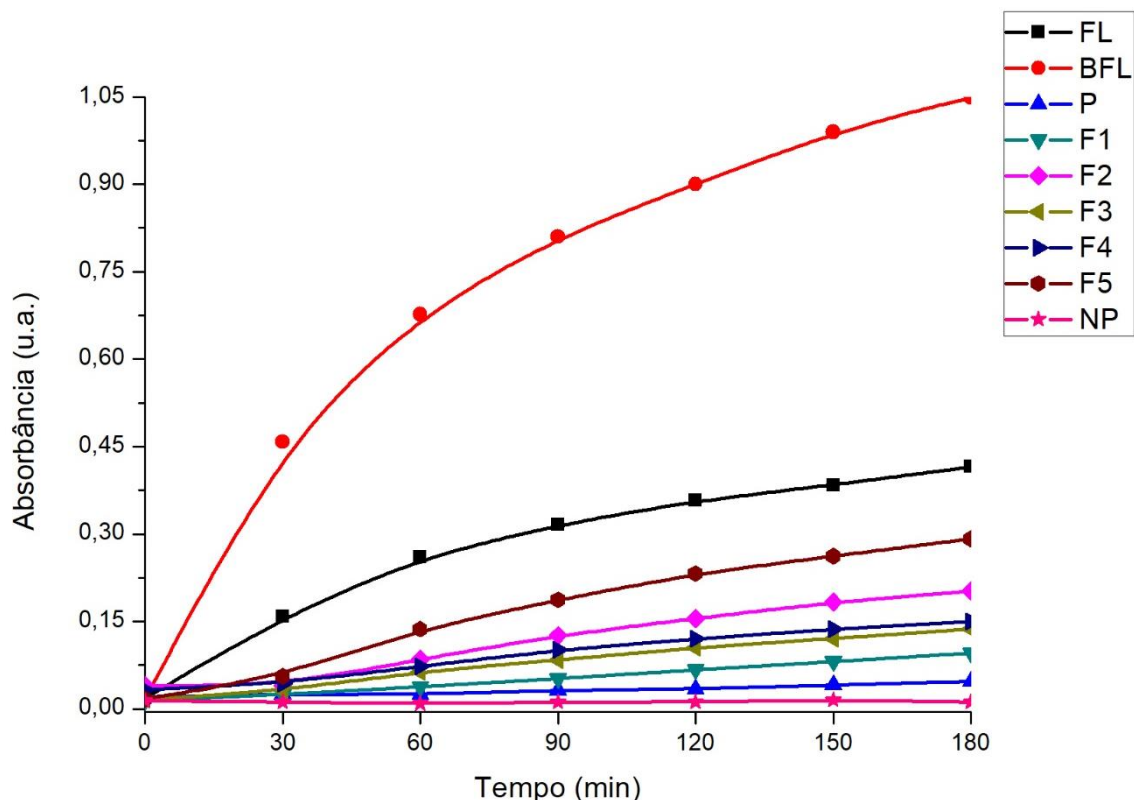


Figura 6 - Resultados de absorvância por espectrofotometria das reações de biossíntese de AgNPs com diferentes extratos aquosos das partes vegetais da espécie *H. heptaphyllus* em função do tempo de reação, sendo: FL: extrato aquoso de flor; BFL: extrato aquoso de botão floral; P: extrato aquoso de pecíolo; F1 a F5: extrato aquoso dos cinco diferentes folíolos; NP: controle negativo de formação apenas com nitrato de prata.

Fonte: do autor

A verificação cinética do aumento da absorvância ao longo do tempo está apresentada na Figura 6. Os registros de aumento da absorvância foram mais expressivos nas AgNP-BFL-HH e AgNP-FL-HH. Isso pode ter acontecido porque o botão floral e a flor contêm moléculas responsáveis por atrair polinizadores, oferecer valor nutritivo ao néctar, dar coloração e aroma. De fato, sabe-se que existem metabólitos secundários em maior concentração nos órgãos reprodutivos das plantas (SARINI, BOPAIAH, 2016). No botão floral, existem alcalóides específicos para aumentar a concentração de néctar e possibilitar a formação de pólen (STEVENSON et al., 2017). Em flores, há também uma maior concentração de proteínas de transporte de alcalóides, que além de aumentar a concentração de metabólitos secundários nesse órgão, também facilita sua função reprodutiva (SHITAN, 2016). Entretanto, um desafio quanto à utilização de botão floral ou flores de ipês reside no fato de que estes órgãos vegetais estão presentes nas plantas apenas em um curto período do ano.

Como mostrado na Figura 7, as AgNPs formadas com o uso do extrato aquoso de flor e botão floral apresentaram um pico de absorvância a 450 nm, enquanto as AgNPs formadas com

o extrato aquoso dos folíolos 1, 3, 4 e 5 apresentaram picos máximos de absorvância a 440 nm; as que foram sintetizadas com o extrato aquoso do folíolo 2 apresentou pico em 430 nm; e, por fim, as que foram sintetizadas com o pecíolo demonstraram um pico em 420 nm. Estas diferenças nos picos de máxima de RPS podem ter ocorrido devido a alguma alteração nos tamanhos e/ou formas das AgNPs (MOCK et al., 2002).

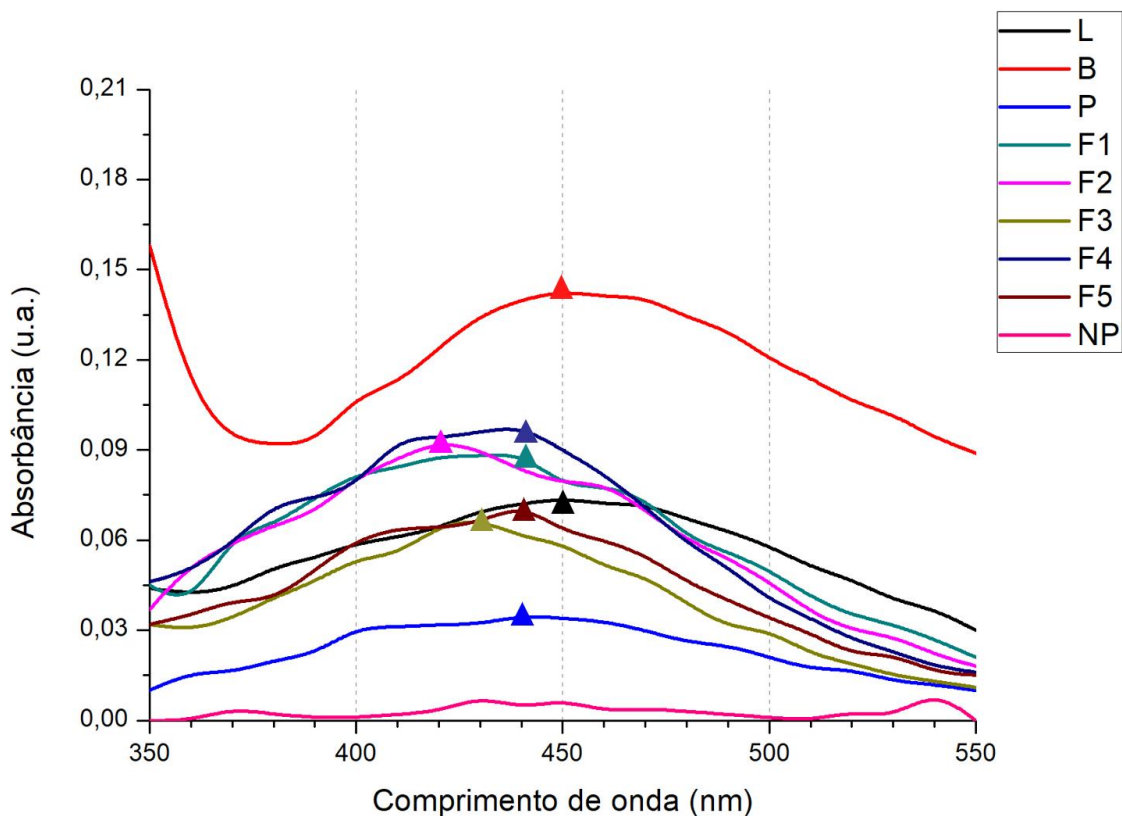


Figura 7 – Avaliação realizada por espectrofotometria das AgNPs formadas após um dia das reações de síntese e com diluição de 10 vezes em água ultrapura. Curva de absorção obtida de 350 a 550 nm. As diferentes siglas demonstram as AgNPs formadas a partir de extrato aquoso de diferentes partes da espécie *H. heptaphyllus* (FL: extrato aquoso de flor; BFL: extrato aquoso de botão floral; P: extrato aquoso de pecíolo; F1 a F5: extrato aquoso dos cinco diferentes folíolos; NP: controle negativo de formação apenas com nitrato de prata).

Fonte: do autor.

Para a caracterização por DLS, também foi feita a diluição das amostras de AgNPs de 10 vezes em água ultrapura e pH neutro (entre 6 e 7). Na Figura 8 consegue-se observar a formação de dois grupos distintos, sendo que o diâmetro hidrodinâmico das AgNPs formadas com o extrato aquoso das partes reprodutivas (botão floral e flor) foi menor do que o diâmetro hidrodinâmico daquelas formadas com o extrato aquoso das partes vegetativas (folíolos, pecíolo). Este fato reforça a hipótese de que há uma maior concentração de metabólitos secundários, em particular alcaloides, nos órgãos reprodutivos (SARINI, BOPAIAH, 2016),

pois há evidências de que o aumento da concentração dos agentes redutores provoca uma diminuição no diâmetro hidrodinâmico das AgNPs formadas (SURIATI, MARIATTI e AZIZAN, 2014; ROY et al., 2017). Isso também explica o fato de que nesses órgãos obteve-se AgNPs com maior intensidade de absorvância.

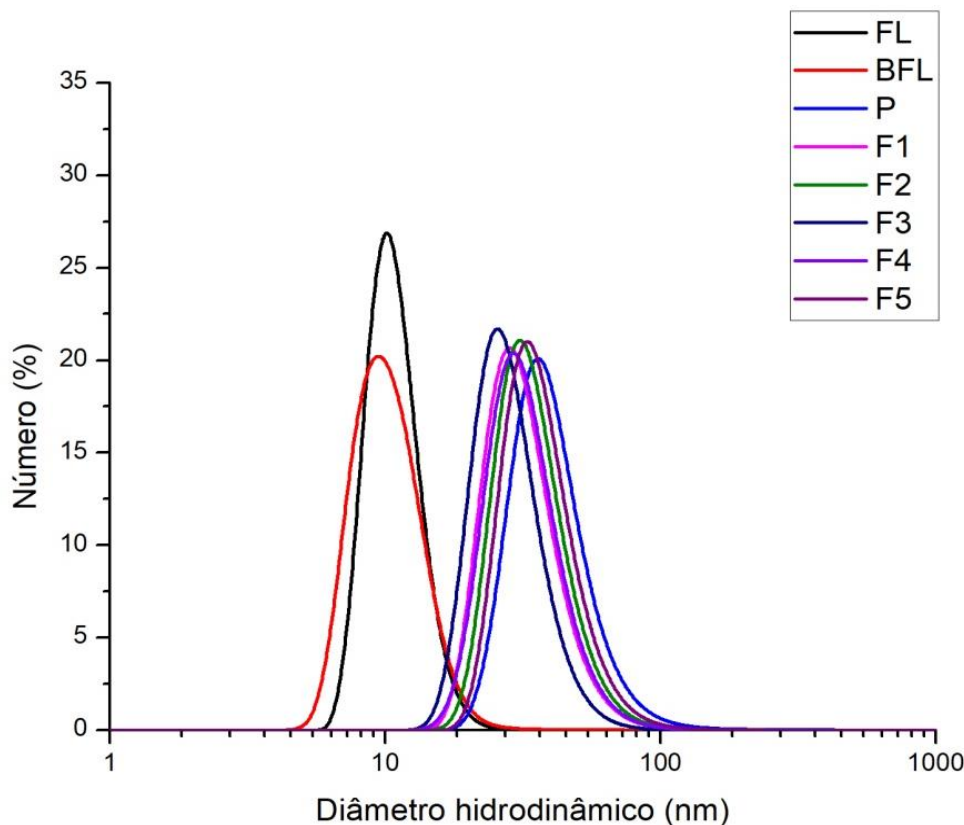


Figura 8 – Demonstração do diâmetro hidrodinâmico, em número (%), das AgNPs formadas após um dia das reações de síntese e diluição de 10 vezes em água ultrapura. Avaliação realizada em equipamento ZetaSizer Nano ZS em espalhamento de luz dinâmico, em modo automático com três leituras. As diferentes siglas demonstram as AgNPs formadas utilizando extratos aquosos de diferentes partes da espécie *H. heptaphyllus* (FL: extrato aquoso de flor; BFL: extrato aquoso de botão floral; P: extrato aquoso de pecíolo; F1 a F5: extrato aquoso dos cinco diferentes folíolos).
Fonte: do autor.

O PDI oferece informações sobre o grau de dispersividade da amostra, sendo que valores mais próximos de 1 demonstram partículas mais polidispersas e abaixo de 0,15 materiais mais uniformes. Já o potencial Zeta indica a carga elétrica da superfície a qual juntamente com a camada de solvatação fornece informações acerca da estabilidade coloidal das AgNPs, sendo que quanto maior o valor em módulo, maior a propensão de que a partícula esteja mais estável na suspensão, já que cargas elétricas de mesma polaridade tendem a se repelir. De acordo com a Tabela 3, todas as AgNPs apresentaram estabilidade coloidal incipiente conforme indicada pelo potencial Zeta (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, 1985), mas

houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre aquelas AgNPs formadas com os extratos aquosos de partes reprodutivas ou vegetativas, sendo a primeira com maior valor em módulo que o segundo. Isso demonstra que AgNPs formadas com partes vegetativas têm a tendência de aglomeração maior do que aquela observada para as AgNPs formadas com partes reprodutivas.

O PDI também mostra diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os dois grupos, com aquelas AgNPs formadas com extratos aquosos de partes reprodutivas apresentando menor valor do que as sintetizadas com extratos aquosos de partes vegetativas (Tabela 3). Isso possivelmente se deve ao fato de que os alcaloides, mais abundantes nas partes reprodutivas, devem atuar mais fortemente nas etapas de formação e estabilização das AgNPs, tornando-as mais homogêneas em tamanho.

Tabela 3 – Caracterização de AgNPs utilizando equipamento ZetaSizer Nano ZS demonstrando valores de índice de polidispersividade e potencial Zeta de superfície. AgNPs formadas após um dia da síntese e diluição de 10 vezes em água ultrapura. As diferentes siglas demonstram as AgNPs formadas com extratos aquosos de diferentes partes da espécie *H. heptaphyllus* (F1 a F5: extrato aquoso dos cinco diferentes folíolos; P: extrato aquoso de pecíolo; FL: extrato aquoso de flor; BFL: extrato aquoso de botão floral).

Partes	Índice de polidispersividade (PDI)	Potencial Zeta (mV)	Diâmetro hidrodinâmico - Z-Average (nm)
F1	0,466 ± 0,052 ^a	-21,4 ± 0,7 ^a	98,00 ± 1,61 ^a
F2	0,411 ± 0,068 ^a	-24,2 ± 7,4 ^a	94,20 ± 3,30 ^a
F3	0,515 ± 0,113 ^a	-22,1 ± 2,6 ^a	86,20 ± 4,14 ^a
F4	0,446 ± 0,066 ^a	-22,5 ± 1,0 ^a	81,70 ± 0,43 ^a
F5	0,411 ± 0,034 ^a	-19,4 ± 5,1 ^a	96,22 ± 0,87 ^a
P	0,466 ± 0,026 ^a	-21,1 ± 1,8 ^a	181,20 ± 9,16 ^b
FL	0,282 ± 0,008 ^b	-29,5 ± 0,6 ^b	66,03 ± 1,40 ^a
BFL	0,383 ± 0,007 ^c	-25,6 ± 0,4 ^c	62,25 ± 0,14 ^a

Análise estatística ANOVA com $p < 0,05$ seguido do teste Tukey. Letras iguais indicam resultados estatisticamente semelhantes.

Fonte: do autor.

Avaliando essas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dois grupos, observou-se que houve uma tendência de formação de AgNPs menores, mais homogêneas e mais estáveis naquelas sintetizadas com o extrato aquoso das partes reprodutivas do que nas partes

vegetativas. Para confirmação, foi necessária uma avaliação mais específica da forma e diâmetro seco (altura) por meio de microscopia de força atômica (MFA), permitindo a compreensão destes valores indicados.

Até então, as diferenças foram consideráveis entre os dois grupos, AgNPs sintetizadas com o uso de extratos aquosos de partes reprodutivas (flor e botão floral) em comparação com aquelas de partes vegetativas (folíolos 1 a 5 e pecíolo). Porém, houve uma grande similaridade das AgNPs formadas dentro de cada grupo, então por esse motivo, apenas uma amostra de AgNPs de cada grupo foi analisada. Para a parte reprodutiva utilizou-se AgNPs produzidas com o extrato aquoso de flor e para a parte vegetativa foram utilizadas AgNPs sintetizadas com o extrato aquoso do folíolo 4.

Os diâmetros secos das AgNPs foram verificados, com avaliação de pelo menos 250 partículas para cada amostra. Os dados foram distribuídos em classes em porcentagem para ilustrar a população e obter curvas de distribuição. A interpolação foi feita de acordo com a função gaussiana com o auxílio do software OriginPro 8.

Pode ser observado na Figura 9 que as AgNPs sintetizadas com a parte reprodutiva (flor) apresentam formas variadas, predominantemente esféricas ou quase esféricas com cerca de 15 nm de altura. Também é possível notar a presença de camada de cobertura (Fig 6.c.), mostrando que há o possível recobrimento com metabólitos estabilizando, oferecendo o maior entendimento do porquê de o potencial Zeta ser maior neste grupo. Na figura 10 é possível observar que as formas das AgNPs sintetizadas com uso de extrato aquoso da parte vegetativa (folíolo 4) são bem diversificadas, encontrando até mesmo algumas formas geométricas. Pode haver alguns metabólitos ou condições que levam à formação de nanocubos ou nanopirâmides. No entanto, essas formas prismáticas não representavam a maior subpopulação formada. O número de AgNPs contabilizadas de formas piramidais e cúbicas foi tão pequeno que, no gráfico de distribuição de diâmetros secos (em altura), não apareceu uma população de AgNPs para essas partículas. De fato, a maior subpopulação foi de nanopartículas com forma aproximadamente esférica com cerca de 35 nm de altura.

Pode-se observar que somente alterando a origem do material botânico de uma mesma espécie foi possível modular o diâmetro e a forma das AgNPs. Esta diversidade de formas confirma o que foi mostrado no PdI, revelando que houve de fato uma variação de forma e tamanho, de modo que o valor foi maior para AgNPs sintetizadas com o extrato aquoso de partes vegetativas, como o folíolo 4.

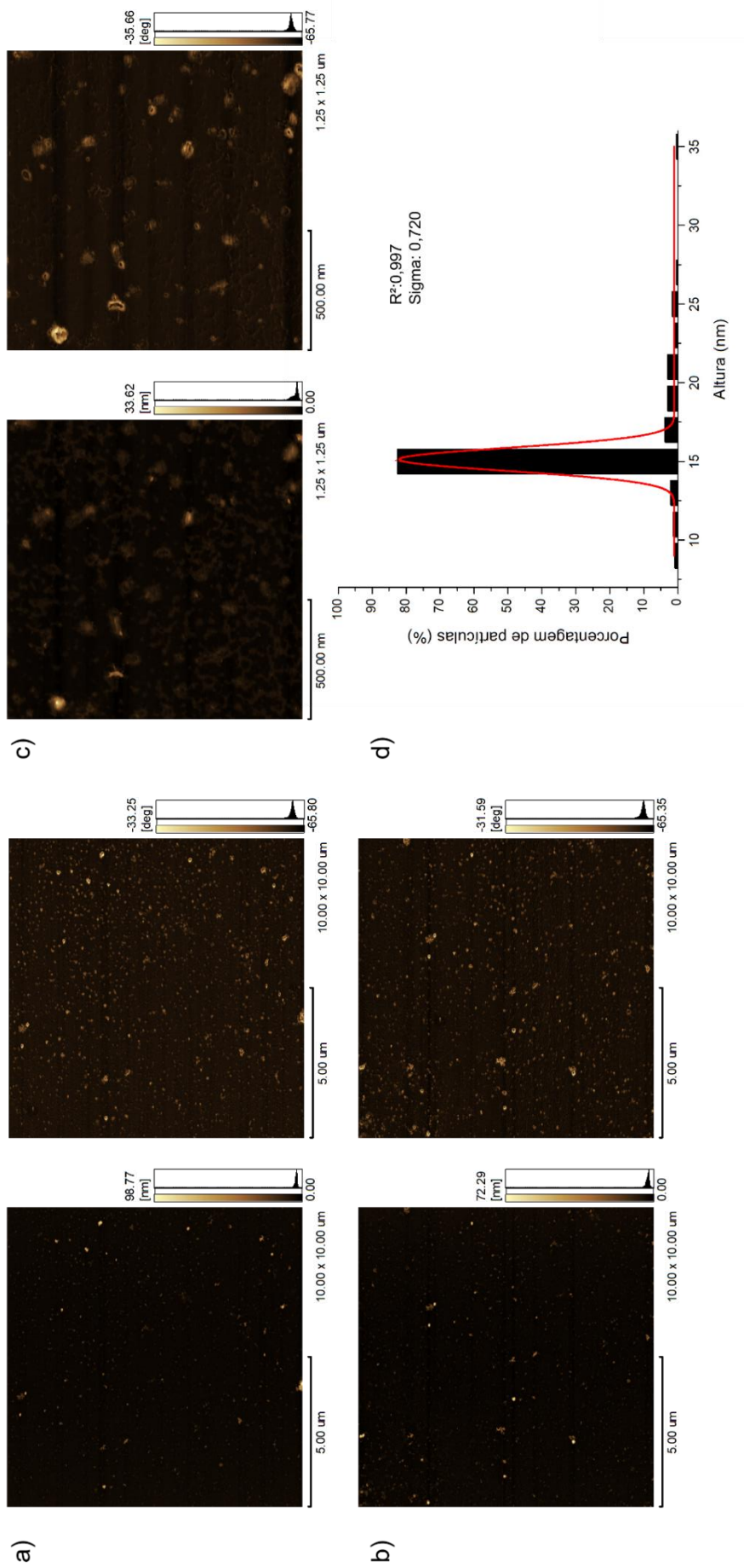


Figura 9 – Imagens obtidas por microscopia de força atômica de AgNPs sintetizadas com extratos aquosos de partes reprodutivas (flor) de *H. heptaphyllus*. As imagens topográficas de altura (esquerda) e fase (direita) apresentadas em pares correspondentes foram adquiridas em modo dinâmico-viscoelástico, com resolução de 512×512 linhas e taxa de varredura de 1 Hz. Cada imagem representativa refere-se a uma das aquisições, totalizando aproximadamente 250 AgNPs medidas, das quais o valor da altura é representado pelo histograma. a) e b) Imagens mostrando AgNPs com diferentes tamanhos e formas sintetizadas utilizando o extrato aquoso de flores (L). c) Imagem mostrando AgNPs com várias formas e tamanhos, sendo recobertas por uma camada de componentes presentes no extrato aquoso de flor. d) Histograma com número relativo de partículas distribuídas em classes e que foram formadas por extrato aquoso de flores, ajustadas à função gaussiana. Fonte: do autor.

Os histogramas das Figuras 9 e 10 mostram que os diâmetros secos (altura) são distintos, como visto no diâmetro hidrodinâmico, novamente sugerindo a possibilidade de uma maior concentração de metabólitos redutores nas partes reprodutivas. A mais abundante população de AgNPs formadas a partir do extrato aquoso da parte vegetativa avaliada, folíolo 4, apresentou uma altura de cerca de 35 nm e a maior população de AgNPs formadas a partir do extrato aquoso da parte reprodutiva, flor, apresentou altura de cerca de 15 nm. As diferenças observadas entre os diâmetros determinados por DLS ou MFA são esperadas devido às formas de medida de cada técnica. A MFA demonstra o diâmetro seco, já o DLS mensura o diâmetro hidrodinâmico, que engloba o diâmetro seco mais a camada de solvatação em volta da partícula, fazendo com que a segunda medida seja maior do que a primeira.

A fim de avaliar a possível estrutura cristalina e possível presença de prata metálica nas AgNPs produzidas foi realizada análise por difração de raios X (Figura 11). Nesta análise foram utilizadas amostras sintetizadas com o extrato aquoso do folíolo 4, pecíolo, botão floral e flor. As suspensões foram liofilizadas a fim de se obter um pó para ser aplicado no equipamento.

Na amostra foi identificado um grande pico com os valores de $2\theta = 32,29^\circ$ que já foi caracterizado como pico referente a constituinte fitoquímico que possa estar junto as AgNPs (ANANDALAKSHMI, VENUGOBAL e RAMASAMY, 2016). Porém, este pico e os demais com valores $2\theta = 32,29^\circ$ (hkl 200), $45,93^\circ$ (hkl 220), $55,07^\circ$ (hkl 311) e $59,11^\circ$ (hkl 222) também foram identificados como a presença de outra fase (AgCl) ver na Figura 11 a. (XU et al., 2011), esses picos apareceram em decorrência da reação da prata com ions cloretos e também já foram identificados na literatura de síntese verde utilizando extratos aquosos de planta. Na Figura 11 b dos graus 2θ de 33° a 80° , consegue-se evidenciar a cristalinidade da prata em $2\theta = 34,52^\circ$ (hkl 121); $38,18^\circ$ (hkl 111); $43,30^\circ$ (hkl 200); $67,50^\circ$ (hkl 200) e $77,25^\circ$ (hkl 311) dos planos cristalinos vistos pelas de estruturas da prata cúbica de face centrada (BAR et al., 2009; VELAYUTHAM, RAMANIBAI, 2016). As diferentes larguras e intensidades desses picos estão relacionadas à cristalinidade (SEGAL et al., 1959; FONER e ADAN, 1983).

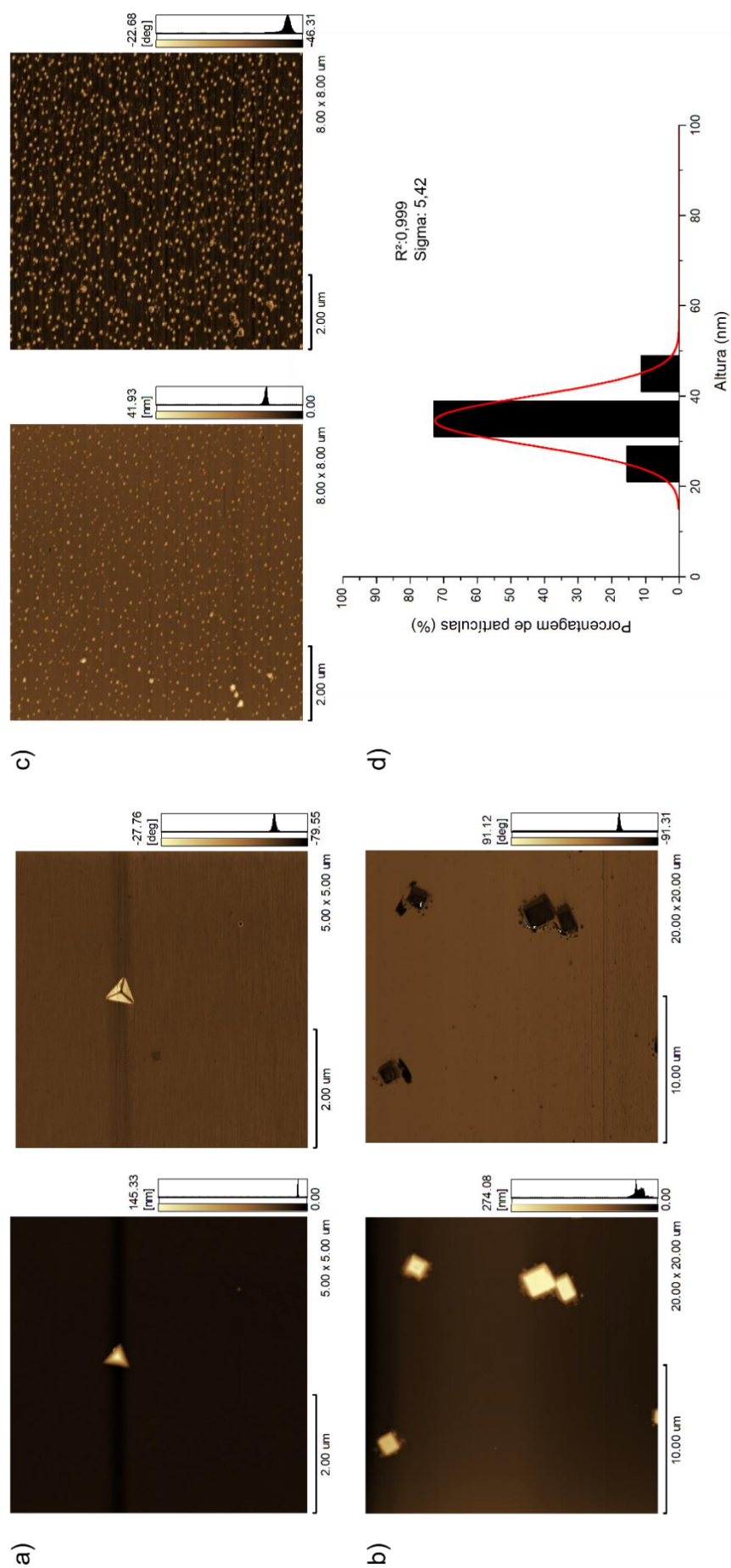


Figura 10 - Imagens obtidas por microscopia de força atômica de AgNPs sintetizadas com extrato aquoso de parte vegetativa (folíolo 4) de *H. heptaphyllus*. As imagens topográficas de altura (esquerda) e fase (direita) apresentadas em pares correspondentes foram adquiridas em modo dinâmico-viscoelástico, com resolução de 512×512 linhas e taxa de varredura de 1 Hz. Cada imagem representativa refere-se a uma aquisição, totalizando aproximadamente 250 AgNPs medidas, das quais o valor da altura é representado pelo histograma. a) -b) -c) Imagens mostrando AgNPs com diferentes tamanhos e formas sintetizadas utilizando o extrato aquoso do folíolo 4 (F4). d) Histograma com número relativo de partículas formadas com o extrato aquoso de F4, ajustado à função gaussiana. Fonte: do autor.

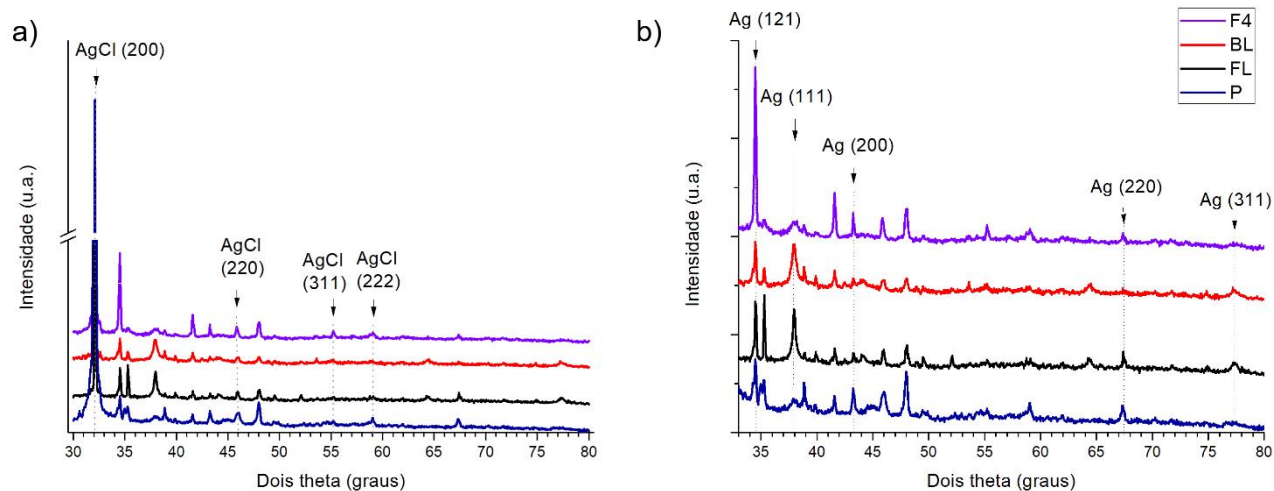


Figura 11 – Difractogramas de raios X das AgNPs formadas por síntese verde utilizando extratos aquosos de diferentes partes de *H. heptaphyllus*. a) Todos os picos obtidos a partir do escaneamento 2θ de 25° a 80° demonstrando fase de AgCl. b) Picos obtidos no escaneamento 2θ de 32° a 80° , a fim de dar enfoque e demonstrar a presença dos picos de prata (Ag) obtidos. As diferentes siglas demonstram as AgNPs formadas com extrato aquoso de diferentes partes da espécie *H. heptaphyllus*.

Fonte: do autor.

A partir dessa triagem de características físico-químicas pode-se perceber que é possível modular algumas das características mais importantes das AgNPs utilizando biossíntese apenas alterando a origem do material botânico. Síntese utilizando extrato aquoso de partes reprodutivas (botão floral e flor) acarretam em AgNPs com menor diâmetro hidrodinâmico, menor PDI (características mais homogêneas) e maior potencial Zeta em módulo (maior estabilidade) do que AgNPs sintetizadas com extrato aquoso de partes vegetativas (folíolos e pecíolo). Isso sugere que, possivelmente, as partes reprodutivas sejam mais indicadas para a biossíntese de AgNPs com menores dimensões nanométricas, uniformes e estáveis coloidalmente. Porém, a espécie utilizada tem apenas poucos dias de floração durante o ano. As flores dessa espécie permanecem na planta apenas de 3 a 15 dias ao ano. Então, para analisar a influência dos fatores abióticos temporais como a estação do ano e precipitação chuvosa e posterior modulação das características físico-químicas das AgNPs, o extrato aquoso dos folíolos são os materiais botânicos mais indicados para biossíntese, já que dos materiais botânicos vegetativos eles apresentaram maior rendimento da formação de AgNPs. A partir deste ponto todos os testes de modulação de concentração, temperatura e fonte de energia nos processos se darão com uma combinação dos folíolos de cada espécie.

Foi realizado também um teste de atividade biológica das AgNPs contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* para averiguar se as AgNPs produzidas a partir de extratos aquosos de diferentes partes das plantas levam a efeitos biológicos distintos. Como demonstrado na Figura 12 para ambas as bactérias, apenas as AgNPs produzidas com extrato aquoso do folíolo 5 fez com que a viabilidade celular fosse estatisticamente igual ao controle positivo nas concentrações de 256 e 128 μM . Para o teste de atividade contra *E. coli*, as AgNPs produzidas com extrato aquoso dos folíolos 2 e 5 foram estatisticamente igual ao controle positivo nas concentrações acima de 128 μM , e para as AgNPs produzidas a com extrato aquoso do pecíolo foi estatisticamente igual ao controle positivo apenas em 256 μM . Já para o teste de atividade contra *S. aureus*, as AgNPs produzidas com extrato aquoso dos folíolos 1 e 5 foram bactericidas estatisticamente iguais ao controle positivo, a primeira na concentração de 256 μM e a segunda na concentração de 128 μM .

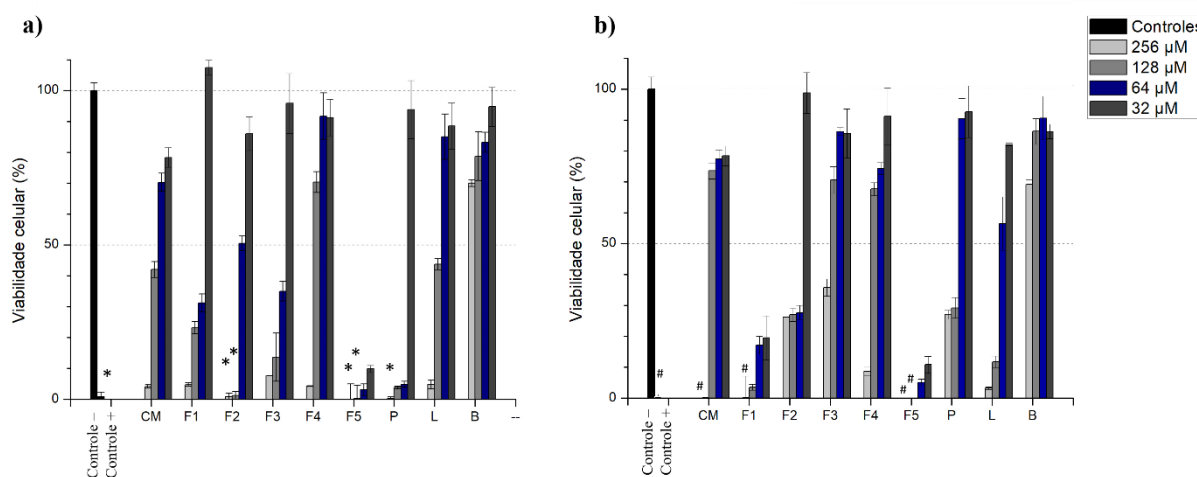


Figura 12 - Atividade antimicrobiana de AgNPs produzidas por síntese verde com extratos aquosos de *H. heptaphyllus* oriundos de folíolos (F1, F2, F3, F4 e F5), botão floral (B), flor (L), pecíolo (P) e controle de solução de nitrato de prata (CM). Para controle negativo foi utilizada água e para controle positivo penicilina e estreptomicina. Barras marcadas com o mesmo símbolo representam ação igual ou menor que o controle positivo no tempo de 72h. Análise estatística ANOVA com $p < 0,05$. O mesmo símbolo indica resultados estatisticamente semelhantes de acordo com o teste Tukey. a) Resultados da concentração inibitória mínima de AgNPs em *E. coli*. b) Resultados da concentração inibitória mínima de AgNPs em *S. aureus*.

Fonte: do autor.

Já é comprovado que os folíolos mais antigos tendem a ter menor concentração de metabólitos secundários, particularmente triterpenos (GEISLER et al., 2013). Nas espécies de ipê, quando uma folha vai ser formada, o primeiro folíolo a ser desenvolvido é o F3 seguido pelos F2 e F4 e posteriormente F1 e F5. Por isso as AgNPs formadas a partir do extrato aquoso

dos F3 possivelmente tem menor quantidade de triterpenos fazendo dele o folíolo que acarreta em menor formação de AgNPs e subsequentemente não apresentara atividade antimicrobiana em nenhuma bactéria testada. Embora exista uma grande quantidade de formação de AgNPs utilizando de extrato aquoso do botão floral e flor, possivelmente devido à grande presença de alcaloides (GEISLER et al., 2013), essas AgNPs não apresentam potencial antimicrobiano, isso pode acontecer pois os alcaloides não devem ser agentes estabilizantes tão bons quanto os triterpenos quando na (presente nos folíolos) quando na presença de meio MS e as concentrações de triterpenos nos órgãos reprodutivos é quantitativamente menor (KATERERE et al., 2003). Portanto, mesmo que haja maior formação de AgNPs nos órgãos reprodutivos, estas não apresentam atividade antibacteriana estatisticamente iguais ao controle positivo.

4.2. SÍNTESE COM FOLHAS COLETADAS MENSALMENTE AO LONGO DE UM ANO

A fim de verificar se as características físico-químicas de AgNPs produzidas via síntese verde são moduladas de acordo com fatores abióticos, como a precipitação chuvosa e estações do ano, folhas das mesmas plantas, e do mesmo galho de três espécies de ipê: *Handroanthus serratifolius*, *Handroanthus impetiginosus* e *Tabebuia roseoalba* foram coletadas ao longo de um ano (18/03/2017 a 18/02/2018). Foram consideradas 11 coletas para cada espécie neste período de 12 meses, pois cada espécie passou por um período de caducifolia, tempo em que a planta perde todas as suas folhas, com cerca de um mês. Em todas as espécies houve a mudança de coloração dos meios reacionais, indicando formação de AgNPs, como demonstrado na Figura 13. Na curva de formação, demonstrada na Figura 14, realizada em leitora de microplacas operada em 450 nm a cada 30 min durante 180 min de reação de síntese, percebeu-se que não houve uma sincronização entre todas as espécies em relação a algum mês específico eventualmente mais propenso a possibilitar maior rendimento de formação de AgNPs. Porém, os meses da estação de verão (março e dezembro) e imediatamente após esta (abril) foram os mais indicados para a formação de AgNPs em *T. roseoalba*, *H. impetiginosus* e *H. serratifolius*, respectivamente. Reforçando que para cada espécie houve um mês sem informações devido à caducifolia ocorrida em cada espécie e que aconteceu em meses diferentes. Para *H. impetiginosus*, *H. serratifolius* e *T. roseoalba* os meses em que não haviam folhas foram outubro, junho e setembro, respectivamente.

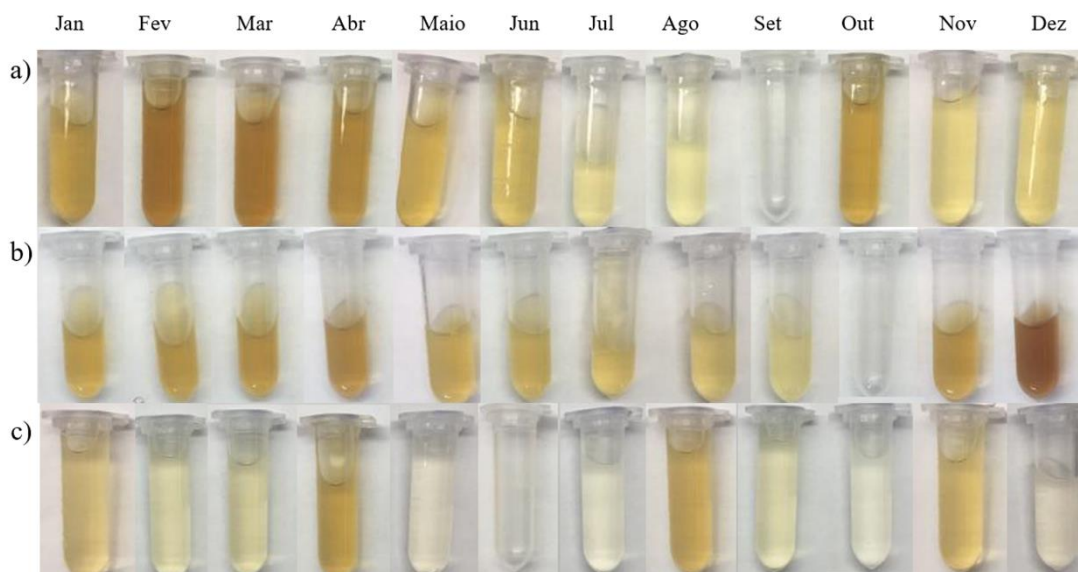


Figura 13 – Fotografia das AgNPs biossintetizadas a partir de folhas coletadas ao longo de um ano com extrato aquoso de a) *Tabebuia roseoalba*; b) *Handroanthus impetiginosus*; c) *Handroanthus serratifolius*.

Fonte: do autor.

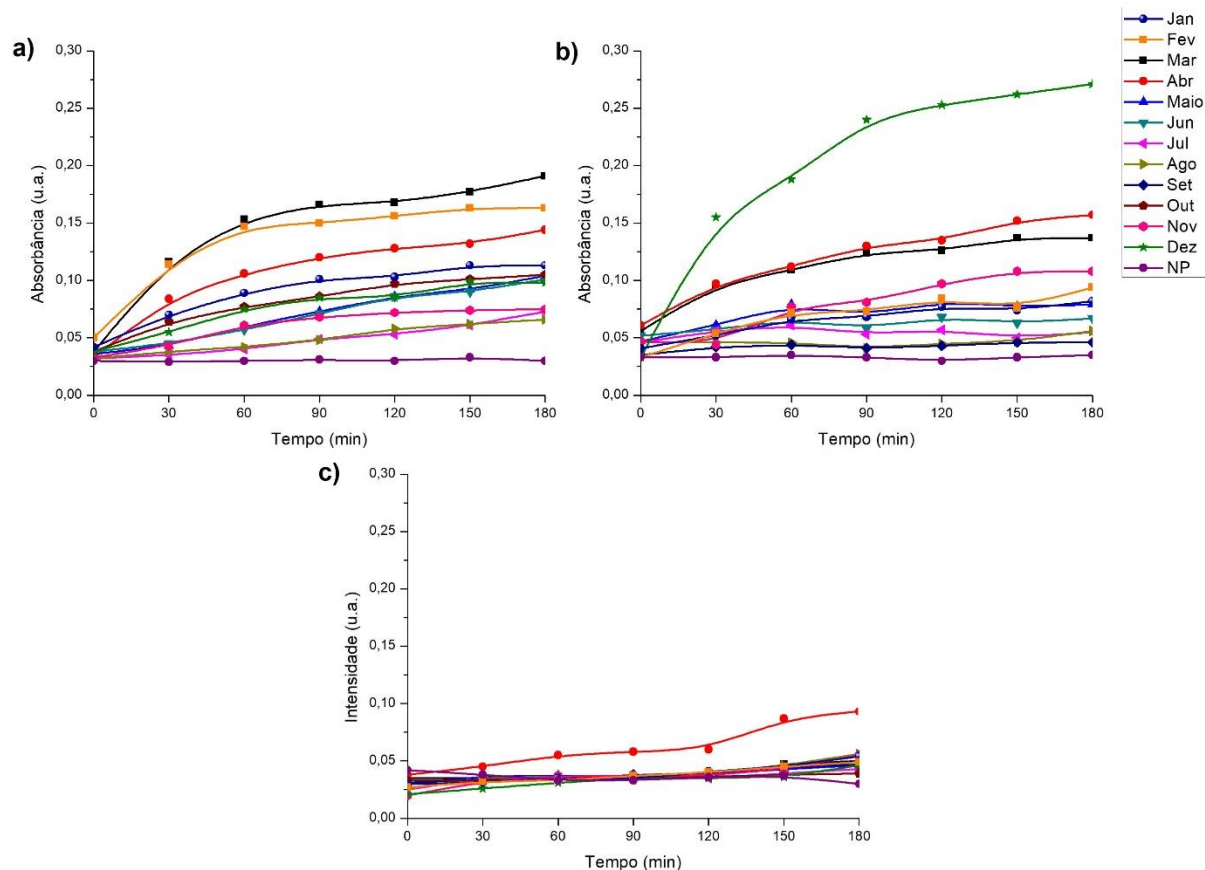


Figura 14 – Resultados da caracterização espectrofotométrica em leitora de microplacas a 450 nm durante as reações de biossíntese de AgNPs com extratos aquosos de folhas das espécies, sendo: (a) *T. roseoalba*; (b) *H. impetiginosus* e (c) *H. serratifolius*. As reações de síntese foram realizadas com diferentes extratos aquosos provenientes de folhas coletadas em diferentes meses e utilizando a mesma planta. O aumento da absorbância medida indica a formação de AgNPs. Para *T. roseoalba*, *H.*

impetiginosus e *H. serratifolius* não existem informações referentes aos meses de setembro, outubro e junho, respectivamente, por causa da caducifolia das plantas. NP: controle negativo de formação apenas com nitrato de prata.

Fonte: do autor.

Já é conhecido que alguns parâmetros como incidência de radiação solar podem ter um efeito pronunciado sobre a composição química das folhas de plantas (ESMELINDRO et al., 2004). Taninos, que estão presentes nas três espécies aqui estudadas, já demonstraram direta relação quantitativa com a incidência de raios solares (MOSSI et al., 2009). A época que o hemisfério Sul recebe maior incidência de raios solares é no solstício de verão (21 de dezembro), quando os raios solares atingem a Terra verticalmente, sendo assim mais concentrados. Dessa forma, uma hipótese a ser considerada é de que pelo menos na espécie *H. impetiginosus*, o metabólito secundário que pode estar presente no extrato aquoso e consequentemente envolvido no processo de síntese pode ser um tanino, já que a maior formação de AgNPs pela intensidade de absorbância medida coincidiu justamente com esta época.

Já com a caracterização por DLS, após diluição de 10 vezes em água ultrapura em pH neutro (entre 6 e 7) consegue-se observar nitidamente, na Figura 15, que houve expressiva alteração no diâmetro hidrodinâmico de acordo com a variação dos meses. De acordo com a *National Nanotechnology Initiative* um material em escala nanométrica é aquele que apresenta pelo menos uma de suas dimensões em tamanho de 1 a 100 nanômetros. Levando em conta essa consideração, a única espécie utilizada nas biossínteses em que a maioria das AgNPs formadas se mantiveram na escala nanométrica foi a *T. roseoalba*, com apenas as AgNPs sintetizadas com o extrato aquoso do mês de junho (inverno) foram dessa escala. Para a espécie *H. impetiginosus*, as AgNPs biossintetizadas com os extratos aquosos das folhas dos meses de dezembro e janeiro (verão) mantiveram seu DH dentro da escala nanométrica. Por fim, para a espécie *H. serratifolius*, apenas as AgNPs sintetizadas com o extrato aquoso do mês de abril (início do outono) mantiveram o DH dentro da escala nanométrica.

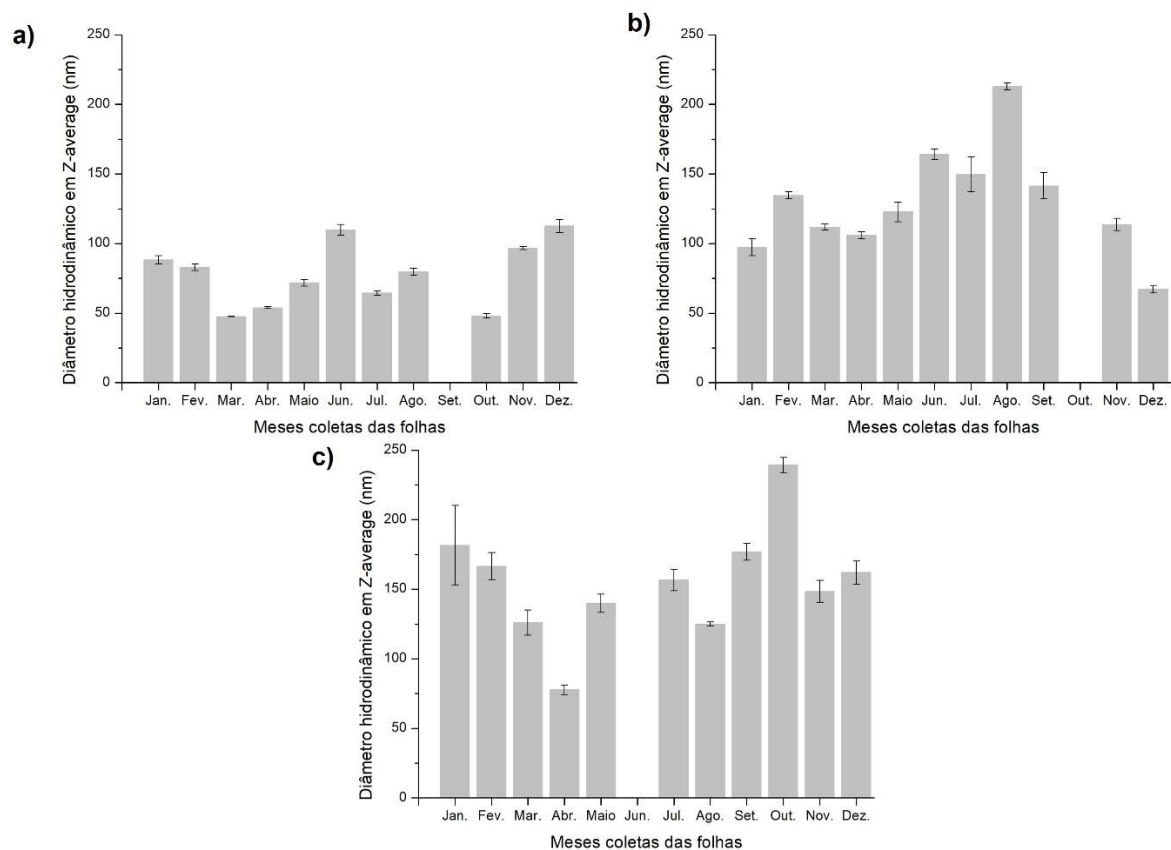


Figura 15 – Diâmetro hidrodinâmico médio de AgNPs sintetizadas com extratos aquosos das folhas de ipês que foram coletadas em diferentes meses ao longo de um ano. a) *Tabebuia roseoalba*; b) *Handroanthus impetiginosus*; c) *Handroanthus serratifolius*.

Fonte: do autor.

As taxas de variação de DH ao longo do ano para essas três espécies *T. roseoalba*, *H. impetiginosus* e *H. serratifolius* foram altas com 46,97 %, 64,69 % e 76,81 %, respectivamente, comprovando a existência de desafios relacionados à padronização das características físico-químicas de AgNPs quando se utiliza síntese verde com materiais botânicos que são coletados diretamente na natureza, sem controle adequado, e que sofrem influências dos fatores abióticos. Os extratos aquosos de folhas coletadas nos meses que resultaram em maiores produções de AgNPs (por intensidade de absorvância) em cada espécie foram os que apresentaram menores diâmetros hidrodinâmicos. Possivelmente há maior concentração de agentes redutores nesses meses os quais podem ter acarretado em uma maior produção de AgNPs e com menores diâmetros.

Outras características físico-químicas das AgNPs produzidas foram avaliadas, como PdI (Figura 16) e o pZ (Tabela 4). No PdI pode-se perceber que todas as partículas estavam com a dispersividade mediana. Para as AgNPs biossintetizadas com o extrato aquoso de *T. roseoalba*,

houve um aumento na polidispersividade nos meses de junho, julho e agosto (inverno). Para as AgNPs biossintetizadas com os extratos aquosos de *H. impetiginosus* e *H. serratifolius*, percebeu-se um aumento da polidispersividade nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro (verão).

Já com o pZ pode-se perceber que todas as AgNPs apresentaram estabilidade coloidal incipiente, exceto aquela sintetizada com extrato aquoso de *H. impetiginosus* no mês de abril, que obteve estabilidade coloidal moderada (< -30 mV), partícula que também teve o menor PdI. Tanto o PdI como o pZ demonstraram como as características das AgNPs são alteradas com o transcorrer dos meses de coleta das folhas e podem estar relacionadas às estações do ano e índice de precipitação chuvosa.

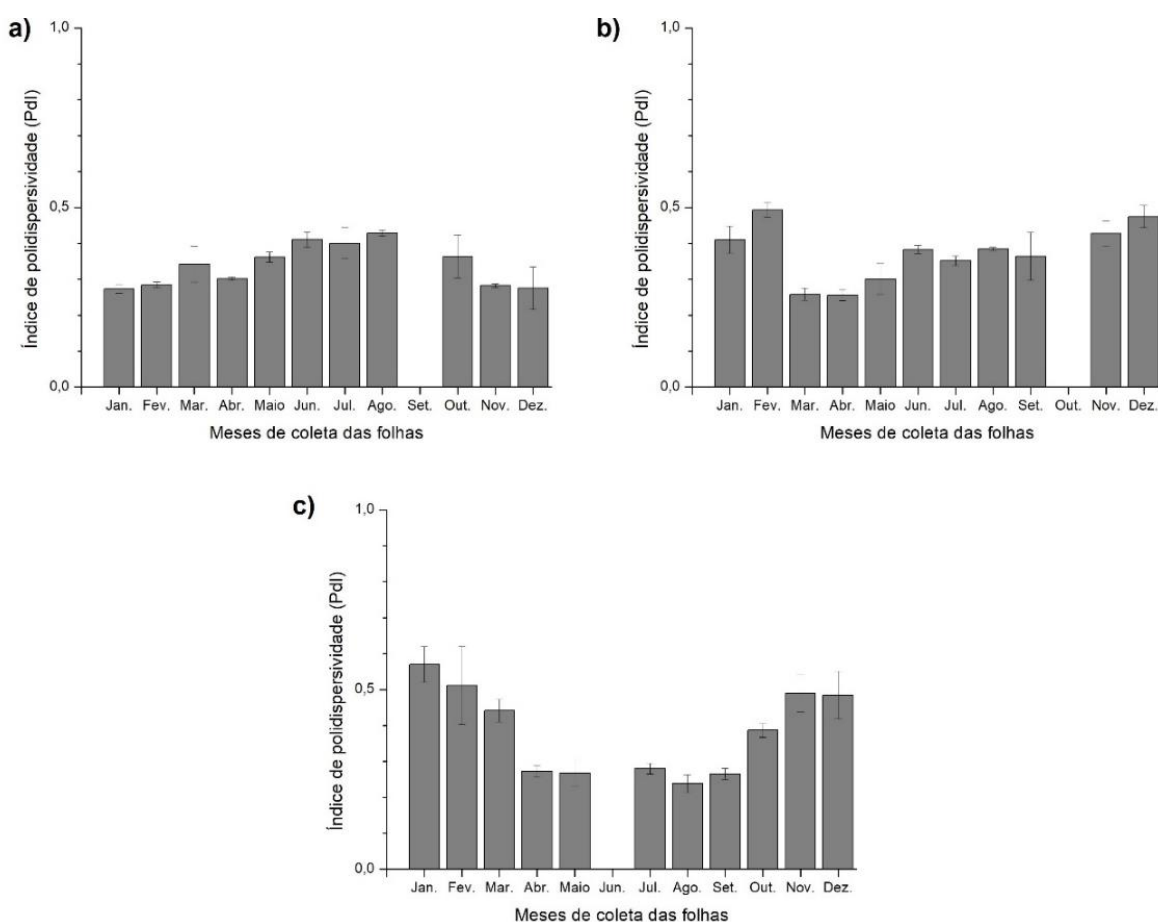


Figura 16 – Índices de polidispersividade médio de AgNPs sintetizadas com os extratos aquosos das folhas coletadas em diferentes meses durante um ano. a) *T. rosealba*, b) *H. impetiginosus* e c) *H. serratifolius*.

Fonte: do autor.

Tabela 4 – Dados de potencial Zeta de AgNPs biossintetizadas a partir de extratos aquosos das folhas de plantas de ipês coletadas mensalmente ao longo de um ano.

Meses	Potencial Zeta (mV)					
	Espécie	Valor medido	Espécie	Valor medido	Espécie	Valor medido
Jan.		-28,1 ± 1,3 ^a		-23,9 ± 1,2 ^a		-13,8 ± 7,7 ^b
Fev.		-24,5 ± 1,1 ^a		-30,4 ± 4,3 ^a		-26,4 ± 5,2 ^a
Mar.		-24,5 ± 0,8 ^a		-30,1 ± 1,0 ^a		-15,7 ± 5,6 ^b
Abr.	<i>Tabebuia roseolba</i>	-21,9 ± 1,2 ^a	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	-33,6 ± 0,5 ^c	<i>Handroanthus serratifolius</i>	-28,8 ± 3,5 ^a
Mai.		-22,3 ± 1,4 ^a		-30,2 ± 1,9 ^a		-28,0 ± 0,8 ^a
Jun.		-24,4 ± 1,8 ^a		-25,3 ± 2,8 ^a		-
Jul.		-14,2 ± 0,2 ^b		-27,9 ± 1,6 ^a		-27,4 ± 1,0 ^a
Ago.		-22,8 ± 5,6 ^a		-25,3 ± 2,4 ^a		-29,4 ± 3,3 ^a
Set.		-		-25,0 ± 3,4 ^a		-28,6 ± 1,4 ^a
Out.		-27,2 ± 1,3 ^a		-		-26,7 ± 6,2 ^a
Nov.		-24,1 ± 4,5 ^a		-24,7 ± 0,6 ^a		-23,9 ± 5,5 ^a
Dez.		-29,2 ± 0,1 ^a		-27,8 ± 1,0 ^a		-18,4 ± 7,1 ^a

Os testes realizados foram One-Way ANOVA seguido do teste Tukey, sendo que todos os p-valores foram abaixo de 0,05. As letras iguais sobrescritas demonstram que os valores são significativamente iguais, as letras sobrescritas diferentes demonstram que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste Tukey.

Fonte: do autor.

Como se pode perceber todas as características físico-químicas das AgNPs analisadas, variaram de acordo com o mês de coleta das folhas *in natura*. Isso poderia ter relação com fatores bióticos e abióticos aos quais as plantas estiveram expostas neste período. Um dos fatores abióticos que teve correlação com as mudanças percebidas foi o índice de precipitação chuvosa, mostrado na Figura 17. As espécies *T. roseolba* e *H. serratifolius* apresentaram menores diâmetros hidrodinâmicos médios e maior intensidade de absorvância das suspensões de AgNPs nos meses em que a precipitação chuvosa estava decaindo, março e abril, respectivamente. Já para a espécie *H. impetiginosus*, os menores diâmetros hidrodinâmicos e maiores absorvâncias das suspensões de AgNPs ocorreram no mês em que estava aumentando o volume de chuva, dezembro. Nenhum extrato aquoso das folhas das espécies coletadas revelou maior produção ou características físico-químicas desejáveis (menor diâmetro hidrodinâmico e maior potencial Zeta, em módulo) nos meses referentes ao inverno.

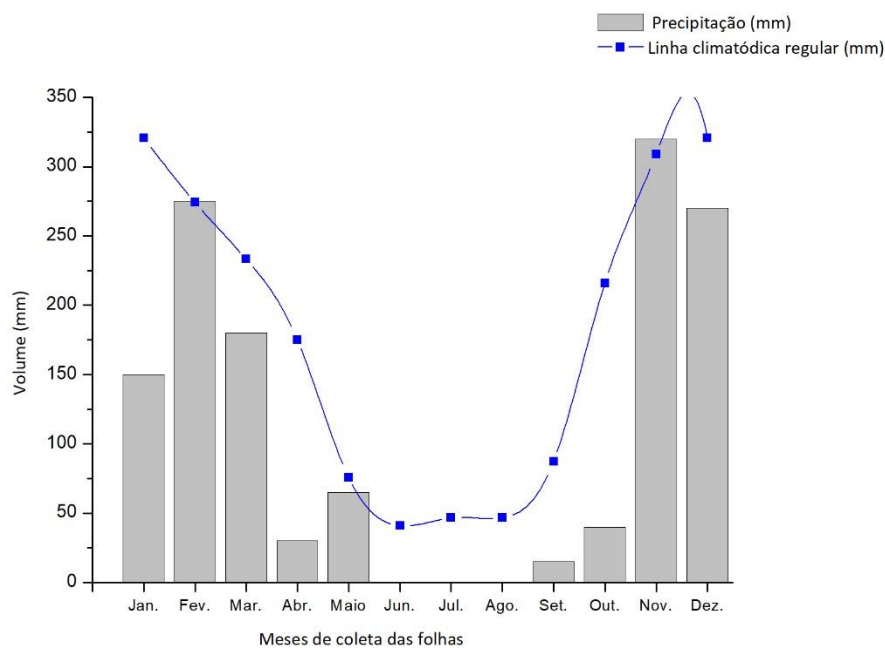


Figura 17 – Dados de precipitação chuvosa em Brasília obtidos pelo Instituto de Meteorologia (INMET) demonstrando a precipitação mensal acumulada.

Fonte: INMET (dados)

Esses dados de variações das características físico-químicas das AgNPs sintetizadas com extrato aquoso das folhas de diferentes espécies de ipês coletadas em diferentes meses comprovam a hipótese de que existam modificações das características físico-químicas de AgNPs biossintetizadas a partir de uma mesma planta com interferências de fatores abióticos. As diferenças observadas indicam que o índice pluviométrico pode ser pelo menos uma das variáveis a influenciar na formação e nas características físico-químicas das AgNPs produzidas, sendo, portanto, essencial relatar a data de coleta e índice pluviométrico nas produções bibliográficas relacionadas à síntese verde de AgNPs com extratos aquosos de plantas. Essas diferenças se devem muito possivelmente à produção desigual de metabólitos secundários em condições ambientais distintas.

Foram realizados também testes de atividade biológica contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus* para averiguar se as AgNPs produzidas com extratos aquosos de folhas coletadas em diferentes meses levam a efeitos antibacterianos distintos. Como indicado pela Figura 18, apenas AgNPs produzidas com o extrato aquoso de folhas coletadas em meses com intensas chuvas (Dez, Jan e Mar) e meses de estiagem (Jun e Jul) levaram a atividades bactericidas contra *E. coli*. Apenas com AgNPs sintetizadas com os extratos aquosos das folhas de *H. impetiginosus* coletadas nos meses de junho (inverno) e dezembro (verão) apresentaram

atividade antimicrobiana a partir da concentração de 128 μM , sendo o primeiro em período de estiagem e o segundo período chuvoso. Já para as AgNPs sintetizadas com os extratos aquosos das folhas de *T. roseoalba* e *H. serratifolius* coletadas nos meses de janeiro (verão) e julho (inverno), respectivamente, apresentaram atividade antimicrobiana em 256 μM . Com essas avaliações percebe-se que AgNPs produzidas a partir de extratos aquosos de folhas coletadas em diferentes meses acarretam em respostas antimicrobianas distintas em função da estação do ano e precipitação chuvosa. Consegue-se avaliar que o potencial antimicrobiano das é modulado de acordo com as variações de suas características físico-químicas AgNPs, que são alteradas com a estação do ano de coleta das folhas e também diretamente responsivo a fatores abióticos como estações chuvosas e estiagem.

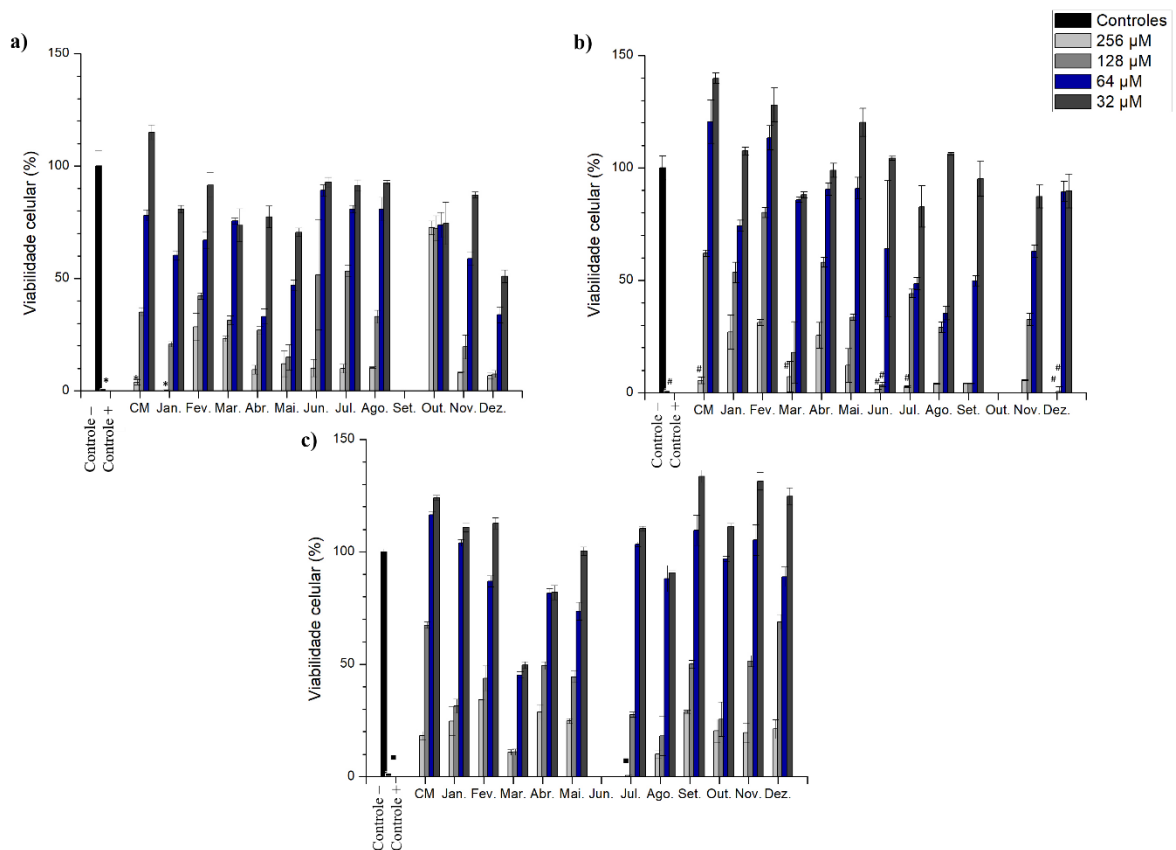


Figura 18 – Atividade biológica contra *E. coli* de AgNPs obtida da síntese verde de extratos aquosos a) *T. roseoalba*, b) *H. impetiginosus* e c) *H. serratifolius*. Além das AgNPs, como controles foi utilizada solução de nitrato de prata (CM), como controle negativo apenas água e como controle positivo estreptomicina e penicilina na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Com tempo de ensaio de 72h. Barras marcadas com o mesmo símbolo têm ação igual ou menor que o controle positivo. Análise estatística ANOVA com $p < 0,05$. O mesmo símbolo indica resultados estatisticamente semelhantes de acordo com o teste Tukey.

Fonte: do autor.

Na figura 19 consegue-se perceber que para *S. aureus*, as AgNPs sintetizadas com o extrato aquoso de *H. serratifolius* apresentou atividade antimicrobiana mais pronunciada. Não houve atividade antibacteriana com as AgNPs sintetizadas com extrato aquoso das folhas de *T. roseoalba*.

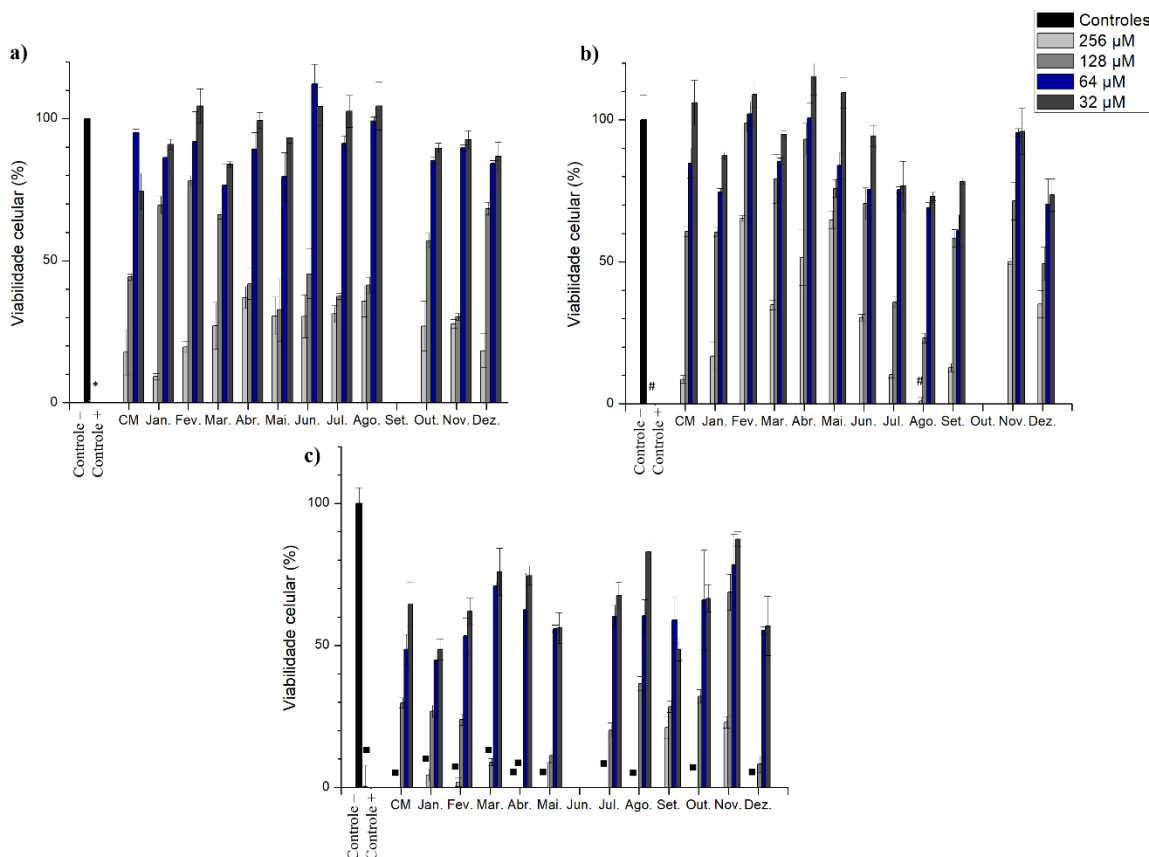


Figura 19 - Atividade biológica contra *S. aureus* de AgNPs produzidas por síntese verde com extratos aquosos das folhas de a) *T. roseoalba*, b) *H. impetiginosus* e c) *H. serratifolius*. Além das AgNPs, como controle foi utilizada solução de nitrato de prata (CM), como controle negativo apenas água e como controle positivo estreptomicina e penicilina na concentração de 100 µg/mL. Com tempo de ensaio de 72h. Barras marcadas com o mesmo símbolo têm ação igual ou menor que o controle positivo. Análise estatística ANOVA com $p < 0,05$. O mesmo símbolo indica resultados estatisticamente semelhantes de acordo com o teste Tukey.

Fonte: do autor.

4.3. SÍNTESE COM VARIAÇÃO DE TEMPERATURA

A fim de avaliar a possibilidade de modulação das características físico-químicas de AgNPs modificando as condições reacionais e utilizando apenas a parte vegetativa (folha), foram realizadas biossínteses utilizando três diferentes espécies de ipês: *H. serratifolius*, *H. impetiginosus* e *T. roseoalba*, com variação de temperatura no momento das reações de síntese. Com cada espécie foi realizada uma reação de síntese a 25°C, 50°C e 75°C. As folhas de todas essas espécies foram coletadas no mesmo local e no mesmo dia (18/03/2017) já que o mês de

Março foi o intermediário entre os três melhores meses (dezembro, março e abril) para a coleta nas três diferentes espécies.

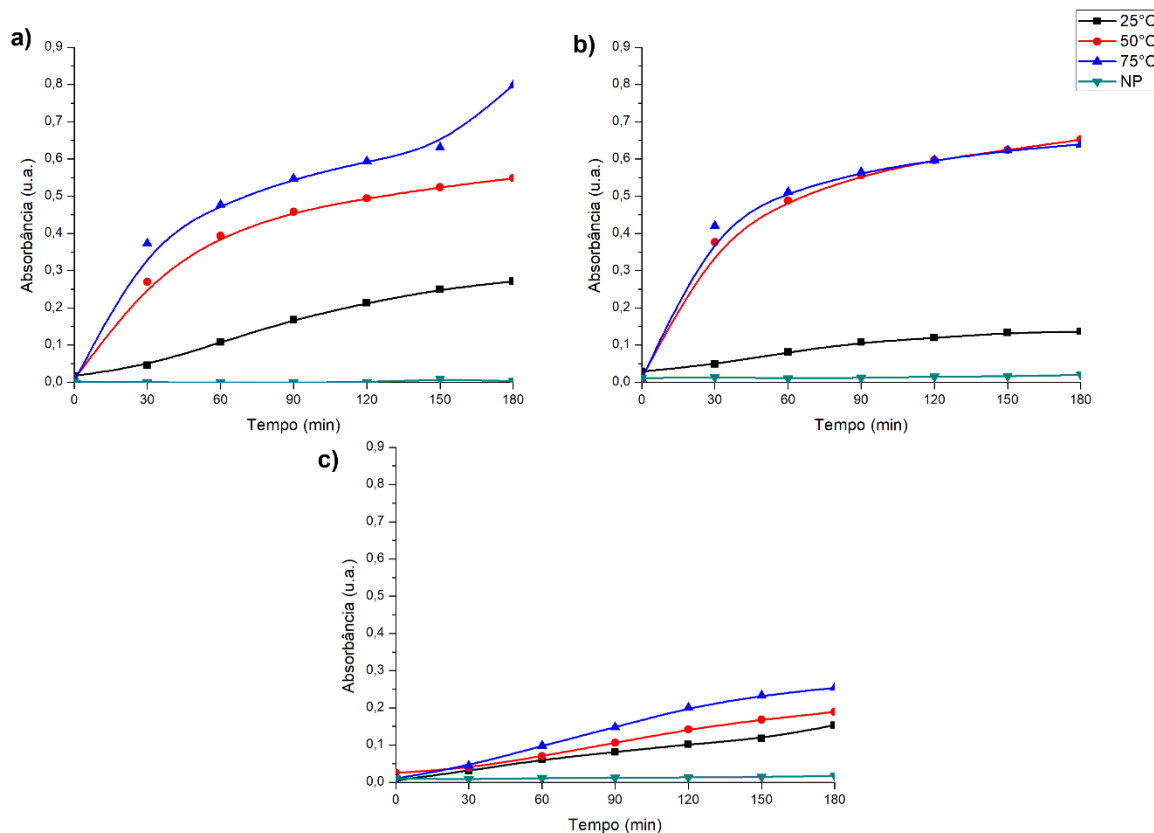


Figura 20 – Curvas de formação de AgNPs obtidas por espectrofotometria em 450 nm durante a biossíntese de AgNPs com extratos aquosos de folhas das espécies a) *T. roseoalba*, b) *H. impetiginosus* e c) *H. serratifolius*. A síntese foi realizada com a mesma concentração de extratos aquosos das três espécies em três diferentes temperaturas em banho-maria (25°C, 50°C e 75°C). O aumento da absorbância indica a formação de AgNPs. NP: controle negativo de formação apenas com nitrato de prata.

Fonte: do autor

Em todas as temperaturas avaliadas e espécies de ipês houve mudança de coloração do meio reacional, indicando formação de AgNPs. As curvas de formação, demonstradas na Figura 20 obtidas por espectrofotometria em 450 nm a cada 30 min durante 180 min de reações de síntese, demonstraram que para as espécies *T. roseoalba* e *H. impetiginosus* a temperatura de 75°C em banho-maria foi a que mais possibilitou formação de AgNPs. Já para a espécie *H. impetiginosus*, a diferença entre utilizar 75°C ou 50°C foi praticamente imperceptível. Também foi possível observar que os extratos aquosos das folhas das espécies que mais resultaram na formação de AgNPs foram provenientes de *T. roseoalba* e *H. impetiginosus*. Este resultado demonstra que a temperatura mais indicada para realização desses processos de síntese pode

ser a de 75°C. Normalmente, com o aumento de temperatura também há aumento na formação de AgNPs, já que o aumento da temperatura da reação, há o aumento das correntes de convecção, aumentando assim o transporte de massa facilitando o encontro dos agentes redutores com o agente oxidante, necessário para a redução do Ag^+ em Ag^0 . Assim, o aumento de temperatura acelera a nucleação e crescimento de AgNPs. Com o aumento da temperatura, a taxa de transporte de elétrons aumenta via agente redutor, no caso os extratos vegetais. A taxa de transporte de elétrons normalmente é uma etapa limitadora na síntese de AgNPs, que pode ser superada com o aumento da temperatura (HAMEDI, 2017; MOHAMMED et al., 2009; PARK et al., 2007).

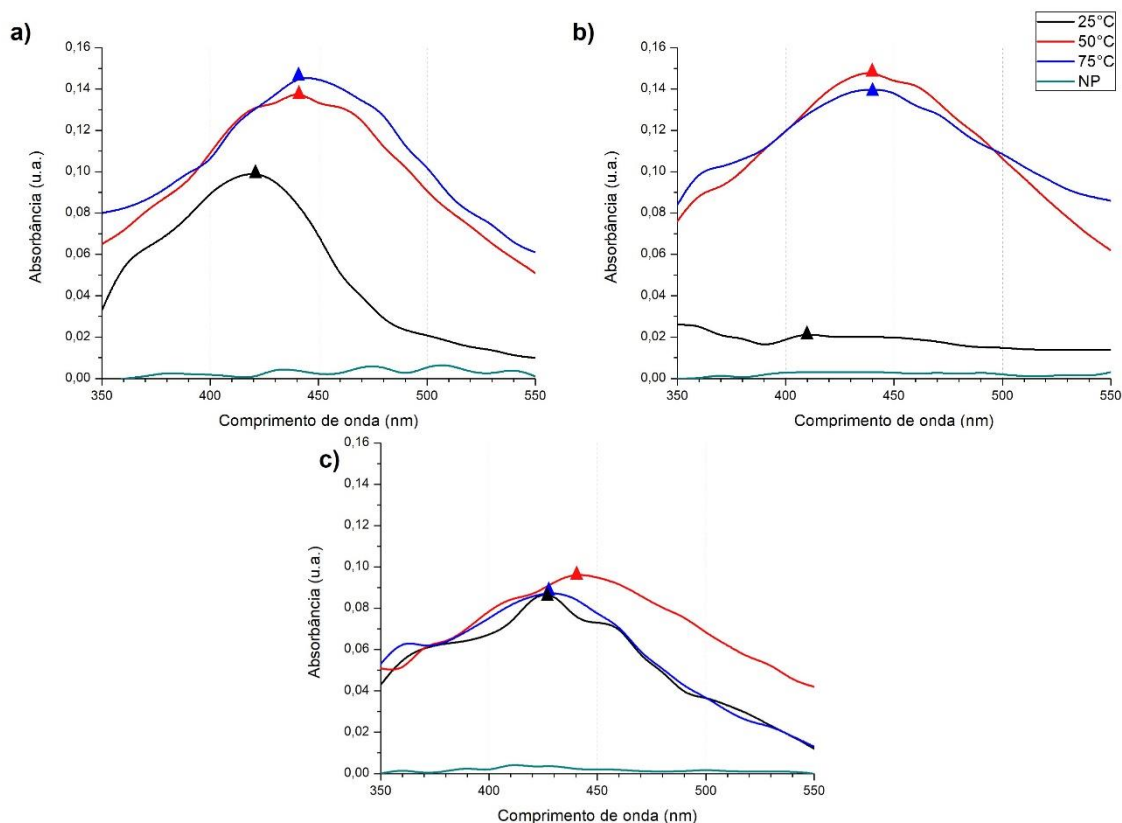


Figura 21 - Avaliação espectrofotométrica das AgNPs formadas após um dia das reações de síntese e diluição de 10 vezes em água ultrapura. Curvas de absorção obtidas da biossíntese utilizando como agente redutor o extrato aquoso das folhas de (a) *T. roseoalba*; (b) *H. impetiginosus*; (c) *H. serratifolius*. As diferentes cores indicam a temperatura utilizada em banho-maria no momento da síntese. NP: controle negativo de formação apenas com nitrato de prata.

Fonte: do autor.

Como demonstrado na Figura 21, os picos/bandas de absorbância tiveram seu máximo de absorção predominantemente em 440 nm, sendo que a única temperatura que apresentou o mesmo pico de absorção nas três espécies foi a de 50°C. O pico de absorbância de uma

suspensão de AgNPs é muito sensível às mudanças de tamanho, forma e/ou composição (PIMPAN e RITTHICHAJ, 2016), o que permite sugerir que a temperatura de 50°C pode favorecer a homogeneidade das características físico-químicas de AgNPs mesmo quando sintetizadas com extratos aquosos das folhas de espécies diferentes.

Com a caracterização por DLS, realizada com diluição de 10 vezes em água ultrapura e pH neutro (entre 6 e 7), consegue-se observar na Figura 22 que a única temperatura que gerou apenas uma população de partículas, nas três espécies de ipês analisadas foi a de 25°C. Porém, esta temperatura não é muito indicada para as reações de síntese já que a produção de AgNPs avaliada pela intensidade de absorvância em 25°C foi extremamente menor do que nas demais temperaturas mais altas como já apresentado na Figura 20.

A Figura 22 demonstra a primeira evidência da possibilidade de modulação das características físico-químicas de maneira temperatura-dependente utilizando rota de síntese verde com extratos aquosos das folhas de ipês. Tal fato pode ser observado a partir da análise dos resultados de DLS do extrato aquoso da espécie *T. roseoalba*, no qual é possível perceber que com a temperatura maior (75°C) houve uma população de AgNPs acima de 10 nm em número (%), já com a temperatura menor (25°C) houve a formação de uma população de AgNPs com diâmetro hidrodinâmico menor que 10 nm em número (%), e por fim com a utilização da temperatura intermediária (50°C) houve a presença de ambas populações mencionadas acima, ou seja, conseguiu-se modular o diâmetro hidrodinâmico a partir de mudança da temperatura reacional. Com a utilização do extrato de *H. impetiginosus* não se conseguiu perceber uma relação direta de modulação de tamanho em função da temperatura; e com a utilização do extrato aquoso de *H. serratifolius* percebeu-se que não ocorreram mudanças expressivas. Isso sugere que os compostos ativos no extrato de *T. roseoalba* que levam à síntese de AgNPs podem ter suas ações potencialmente moduladas em função da temperatura.

Na literatura já foram extraídos das folhas de *T. roseoalba* os seguintes compostos: β -amirinas, β -sitosterol, estigmasterol, rutina, ácido caféico e ácido clorogênico (FERRAZ FILHA, 2016). A rutina extraída de outras espécies plantas e sua relação com a temperatura já foi avaliada, e mostrou que ao aumentar a temperatura de infusão das plantas em água, a concentração de rutina diminuía e chegava a níveis até mesmo inquantificáveis de 81,9°C a 90°C (SILVEIRA et al., 2013). Eventualmente, a rutina pode ser um dos metabólitos secundários envolvidos na síntese de AgNPs, então em maiores temperaturas podem haver menores quantidades de rutina e isto pode acarretar no fato de as AgNPs sintetizadas com o extrato aquoso das folhas de *T. roseoalba* apresentem diâmetros hidrodinâmicos maiores. Já os

compostos presentes no extrato aquoso das folhas de *H. serratifolius* não tiveram sua ação na síntese de AgNPs alterada neste leque de temperaturas analisadas, demonstrando serem possivelmente compostos termo-estáveis ou que sua concentração não se altera com a temperatura de reação estão envolvidos no processo de síntese.

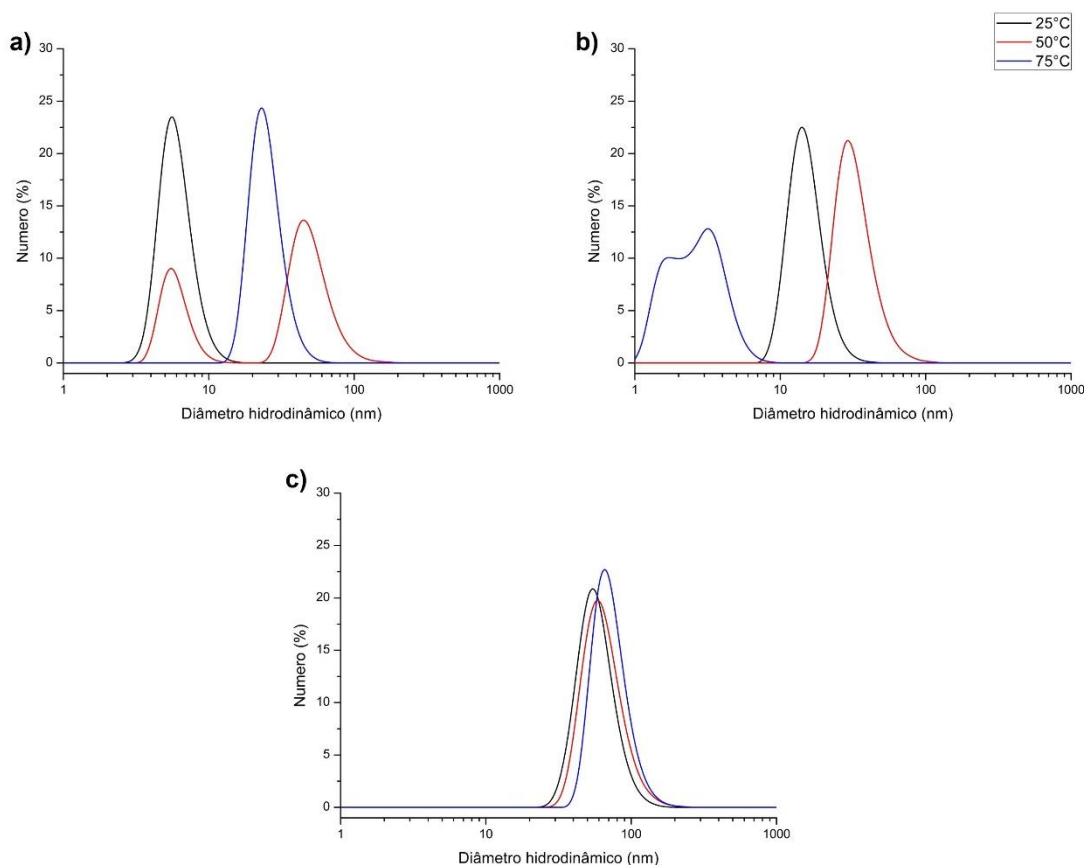


Figura 22 – Distribuições dos diâmetros hidrodinâmicos, em número (%), obtidos por espalhamento de luz dinâmico das AgNPs formadas com diferentes temperaturas em banho-maria, após um dia da síntese e diluição de 10 vezes em água ultrapura. Avaliações realizadas em equipamento ZetaSizer Nano ZS, em modo automático com três leituras. a) AgNPs sintetizadas com extrato aquoso de *T. roseoalba*. b) AgNPs sintetizadas com extrato aquoso de *H. impetiginosus*. c) AgNPs sintetizadas com extrato aquoso de *H. serratifolius*.

Fonte: do autor.

Outras características físico-químicas foram avaliadas como índice de polidispersividade (PdI) e potencial Zeta. Como visto na Tabela 5, conseguiu-se também uma modulação de PdI nas AgNPs sintetizadas com o extrato aquoso de *T. roseoalba* e *H. impetiginosus*. Com o aumento da temperatura houve o aumento do PdI, tornando a partícula mais polidispersa (menos homogênea). Já para o pZ as únicas AgNPs que exibiram resposta direta ao aumento de temperatura foram aquelas sintetizadas a partir do extrato aquoso de *T.*

roseoalba. Com o aumento da temperatura houve a diminuição em módulo do valor de pZ, tornando a partícula menos estável.

Tabela 5 – Dados de PDI e potencial Zeta de AgNPs biossintetizadas com extratos aquosos das folhas de espécies de ipês em meios reacionais submetidos a diferentes temperaturas.

Característica	Temp.	<i>T. roseoalba</i>	<i>H. impetiginosus</i>	<i>H. serratifolius</i>
PDI	25°C	0,526 ± 0,004 ^a	0,454 ± 0,013 ^a	0,628 ± 0,211 ^a
	50°C	0,399 ± 0,077 ^a	0,421 ± 0,008 ^a	0,385 ± 0,017 ^a
	75°C	0,781 ± 0,156 ^b	0,637 ± 0,203 ^b	0,597 ± 0,117 ^a
Potencial Zeta (mV)	25°C	- 22,6 ± 0,2 ^a	- 23,8 ± 1,6 ^a	- 18,5 ± 9,4 ^a
	50°C	- 20,9 ± 1,2 ^a	- 18,6 ± 0,9 ^b	- 22,1 ± 8,4 ^b
	75°C	- 18,7 ± 2,0 ^b	- 22,0 ± 0,9 ^a	- 19,1 ± 0,9 ^a

Obs.: Os testes realizados foram One-Way ANOVA seguido de teste Tukey, todos os p-valores foram abaixo de 0,05. As letras sobrescritas demonstram que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste Tukey, que foi feito em cada característica separadamente.

Fonte: do autor.

Para a variação de temperatura, conclui-se que para obter uma partícula menos polidispersa e com maior estabilidade, as AgNPs sintetizadas com o extrato aquoso das folhas de *T. roseoalba* as temperaturas mais indicadas são 25°C ou 50°C; para AgNPs sintetizadas com o extrato aquoso das folhas de *H. impetiginosus* a temperatura ideal é 25°C; e para aquelas sintetizadas com o extrato aquoso das folhas de *H. serratifolius* a temperatura de 50°C é a mais apropriada. Como as temperaturas que acarretaram em maior formação de AgNPs foram as maiores e as para formação de AgNPs mais estáveis e menos polidispersas variaram entre 25°C e 50°C, a temperatura escolhida para seguir nas próximas rotas de síntese foi a de 50°C em banho-maria.

4.4. SÍNTESE COM VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE EXTRATOS AQUOSOS

A fim de modular as características físico-químicas das AgNPs, alterando as condições reacionais, utilizando apenas a parte vegetativa folha, foi realizada uma estratégia de biossíntese utilizando três diferentes espécies de ipês: *H. serratifolius*, *H. impetiginosus* e *T. roseoalba*, com a temperatura mais indicada (50°C) e com variação de concentração do agente redutor (extrato aquoso da folha) no momento da síntese. Com cada espécie foi realizada uma reação de síntese a 50°C em banho-maria com as concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; e 16,0 mg/mL de

equivalente em tecido vegetal pesado como agente redutor. Todos esses materiais biológicos foram coletados no mesmo local e no mesmo dia (18/03/2017).

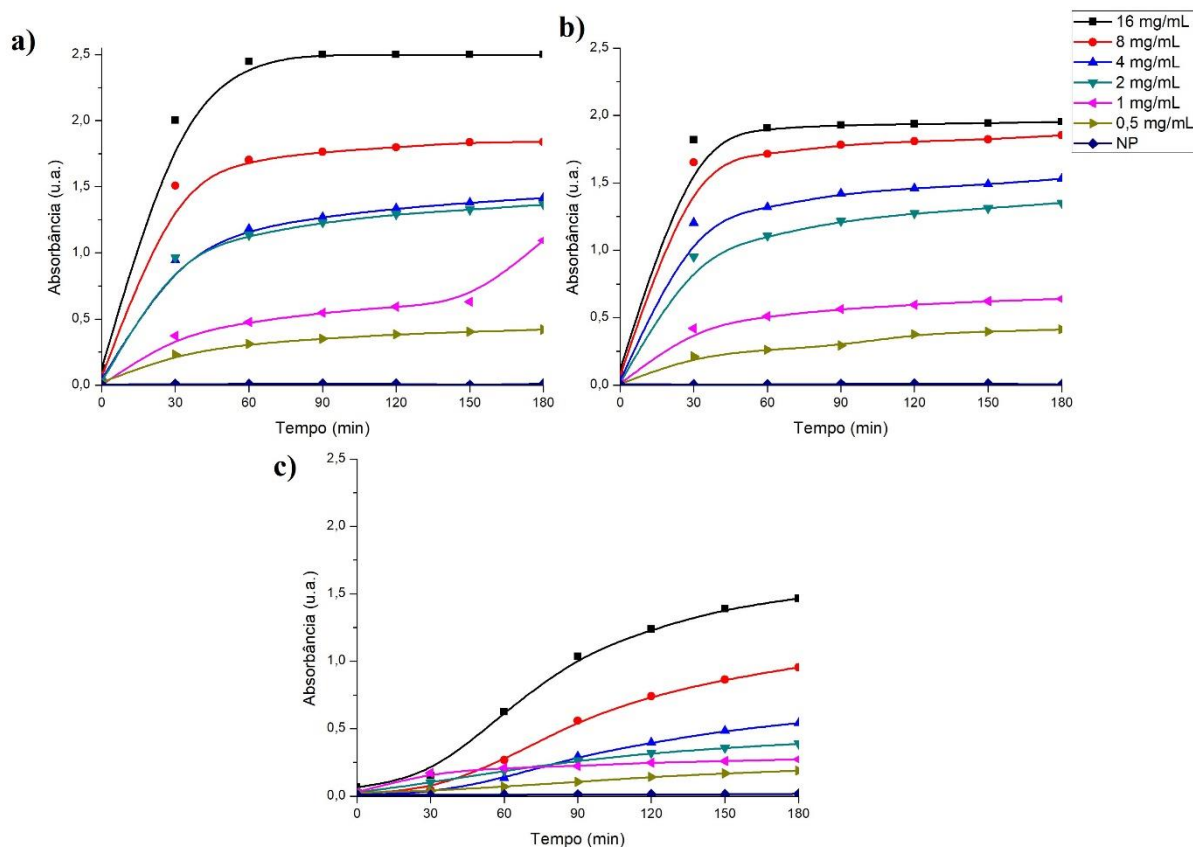


Figura 23 - Curvas de formação de AgNPs obtidas por espectrofotometria em 450 nm relativas à formação de AgNPs durante as reações de biossíntese de AgNPs com extrato aquoso das folhas das espécies a) *T. rosealba*; b) *H. impetiginosus*; c) *H. serratifolius*. As reações de síntese foram realizadas em banho-maria a 50°C por 180 min com variação de concentração de extratos aquosos das três espécies (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 mg/mL). O aumento da absorbância indica a formação de AgNPs. NP: controle negativo de formação apenas com nitrato de prata.

Fonte: do autor

Todas as reações de síntese apresentaram mudança de coloração do meio reacional e também aumentaram a sua absorbância na leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 450 nm durante o tempo de 180 min de síntese, indicando que houve a formação de AgNPs. Na Figura 23, consegue-se observar uma maior formação de AgNPs com as maiores concentrações de agentes redutores em todas as espécies. Pode-se perceber que a concentração do agente redutor é uma etapa crucial a ser considerada durante a síntese de AgNPs, e que ao aumentar a sua concentração foi aumentada também a sua produção. Contudo, após determinar as concentrações que propiciam a maior taxa de síntese de AgNPs é necessário também avaliar

suas características ópticas e físico-químicas como pico de máximo de absorção, diâmetro hidrodinâmico e potencial Zeta de superfície.

Para a caracterização e confirmação da formação das AgNPs, as mesmas foram diluídas dez vezes e analisadas por espectrofotometria UV-Vis nos comprimentos de onda de 350 a 550 nm e os picos de máxima absorbância confirmaram a formação de AgNPs.

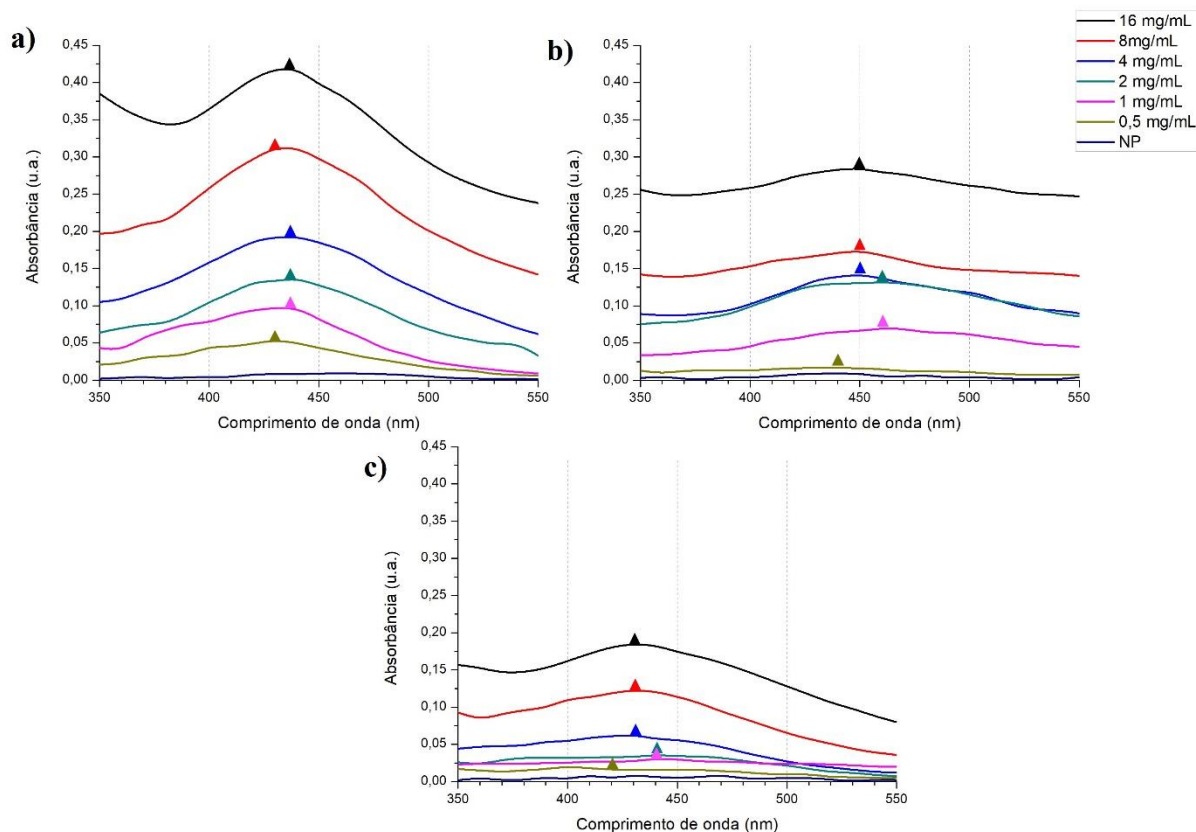


Figura 24 – Curvas de absorção das AgNPs obtidas pela avaliação espectrofotométrica após um dia da síntese e diluição de 10 vezes em água ultrapura. a) Biossíntese utilizando extrato aquoso das folhas de *T. roseoalba* como agente redutor. b) Biossíntese utilizando extrato aquoso das folhas de *H. impetiginosus* como agente redutor. c) Biossíntese utilizando extrato aquoso das folhas de *H. serratifolius* como agente redutor. As diferentes cores indicam as diferentes concentrações de agentes redutores utilizados na forma de extratos vegetais. NP: controle negativo de formação apenas com nitrato de prata.

Fonte: do autor.

Como indicado na Figura 24, para a maioria das AgNPs sintetizadas com o extrato aquoso de *T. roseoalba* observou-se o pico máximo de absorção de foi em 440 nm. Já para a maioria das AgNPs sintetizadas com o extrato aquoso de *H. impetiginosus*, o pico máximo de absorção foi em 450 nm; e por fim para a maioria das AgNPs sintetizadas com o extrato aquoso de *H. serratifolius* o pico máximo de absorção foi em 430 nm. Em geral, houve variação dos picos máximos de absorção de 420 a 460 nm indicando a formação de AgNPs. A intensidade

dos picos foi significativamente aumentada de acordo com o aumento da concentração de extrato aquoso. A única concentração final de extrato que não indicou a formação de AgNPs em todas as espécies foi a de 0,5 mg/mL. Dessa forma, as diferenças observadas entre os picos deve-se às variações nas concentrações de agentes redutores e estabilizantes, de modo que quanto menor a concentração de extrato, menor a formação de AgNPs, pois quando os metabólitos são o fator limitante em uma síntese as etapas de formação de AgNPs podem não ser concluídas, levando a partículas com diferentes tamanhos e formas e conseqüentemente com picos de absorção máxima diferente dos demais (PIMPAN e RITTHICHAJ, 2016).

Com a caracterização por DLS, consegue-se perceber na Figura 25 que para *T. roseoalba* não houve qualquer modulação correlacionável de forma direta entre a concentração do agente redutor e o diâmetro hidrodinâmico. Para *H. impetiginosus*, o diâmetro hidrodinâmico foi semelhante nas concentrações de 16 mg/mL até 1 mg/mL, somente com 0,5 mg/mL houve um aumento do tamanho da AgNPs. Assim, esse resultado sugere que desde que a concentração do agente redutor seja maior ou igual a 1 mg/mL o diâmetro hidrodinâmico das AgNPs biossintetizadas com extratos aquosos das folhas dessa espécie será similar, utilizando as mesmas condições reacionais. Já para AgNPs sintetizadas com o extrato aquoso das folhas de *H. serratifolius*, consegue-se perceber a possibilidade de modulação do diâmetro hidrodinâmico de extratos aquosos dessa espécie pela alteração de concentração do agente redutor. Neste caso, quando há o aumento na concentração do extrato, há possivelmente o aumento na concentração de moléculas doadoras de elétrons e assim há o aumento da taxa de transporte de elétrons fazendo com que haja maior formação de AgNPs e também que elas tenham diâmetro hidrodinâmico menor.

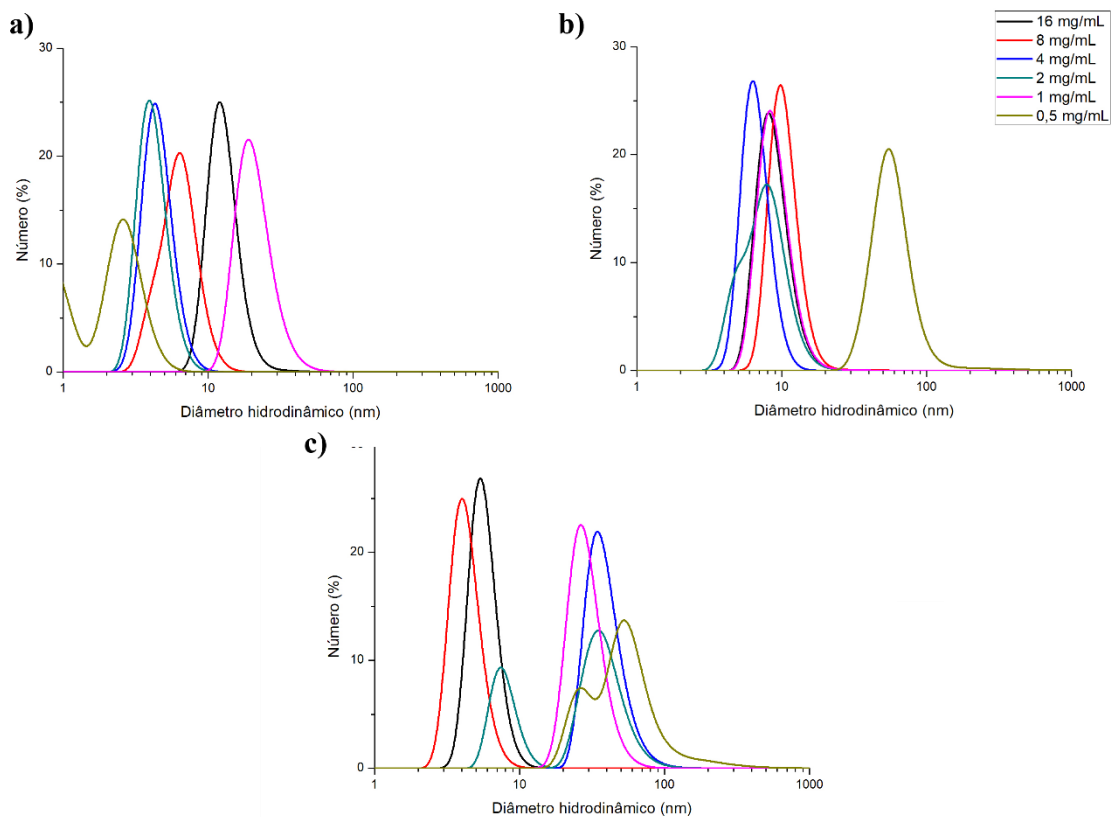


Figura 25 – Distribuições dos diâmetros hidrodinâmicos obtidos por espalhamento de luz dinâmico, em número (%), das AgNPs formadas com diferentes concentrações de extratos aquosos das folhas de ipês, após um dia da síntese e diluição de 10 vezes em água ultrapura. Avaliação realizada em equipamento ZetaSizer Nano ZS em, em modo automático com três leituras. a) AgNPs sintetizadas com extrato aquoso das folhas de *T. roseoalba*. b) AgNPs sintetizadas com extrato aquoso das folhas de *H. impetiginosus*. c) AgNPs sintetizadas com extrato aquoso das folhas de *H. serratifolius*.
 Fonte: do autor.

Outras características físico-químicas como PdI e potencial Zeta também tiveram seus valores alterados pelas concentrações de extratos, como demonstrado na Tabela 6. Para o PdI, a única modulação foi nas AgNPs sintetizadas com o extrato aquoso de *T. roseoalba*, sendo que se consegue perceber que quanto maior a concentração de extrato, menor o PdI, ou seja, suas características de tamanho ficaram mais homogêneas. Isto deve ocorrer devido ao aumento de concentração de extrato que faz das etapas de nucleação, crescimento e estabilização ocorra de forma mais rápida e possivelmente com o metabólito mais disponível na suspensão. Todas as AgNPs sintetizadas a partir do extrato aquoso de *H. impetiginosus* e *H. serratifolius* tiveram seus PdI medianos. Já para o potencial Zeta, não houve relação direta com o aumento da

concentração e variações em seu valor, todas as partículas sintetizadas apresentaram estabilidade coloidal incipiente (-10 a -30 mV).

Tabela 6 – Dados de PDI e potencial Zeta de AgNPs biossintetizadas a partir de extratos aquosos de plantas de Ipê em meios reacionais de diferentes concentrações de agentes redutores.

Característica	Concentração (mg/mL)	<i>T. roseoalba</i>	<i>H. impetiginosus</i>	<i>H. serratifolius</i>
Índice de polidispersividade (PDI)	16	0,275 ± 0,001 ^b	0,297 ± 0,009 ^a	0,477 ± 0,005 ^a
	8	0,314 ± 0,516 ^a	0,271 ± 0,011 ^a	0,460 ± 0,047 ^a
	4	0,428 ± 0,014 ^a	0,281 ± 0,004 ^a	0,393 ± 0,046 ^a
	2	0,339 ± 0,046 ^b	0,428 ± 0,005 ^a	0,465 ± 0,027 ^a
	1	0,526 ± 0,082 ^a	0,410 ± 0,002 ^a	0,498 ± 0,003 ^a
	0,5	0,648 ± 0,152 ^c	0,415 ± 0,042 ^a	0,445 ± 0,024 ^a
Potencial Zeta (mV)	16	- 16,8 ± 0,2 ^a	- 18,8 ± 0,3 ^a	-20,7 ± 0,9 ^a
	8	-20,9 ± 0,1 ^a	-10,9 ± 0,5 ^a	-22,9 ± 0,8 ^b
	4	-24,6 ± 0,8 ^b	- 25,1 ± 1,7 ^b	-22,4 ± 1,9 ^b
	2	-26,4 ± 2,3 ^b	-20,3 ± 0,9 ^a	- 19,2 ± 2,5 ^a
	1	-27,8 ± 0,9 ^b	- 23,7 ± 1,5 ^b	-13,8 ± 3,2 ^a
	0,5	-26,0 ± 3,7 ^b	- 21,9 ± 3,7 ^b	-24,5 ± 1,9 ^b

Obs.: Os testes realizados foram One-Way ANOVA seguido de teste Tukey, todos os p-valores foram abaixo de 0,05. As letras sobrescritas demonstram que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste Tukey, que foi feito em cada característica separadamente.

Fonte: do autor.

A síntese de nanopartículas metálicas é bastante afetada pela concentração do precursor redutor e estabilizador (SILVA, PEREIRA e BONATTO 2019). As AgNPs biossintetizadas com o extrato aquoso das folhas de *H. serratifolius* tiveram seu DH modulado apenas por meio da alteração na concentração de extrato. Essa modificação já foi demonstrada na literatura para outras espécies (SONG e KIM, 2009; KHALIL et al., 2014), ou seja, consegue-se controlar o DH alterando apenas esta variável, como visto no presente estudo. O PDI foi modulado em AgNPs biossintetizadas com o extrato aquoso de *T. roseoalba*, sendo que a menor concentração de extrato produziu partículas mais polidispersas e maior concentração de extrato sintetizou partículas menos polidispersas o que também corrobora com dados já demonstrados na literatura (WHITE et al., 2012).

Todas as concentrações acima de 1 mg/mL propiciaram biossíntese de AgNPs com características físico-químicas consideradas adequadas. Em todas as espécies avaliadas nessa concentração foi detectado apenas um pico, indicando apenas uma população em termos de diâmetro hidrodinâmico, com estabilidade coloidal incipientes e PDI moderados.

4.5. REAÇÕES DE SÍNTESE COM VARIAÇÃO DE FONTE DE ENERGIA

Ainda no intuito de identificar condições de reação apropriadas para modular as características físico-químicas das AgNPs biossintetizadas foi também realizada a alteração da fonte de energia com base na variação do equipamento empregado no momento da síntese. Tendo por material biológico a parte vegetativa folhas foi realizada uma biossíntese utilizando as três diferentes espécies de ipês: *H. serratifolius*, *H. impetiginosus* e *T. roseoalba*, com a concentração de extrato de 1 mg/mL, pois foi a concentração mínima a possibilitar formação de AgNPs com características físico-químicas desejáveis. Levando em consideração a variação entre os métodos de síntese: síntese por aquecimento em banho-maria a 50°C, síntese por aquecimento e pressão em autoclave, síntese por luz PAR, síntese por luz UV, síntese por vibração em ultrassom e síntese por irradiação e vibração molecular em micro-ondas, as folhas de todas as espécies foram coletadas no mesmo local e no mesmo dia (18/03/2017). O tempo de reação foi variado devido às limitações e especificações impostas por cada equipamento. Os tempos de reação adotados foram: 15 min em forno micro-ondas; 90 min em autoclave e 180 min para os demais equipamentos previamente citados. Algumas limitações para leituras periódicas a cada 30 min foram observadas, principalmente nos equipamentos: microondas, autoclave e luz PAR, sendo que nestes casos foram realizadas apenas leituras da absorbância inicial e final.

De acordo com a Figura 26 é possível perceber que as reações de síntese por aquecimento e pressão em autoclave favoreceram a formação de AgNPs com todas as espécies, mesmo com um tempo reacional menor. O aquecimento já é bastante conhecido como facilitador das reações de síntese devido a propiciar aumento na taxa de transporte de elétrons (HAMEDI, 2017; MOHAMMED et al., 2009; PARK et al., 2007). A alta pressão não é muitas vezes explorada, mas ela auxilia nas etapas de nucleação e crescimento de AgNPs, pois aumenta a capacidade do extrato de uma planta em reduzir o íon metálico (PANI, LEE e YUN, 2016). Avaliando a formação de AgNPs baseada na sua absorbância final têm-se que o banho-maria com aquecimento nas espécies *T. roseoalba* e *H. impetiginosus* foi a fonte de energia que segundo mais formou AgNPs; e utilizando o extrato aquoso de *H. serratifolius* o método de

irradiação e vibração molecular em micro-ondas foi o segundo colocado. O uso de micro-ondas constitui um método prático e rápido para a síntese verde de nanomateriais. É vantajoso, pois tem intervalos de tempo de reação mais curtos, menor consumo de energia e em geral maior rendimento do produto já que impede a aglomeração das NPs (HEBBALALU et al., 2013). Em terceiro lugar na maioria dos extratos aquosos utilizados, a luz UV mostrou-se promissora sendo que essa rota pode fornecer sistemas monodispersos com a possibilidade de controle efetivo do tamanho de partícula ao conseguir modular a intensidade dessa irradiação (BOGLE, DHOLE e BHORASKAR, 2006).

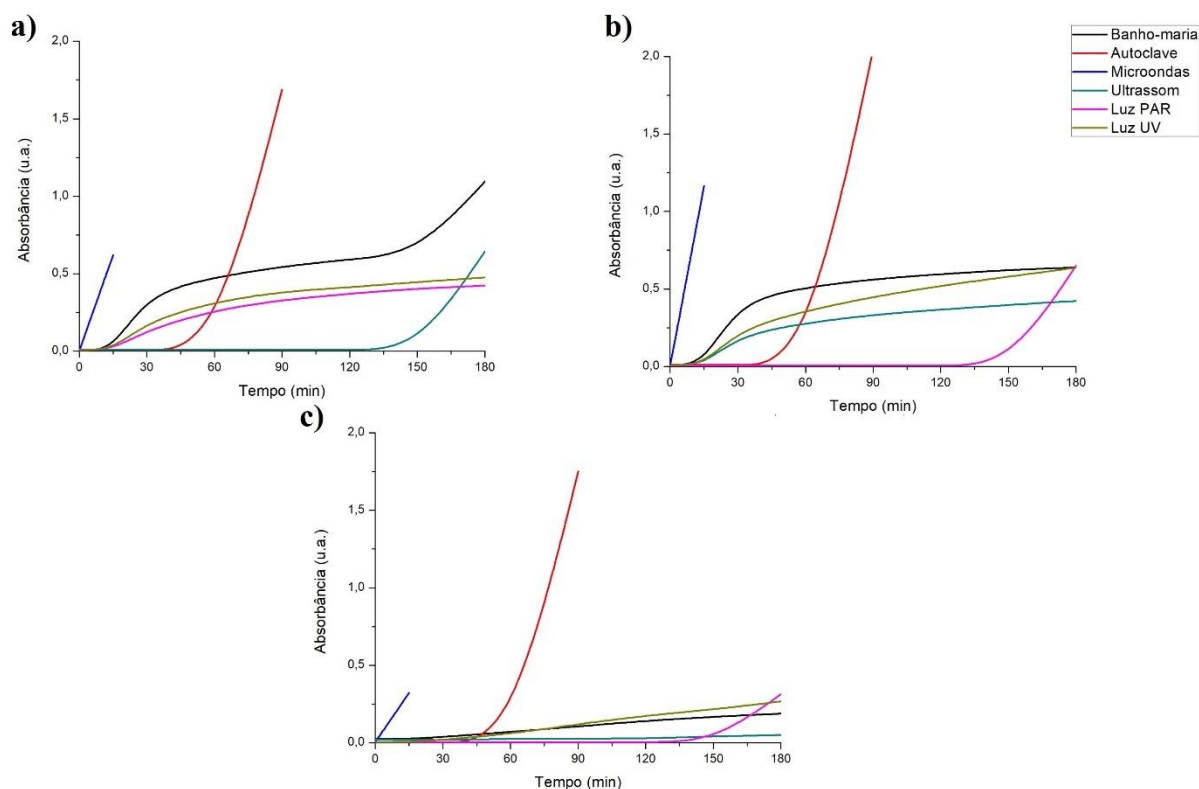


Figura 26 – Curvas de formação (finais ou parciais) de AgNPs obtidas pela caracterização por espectrofotometria em 450 nm durante a biossíntese com extratos aquosos de folhas das espécies a) *T. roseoalba*. b) *H. impetiginosus*. c) *H. serratifolius*. As reações de síntese foram realizadas com diferentes fontes de energia e com diferentes equipamentos como é demonstrado na legenda. O aumento da absorbância indica a formação de AgNPs.

Fonte: do autor

Para a caracterização e confirmação da formação das AgNPs, a ocorrência dos picos máximos de absorção confirmaram a formação de AgNPs, como indicado na Figura 27.

Adicionalmente, percebe-se que ocorreram bastante variações nos picos de máximo de absorção. Sabe-se que quando preparações de coloides de prata apresentam ressonâncias plasmônicas variadas comumente há formas e tamanhos diferentes do nanomaterial (LIAO, NEHL e HAFNER, 2006).

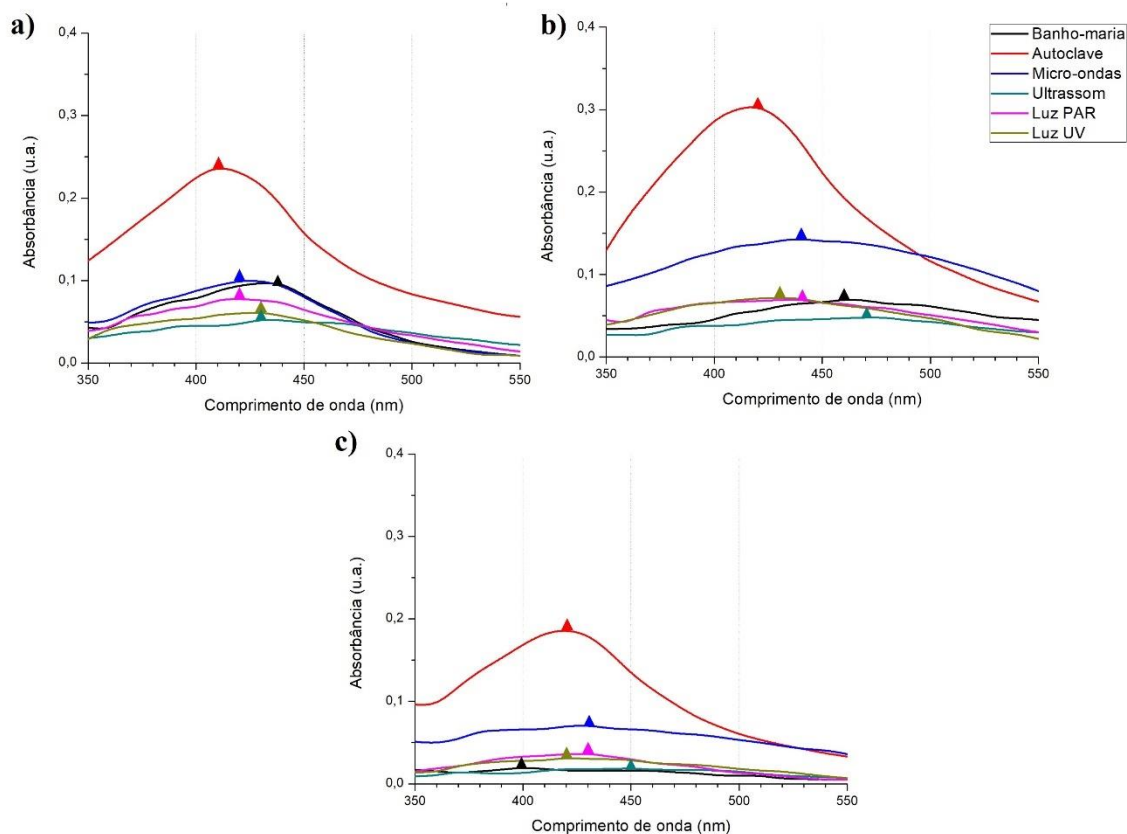


Figura 27 – Curvas de absorção das AgNPs obtidas por espectrofotometria após um dia da síntese e diluição de 10 vezes em água ultrapura. As curvas de absorção foram obtidas de 350 a 550 nm. a) Biossíntese utilizando extrato aquoso das folhas de *T. roseoalba*. b) Biossíntese utilizando extrato aquoso das folhas de *H. impetiginosu*. c) Biossíntese utilizando extrato aquoso das folhas de *H. serratifolius*. As diferentes cores indicam os diferentes métodos de síntese.

Fonte: do autor.

A fim de averiguar as possíveis alterações no diâmetro hidrodinâmico foi realizada caracterização com diluição de 10 vezes em água ultrapura e pH neutro (entre 6 e 7). Conseguir-se perceber na Figura 28 que os únicos métodos que acarretaram na síntese de nanomaterial com apenas uma população de AgNPs em todas as espécies foram banho-maria e luz UV. Esses métodos devem favorecer o encontro das moléculas do extrato com a prata iônica de forma constante levando à formação de apenas uma população. Para a síntese de AgNPs com extrato aquoso das folhas de *T. roseoalba*, os métodos de irradiação de luz e aquecimento foram os

mais adequados quando se averigua apenas o diâmetro hidrodinâmico tomando por base a formação de uma única população de AgNPs. Para a síntese de AgNPs com extrato aquoso das folhas de *H. impetiginosus* houve uma modulação nos diâmetros hidrodinâmicos alterando apenas o equipamento utilizado durante a síntese. Métodos com aquecimento como autoclave e banho-maria favoreceram a formação de AgNPs com DH menores e populações monodispersas; e métodos de irradiação como micro-ondas e ultrassom levaram à formação de AgNPs com DH maiores e populações monodispersas. Já para as AgNPs biossintetizadas com extrato aquoso de *H. serratifolius* não há uma modulação do diâmetro hidrodinâmico a partir da alteração do tipo de equipamento empregado e fonte de energia.

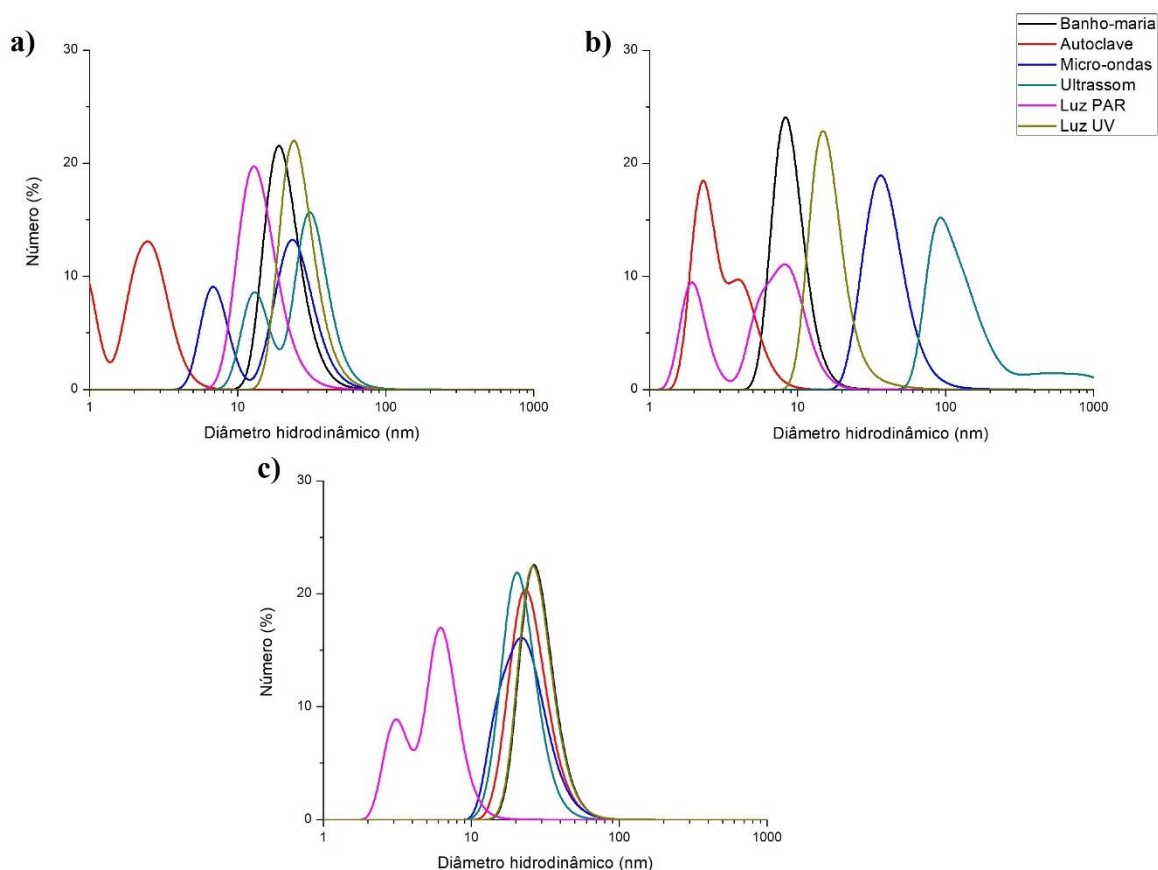


Figura 28 – Distribuição de diâmetros hidrodinâmicos obtidos por espalhamento de luz dinâmico, em número (%), das AgNPs formadas, com diferentes fontes de energia, após um dia da síntese e com diluição de 10 vezes em água ultrapura. As avaliações foram realizadas em equipamento ZetaSizer Nano ZS, em modo automático com três leituras. a) AgNPs sintetizadas com extrato aquoso das folhas de *T. roseoalba*. b) AgNPs sintetizadas com extrato aquoso das folhas de *H. impetiginosus*. c) AgNPs sintetizadas com extrato aquoso das folhas de *H. serratifolius*.

Fonte: do autor.

O PdI e pZ também foram averiguados. A Tabela 7 demonstra que não ocorreram mudanças significativas em PdI, exceto quando biossintetizado com extrato aquoso das folhas de *H. serratifolius* em micro-ondas que fez com que as partículas formadas se apresentassem mais polidispersas, sendo que essas mesmas AgNPs apresentaram um potencial Zeta baixo (em módulo), demonstrando que além de não homogêneas, elas não eram estáveis na suspensão aquosa, facilitando a aglomeração. Os dois equipamentos (fontes de energia) que formaram partículas com as características mais favoráveis e homogêneas nas três espécies, considerando particularmente o PdI e o potencial Zeta foram a luz PAR e o banho-maria.

Tabela 7 – Dados de PdI e potencial Zeta de AgNPs biossintetizadas a partir de extratos aquosos das folhas de ipês em diferentes equipamentos com fontes de energia variadas.

Característica	Equipamento	<i>T. roseoalba</i>	<i>H. impetiginosus</i>	<i>H. serratifolius</i>
Índice de polidispersividade (PdI)	M	0,542 ± 0,148 ^a	0,441 ± 0,001 ^a	0,876 ± 0,030 ^b
	UV	0,488 ± 0,152 ^a	0,389 ± 0,081 ^a	0,482 ± 0,029 ^a
	B	0,526 ± 0,082 ^a	0,428 ± 0,005 ^a	0,465 ± 0,027 ^a
	P	0,508 ± 0,009 ^a	0,548 ± 0,005 ^a	0,536 ± 0,112 ^a
	A	0,593 ± 0,231 ^a	0,772 ± 0,048 ^b	0,641 ± 0,324 ^{ab}
	US	0,691 ± 0,056 ^a	0,567 ± 0,149 ^a	0,485 ± 0,165 ^a
Potencial Zeta (mV)	M	-21,7 ± 4,5 ^a	-8,5 ± 0,4 ^c	-15,4 ± 5,7 ^b
	UV	-15,0 ± 1,1 ^b	-22,9 ± 1,8 ^a	-15,2 ± 1,9 ^b
	B	-27,8 ± 0,9 ^a	-20,3 ± 0,9 ^a	-19,2 ± 2,5 ^a
	P	-23,9 ± 1,2 ^a	-29,1 ± 1,0 ^a	-22,6 ± 0,8 ^a
	A	-24,4 ± 1,5 ^a	-25,3 ± 1,5 ^a	-27,1 ± 1,9 ^a
	US	-8,6 ± 0,9 ^c	-25,0 ± 0,3 ^a	-7,2 ± 1,4 ^c

Obs.: Os testes realizados foram One-Way ANOVA seguido de teste Tukey, sendo que todos os p-valores foram abaixo de 0,05. As letras sobrescritas demonstram que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste Tukey, que foi feito em cada condição separadamente. (M = Micro-ondas; UV = Luz UV; B = Banho-maria; P = Luz PAR; A = Autoclave e US = Ultrassom).

Fonte: do autor.

Averiguando que para o diâmetro hidrodinâmico os equipamentos que demonstraram características mais homogêneas e abrangente para as três espécies foram luz UV e banho-maria, e para o PdI e potencial Zeta foram luz PAR e banho-maria, entende-se que para as AgNPs biossintetizadas a partir das folhas dessas três espécies, o equipamento mais indicado

seria banho-maria a 50°C por congregarem características mais adequadas e homogêneas. O equipamento que houve maior formação foi a autoclave nas três espécies, porém levou a altos PdI, levando a crer que a alta pressão favorece a etapa inicial da síntese (nucleação) mas faz que as demais etapas não sejam finalizadas formando AgNPs com formas e tamanhos diferentes. Com base nesta etapa do estudo foi possível verificar que com a alteração do equipamento utilizado consegue-se modular o diâmetro hidrodinâmico de AgNPs biossintetizadas com o extrato aquoso de *H. impetiginosus*.

4.6. SÍNTESE COM MATERIAL BOTÂNICO OBTIDO POR PROPAGAÇÃO VEGETATIVA

A biossíntese de AgNPs com extratos aquosos de propagações vegetativas representa um grande passo que poderá tornar a síntese verde ainda mais sustentável, sem a extração de materiais botânicos diretamente da natureza. Os calos, que são definidos como aglomerados de células parenquimáticas desorganizadas, irregularmente diferenciadas, que se multiplicam desordenadamente, produzem metabólitos secundários, que podem ser extraídos com água e exercer ação de agente redutor devido ao desenvolvimento de respostas a injúrias químicas ou físicas, podendo ainda se diferenciar em tecidos e órgãos, assim como alterar a sua composição química produzindo mais ou menos metabólitos (ECHER et al., 2006).

Há poucos relatos do uso de extratos de calos para síntese de AgNPs: um utilizando calos de *Catharanthus roseus* (OSIBE et al., 2018); e outro de *Nicotiana tabacum* geneticamente modificada (SHKRYL et al., 2018). Ambos conseguiram realizar as reações de síntese, porém em períodos muito longos de tempo, em 96 e 24 horas, respectivamente. No presente estudo, os calos obtidos de hipocótilo de *H. impetiginosus* foram obtidos pela equipe do Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Genotoxicidade (Biogen) em meio MS com concentração de 1 mg/L de ácido naftalenoacético e mantidos em sala de crescimento e fotoperíodo de 16 h e temperatura de 27 ± 2°C. Em seguida foram retirados do meio, lavados com água ultrapura e macerados, seguindo do processo de extração em água fervente por 2 min. Para iniciar com as melhores condições já descritas acima, a primeira condição reacional foi na temperatura de 50°C em banho-maria, com a concentração de 1 mg/mL de extrato; porém, como pode-se ver na Figura 29, esta condição não alterou a absorbância depois da incubação por 180 min. Por isso uma nova abordagem foi realizada, elevando a temperatura de 50°C para 75°C, já que em ensaios anteriores percebeu-se que o aumento da temperatura levava a uma maior taxa de formação. Entretanto, a formação de AgNPs não foi muito pronunciada. Com isso, uma

terceira estratégia foi adotada, além de elevar a temperatura, também foi aumentada a concentração final do extrato de 1 para 4 mg/mL. Assim, conseguiu-se uma alteração da coloração da suspensão e aumento da absorção, tendo então indícios da formação de AgNPs. Na Figura 29 também está demonstrada a síntese de AgNPs a partir de extrato aquoso das folhas de *H. impetiginosus* com a temperatura de 75°C e concentração final de 4 mg/mL a fim de possibilitar uma comparação da formação de AgNPs pela folha e pelo calo.

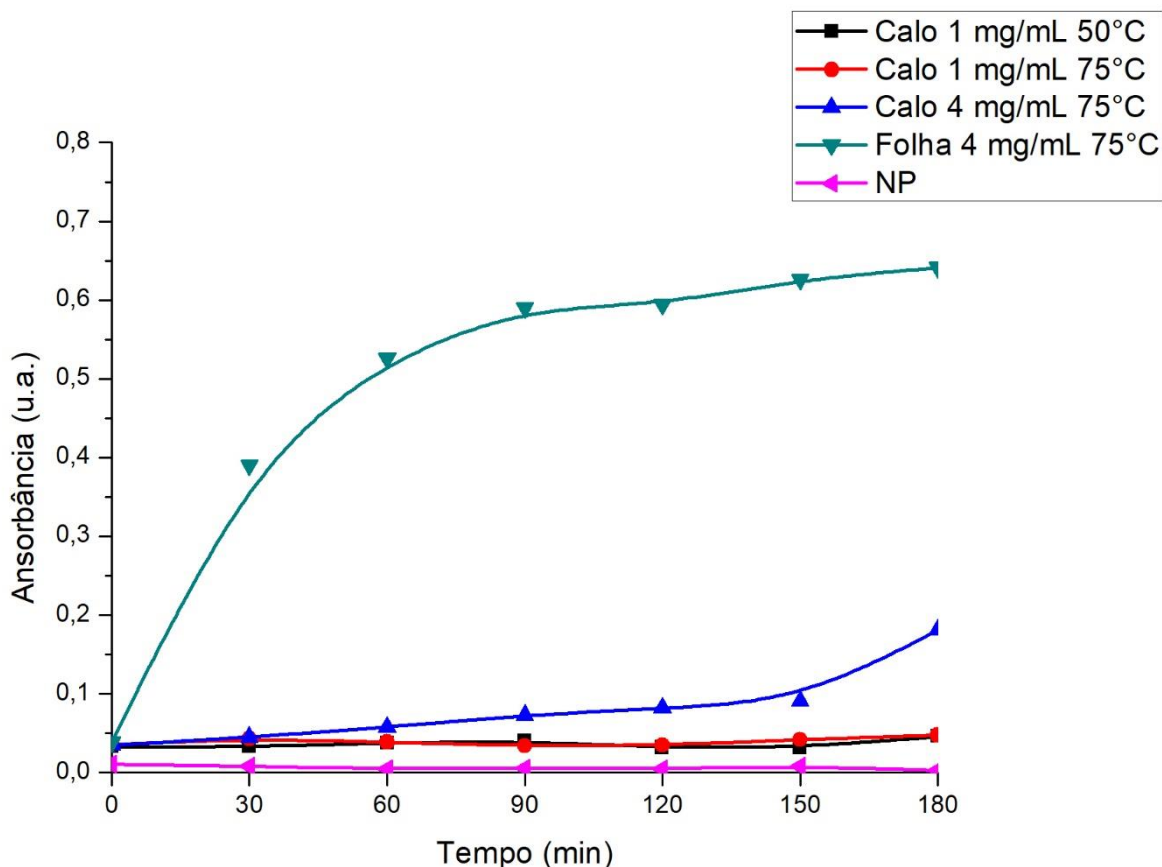


Figura 29 – Curvas de formação de AgNPs com extratos aquosos de calos e folhas da espécie *H. impetiginosus*. NP: controle negativo de formação apenas com nitrato de prata.

Fonte: do autor.

A fim de averiguar se houve a formação de AgNPs nessas condições foi realizada a avaliação das características físico-químicas como diâmetro hidrodinâmico, PdI e potencial Zeta. Consegue-se perceber na Figura 30, que houve a formação de AgNPs em todas as condições testadas, mesmo aquelas em que não foram observadas mudanças expressivas de absorbância na Figura 29. Também se notou que houve modulação fina do diâmetro hidrodinâmico (DH) naquelas AgNPs biossintetizadas com extrato aquoso de calo com as mudanças reacionais. Com o aumento da temperatura houve uma diminuição do DH e posteriormente com o aumento da concentração também houve a diminuição do DH, mostrando

que realmente é possível modular as características físico-químicas das AgNPs por alteração das condições reacionais. O extrato aquoso das folhas utilizado como agente redutor do nitrato de prata conduziu a uma maior taxa de formação de AgNPs com o DH menor do que as indicadas pelas reações com extratos aquosos dos calos. Isso pode acontecer pois há menor produção dos mesmos metabólitos secundários bioativos em ambiente controlado, pois podem alterar as vias metabólicas mudando assim os fatores que influenciam a biossíntese (GRĄBKOWSKA et al., 2016).

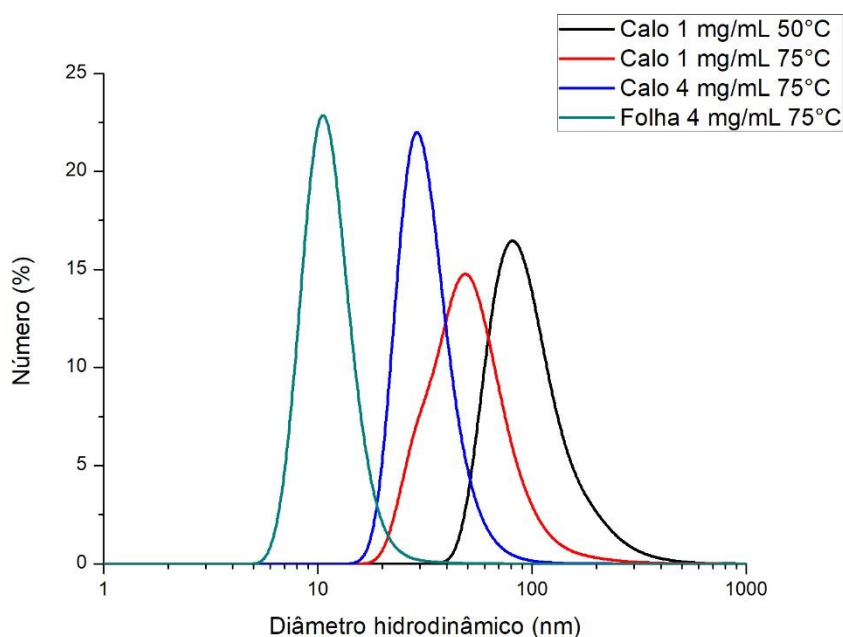


Figura 30 – Distribuições de diâmetros hidrodinâmicos obtidos por espalhamento de luz dinâmico, em número (%), das AgNPs biossintetizadas com extrato aquoso de calos e folhas de *H. impetiginosus*, após um dia da reação de síntese e diluição de 10 vezes em água ultrapura. A avaliação foi realizada em equipamento ZetaSizer Nano ZS, em modo automático com três leituras.

Fonte: do autor.

Como demonstrado na Tabela 8, o PDI foi significativamente modulado quando alterada a origem do material botânico. As AgNPs sintetizadas utilizando as folhas da espécie tiveram uma polidispersividade menor do que aquelas sintetizadas utilizando calos. Isso sugere que os calos apresentam menor concentração de metabólitos secundários do que as folhas (KARUPPUSAMY, 2009), fazendo da escassez de metabólitos o fator limitante para que não se conclua as etapas de síntese, formando partículas de diferentes tamanhos e formas e conseqüentemente mais polidispersas (KHALIL et al., 2014). Outra consideração que deve ser feita é sobre a concentração de extrato aquoso utilizado, já que com maior concentração de

extrato menor foi o PDI para as AgNPs, como já demonstrado em outros estudos com outras espécies de plantas (WHITE et al., 2012).

Já o potencial Zeta apresentou diferenças significativas apenas para as AgNPs que foram sintetizadas com extratos aquosos de calos em uma concentração final de 1 mg/mL e banho-maria a 75°C. Porém todas as AgNPs apresentaram estabilidade incipiente entre -10 a -30 mV. Mesmo que a produção a partir de calos tenha sido inferior à da folha colhida *in natura* (em função da intensidade de absorvância (em 450 nm), pode-se perceber que é um método tecnicamente plausível, já que outros parâmetros podem ser ajustados possibilitando uma maior taxa de síntese e para posterior produção em larga escala de AgNPs biossintetizadas a partir de calos. Essa estratégia pode ser considerada uma forma de diminuir o impacto na natureza, mesmo quando se trata de síntese verde a qual é reconhecidamente menos deletéria. Até então, este é o relato da literatura que representa a rota de síntese a partir de extrato aquoso de calos com o menor tempo de reação (3 h), a primeira síntese de AgNPs utilizando extrato de calos teve seu tempo de reação de 48 h (NETALA et al., 2015).

Tabela 8 – Dados de PDI e potencial Zeta de AgNPs biossintetizadas com extratos aquosos de calos e folhas de *H. impetiginosus*.

	Concentração (mg/mL)	<i>H. impetiginosus</i>
Índice de polidispersividade (PDI)	Calo 1 mg/mL 50°C	0,417 ± 0,047 ^a
	Calo 1 mg/mL 75°C	0,495 ± 0,135 ^a
	Calo 4 mg/mL 75°C	0,397 ± 0,021 ^a
	Folha 4 mg/mL 75°C	0,306 ± 0,014 ^b
Potencial Zeta (mV)	Calo 1 mg/mL 50°C	- 21,3 ± 6,3 ^a
	Calo 1 mg/mL 75°C	-11,7 ± 5,2 ^b
	Calo 4 mg/mL 75°C	-25,0 ± 1,6 ^a
	Folha 4 mg/mL 75°C	-21,7 ± 2,9 ^a

Obs.: Os testes realizados foram One-Way ANOVA seguido de teste Tukey, todos os p-valores foram abaixo de 0,05. As letras sobrescritas demonstram que os valores são significativamente diferentes de acordo com o teste Tukey, que foi feito em cada característica separadamente.

Fonte: do autor.

Adicionalmente, foi avaliada a possível atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus*, das AgNPs produzidas com extrato aquoso dos calos com concentração final de extrato de 4 mg/mL e síntese em banho-maria a 75°C. Como demonstrado na Figura 31, as AgNPs

sintetizadas com extrato aquoso de calos de *H. impetiginosus* apresentaram potencial antimicrobiano estatisticamente igual ao controle positivo em 256 μM , ou seja, a síntese com calos além de ser viável do ponto de vista técnico considerando parâmetros reacionais, elas podem ser aplicadas para o desenvolvimento de nanomateriais com propriedades antimicrobianas.

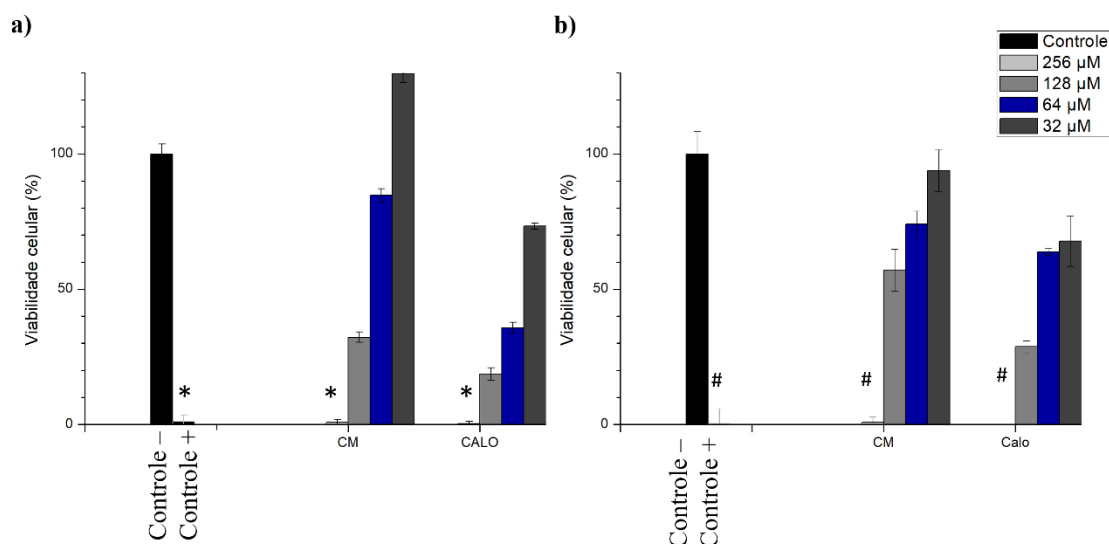


Figura 31 – Atividade antimicrobiana de AgNPs obtidas por síntese verde com extratos aquosos de calos de *H. impetiginosus* juntamente com controle de solução de nitrato de prata (CM), controle negativo com apenas água e controle positivo com estreptomicina e penicilina na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Com tempo de ensaio de 72h. Barras marcadas com o mesmo símbolo têm ação igual ou menor que o controle positivo. Análise estatística ANOVA com $p < 0,05$. O mesmo símbolo indica resultados estatisticamente semelhantes de acordo com o teste Tukey. a) Resultados das concentrações de AgNPs em *E. coli*. b) Resultados das concentrações de AgNPs em *S. aureus*.

Fonte: do autor.

5. CONCLUSÕES

A presente dissertação indicou que a parte vegetal de ipês mais recomendada para biossíntese de AgNPs considerando aspectos ambientais, fisiológicos e físico-químicos são as folhas. Os extratos aquosos das partes reprodutivas como botão floral e flor apesar de apresentarem uma taxa de síntese bem maior que as folhas, menores diâmetros hidrodinâmicos, PDI mais baixo e maior valor em módulo de potencial Zeta, não tiveram efeito antimicrobiano sobre *E. coli* e *S. aureus* além de poderem ser recolhidas da natureza em apenas uma época muito curta do ano.

Houve a produção de AgNPs por síntese verde utilizando extratos aquosos de folhas de espécies de ipês (*T. rosealba*, *H. impetiginosus* e *H. serratifolius*) obtidas *in natura* e

averiguou-se que existem diferença nas suas características físico-químicas (DH, PdI e pZ) correlacionando com a mudança de fatores abióticos como o índice pluviométrico que pode atuar modulando a produção de metabólitos secundários. Cada espécie apresentou características específicas, não houve um extrato aquoso de folhas coletadas no mesmo mês oriundas de diferentes espécies que levassem às características físico-químicas semelhantes sugerindo uma diversificação deste grupo quanto ao comportamento na formação de AgNPs. Por outro lado, como as características físico-químicas das AgNPs produzidas são diferentes é essencial relatar a data de coleta e índice pluviométrico nas produções bibliográficas relacionadas à síntese verde de AgNPs para que exista possibilidade de comparações e mesmo reprodutibilidade dos processos.

Conseguiu-se modular as características como DH e PdI alterando as condições reacionais utilizadas. Foi possível modular a característica diâmetro hidrodinâmico para AgNPs biossintetizadas com o extrato aquoso das folhas de *T. roseoalba* com a alteração da temperatura no momento da síntese. Essa resposta se deve possivelmente a presença de metabólitos que são termosensíveis no momento de sua extração, como a rutina (SILVEIRA et al., 2013). Conseguiu-se modular o diâmetro hidrodinâmico das AgNPs biossintetizadas com extrato aquoso de *H. impetiginosus* alterando o equipamento/fonte de energia utilizado no momento da reação de síntese e o PdI alterando a temperatura em banho-maria. Conseguiu-se também modular o diâmetro hidrodinâmico das AgNPs biossintetizadas com extrato aquoso de *H. serratifolius* alterando a concentração de extrato no momento da reação de síntese. Cada espécie foi responsiva a um tipo de alteração no momento da reação, permitindo perceber que cada espécie foi responsiva a um fator, conseguindo-se assim modular biossínteses utilizando uma dada espécie pela simples variação da condição de ensaio a qual é possível mediante triagem inicial.

Também foi possível realizar a síntese de AgNPs com extrato aquoso de tecidos obtidos por propagação vegetativa (calos) com a espécie *H. impetiginosus*, essas AgNPs também tiveram suas características físico-químicas moduladas de acordo com a variações das condições no momento da sínteses como concentração de extrato e temperatura no banho-maria e mesmo com um material botânico diferente dos utilizados as AgNPs produzidas apresentaram atividade antibacteriana tanto contra *E. coli* quanto *S. aureus* em 256 μM , fazendo dessa estratégia uma alternativa promissora para utilização em larga escala na indústria visando à síntese verde de AgNPs com tecidos vegetais, pois, minimizará o uso de reagentes tóxicos, diminuirá a necessidade de coleta *in natura* de tecidos, e ainda possibilitará a modulação de

características físico-químicas como diâmetro hidrodinâmico com a manutenção da atividade antimicrobiana. Com esse estudo conseguiu-se superar duas barreiras para que a síntese verde chegue até a indústria, primeiramente modulando as características físico-químicas e segundo produzindo AgNPs a partir de material botânico obtido por propagação vegetativa. Para facilitar a visualização de algumas descobertas feitas no presente trabalho a Figura 32 foi elaborada.

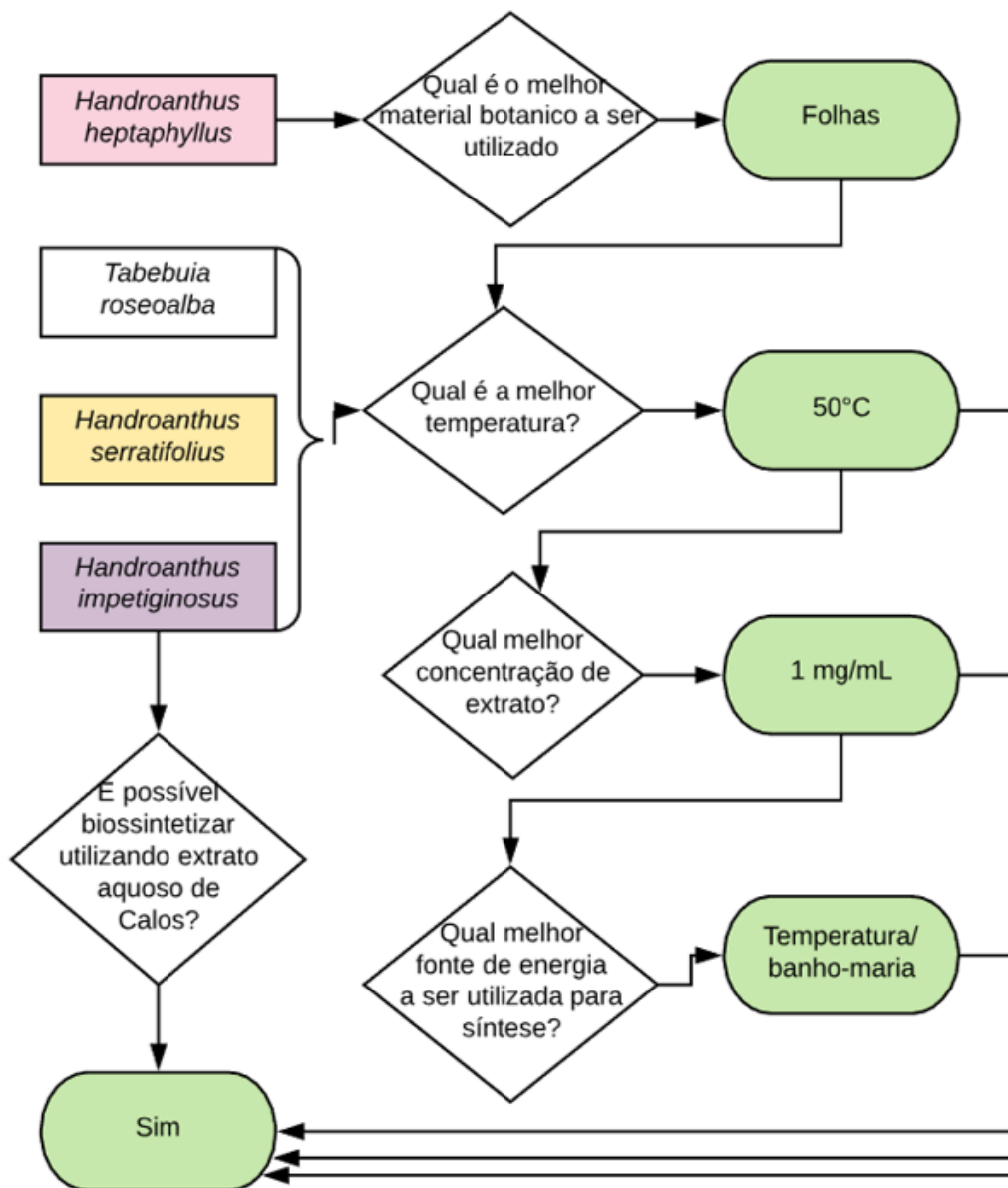


Figura 32 – Fluxograma conclusivo de todas as etapas elaboradas. Os losangulos representam as etapas de tomada de decisão embasados nas etapas de caracterização. E as respostas encontradas para este estudo estão em verde.

Fonte: do autor.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBADE, L.C. **Aspectos do cultivo *in vitro* de ipê-branco**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas-MG, 2008
- ABBADE, L.C.; TAKAKI, M. Biochemical and physiological changes of *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith (Bignoniaceae) seeds under storage. **Journal of seed science**. V. 36, n. 1, p. 100-107. 2014.
- ALBERNAZ, V.L. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico**. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIAL. Zeta Potential of colloids in water and waste water. **ASTM standard D**. p. 4182-4187. 1985.
- ANANDALAKSHMI, K.; VENUGOBAL, J.; RAMASAMY, V. Characterization of silver nanoparticles by green synthesis method using *Pedaliium murex* leaf extract and their antibacterial activity. **Applied Nanoscience**. v. 6, n. 3, p. 399 – 408. 2016.
- BALASHANMUGAMA, P. et al. Phytochemical synthesis of silver nanoparticles, optimization and evaluation of *in vitro* antifungal activity against human and plant pathogens. **Microbiological research**. v. 192, p. 52-64. 2016.
- BALDRY, M. et al. Application of an agr-specific antivirulence compound as therapy for *Staphylococcus aureus*-induced inflammatory skin disease. **The journal of infectious disease**. v. 2018, n. 218, p. 1009-1013. 2018.
- BAR, H. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Jatropha curcas*. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 348, p. 212-216. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.07.021>.
- BESSER, R.E. et al. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. **JAMA**. v. 269, n. 17, p. 2217–2220. 1993.
- 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.
- BEZERRA, D.P. et al. Antitumor activity of two derivatives from 2-acetylamine-1, 4-naphthoquinone in mice bearing S180 tumor. **Journal of experimental therapeutics and oncology**. v. 7, n. 2, p. 113-21. 2008.
- BOGLE, K.A.; DHOLE, S.D.; BHORASKAR, V.N. Silver nanoparticles: synthesis and size control by electron irradiation. **Nanotechnology**. v. 17, p. 3204-3208. 2006.

BONATTO, C.C. **Desenvolvimento e avaliação de atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* de micro- e nanopartículas de prata utilizando plantas do Cerrado**. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

BUDNI, P. et al. Estudos preliminares da atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de folhas jovens e adultas de *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo (ipê-roxo). **Latin american journal of pharmacy**. v. 26, n. 3, p. 394-398. 2007.

BRASIL. Ministério do meio ambiente. **Programa nacional de conservação e uso sustentável do bioma cerrado**. Brasília. 2006.

CABRAL, D.L.V. **Potencial antimicrobiano de plantas da caatinga utilizadas na medicina tradicional como antiinflamatórias**. 2014. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

CHEN, X.; JESEN, L. Understanding the shape effect on the plasmonic response of small ligand coated nanoparticles. **Journal of Optics**. v. 18, n. 7, p. 1-8. 2016.

CHIEN, C-S. et al. Antibacterial activity of silver nanoparticles (AgNP) confined to mesostructured silica against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of alloys and compounds**. V. 747, p. 1-7. 2018.

CHOI, Y. et al. Platycodon saponins from Platycodi Radiz (*Platycodon grandiflorum*) for the green synthesis of gold and silver nanoparticles. **Nanoscale research letters**. v. 13, n. 1, p. 1-10. 2018.

COELHO, J.M. **O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas, em ratos**. 2009. Dissertação (Mestrado em saúde e desenvolvimento) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

COLACITE, J. Triagem fitoquímica, análise antimicrobiana e citotóxica e dos extratos das plantas: *Schinus terebinthifolia*, *Maytenus ilicifolia* Reissek, *Tabebuia avellanadae*, *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Saúde e pesquisa**. v. 8, n. 3, p. 509-516, 2015.

DEVI, S.M. et al. Phytofabrication and encapsulated of silver nanoparticles from *Gloriosa superba*. **Materials Letters**. v. 188, n. 1, p. 197 – 200. 2017.

DONG, P.V. et al. Chemical synthesis and antibacterial activity of novel-shaped silver nanoparticles. **International Nano Letters**. v. 2, n. 9, p. 1-9. 2012.

DOUSSEAU, S.; ALVARENGA, A.A.; SANTOS, M. O.; ARANTES, L. O. Influência de diferentes condições de sombreamento sobre o crescimento de *Tapirira guianensis* Alb. **Revista Brasileira de Biociência**. v. 5, n. 2, p. 477-479. 2007.

DUARTE, J.L. et al. Análise fitoquímica das folhas de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson (Ipê Amarelo). **Estação científica**. v. 4, n. 1, p. 33-43. 2014.

ECHER, M. M. et al. Uso de bioestimulante na formação de mudas de maracujazeiro amarelo. **Ciências agrárias**. v. 27, n. 3, p.351-360. 2006

ESMELINDRO, A.A. et al. Influence of agronomic variables on the composition of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) extracts obtained from CO₂ extraction at 30°C and 175 bar. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 52, n. 7, p. 1990-1995. 2004.

FERRAZ FILHA, Z.S. **Avaliação química e farmacológica de Tabebuia roseoalba e das atividades anti-hiperuricêmica e anti-inflamatória de quinonas comuns em Tabebuia**. 2016. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Escola de farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais.

FONER, H.A.; ADAN, N. The characterization of papers by X-Ray diffraction (XRD): measurement of cellulose crystallinity and determination of mineral composition. **Journal of the Forensic Science Society**. v. 23, p. 313–321. 1983.

FREESTONE, I. et al. The lycurgus cup – A roman nanotechnology. **Gold Bulletin**. v. 40, n. 4, p. 270-277. 2007.

GAIKWAD, S. et al. Antiviral activity of mycosynthesized silver nanoparticles against herpes simplex virus and human parainfluenza virus type 3. **International journal of nanomedicine**. v. 8, p. 4303-4314. 2013.

GEISLER, K. et al. Biochemical analysis of a multifunctional cytochrome P450 (CYP51) enzyme required for synthesis of antimicrobial triterpenes in plants. **Proceedings of the national academy of sciences**. v. 110, n. 35, e3360–e3367. 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309157110>.

GERSHENZON, S. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. **Phytochemical adaptations to stress**. v. 18, p. 273–320. 1984.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 374–381. 2007

GRĄBKOWSKA, R. et al. Callus cultures of *Harpagophytum procumbens* (Burch.) DC. ex Meisn.; production of secondary metabolites and antioxidant activity. **South african journal of botany**. v. 103, p. 41-48. 2016.

GRAND VIEW RESEARCH, INC. Silver Nanoparticles market by application (Electronics & electrical, healthcare, food & beverages, textiles) and segment forecasts To 2022. **Market Research Report.**, San Francisco, 2015.

HAMEDI, S. Controlled biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of filamentous fungus. **Iranian journal of chemistry and chemical engineering**. v. 36, n. 5, p. 33-42. 2017.

HAMMER, Ø. et al. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**. v. 4, n. 1, p. 1–9. 2001.

HEBBALALU, D. et al. Greener techniques for the synthesis of silver nanoparticles using plant extracts, enzymes, bacteria, biodegradable polymers and microwaves. **ACS sustainable chemistry engineering**. v. 1, n. 7, p. 703-712. 2013.

HUSSAIN, H. et al. Lapachol: An overview. **ARKIVOC**. v. 2, p. 145-171. 2007.

KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. **Journal of medicinal plants research**. v. 3, n. 13, p. 1222-1239. 2009.

KATERERE, D.R. et al. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. **Phytochemistry**. v. 63, n. 1, p. 81-88. 2003.

KELKAWI, A.H.A.; KAJANI, A.A.; BORDBAR, A-K. Green synthesis of silver nanoparticles using *Mentha pulegium* and investigation of their antibacterial, antifungal and anticancer activity. **IET Nanobiotechnology**. v. 11, n. 4, p. 370-376. 2017.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2 ed. Rio de Janeiro - RJ : Guanabara Koogan S.A. 2004. 451 p.

KHALIL, M.M.H. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. **Arabian journal of chemistry**. v. 7, p. 1131-1139. 2014.

KUNG, H.N. et al. *In vitro* and *in vivo* wound healing-promoting activities of beta-lapachone. **American journal of physiology – Cell physiology**. v. 295, n. 4, p. 931-943. 2008.

LARA, H.H. et al. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. **Journal of nanobiotechnology**. v. 8, n. 1, p. 1-10. 2010.

LEE, S.E.; PARK, B.S.; YUM, J.H. Antioxidative activity of taheebo (*Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC.) extracts on the H₂O₂- induced NIH3T3 cells. **Journal of medicinal plants Research**. v. 6, n. 39, p. 5258-5265. 2012.

LIAO, H.; NEHL, C.L.; HAFNER, J.H. Biomedical applications of plasmon resonant metal nanoparticles. **Nanomedicine**. v. 1, n. 2, p. 201-208. 2006.

LOKINA, S. et al. Cytotoxicity and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles. **European journal of medicinal chemistry**. v. 76, n. 9, p. 256 – 263. 2014.

MALLMANN, E.J.J. et al. Antifungal activity of silver nanoparticles obtained by green synthesis. **Revista do instituto de medicina tropical de São Paulo**. v. 57, n. 2, p. 165-167. 2015.

MARTINS, L. et al. Qualidade fisiológica de sementes de *Tabebuia avellanedae* e *Tabebuia impetiginosa* submetidas à ultra-secagem. **Revista brasileira de sementes**. v. 33, n. 4, p. 626-634. 2011.

MEHMOOD, A. et al. Facile green approach to investigate morphology controlled formation mechanism of silver nanoparticle. **Journal of cluster science**. v. 27, n. 5, p. 1797 – 1814. 2016.

MOCK, J.J. et al. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. **The journal of chemical physics**. v. 116, p. 6755-6759. 2002. <https://doi.org/10.1063/1.1462610>.

MOHAMMADLOU, M.; MAGHSOUDI, H.; JAFARIZADEH-MALMIRI, H. A review on green silver nanoparticles based on plants: Synthesis, potential applications and eco-friendly approach. **International food research journal**. v. 23, n. 2, p. 446-463. 2016.

MOHAMMED, F.A. et al. Fungal based synthesis of silver nanoparticles-an effect of temperature on the size of particles. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**. v. 74, p. 123-126. 2009.

MOSSI, A.J. et al. Chemical variation of tannins and triterpenes in Brazilian populations of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. **Brazilian journal of biology**. v. 69, n. 2, p. 339-345, 2009.

MUNIYAN, A. et al. Characterization and in vitro antibacterial activity of saponin-conjugated silver nanoparticles against bacteria that cause burn wound infection. **World journal of microbiology and biotechnology**. v. 33, n. 147, p. 1 – 12. 2017.

NAMDEO, A.G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. **Pharmacognosy reviews**. v. 1, n. 1, p. 69-79. 2007.

NETALA, V.R. et al. First report of biomimetic synthesis of silver nanoparticles using aqueous callus extract of *Centella asiatica* and their antimicrobial activity. **Applied Nanoscience**. v. 5, n. 7, p. 801-807. 2015.

OLIVEIRA, A.K.M. et al. Caracterização morfológica, viabilidade e vigor de sementes de *Tabebuia chrysotricha* (Mart. Ex. DC.) Standl. **Revista Árvore**. v. 32, n. 6, p. 1011-1018. 2008.

OLIVEIRA, G.Z.S. **Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extrato aquoso e metabólito secundário (quercetina) das folhas de Pterodon emarginatus (sucupira branca) direcionadas para aplicações biomédicas e agrícolas**. Tese (Doutorado em Nanociência e Nanobiotecnologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

OSIBE, D.A. et al. Stable antibacterial silver nanoparticles produced with seed-derived callus extract of *Catharanthus roseus*. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**. v. 46, n. 6, p. 1266-1273. 2018.

PALMELA, C. et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. **BMJ Journals**. v. 67, n. 3, p. 574-587. 2017.

PANI, A.; LEE, J.H.; YUN, S. Autoclave mediated one-pot-one-minute synthesis of AgNPs and Au–Ag nanocomposite from *Melia azedarach* bark extract with antimicrobial activity against food pathogens. **Chemistry central journal**. v. 10, n. 15, p. 1-11. 2016.

PARK, B.S. et al. Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 105, n. 1-2, p. 255-262. 2006.

- PARK, B.S. et al. Selective growth-inhibiting effects of compounds identified in *Tabebuia impetiginosa* inner bark on human intestinal bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, n. 4, p. 1152–1157. 2005.
- PARK, J. et al. Synthesis of monodisperse spherical nanocrystals. **Angewandte chemie international edition** 2. v. 46, p. 4630-4660. 2007.
- PARLINSKA-WOJTAN, M. et al. Green synthesis and antibacterial effects of aqueous colloidal solutions of silver nanoparticles using camomile terpenoids as a combined reducing and capping agent. **Bioprocess and biosystems engineering**. v. 39, n. 8, p. 1213 – 1223. 2016.
- PIMPAN, V.; RITTHICHAJ, T. pH effect on characteristics and ammonia aensing of silver nanoparticles synthesized in the presence of tannic aci. **Key engineering materials**. v. 759, p. 98-101. 2016.
- RAJARAM, K. et al. Green synthesis of silver nanoparticle using *Tephrosia tinctorial* and its antidiabetic activity. **Materials letters**. v. 138, p. 251- 254. 2015.
- RASHID, M.U.; BHUIYAN, M.K.H.; QUAYUM, M.E. Synthesis of silver nano particles (Ag-NPs) and their uses for quantitative analysis of vitamin C tablets. **Bangladesh journals online**. v. 12, n. 1, p. 29-33. 2013.
- REGO, G.M.; POSSAMAI, E. Efeito do sombreamento sobre o teor de clorofila e crescimento inicial do Jequitibá-rosa. **Pesquisa Florestal Brasileira**. v. 53, p. 179-194. 2011.
- ROMAGNOLI, M. et al. Wood colour in Lapacho (*Tabebuia serratifolia*): chemical composition and industrial implications. **Wood science and technology**. v. 47, p. 701-716. 2013.
- ROY. P. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* leaf extract and its antimicrobial study. **Applied nanoscience**. v. 9, p. 1-7. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.06.006>.
- SAHU, N. et al. Synthesis of silver nanoparticles using flavonoids: hesperidin, naringin and diosmin, and their antibacterial effects and cytotoxicity. **International nano letters**. v. 6, n. 3, p. 173 – 181. 2016.
- SARGENTELLI, V. Nanociência: Aplicações tecnológicas em química, saúde, agricultura e meio ambiente: uma sinopse. **Revista Eletrônica Ambiente Gestão & Desenvolvimento**. v.4, n.1. 2012.
- SARINI, G.; BOAIAH, A.K. Phytochemical screening of the leaf and flower extracts of five *Ipomoea species* collected from in and around Bangalore. **International journal of pharma and bio sciences**. v. 7 p. 71-73. 2016.
- SEGAL, L. et al. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal**. v. 29, p. 786–794. 1959.

SILVA, L.D. **Síntese verde, caracterização e atividade biológica de nanopartículas de prata obtidas utilizando extratos de *Hancornia speciosa* Gomes – Apocynaceae (mangabeira)**. 2014. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

SILVA, L.P.; PEREIRA, T.M.; BONATTO, C.C. Frontiers and perspectives in green synthesis of silver nanoparticles. **Elsevier**. 1 ed. Amsterdã: 2019. cap 7. pag 1-30.

SHANKAR, S.; RHIM, J-W. Amino acid mediated synthesis of silver nanoparticles and preparation of antimicrobial agar/silver nanoparticles composite films. **Carbohydrate polymers**. v. 130, p. 353-363. 2015.

SHKRYL, Y.N. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using transgenic *Nicotiana tabacum* callus culture expressing silicatein gene from marine sponge *Latrunculia oparinae*. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**. v. 46, n. 8, p. 1646-1658. 2018.

SILVEIRA, T.F.F. et al. The effect of the duration of infusion, temperature, and water volume on the rutin content in the preparation of mate tea beverages: An optimization study. **Food Research International**.v. 60, p. 241-245. 2014.

SON, D.J. et al. Inhibitory effects of *Tabebuia impetiginosa* inner bark extract on platelet aggregation and vascular smooth muscle cell proliferation through suppressions of arachidonic acid liberation and ERK1/2 MAPK activation. **Journal of ethnopharmacology**. v. 108, n. 1, p. 148–151. 2006.

SONG, J.Y., KIM, B.S. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 32, p. 79-84. 2009.

SRIKAR, S.K. et al. Green synthesis of silver nanoparticles: A review. **Chemistry & materials Science**. v. 6, n. 1, p. 34-56. 2016.

STEVENSON, P.C.; NICOLSON, S.W.; WRIGHT, G.A. Plant secondary metabolites in nectar: impacts on pollinators and ecological functions. **Functional Ecology**. v. 31, p. 65-75. 2017.

SHITAN, N. Secondary metabolites in plants: transport and self-tolerance mechanisms. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**. v. 80, p. 1283-1293. 2016. <http://doi.org/10.1080/09168451.2016.1151344>.

SURIATI, G.; MARIATTI, M.; AZIZAN, A. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method: effect of reducing agent and surfactant concentration. **International journal of automotive and mechanical engineering**. v. 10, p. 1920-1927. 2014. <http://doi.org/10.15282/ijame.10.2014.9.0160>.

TANDON, V.K.; SINGH, R.V.; YADAV, D.B. Synthesis and evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives as antiviral, antifungal and anticancer agents. **Bioorganic and medicinal chemistry letters**. v. 14, n. 11, p. 2901–2904. 2004.

TERENTEVA, E.A. et al. Formation of plasmonic silver nanoparticles by flavonoid reduction: A comparative study and application for determination of these substances. **Spectrochimica acta part A: Molecular and biomolecular spectroscopy**. v. 151, p. 89 – 95. 2015.

VELAYUTHAM, K.; RAMANIBAI, R. Larvicidal activity of synthesized silver nanoparticles using isoamyl acetate identified in *Annona squamosa* leaves against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Basic and Applied Zoology**. v. 74, p. 16-22. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2016.02.002>.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A.C.; WEBER, G.E.B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa clima temperado documentos**. v. 315, 16 p. 2010.

WHITE, G.V. et al. Green synthesis of robust, biocompatible silver nanoparticles using garlic extract. **Journal of Nanomaterials**. v. 2012, ID 730746, p. 55-67. 2012.

XIANG, D.X. et al. Inhibitory effects of silver nanoparticles on H1N1 influenza A virus *in vitro*. **Journal of virological methods**. v. 178, n. 1-2, p. 137-142. 2011.

XU, Y. et al. Enhanced photocatalytic activity of new photocatalyst Ag/AgCl/ZnO. **Journal of alloys and compound**. v. 509, p. 3286–3292. 2011.

YI, Z. Green, effective chemical route for the synthesis of silver nanoplates in tannic acid aqueous solution. **Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects**. v. 392, n. 1, p. 131 – 136. 2011.

ZHANG, X-F. et al. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. **International journal of molecular sciences**. v. 13, n. 9, p. 1-34. 2013.