

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

VALCILAINÉ TEIXEIRA BARBOSA

Síntese biogênica de nanopartículas de prata usando própolis vermelha de Alagoas

Maceió

2018

VALCILAINÉ TEIXEIRA BARBOSA

Síntese biogênica de nanopartículas de prata usando própolis vermelha de Alagoas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Camila Braga Dornelas

Maceió

2018

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

B238s Barbosa, Valcilaine Teixeira.

Síntese biogênica de nanopartículas de prata usando própolis vermelha de Alagoas / Valcilaine Teixeira Barbosa. – 2018.
74 f. : il.

Orientadora: Camila Braga Dornelas.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 63-74.

1. Própolis vermelha de Alagoas. 2. Nanopartículas de prata – Síntese biogênica.
I. Título.

CDU: 615.3:638.135

Folha de Aprovação

AUTOR: VALCILAINÉ TEIXEIRA BARBOSA

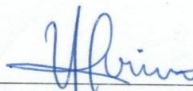
(Síntese biogênica de nanopartículas de prata usando própolis vermelha de Alagoas / dissertação de mestrado em ciências farmacêuticas, da Universidade Federal de Alagoas, na forma normalizada e de uso obrigatório)

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 15 de fevereiro de 2018.



(Doutora, Camila Braga Dornelas, Universidade Federal de Alagoas)(Orientadora)

Banca Examinadora:



(Doutor, Valter Alvino da Silva, Universidade Federal de Alagoas) (Examinador Externo)



(Doutor, Mário Roberto Meneghetti, Universidade Federal de Alagoas) (Examinador Interno)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades e bênçãos que Ele tem me proporcionado.

Aos meus pais, pelo qual sou eternamente grata por tudo e tenho maior amor e admiração.

À minha irmã, que faz os meus dias ficarem mais alegres com sua doçura da infância.

Ao meu noivo, pela sua presença em todas as horas, paciência e amor.

À Joyelanne, que surgiu para dividir todos os momentos bons e ruins da pesquisa e se tornou também uma grande amiga.

Aos colegas do TecNano pela ajuda nos experimentos, cálculos, análises e por compartilhar bom tempo de nossos dias.

À Milla, Thomás, Josiel e Mari do LBFI, pela disponibilidade de sempre e por tornar os dias mais leves e felizes.

Ao professor Irinaldo Diniz e seus alunos Valdemir e Saulo, do Laboratório de Controle e Qualidade de Medicamentos (LBTCO) pelas análises de TG e DSC.

Aos professores Josué Carinhonha, Mario Meneghetti, Luciano Grillo e Lysete Bastos, que cederam seus laboratórios e conhecimentos em diversas partes deste trabalho.

Ao professor Valter Alvino, Juliana, Rodrigo e Natália, pelas análises de atividade antibacteriana.

À TESCAN, por fornecer as micrografias de STEM.

À Elaine e ao professor Eduardo pela realização das análises de Espectroscopia Raman.

À Central Analítica da USP, que realizou a técnica de ICP-OES.

Ao programa de pós graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade.

Ao Daniel Ricarte, que sempre estava disponível auxiliando no andamento do mestrado durante todo este período.

A minha orientadora Camila Braga Dornelas, que me acompanha desde o início da graduação, pelo apoio e confiança.

À banca de qualificação, nas pessoas do professor Mário Meneghetti, da professora Fabiane Caxico e do professor Luciano Grillo, que contribuíram grandiosamente com sugestões para melhora do presente manuscrito.

À banca de defesa nas pessoas do professor Mário Meneghetti, do professor Valter Alvino e do professor Luciano Grillo, que aceitaram fazer parte desta etapa de avaliação a fim de contribuir com o trabalho.

E, por fim, à Capes pela bolsa concedida e aos demais órgãos de fomento, CNPq, Fapeal, Finep que deram suporte ao trabalho.

RESUMO

O design e uso de nanomateriais vem se tornando uma prática cada vez mais comum nos últimos anos, dentre os quais nanopartículas inorgânicas, como as metálicas, se destacam por importantes propriedades ópticas e elétricas, únicas, como a ressonância plasmônica de superfície (SPR). No entanto, a utilização de tais nanopartículas ainda gera diversos questionamentos acerca de sua biocompatibilidade e toxicidade. Assim, existe uma busca por novas alternativas de síntese e preparação menos tóxicas como a síntese biogênica, que se utilizam de materiais biológicos, como a própolis, na elaboração de nanopartículas metálicas. Dessa forma, tendo em vista o já consagrado uso de prata para atividade antimicrobiana e das inúmeras propriedades da própolis vermelha de Alagoas (PVA), o presente trabalho objetivou sintetizar nanopartículas de prata usando própolis vermelha de Alagoas (NPAg-PVA). Para escolha das melhores condições de síntese para a obtenção de um menor tamanho de nanopartículas, utilizou-se planejamento fatorial 2^3 com tratamento estatístico via Statistica (Statsoft®). Após, realizou-se caracterização da suspensão coloidal por espectrofotometria Ultra-Violeta na região do visível (UV-Vis), espalhamento de luz dinâmico (DLS) e fluorimetria. A caracterização do material sólido isolado se deu por Espectrometria Ótica de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES, análise de difração de Raios X (PXRD), espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), espectroscopia Raman, análise térmica e microscopia eletrônica de varredura (SEM). Para avaliação antibacteriana, utilizou-se concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC). Como resultados, obteve-se que a condição ótima de síntese de NPAg-PVA rotação de 650 rpm, concentração de nitrato de prata (AgNO_3) de 500 μM e de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PVA. Com relação a caracterização da suspensão coloidal, observou-se a banda que representa a SPR da prata em 412 nm, confirmando a formação de NPAg esféricas. Constatou-se um tamanho médio de 109 nm, com índice de polidispersão (PDI) de 0,207, representando uma boa uniformidade de tamanho. A respeito da fluorescência de NPAg-PVA, observou-se *quenching* da NPAg-PVA em relação a própolis, além de um deslocamento de 448 para 472 nm. Avaliando-se estabilidade, observou-se uma gradual polidispersão das nanopartículas a partir de 24 h, com o aumento do PDI. Tratando-se da caracterização do pó, por ICP-OES obteve-se um rendimento em prata de aproximadamente 55% e PXRD demonstrou os planos cristalinos referentes a prata metálica (JCPDS 96-901-3051) nos ângulos 2θ 38,18°, 44,42°, 64,44° e 77,52° e 81,56°, enquanto a partir de FTIR e Raman pôde-se observar a evidência de participação de grupos carbonilas e carboxilas na redução de prata e estabilidade de NPAg-PVA. Análise térmica demonstrou perda de cerca de 22% de massa referente ao material orgânico presente em NPAg-PVA e microscopia corroborou com os achados de UV-Vis e DLS à respeito de formato esférico e tamanho próximo a 100 nm. Por fim, NPAg-PVA demonstrou potencial atividade antibacteriana, com maior sensibilidade frente à *Staplycoccus aureus* (MIC = 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e BMC = 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) comprovando o sinergismo entre os precursores utilizados.

Palavras chave: Nanopartículas de prata, Síntese biogênica, Própolis vermelha de Alagoas

ABSTRACT

The design and use of nanomaterials have been becoming a practice once more common in the last years, among inorganic nanoparticles, such as metallics, have been important for their optical and electrical unique properties, such as Surface Plasmon Resonance (SPR). However, their use still generates a series of questions due to its compatibility and toxicity. Thus, there is a pursuit for new alternatives of synthesis and preparation less toxic, such as biogenic synthesis, which uses biological materials like propolis in metallic nanoparticles elaboration. Therefore, knowing the use of silver for antimicrobial activity and the innumerable range of properties from red propolis of Alagoas, the given work had as an aim to synthesize silver nanoparticles using red propolis of Alagoas (NPAg-PVA). In order to choose the most suitable conditions of synthesis for obtention of lower size of nanoparticles, was used factorial design 2^3 with statistic evaluation by Statistica (Statsoft®). Next, it was done the characterization of colloidal suspension by Ultra-Violet visible (UV-Vis) spectrophotometry, dynamic light scattering (DLS) and fluorimetry. The solid material isolated was analyzed by optical spectroscopy of emission (ICP-OES), powder X-Ray Diffraction (PXRD), Infrared Spectroscopy (FT-IR), Raman Spectroscopy, thermal analysis and scanning electronic microscopy (SEM). For antibacterial evaluation, has been used minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC). As a result, it was obtained that the optimal condition of NPAg-PVA synthesis was an agitation of 650 rpm and 500 μM of silver nitrate (AgNO_3) and 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of PVA. With regards to colloidal suspension, was noticed the SPR band in 412 nm, confirming spherical NPAg-PVA formation. The mean hydrodynamic size was 109 nm, with a polydispersity index (PDI) of 0,207, representing an uniformity of size. Considering fluorescence, it was observed a quenching for NPAg-PVA in relation to propolis, besides a red shift from 448 to 472 nm. Evaluating stability was possible to note a gradual polydispersity of nanoparticles after 24h with PDI increasing. For powder characterization, for ICP-OES was obtained a silver yield of approximately 55% and PXRD demonstrated the main planes related to metallic silver (JCPDS 96-901-3051 in the degrees 2θ of $38,18^\circ$, $44,42^\circ$, $64,44^\circ$ e $77,52^\circ$ e $81,56^\circ$. For FTIR and Raman could be observed evidence of carbonyl and carboxyl groups' participation on silver reduction and NPAg-PVA stability. Thermal analysis indicated around 22% (mass) for present organic material in NPAg-PVA and microscopy corroborated with UV-Vis and DLS findings respecting to spherical shape and size around 100 nm. Lastly, NPAg-PVA has evidenced potential antibacterial activity, with more sensibility for *Staphylococcus aureus* (MIC = 8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e BMC = 32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), confirming synergic action from its precursors.

Keywords: Silver nanoparticles, Biogenic Synthesis, Red Propolis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Classificação de nanomateriais baseado na quantidade de dimensões fora da escala manométrica	16
Figura 2- Ilustração esquemática de SPR. Em a) nanopartículas esféricas; b) nanoesferas e c) nanobastões.....	18
Figura 3 - Representação da banda de ressonância plasmônica de superfície de nanopartículas de prata de diferentes morfologias na região do UV-Vis	19
Figura 4 - Demonstração da diferença de tamanho entre as técnicas de DLS e TEM	21
Figura 5- Avaliação de potencial zeta para estabilidade	22
Figura 6- Vias de síntese de nanopartículas. À esquerda, a síntese “Bottom-up” e à direita a síntese “Top-down”	23
Figura 7 - Processo de formação de nanopartículas de prata através do método químico utilizando citrato de sódio.....	24
Figura 8- Esquema de método biológico de síntese de nanopartículas metálicas	25
Figura 9 - Pesquisa na base de dados dos periódicos da CAPES de 1987 até os dias atuais (de 5 em 5 anos) utilizando os descritores silver nanoparticles AND green synthesis OR biogenic synthesis em 07/02/2018	26
Figura 10 - Mecanismo sugerido para redução de prata por flavonoides na síntese de nanopartículas.....	30
Figura 11 - Aspecto visual de: a) Própolis vermelha de Alagoas e b) Planta da espécie <i>Dalbergia ecastophyllum</i> (rabo-de-bugio).....	32
Figura 12 - Principais componentes da própolis vermelha do nordeste do Brasil	35
Figura 13 - Gráfico de Pareto obtido por análise de planejamento fatorial 2^3 ($[AgNO_3]$, agitação e $[PVA]$)	46
Figura 14 - Superfície de resposta relacionando a concentração de $AgNO_3$ e PVA.....	47
Figura 15 - Superfície de resposta relacionando agitação e $[PVA]$	48
Figura 16- Representação dos valores obtidos versus valores preditos no planejamento fatorial	49
Figura 17- Espectros UV-Vis de NPAg-PVA.	50
Figura 18 - Emissão de fluorescência de PVA (preto) e NPAg-PVA (vermelho) após 30 minutos	51
Figura 19 - Espectros UV-Vis de NPAg-PVA em função do tempo	52

Figura 20 - Tamanho médio do raio hidrodinâmico de NPAg-PVA após 30 minutos por DLS	53
Figura 21 - Difratoograma representando a estrutura cristalina de NPAg-PVA.....	55
Figura 22 - Espectros FT-IR de: em a) PVA e em b) NPAg-PVA.....	56
Figura 23 - Espectro Raman de NPAg-PVA	57
Figura 24 - Curvas TG (preto) com derivadas (vermelho) da decomposição dos produtos utilizando uma taxa de aquecimento de 10 °C/ min.	58
Figura 25 - Curvas DSC da decomposição dos produtos utilizando uma taxa de aquecimento de 10 °C/ min.....	58
Figura 26 - Imagens de microscopia de NPAg-PVA.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Atividades biológicas da própolis vermelha de Alagoas.....	33
Tabela 2- Variáveis do planejamento fatorial 2^3	39
Tabela 3 - Matriz de planejamento fatorial completo	39
Tabela 4 - Planejamento fatorial com resposta obtida através de tamanho médio por DLS	45
Tabela 5 - Avaliação da estabilidade de NPAG através de tamanho de partícula e PDI	54
Tabela 6 - Resultados obtidos experimentalmente dos produtos por TG.....	59
Tabela 7- Resultados obtidos experimentalmente dos produtos por DSC	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Agrupamento da própolis brasileira quanto à cor	31
Quadro 2 - Valores de MIC (cinza claro) e MBC (cinza escuro) obtidos por microdiluição em caldo. (Os valores entre parênteses são relativos a concentração de Ag presente nos produtos)	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	Prata
Au	Ouro
Cu	Cobre
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico (do inglês: “Dynamic Light Scattering”)
DSC	Calorimetria Diferencia Exploratória (do inglês: “Differential Scanning Calorimetry”)
IC	Concentração inibitória (do inglês: “inhibitory concentration”)
FTIR	Espectroscopia por Transformada de Fourier (do inglês: “Fourier-transform infrared spectroscopy”)
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
MBC	Minimal Bactericidal Concentration
mV	Milivolts
nm	Nanômetro
NPAg	Nanopartículas de Prata
NPAg-PVA	Nanopartículas de Prata sintetizadas com própolis vermelha de Alagoas
PDI	Índice de polidispersão (do inglês: “Polydispersity Index”)
pH	Potencial hidrogeniônico
PVA	Própolis Vermelha de Alagoas
PXRD	Difração de Raios X em pó (Do inglês: “Powder X-Ray Diffraction”)
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura (do inglês: “Scanning Electronic Microscopy”)
SPR	Ressonância Plasmônica de Superfície (do inglês: “Surface Plasmon Resonance”)
STEM	Microscopia Eletrônica de Varredura por Transmissão (do inglês: “Scanning Transmission Electron Microscopy”)
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão (do inglês: “Transmission Electronic Microscopy”)
TG	Termogravimetria
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. Nanomateriais	16
2.2. Nanopartículas metálicas	17
2.2.1. Nanopartículas de prata (NPAg)	18
2.2.1.1. Características das nanopartículas de prata	19
2.3. Síntese de nanopartículas	23
2.3.1. Métodos de síntese de nanopartículas metálicas	23
2.3.2. Síntese biogênica de nanopartículas de prata	25
2.3.2.1. Fatores que influenciam a síntese biogênica de nanopartículas de prata.....	26
2.3.2.2. Materiais biológicos utilizados para síntese de nanopartículas de prata	28
2.4. Própolis	30
2.4.1. Própolis Vermelha de Alagoas (PVA)	32
3 OBJETIVOS	36
3.1. Objetivo geral	36
3.2. Objetivos específicos	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1. Material	37
4.2. Obtenção do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas (PVA)	37
4.3. Síntese de NPAg-PVA e derivados	38
4.4. Planejamento fatorial para otimização da síntese de NPAg-PVA	38
4.5. Caracterização	40
4.5.1. Caracterização de NPAg - PVA na forma de suspensão coloidal	40
4.5.1.1. UV-Vis	40
4.5.1.2. DLS	40
4.5.1.3. Fluorimetria.....	40
4.5.2. Caracterização de NPAg-PVA na forma de pó	41
4.5.2.1. ICP-OES.....	41
4.5.2.2. PXRD	41
4.5.2.3. FTIR	42
4.5.2.4. Espectroscopia Raman	42
4.5.2.5. Análise térmica.....	42
4.5.2.6. SEM.....	42
4.6. Avaliação da atividade antibacteriana	43
4.6.1. Síntese de NPAg-Conv.....	43

4.6.2. Determinação de atividade antibacteriana.....	43
5 RESULTADOS	45
5.1. Obtenção do extrato hidroalcoólico bruto de PVA	45
5.2. Otimização de síntese de NPAg-PVA através de planejamento fatorial 2³	45
5.3. Caracterização de NPAg-PVA em suspensão coloidal.....	49
5.4. Caracterização de NPAg-PVA na forma de pó	55
5.5. Avaliação antibacteriana	61
6. CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

Devido a suas importantes características, os nanomateriais vêm conquistando cada vez mais espaço no mundo científico. Dentre eles, as nanopartículas inorgânicas possuem propriedades interessantes devido à fácil funcionalização e propriedades físico-químicas específicas e dependentes de tamanho (HUANG et al., 2011). Uma das mais estudadas são as nanopartículas metálicas nas quais as de prata possuem atividade antimicrobiana já reconhecida, bem como sua característica de ressonância plasmônica de superfície (SPR) (KHAN; SAEED; KHAN, 2017).

Diante de tais propriedades, as nanopartículas de prata possuem um amplo espectro de aplicações, como incorporação em formulações antimicrobianas, biossensores, fibras, materiais supercondutores, cosméticos e componentes eletrônicos o qual, de acordo com Iravani et al. (2014), o que justifica o interesse. No entanto, alguns pontos relacionados principalmente à biocompatibilidade dessas nanopartículas inorgânicas ainda não estão claros na literatura por falta de evidência e informação específica com relação, em especial, às suas rotas de excreção, toxicidade em longo prazo e comportamento de biodegradação (PANDEY; DAHIYA, 2016).

Diante disso, a busca por novos processos de síntese que sejam cada vez menos tóxicos se faz legítima. Assim, com o avanço da chamada síntese biogênica, um dos métodos que mais vem ganhando destaque nos últimos anos é o método biológico, que faz uso de materiais como plantas, bactérias, fungos e até mesmo própolis. Isto acontece porque tal método possui mais vantagens frente aos químicos e físicos devido à suas características mais sustentáveis, seguras e utilização de reagentes menos tóxicos (TAHERINIYA; BEHBOODI, 2016).

Um importante fator na produção das nanopartículas é prevenir sua agregação. Para isso, além de um agente redutor, são utilizadas diferentes moléculas encapsulantes, chamadas estabilizantes, que se ligam à superfície das nanopartículas, impedindo o processo de agregação (OLIVEIRA et al., 2005). No caso dos métodos biológicos, a maioria dos materiais possuem componentes que já funcionam como redutores e estabilizantes, como compostos fenólicos, aumentando assim a rapidez do processo de síntese, quando comparada a outros métodos (AMIN et al., 2012; JASUJA et al., 2014). Além disso, a utilização de materiais biológicos na síntese de nanopartículas metálicas desempenham importância na atividade biológica do produto final, resultado do possível sinergismo entre as propriedades do material

utilizado e da prata (PADALYA; MOTERIYA; CHANDA, 2015; TIPPAYAWAT, et al., 2016).

Diante do exposto, a própolis vermelha de Alagoas se mostra como uma boa candidata para a síntese de nanopartículas de prata. Portanto, sabendo-se da capacidade de ação redutora (DO NASCIMENTO et al., 2016), ação cicatrizante (JACOB et al., 2015), estabilizante (ROY et al. 2010), antibacteriana (ALENCAR et al., 2007) e anti-inflamatória (BUENO-SILVA et al., 2015) da própolis, juntamente às propriedades já reconhecidas das nanopartículas de prata, justifica-se a proposição do presente trabalho.

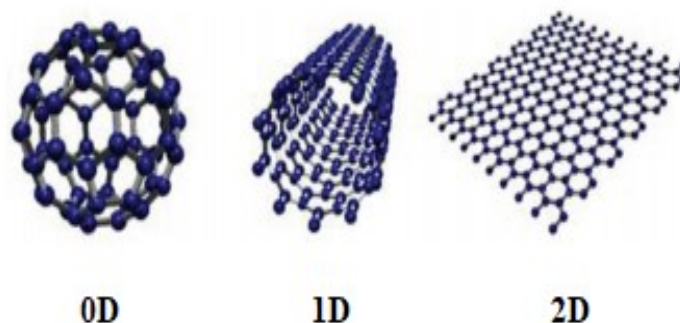
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nanomateriais

O interesse por nanomateriais como objeto de estudos vem ganhando espaço nos últimos anos por sua importância tecnológica (AHMED; IKRAM; YUDHA, 2016) e por serem considerados uma ponte entre os materiais em grande escala e suas estruturas atômicas ou moleculares (THAKKAR; MHATRE; PARIKH, 2010). No entanto, o termo nanopartícula ainda gera bastante conflito na literatura. De acordo com Auffan et al. (2009) este termo tem sido definido como qualquer partícula intencionalmente produzida que tenha dimensão característica de 1 a 100 nm, porém existem outros tipos de classificações.

Segundo Narendar; Gopalakrishnan (2010), os nanomateriais podem ser divididos em três tipos, conforme pode ser visto na figura 1: zero-dimensionais (0D); unidimensionais (1D) e bidimensional (2D), que variam de acordo com a quantidade de dimensões fora da escala nanométrica. Estruturas em 0D são aquelas que não possuem nenhuma das dimensões fora da nanoescala, tendo como exemplo os *quantum dots* e as nanoesferas. Os nanoestruturados 1D possuem apenas uma dimensão fora desta escala, como os nanotubos de carbono, enquanto que os nanomateriais 2D ou, os chamados filmes finos, contêm duas de suas dimensões fora da nanoescala (NARENDAR; GOPALAKRISHNAN, 2010).

Figura 1- Classificação de nanomateriais baseado na quantidade de dimensões fora da escala nanométrica



Fonte: Adaptado de Low et al., 2014

De acordo com Khan; Saeed; Khan (2017), tais materiais podem ser categorizados também segundo suas morfologias, tamanhos e propriedades químicas, em nanopartículas

baseadas em carbono, cerâmicas, semicondutoras, poliméricas, baseadas em lipídeos e metálicas.

Como o foco do presente trabalho são as nanopartículas metálicas, as mesmas serão abordadas com maior profundidade, a seguir.

2.2. Nanopartículas metálicas

De acordo com a literatura, os primeiros relatos de formação de nanopartículas metálicas surgiram com os trabalhos de Faraday sobre a síntese de ouro coloidal (FERREIRA; RANGEL, 2009) e desde então vários estudos sobre elas continuam sendo desenvolvidos.

Os metais nobres (rutênio, ródio, paládio, prata, ósmio, irídio, platina e ouro), conhecidos por suas características de resistência a corrosão e oxidação em ar úmido são os mais utilizados na síntese de nanopartículas metálicas. Além disso, estas, comparados às de metais de transição como o ferro, níquel e cobalto, possuem citotoxicidade relativamente menor para aplicações biológicas ou ambientais (SREEPRASAD; PRADEEP, 2013).

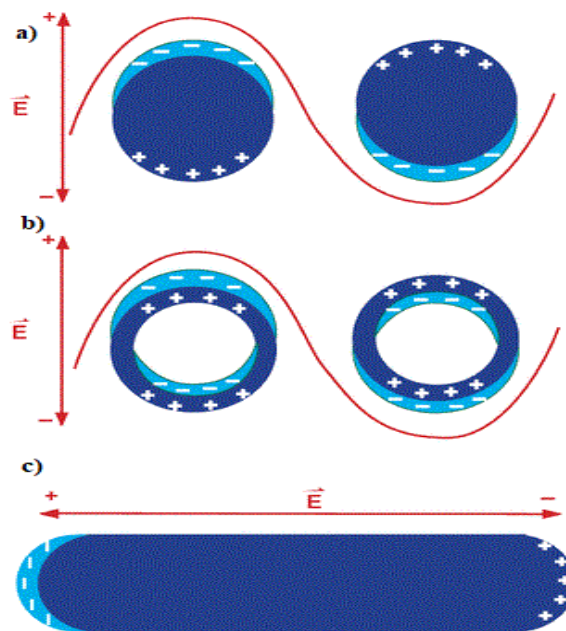
Geralmente, essas nanopartículas são encontradas em sua forma coloidal. Shaw (1975) classificou sistemas coloidais como aqueles que possuem um ou mais de seus componentes com pelo menos uma de suas dimensões dentro do intervalo de 1 nm e 1 μ m, nos quais há a presença de duas fases, uma fase dispersa (partículas) e o meio de dispersão (meio no qual estão distribuídas). As dispersões coloidais possuem como características serem termodinamicamente instáveis devido a alta energia livre de superfície das partículas e, por conta de sua grande relação área/volume para as partículas envolvidas, na interface entre as fases, onde ocorrem fenômenos de superfície característicos, como efeitos de adsorção e dupla camada elétrica (SHAW, 1975).

A síntese e aplicação de nanopartículas metálicas têm atraído diversos setores devido a suas propriedades elétricas, magnéticas e ópticas. Esta última se destaca, em razão de uma característica absorção na região do visível do espectro chamada de banda SPR (ressonância de superfície plasmônica) (SIGNORI et al., 2010). A banda de SPR é uma forte e ampla banda na qual absorção é observada na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) para nanopartículas maiores que 2 nm.

De acordo com Zhang e Noguez (2008), o fenômeno de SPR origina uma absorção na região visível do espectro, que acontece devido a oscilação coletiva de elétrons em resposta a um campo elétrico de radiação eletromagnética de luz. Tal absorção irá se comportar de

maneira diferente, dependente de tamanho e forma da nanopartícula (Figura 2). Segundo Garcia (2011), a nanopartícula metálica é constituída por núcleos iônicos com condução de elétrons que se movem livremente dentro dela. Quando ela é iluminada, o campo magnético exerce uma força que move estes elétrons para sua superfície, formando um dipolo elétrico, pois carga negativa ficará acumulada de um lado e positiva de outro, o que gera essa oscilação coletiva de elétrons.

Figura 2- Ilustração esquemática de SPR. Em a) nanopartículas esféricas; b) nanoesferas e c) nanobastões



Fonte: ZHANG; NOGUEZ (2008)

Embora todos os metais na forma de nanopartículas possuam esta propriedade, ouro (Au), prata (Ag) e cobre (Cu) exibem uma SPR mais intensa. Aliado à isso e também por sua facilidade de síntese e robustez, as nanopartículas de ouro e prata são as mais estudadas nesta área (MOORES; GOETTMANN, 2006).

2.2.1 Nanopartículas de prata (NPAg)

As nanopartículas de prata podem ser incorporadas em aplicações antimicrobianas, materiais biossensores, combinação de fibras, materiais supercondutores criogênicos, produtos cosméticos e componentes eletrônicos, assim como importantes aplicações na área farmacêutica, médica e dentística (IRAVANI et al., 2014).

A prata é um metal nobre que vem sendo usado pela humanidade há aproximadamente 7000 anos por suas propriedades antibacterianas (CHERNOSOUVA; EPPLE, 2013). Antigamente, as aplicações de prata eram basicamente estocagem e purificação de água, no entanto, a partir de 1800, começou-se a utilizá-la como antisséptico para infecções pós-cirúrgicas, na odontologia, no tratamento de feridas, em utensílios médicos e, posteriormente, nitrato de prata foi utilizado no tratamento de várias doenças infecciosas. Porém com a emergência de novos antibióticos após a segunda guerra, os compostos com prata caíram em desuso, voltando mais recentemente com o aparecimento de microrganismos resistentes e a necessidade de antimicrobianos mais eficazes (MELAIYE; YOUNGS, 2005). A sulfadiazina de prata, por exemplo, ficou conhecida por sua atuação tópica no tratamento de queimaduras (SILVER; PHUN; SILVER, 2006).

De fato, os íons prata(I) possuem importantes propriedades antibacterianas, no entanto, com o uso da nanotecnologia, as nanopartículas de prata trazem consigo características únicas, com propriedades físicas diferentes do material original, que funcionam como alternativas promissoras no desenvolvimento de novos bactericidas (LE et al., 2005; KIM et al., 2007).

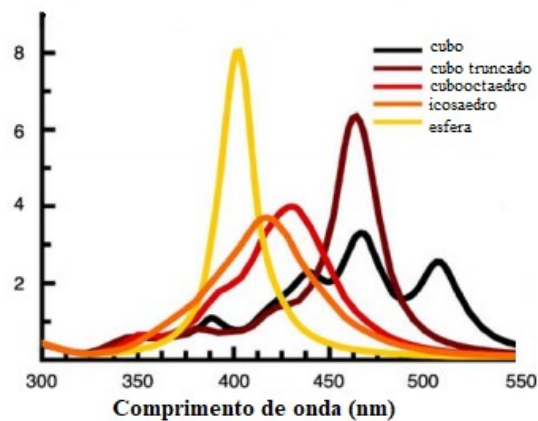
2.2.1.1. Características das nanopartículas de prata

As nanopartículas de prata podem ser avaliadas em função de suas diversas características, as que mais se destacam são a absorção na região do UV-Vis, tamanho e potencial zeta.

- Absorção na região do UV-Vis

Como características ópticas, a banda de SPR para nanopartícula de prata pode apresentar absorção em diferentes comprimentos de onda na região do UV-Vis a depender de suas diferentes morfologias, conforme pode ser visto na figura 3.

Figura 3 - Representação da banda de ressonância plasmônica de superfície de nanopartículas de prata de diferentes morfologias na região do UV-Vis



Fonte: Adaptado de Zhang e Noguez (2008)

De acordo com a literatura, os valores de SPR são bem variados na indicação de nanopartículas esféricas. Alguns autores demonstraram absorção na região de 405 nm com uso de citrato de sódio (SUN; XIA, 2003) e 425 nm com a utilização da planta da espécie *Desmodium triflorum* (AHMAD et al., 2011), enquanto outros consideraram valores maiores como 440 nm (KUMAR et al., 2014). Com relação a outros formatos, Pal, Tak e Song (2007) observaram que as nanopartículas de prata triangulares absorviam em duas regiões (418 e 514 nm) e os nanopratos triangulares em 770 nm, enquanto que corroborando com os estudos acima citados as esféricas possuíam absorção máxima em 420 nm.

Além da formação e indicação de formato das nanopartículas, a banda de SPR também contribui para avaliar a estabilidade das mesmas. Geralmente são verificados os deslocamentos presentes na SPR e também o aparecimento de outros picos em comprimentos de onda maiores, que indicam a formação de aglomerados. Os tempos de estabilidade encontrados em literatura são altos. Ravichandran et al. (2016) obtiveram nanopartículas estáveis em até 60 dias, Amaladhas et al. (2012) chegaram a seis meses de estabilidade, com pequenos deslocamentos para o vermelho ao longo desse período, enquanto Pinto et al. (2010) obtiveram nanopartículas estáveis por um ano.

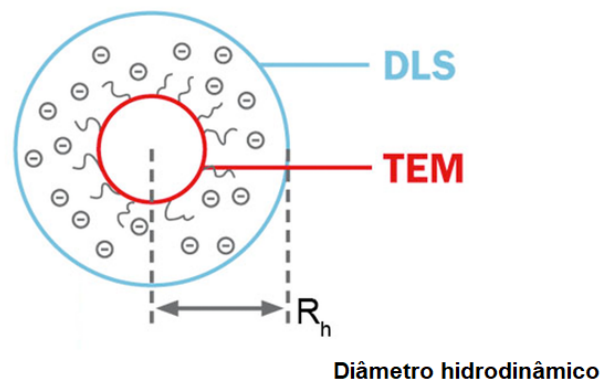
- Tamanho

O tamanho das nanopartículas pode ser encontrado por diferentes técnicas. As principais delas são microscopia eletrônica de transmissão, de varredura e espalhamento de luz dinâmico (DLS).

Os tamanhos variam desde partículas muito pequenas, como aquelas obtidas na presença de três diferentes tipos de fungos *A. tamarii* PFL 2, *Niger* PFR6 e *P. ochrochloron* PFR8 de tamanhos de 3,5, 8,7 e 7,7 nm, respectivamente (medidas por microscopia eletrônica de transmissão) a partículas que possuem raio hidrodinâmico de 5 a 200 nm, medidas por DLS (REDDY et al., 2014).

Observou-se, assim, que a técnica de obtenção do tamanho tem significativa influência na avaliação desta propriedade, confirmado por Ravichandran et al. (2016), que obtiveram valores de 34, 38 e 162,3 nm para SEM, MET e DLS, respectivamente. A explicação se deve ao fato de o DLS representar o raio hidrodinâmico das partículas (Figura 4), que se apresentam maiores quando em solução influenciados por outras substâncias que possam estar presentes na suspensão coloidal como os estabilizantes e se movem juntamente com as nanopartículas (TOMASZEWSKA et al., 2013).

Figura 4 - Demonstração da diferença de tamanho entre as técnicas de DLS e TEM



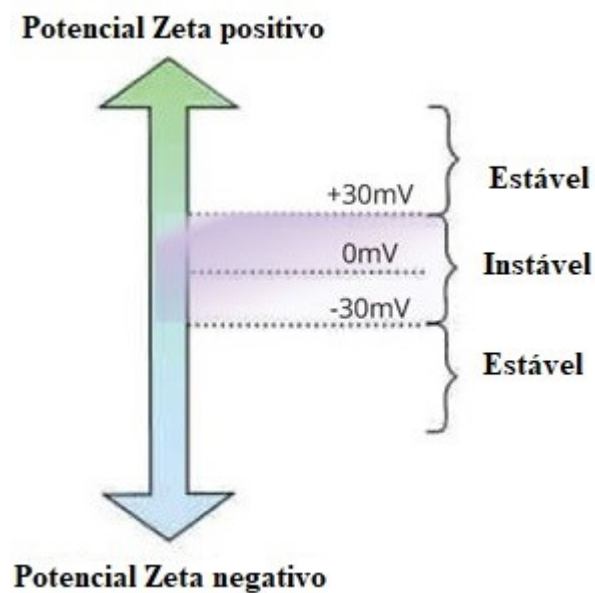
Fonte: Adaptado de <http://www.fritsch.es/medicion-de-particulas/conocimientos-de-fritsch/diametro-hidrodinamico/>

Como a técnica de DLS implica na distribuição das nanopartículas na suspensão coloidal, outro dado é importante para avaliar tais resultados, o índice de polidispersão (PDI). Este é considerado um parâmetro que descreve a distribuição de tamanho de nanopartículas. Quando este valor se encontra abaixo de 0,3, indica a ausência de agregados e a formação de um sistema monodisperso (GREULICH et al., 2011).

- Potencial Zeta

Outro fator observado é o valor de potencial zeta. De acordo Akman et al. (2011), esta propriedade é caracterizada pela carga da superfície dessas nanopartículas dentro de uma solução, no qual cargas mais negativas ou positivas influenciam na repulsão desses materiais impedindo a formação de aglomerados. Segundo Dutta et al. (2017), um valor negativo com magnitude alta está associado a formação de nanopartículas bastante estáveis. Haider e Mehdi (2014) consideraram como critérios de estabilidade, valores maiores 30 mV, em módulo (Figura 5).

Figura 5- Avaliação de potencial zeta para estabilidade



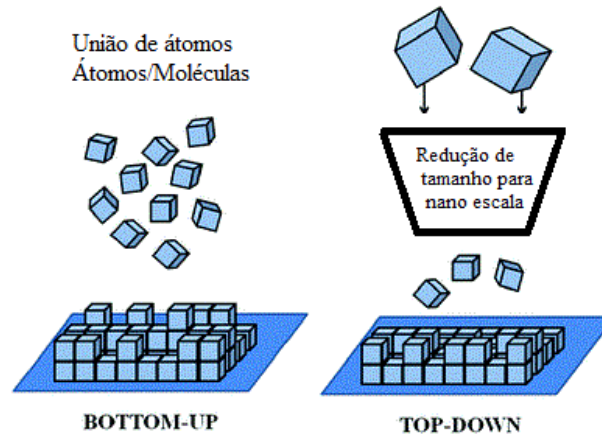
Fonte: Adaptado de Baseeth; Leightner, 2013

Geralmente tais valores variam a depender do material utilizado para síntese. Para nanopartículas sintetizadas com flores de calêndula, foram obtidos valores de potencial zeta de -27,63 mV (PADALIA; MOTERIYA; CHANDA, 2015), para a síntese com *Calliandra haematocephala*, foi encontrado valor de -17,2 mV (RAJA; RAMESH; THIVAHARAN, 2017) e entre -25,5 e -38,3 mV com redução química (HAIDER; MEHDI, 2014).

2.3. Síntese de nanopartículas

Genericamente, as nanopartículas podem ser sintetizadas via duas abordagens principais: as chamadas “Bottom-Up” e “Top-Down”, como ilustrado na figura 6.

Figura 6- Vias de síntese de nanopartículas. À esquerda, a síntese “Bottom-up” e à direita a síntese “Top-down”



Fonte: Adaptado de Birol et al. (2013)

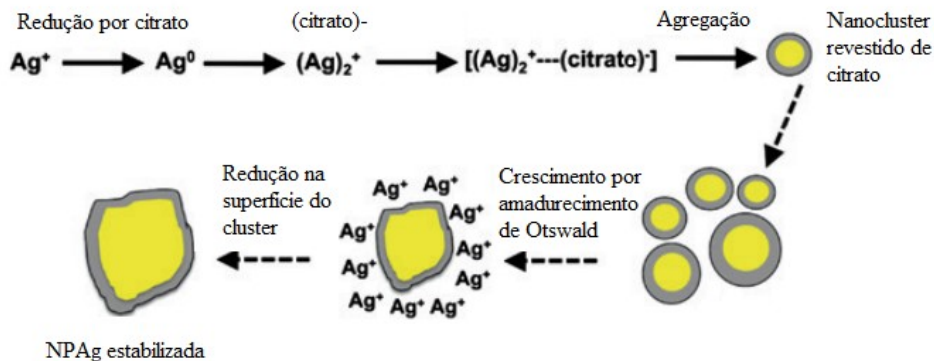
A primeira delas, “Bottom-Up”, refere-se à construção da estrutura da nanopartícula do menor para o maior, átomo por átomo, molécula por molécula ou grupo por grupo, no qual, inicialmente, os blocos nanoestruturados construídos são formados e, subsequentemente, formam o material resultante através de procedimentos químicos e biológicos. Sua principal vantagem é o aumento da possibilidade de obter nanopartículas com menos defeitos e com uma composição química mais homogênea (THAKKAR; MHATRE; PARIKH, 2010). Pela via “Top-Down” (AHMED et al., 2016), o material em maior escala é quebrado em partículas finas através de redução de tamanho com auxílio de várias técnicas litográficas, como, por exemplo, moagem, pulverização, ablação térmica ou a laser, dentre outras. Neste caso, métodos físicos ou químicos podem ser usados para a síntese.

2.3.1. Métodos de síntese de nanopartículas metálicas

Os métodos utilizados para síntese de nanopartículas metálicas podem ser divididos em métodos químicos, físicos e biológicos. O método químico é o mais comum por conta da

sua conveniência e uso de equipamentos simples, além do baixo custo e alto rendimento. Tal processo usualmente emprega três importantes componentes: os precursores metálicos, agentes redutores e agentes encapsulantes ou estabilizantes, que levam a formação de uma suspensão coloidal no qual estiveram envolvidos dois estágios de nucleação e posterior crescimento, como pode ser observado no esquema da figura 7 (NATSUKI; NATSUKI; HASHIMOTO, 2015). Tal crescimento pode ser influenciado pelo amadurecimento de Ostwald, no qual nanopartículas de menores tamanhos em um sistema instável se unem formando nanopartículas de maior tamanho.

Figura 7 - Processo de formação de nanopartículas de prata através do método químico utilizando citrato de sódio



Fonte: Adaptado de PILLAI E KAMAT (2004)

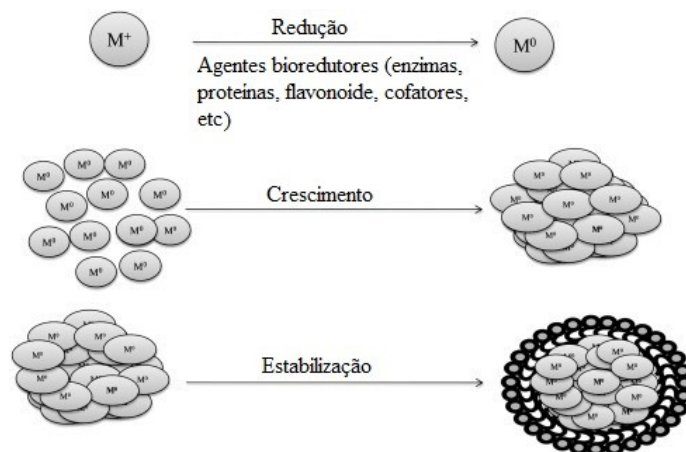
Usualmente, para produzir nanopartículas de prata por este método, utiliza-se borohidreto de sódio, dimetilformamida, trietanolamina ou hidrazina como agente redutor e, como fonte de metal, o nitrato de prata (YOKSAN; CHIRACHANCHAI, 2010). Guzman; Dille; Godet (2012) realizaram a síntese de nanopartículas de prata utilizando citrato de sódio como agente redutor, com a formação de aglomerados de 40 a 60 nm de raios individuais de 10 a 20 nm, que demonstraram interessante atividade contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* utilizando-se o método de Kirby-Bauer.

No caso dos métodos físicos, diferentes processos, como condensação e evaporação são utilizados para formar as nanopartículas de prata, possuindo como principais desvantagens o tempo gasto para realização da síntese e necessidade de uma alta quantidade de energia (SALEH; ALAQAD, 2016). Ainda, existe também o método de ablação a laser em líquidos, que consiste em evaporação e condensação de vapor acontecendo de forma simultânea a fim de formar as nanopartículas. Herrera; Padilla; Hernandez-Rivera (2013)

obtiveram, com sucesso, suspensões coloidais de prata e ouro por ablação a laser, tendo como solvente a água, no qual se formaram diferentes cores e tamanhos dependendo do tempo de radiação da síntese e do pH do solvente.

Apesar do bom rendimento desses métodos, existem algumas limitações atreladas, como o uso de substâncias tóxicas, um alto custo operacional e uma grande necessidade de energia (SRIKAR et al., 2016). Diante desse contexto, os métodos biológicos surgiram como uma alternativa e vêm crescendo largamente nos últimos anos com a chamada “síntese biogênica”. Esta síntese trata-se do uso de materiais biológicos que possuem a função de reduzir a prata e estabilizar as nanopartículas através de seus constituintes, como pode ser observado na figura 8. Uma desvantagem deste método, que pode ocorrer, em algumas aplicações, é a necessidade de purificação/separação do material biológico utilizado (SCHRÖFEL et al., 2014).

Figura 8- Esquema de método biológico de síntese de nanopartículas metálicas



Fonte: Adaptado de MITTAL; CHISTI; BANERJEE (2013)

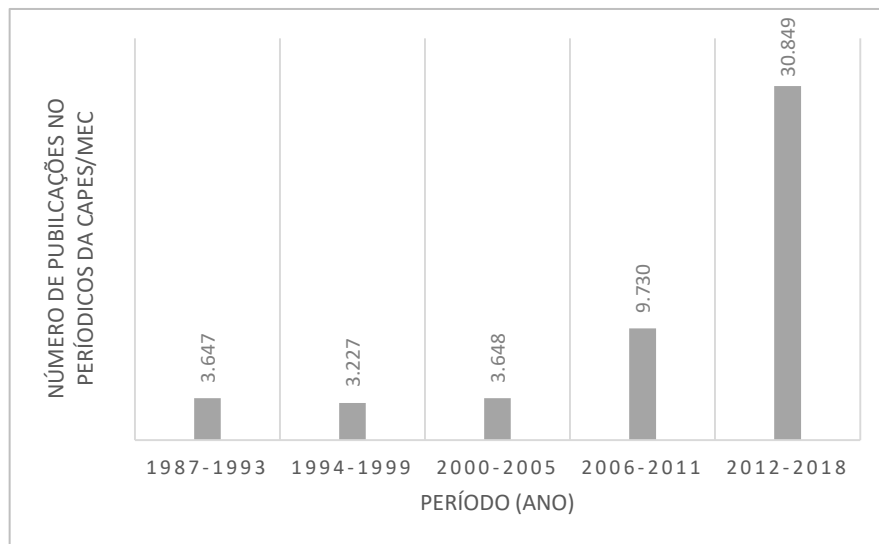
Os materiais mais utilizados variam entre plantas, polímeros naturais, bactérias, fungos, dentre outros, no entanto, microrganismos não são muito visados pela indústria por conta da necessidade de condições altamente assépticas e sua manutenção (AHMED et al., 2016).

2.3.2. Síntese biogênica de nanopartículas de prata

Como mencionado anteriormente, a síntese biogênica vem crescendo bastante nos últimos anos. Corroborando tal fato, observou-se que, utilizando os termos de busca “silver

nanoparticles” e “*silver nanoparticles AND green synthesis OR biogenic synthesis*” na plataforma de periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) para os últimos 20 anos (acesso em 07/02/18), houve uma grande quantidade de publicações relacionadas a nanopartículas de prata (109.749), no qual quase metade delas (50.569) foram baseadas na síntese verde ou biogênica. Além disso, na figura 9, pode-se visualizar que, embora desde 1.987 já se tenham publicações com o tema (3.647), esse número cresceu extensivamente a partir de 2006, triplicando nos últimos cinco anos, chegando atualmente a um número de 30.849 publicações.

Figura 9 - Pesquisa na base de dados dos periódicos da CAPES de 1987 até os dias atuais (de 5 em 5 anos) utilizando os descritores *silver nanoparticles AND green synthesis OR biogenic synthesis* em 07/02/2018



Fonte: O autor (2018)

2.3.2.1 Fatores que influenciam a síntese biogênica de nanopartículas de prata

É sabido que diversos fatores, como pH, concentração de AgNO_3 , concentração do material biológico, temperatura e agitação, são avaliados de forma a otimizar a síntese de nanopartículas de prata, principalmente no que diz respeito a tamanho e rendimento.

- pH

Segundo a literatura, pH alcalino é considerado mais indicado quando se deseja diminuir o tamanho das nanopartículas e aumentar sua formação (DUTTA et al., 2017;

MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013; PARAMESHWARAN; KALAISELVAM; JAYAVEL, 2013). De acordo com Velu et al. (2017), isso ocorre porque aumenta o número de grupos funcionais disponíveis para ligação. Segundo Amaladhas et al. (2012), o pH alcalino facilita a ionização de grupos $-OH$ e $-COOH$ das biomoléculas do extrato, no qual o $-O^-$ pode reduzir os íons Ag^+ em NP Ag , enquanto o $-COO^-$ estabilizam as partículas formadas. Mittal e colaboradores (2014), no entanto, observaram, ainda, que quando o pH é maior que 11, ocorre aumento de aglomeração, escolhendo como pH ótimo 8. Poucos estudos, como Balashanmugam et al. (2016), escolheram o pH neutro como melhor condição.

- Concentração dos reagentes

Com relação à razão entre as concentrações de $AgNO_3$ e do material biológico utilizado, Rao; Paria (2013) observaram que um aumento no valor está diretamente relacionado ao aumento de tamanho das nanopartículas, no qual a relação escolhida foi 1/0,3. Já Dong et al. (2014) e Pourmortazavi et al. (2015) notaram que um aumento na concentração de $AgNO_3$ diminuíram o tamanho das nanopartículas, sendo que o segundo estudo constatou que a concentração de $1-5\text{ mmolL}^{-1}$ ocasionou um aumento de tamanho, enquanto de $5-10\text{ mmolL}^{-1}$ ocorreu o inverso. Dong et al. (2014) explicaram que isso pode ocorrer porque quanto maior a concentração de nitrato de prata, mais núcleos serão gerados e o tamanho será reduzido.

Estudo de Parameshwaran; Kalaiselvam; Jayavel (2013) ainda indicou que a diminuição da quantidade de extrato possui influência direta na diminuição da formação das nanopartículas observadas por UV-Vis, mas que o aumento na concentração do extrato, aumentou a capacidade de redução do sistema e formou nanopartículas mais estáveis.

- Temperatura

A temperatura também é uma das condições que interferem na formação e tamanho das nanopartículas de prata, no entanto, os autores divergem um pouco quanto a essa questão. Dong et al. (2014) notaram que o aumento de temperatura diminuiu o tamanho e aumentou o processo de redução de prata. Porém, Pourmortazavi et al. (2015) observaram que a faixa de temperatura é importante nessa avaliação, pois uma faixa de 25 a $50\text{ }^\circ\text{C}$ proporcionaram um

aumento de tamanho de nanopartículas, enquanto que elevação para 100 °C levou a uma diminuição delas. Em contrapartida, Balashanmugam et al. (2016); Chan; Don (2013); Mittal et al. (2014) utilizaram como temperatura ótima 37, 38 e 35°C, respectivamente.

- Velocidade de agitação

Alguns estudos padronizaram como velocidade de agitação uma rotação de 200 rpm (CHAN; DON, 2013; MITTAL et al., 2014), o que foi corroborado com estudo usando diferentes rotações (200, 400 e 800 rpm), que observaram que agitação leve de 200 rpm por 1 hora foi suficiente para obter pequenas nanopartículas, enquanto que com uma agitação maior (800 rpm) houve presença de agregação, com formação de grandes “clusters” de nanopartículas, o que foi explicado pela influência da presença de forças coalescentes com uma alta agitação (ORTIZ; TORRES; PAREDES, 2014).

2.3.2.2. Materiais biológicos utilizados para síntese de nanopartículas de prata

A utilização de materiais biológicos na síntese de nanopartículas de prata desempenham importância na atividade biológica do produto final, resultado do possível sinergismo entre as propriedades do material utilizado e da prata, conforme observado, por exemplo, através do aumento da atividade antimicrobiana com o uso de *Aloe vera* (TIPPAYAWAT et al., 2016) e de flores de calêndula (PADALYA; MOTERIYA; CHANDA, 2015). Comparando a síntese biogênica com a química, Shaik et al. (2016) observaram ainda que a nanopartícula de prata quimicamente sintetizada exibiu atividade antibacteriana menor ou comparável a proveniente de síntese biogênica.

Como visto anteriormente, diversos materiais biológicos podem ser utilizados para síntese de nanopartículas de prata. No caso das plantas como fonte de agentes redutores para síntese de nanopartículas de prata, extratos como o da *Boerhaavia diffusa* foram capazes de sintetizar nanopartículas de forma eficiente, no qual se obteve um formato esférico e um tamanho de 24 nm com uma significativa ação antibacteriana, sendo um candidato em potencial para aplicações médicas (KUMAR et al., 2013). O estudo de Logeswari; Silambarasan e Abraham (2015) demonstraram que as folhas de cinco plantas das espécies *O. tenuiflorum* (Tulsi), *S. tricobatum* (Thudhualai), *S. cumini* (Naval), *C. asiatica* (Vallarai) e a casca de *C. sinensis* (Laranja) também foram capazes de sintetizar nanopartículas de prata com boa capacidade antibacteriana contra bactérias patogênicas.

No que diz respeito às bactérias, determinadas cepas foram consideradas candidatas em potencial para síntese rápida de nanop prata, como a S-27 pertencente ao *Bacillus flexus*. Observou-se a formação de nanopartículas anisotrópicas, com formatos esféricos e triangulares, de tamanhos 12 e 65 nm, respectivamente, e mostraram também propriedade antibacteriana contra microrganismos multirresistentes clinicamente isolados (PRIYADARSHINI et al., 2012).

Quanto aos fungos, avaliando a capacidade de redução dos metabólitos secundários de fungos, chegaram à conclusão de que os três fungos endofíticos *A. tamarii* PFL 2, *Niger* PFR6 e *P. ochrochloron* PFR8 foram capazes de reduzir íons prata em nanopartículas, sendo que o primeiro formou nanopartículas de tamanho médio 3,5 nm, consideradas umas das menores em termos de diâmetro quando comparado a outras nanopartículas de prata biossintetizadas (DEVI; JOSHI, 2015).

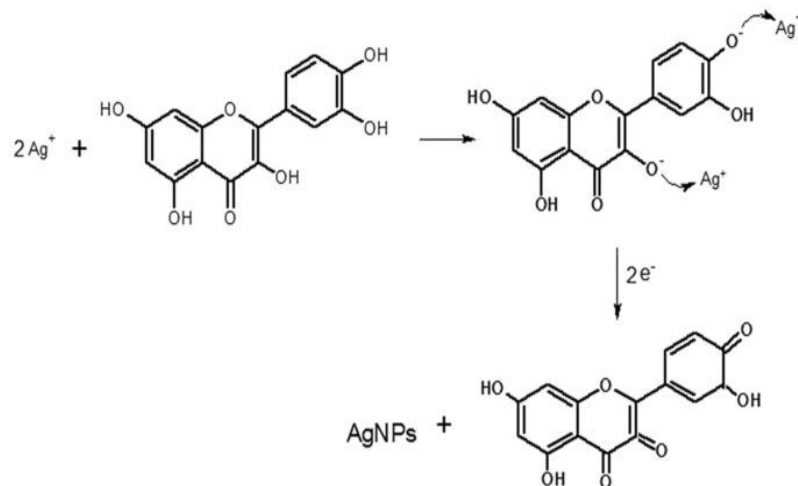
A própolis também está dentre os materiais biológicos capazes de formar nanopartículas metálicas. Roy et al. (2010), que estudaram a formação de NPAg de prata e ouro utilizando o extrato aquoso e etanólico da própolis indiana, sugeriram que as principais biomoléculas responsáveis pela biossíntese seriam polifenóis e flavonoides, que estão presentes em considerável quantidade no extrato. Mais recentemente, outra própolis também foi testada por Kothai; Jayanthi (2015), a própolis de Tamilnadu (Índia), produzida por abelhas da espécie *Tetragonula iridipennis*, no qual avaliou-se o uso de irradiação ultrassônica na produção de nanopartículas metálicas e sua atividade antitumoral, no qual notaram resultado significativo frente células pulmonares cancerígenas A549 com IC₅₀ de 38 µg/mL.

A composição fenólica da própolis, principalmente sua composição rica em flavonoides, a tornam importante na formação de nanopartículas metálicas por proporcionarem a redução de metais e também sua estabilização. Tais funções dos flavonoides já foram relatadas, conforme visto por Sierra et al. (2016) através de estudo com flavonoides na formação de nanopartículas de ouro, tendo a hesperetina como modelo. Além disso, outros estudos também fazem uso de flavonoides na redução de nanopartículas metálicas, como Radhakrishnan et al. (2017), que utilizaram apigenina e Su et al. (2016), que fizeram uso de hesperidina, naringina e diosmina.

Jain e Mehata (2017), que avaliaram, o extrato de *Ocimum Sanctum* e de seu flavonoide quercetina na síntese de nanopartículas de prata sugeriram o possível mecanismo de redução deste processo (Figura 10). Acredita-se que o mesmo se dê pela presença de grupos hidroxila nos flavonoides, no qual é possível que a transformação

tautométrica de flavonoides na forma cetólica para enólica libere átomos de hidrogênio reativos que possuem a capacidade de reduzir os íons prata em nanopartículas (JAIN; MEHATA, 2017).

Figura 10 - Mecanismo sugerido para redução de prata por flavonoides na síntese de nanopartículas



Fonte: Jain; Mehata (2017)¹

2.4. Própolis

Conhecida também como cola de abelha, a própolis é uma matriz complexa natural, sintetizada por abelhas através de brotos de árvores, seiva, resina, mucilagem e outros derivados de plantas. Além disso, sua palavra tem origem grega, no qual significando “na entrada da cidade”, indicando sua função de defesa nas colmeias devido a sua natureza cerosa e propriedades mecânicas, sendo utilizada para manter a umidade e a temperatura controladas, através do selamento de rachaduras ou espaços abertos (WAGH, 2013; ZABAIYOU et al., 2017).

A composição da própolis inclui substâncias como ácidos aromáticos, ésteres, aldeídos, cetonas, terpenoides, fenilpropanoides, esteroides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos, flavonoides (galangina, quercetina, pinocembrina e kaempferol), dentre outros, no qual este último é considerado mais marcante junto com os

¹ A figura 13 foi retirada da referência citada exatamente da forma em que foi encontrada, no entanto, foi observado erro na quantidade de ligações de C-3 (5 ligações).

ácidos fenólicos por suas propriedades antivirais, antibacterianas e antioxidantes (LUSTOSA et al., 2008).

Devido ao grande número de propriedades deste produto, suas aplicações atingem um espectro bastante relevante nos dias atuais, conforme descrito por Wagh (2013), como formulações para infecções respiratórias, gripes e resfriados; preparações dermatológicas utilizadas no tratamento de feridas, queimaduras, acne, herpes simples e genital e neurodermatite; uso em enxaguantes bucais e pastas de dente, para prevenir cárie e tratar gengivites e estomatites; além de ser utilizada amplamente em cosméticos, alimentos e bebidas.

De acordo com Bankova (2005), a origem vegetal da própolis determina a sua composição química, ou seja, esta depende da flora local, no local de coleta, além das características climáticas e geográficas da região. Dessa forma, as diferentes própolis existentes ao redor do mundo possuem uma ampla diversidade em sua composição, especialmente as originárias das regiões tropicais. No Brasil, existem 13 grupos de própolis (Quadro 1) baseadas em suas características físico-químicas (ALENCAR et al., 2007; DAUGSCH et al., 2007), no qual a própolis vermelha é o tipo mais recentemente encontrado. Além do Brasil, a própolis vermelha também pode ser encontrada em Cuba, Venezuela e México (FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016).

Quadro 1- Agrupamento da própolis brasileira quanto à cor

Grupo	Cor	Região
1	Amarelo	Rio Grande do Sul
2	Castanho claro	Rio Grande do Sul
3	Castanho escuro	Paraná
4	Castanho claro	Paraná
5	Marrom esverdeado	Paraná
6	Marrom avermelhado	Bahia
7	Marrom esverdeado	Bahia
8	Castanho escuro	Pernambuco
9	Amarelo	Pernambuco
10	Amarelo escuro	Ceará
11	Amarelo	Piauí
12	Verde ou marrom esverdeado	São Paulo

13	Vermelha	Alagoas
----	----------	---------

Fonte: Adaptado de PARK et al. (2000) e ALENCAR et al. (2007)

Avaliando as própolis brasileiras verde, marrom e vermelha, Machado et al. (2016) encontraram que esta última (própolis vermelha das regiões de Sergipe e Alagoas) apresenta um maior conteúdo de compostos fenólicos.

2.4.1. Própolis Vermelha de Alagoas (PVA)

Dentre as própolis vermelhas brasileiras, a própolis vermelha de Alagoas (PVA) (Figura 11a) se destaca por possuir a sua produção padronizada, de forma a respeitar a política de conservação da floresta atlântica, nas áreas de manguezais de Alagoas, Brasil, no qual a produção do material bruto e do extrato hidroalcolólico faz parte da produção da cadeia de apicêuticos e bioprodutos que promovem o sustento e o desenvolvimento da população local, tendo, dessa forma, ganhado o título de indicação geográfica de origem (DO NASCIMENTO et al., 2016).

As propriedades deste composto estão amplamente relacionadas à sua composição química. No caso da PVA, a planta presente na região, que é considerada fonte botânica para produção da própolis é a espécie *Dalbergia ecastophyllum* da família *Fabaceae*, conhecida popularmente como rabo-de-bugio (Figura 11b), como já descrito em literatura (REGUEIRA et al., 2017; SILVA et al., 2007).

Figura 11 - Aspecto visual de: a) Própolis vermelha de Alagoas e b) Planta da espécie *Dalbergia ecastophyllum* (rabo-de-bugio)

a)



b)



Fonte: a) WEBER, 2017 b) SEABEAN, 2017

Na figura 12, pode-se observar os principais constituintes e suas respectivas estruturas da própolis vermelha do nordeste do Brasil, como chalconas, isoflavonas e pterocarpanos.

Análise fitoquímica de PVA e de suas frações hexânicas, de acetato de etila e clorofórmica demonstraram a presença de compostos fenólicos, incluindo flavonoides (catequinas, chalconas, auronas, flavonas e flavonóis), além de taninos xantonas e triterpenoides pentacíclicos (MENDONÇA et al., 2015). Através do auxílio da cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas, Alencar et al. (2007) conseguiram identificar 20 compostos presentes na PVA, dentre eles, foram identificados pela primeira vez, o metil o-orselinato, metil abietato, 2,4,6-trimetilfenol, homopterocarpina, medicarpina, 4',7-dimetóxi-2'-isoflavonol e 7,4'-dihidroisoflavona, dentre os quais os últimos quatro foram encontrados em maior quantidade, que são isoflavonas, que possuem importantes propriedades biológicas e que podem ser úteis como marcadores químicos dessa própolis.

Na tabela 1 abaixo podemos notar a grande variedade de aplicações já estudadas da PVA, desde atividade antibacteriana, antileishmaniose, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e até na diminuição de dano renal e hipertensão.

Tabela 1- Atividades biológicas da própolis vermelha de Alagoas

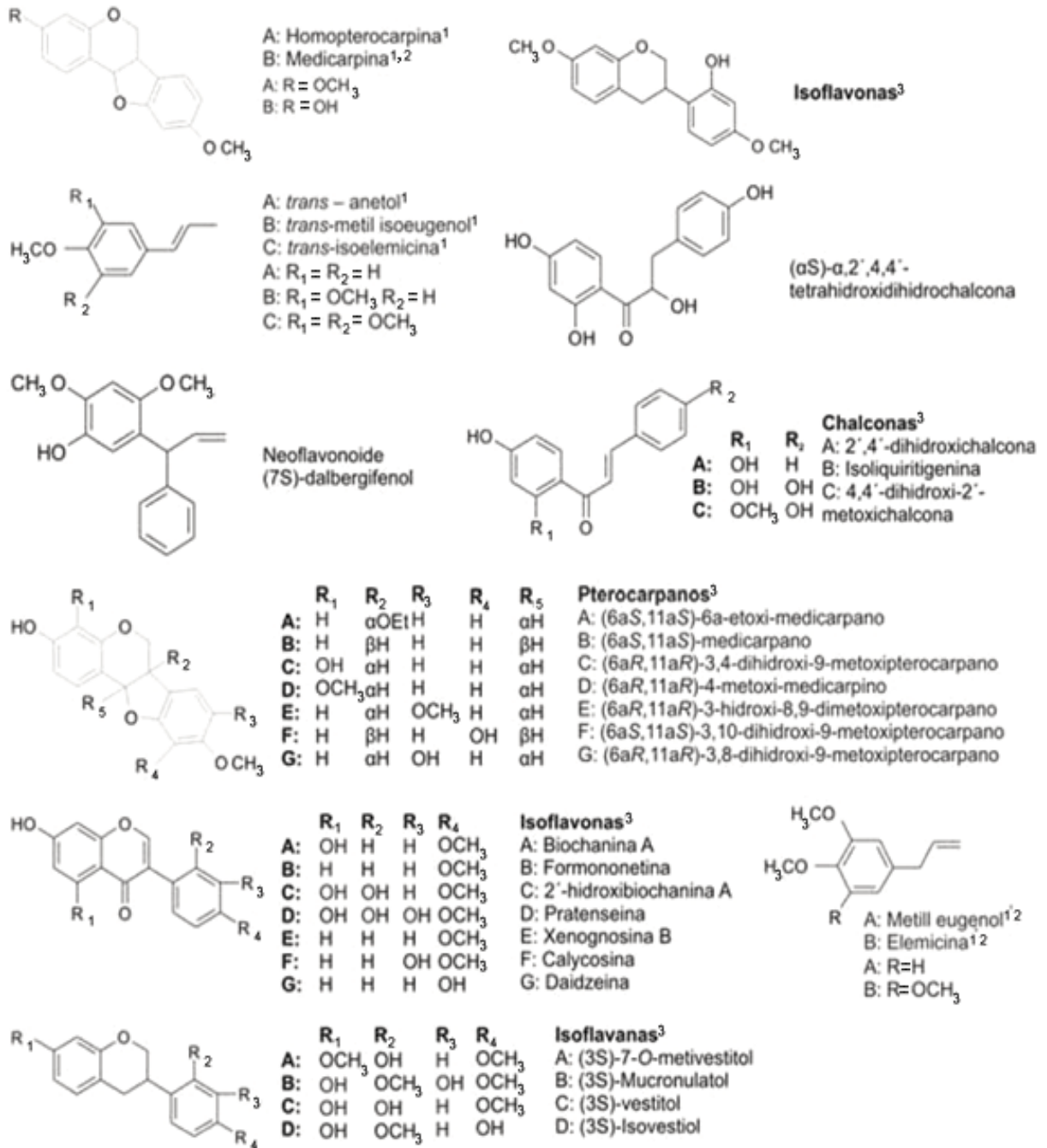
Atividade biológica da PVA	Referências
Antibacteriana	ALENCAR et al. (2007) OLDONI et al. (2011) RIGHI et al. (2011) BUENO-SILVA et al. (2017)
Antifúngica	FREIRES; ALENCAR; ROSALEN. (2016)
Anti-inflamatória	CAVENDISH et al. (2015)

	BUENO-SILVA et al. (2016) CORRÊA et al. (2017)
Antileishmaniose	DO NASCIMENTO et al. (2016)
Antioxidante	OLDONI et al. (2011) RIGHI et al. (2011)
Antitumoral	MENDONÇA et al. (2015)
Cicatrizante	BATISTA et al. (2012) CORRÊA et al. (2017)
Diminuição da hipertensão e dano renal	TELES et al. (2015)

Fonte: O autor (2018)

Existem apenas dois trabalhos na literatura que utilizam própolis na síntese biogênica de nanopartículas metálicas: Roy e colaboradores (2010), que utilizaram própolis indiana da região de Kumar e Kothai; Jayanthi (2015), que utilizaram própolis indiana de Tamilhadu.

Figura 12 - Principais componentes da própolis vermelha do nordeste do Brasil



Fonte: Adaptada de Lustosa et al. (2008)

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a síntese de nanopartículas de prata usando própolis vermelha de Alagoas (NPAg-PVA) e sua potencial atividade antibacteriana.

3.2. Objetivos específicos

- Estabelecer melhor condição de síntese de NPAg-PVA;
- Caracterizar NPAg-PVA na forma de suspensão coloidal e de pó;
- Avaliar atividade antibacteriana de NPAg-PVA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

A própolis vermelha de Alagoas (PVA) foi obtida através do apiário de Fernão Velho (Maceió, Brasil).

Para síntese de nanopartículas de prata (NPAg-PVA e NPAg-Conv), além de PVA, foram utilizados, nitrato de prata PA (Dinâmica, Brasil), hidróxido de sódio (Vetec, Brasil) e citrato de sódio tribásico (Dinâmica, Brasil).

Os solventes utilizados foram álcool etílico absoluto PA (Química moderna, Brasil), álcool metílico PA (Química moderna, Brasil), água deionizada (Nalgon, Brasil) e tween 20 (Dinâmica, Brasil) e ácido nítrico (Synth, Brasil).

As cepas utilizadas em atividade antibacteriana foram *Staphylococcus aureus* (CCCD-S007), *Staphylococcus epidermidis* (CCCD-S010), *Escherichia coli* (ATCC-25922) e *Pseudomonas aeruginosa*. (ATCC – 27853).

4.2. Obtenção do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas (PVA)

O extrato foi produzido via remaceração de acordo com Mendonça et al. (2015) com adaptações. Para isso, inicialmente, 50 g de própolis foi grosseiramente picotada e colocada em um recipiente protegido da luz. Em seguida, como líquido extrator, adicionou-se 200 mL de álcool etanólico a 80° GL e deixou-se por 48 h sob repouso. Após este período, o sobrenadante foi retirado e seguiu-se o mesmo procedimento por três vezes. O líquido extraído foi então concentrado em rotaevaporador (IKA® RV10, Alemanha) a uma temperatura de 50 °C. O extrato foi ressuspenso no mesmo solvente numa concentração de 25 mg.mL⁻¹ e levado para agitação velocidade 200 rpm em placa agitadora (Quimis® Q261M23, Brasil) até sua dissolução (adaptado de ROY et al., 2010). Após isso, o mesmo foi filtrado em filtro de papel Qualy® de 205 µm, seguido de filtro de membrana 0,45µm (Chromafil®, Alemanha) para retirar impurezas e auxiliar na etapa seguinte.

4.3. Síntese de NPAg-PVA e derivados

NPAg-PVA foi sintetizada possuindo como fonte de prata, o nitrato de prata, e como agente redutor e encapsulante, o extrato de PVA. As sínteses foram realizadas de acordo com as variáveis selecionadas no planejamento fatorial demonstradas no próximo tópico.

As variáveis escolhidas para o experimento 1 (Tabela 2) serão demonstradas a seguir como exemplo para síntese geral de NPAg-PVA. O extrato ressuspense na concentração de 25 mg.mL⁻¹ (tópico 4.2) foi adicionado à água obtendo uma concentração de 30 µg.mL⁻¹ sob agitação de 200 rpm em placa agitadora (Quimis® Q261M23, Brasil). Ajustou-se o pH desta solução (NaOH 0,1 M) para 10,6 (ROY et al., 2010), utilizando medidor de pH (Tecnonon mPA210, Brasil). Esta fase é essencial para que os flavonoides, que são responsáveis pela redução da prata, sejam oxidados e possuam elétrons disponíveis a serem doados no processo de redução. Em seguida levou-se novamente para agitação e adicionou-se AgNO₃ resultando em uma solução final de 500 µM de nitrato de prata, aguardou-se 30 minutos e, depois, a suspensão coloidal foi reservada e deixada ao abrigo da luz. Todo o experimento foi realizado em temperatura de 32 ± 2°C.

Após avaliação do planejamento fatorial, escolheu-se os parâmetros de síntese que demonstraram ser mais adequados para a formação da NPAg-PVA e esta foi caracterizada em suspensão coloidal e em pó.

Para suspensão coloidal utilizou-se o produto resultante logo após a sua síntese, já para o produto na forma de pó, realizou-se a centrifugação com centrífuga RXII series (Hitachi, Japão) nas condições de 15000 rpm em 20 min, seguida de lavagem (RASTOGI; ARUNACHALAM, 2011). O precipitado foi seco em estufa NI1512i (Nova Instruments, Brasil) a 50°C por 24h e obteve-se o pó.

4.4. Planejamento fatorial para otimização da síntese de NPAg-PVA

De acordo com Funico et al. (2008), um planejamento fatorial determina quais fatores possuem efeitos relevantes de resposta, bem como se um efeito de um fator varia com os níveis dos outros fatores, permitindo estabelecer e quantificar as correlações entre eles.

No intuito de verificar a melhor condição, com base em tamanho, para a síntese de NPAg-PVA, optou-se pela elaboração de um planejamento fatorial do tipo 2³, que apresenta três variáveis e dois níveis, ou seja, duas variações de cada variável, uma considerada o mínimo (-1) e outra o máximo (+1). As variáveis utilizadas foram concentração de AgNO₃

(M), velocidade de agitação (rpm) e concentração de PVA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) com seus dois diferentes níveis, conforme pode ser observado na tabela 2. É importante mencionar que devido à baixa solubilidade de PVA em meio aquoso, as variáveis de sua concentração não puderam ter valores muito distantes entre os seus níveis (apenas com uma diferença de 2x).

Tabela 2- Variáveis do planejamento fatorial 2³

Variáveis	Nível (-1)	Nível (+1)
[AgNO ₃]	500 μM	2.500 μM
Agitação	200 rpm	650 rpm
[PVA]	30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Fonte: O autor (2018)

Na tabela 3 pode-se observar a matriz de planejamento fatorial completo dos experimentos, no qual optou-se como resposta o tamanho do raio hidrodinâmico das partículas, que foi obtido por DLS, conforme Pourmortarvazi et al. (2015). Os resultados estatísticos foram encontrados através de *software Statistica (Statsoft®)*.

Tabela 3 - Matriz de planejamento fatorial completo

Experimento	[AgNO ₃] (μM)	Agitação (rpm)	[PVA] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
1	500	200	30
2	2.500	200	30
3	500	650	30
4	2.500	650	30
5	500	200	50
6	2.500	200	50
7	500	650	50
8	2.500	650	50

Fonte: O autor (2018)

4.5. Caracterização

Para caracterização da suspensão coloidal foram usadas as técnicas de Espectrofotometria de UV-Vis (UV-Vis), DLS e Fluorimetria. Para o pó, utilizou-se Espectroscopia Ótica de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES), Difração de raios X de pó (PXRD), Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia Raman, Termogravimetria (TG), Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) e análise microscópica por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM).

4.5.1. Caracterização de NPAg - PVA na forma de suspensão coloidal

4.5.1.1. UV-Vis

A técnica de espectrofotometria por UV-Vis é muito empregada na caracterização de nanopartículas de prata, visto que tais materiais possuem absorção de luz em um comprimento de onda específico referente às suas bandas de SPR e, além disso, é possível se ter uma ideia sobre o formato e a estabilidade das nanopartículas. Neste trabalho, utilizou-se leitor de placas (Flexstation[®] 3, EUA), no qual observou-se a absorbância dos comprimentos de onda de 200 a 600 nm em placa de poliestireno de 96 poços com fundo chato.

As análises foram realizadas no Laboratório de Biologia e Fisiologia de Insetos (LBFI) – ESENFAR, UFAL.

4.5.1.2. DLS

A técnica de espalhamento de luz dinâmico tem como objetivo determinar o diâmetro hidrodinâmico das partículas por medir sua difusão através do movimento Browniano, e converter este de forma a determinar o tamanho e sua distribuição usando a relação Stokes-Einstein (Malvern, 2017). O aparelho utilizado foi Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Inglaterra). As leituras se deram com índice de refração 1,390 e absorção 0,002 com 20 corridas.

As análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Nanosistemas Carreadores de Substâncias Ativas (TecNano) – ESENFAR, UFAL.

4.5.1.3. Fluorimetria

A fluorescência de uma substância é o resultado da absorção de energia radiante e da posterior emissão de parte dessa energia, em outras palavras, ocorre com a liberação de energia que faz com que a molécula sofra uma transição do estado excitado para o estado fundamental, que a molécula se encontrava antes da absorção da energia que a excitou (SANTOS; GIL, 2010). Tal técnica foi realizada em espectrofluorímetro (Shimadzu RF-5301PC, Japão) com excitação em 331 nm.

As análises foram realizadas no Laboratório de Instrumentação e Desenvolvimento em Química Analítica (LInQA) – IQB, UFAL.

4.5.2. Caracterização de NPAg-PVA na forma de pó

4.5.2.1. ICP-OES

Para determinar o rendimento de nanopartículas de prata formadas a partir da prata iônica inicial e quantificação de prata no pó para a avaliação biológica, utilizou-se a espectrometria de emissão atômica.

Esta técnica consiste na propriedade dos átomos emitirem radiação eletromagnética quando submetidos a determinadas condições, sendo responsável por identificar elementos químicos presentes em determinadas amostras. O aparelho utilizado foi o Espectrômetro Ótico de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES, Radial) Spectro-Arcos foi utilizado. Utilizou-se para digestão das amostras ácido nítrico concentrado.

As análises foram realizadas na Central Analítica da Universidade de São Paulo, USP.

4.5.2.2. PXRD

No PXRD, é possível observar a cristalinidade do material e seus planos de difração característicos. Para tal análise, utilizou difratômetro de raios X 7000 Shimadzu, tendo como fonte de radiação CuK α com voltagem de 30 kV e corrente de 30 mA. Os dados foram coletados em ângulos de 3 a 90 graus, com taxa de velocidade de 2°min⁻¹. A cristalinidade foi obtida através de software PCXRD.

As análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Nanosistemas Carreadores de Substâncias Ativas (TecNano) – ESENFAR, UFAL.

4.5.2.3. FTIR

Nesta técnica é possível identificar os grupamentos funcionais orgânicos, que podem ser responsáveis pela redução da prata em nanopartículas. Foram preparadas pastilhas de KBr na proporção de 2mg de amostra para 200 mg de KBr para a análise e o equipamento utilizado foi o espectrômetro Smart-Omni Sampler Nicolet iS10 (Thermo Scientific, EUA), com faixa de número de onda 4000 a 500 cm^{-1} .

As análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Nanosistemas Carreadores de Substâncias Ativas (TecNano) – ESENFAR, UFAL.

4.5.2.4. Espectroscopia Raman

Na espectroscopia Raman é possível observar as ligações formadas entre os grupos funcionais dos agentes encapsulantes e as nanopartículas de prata.

As medidas Raman foram realizadas à temperatura ambiente usando um espectrômetro Xplora (Horiba) conectado a um microscópio de luz dupla BXFM (Olympus) equipado com uma objetiva (Nikon) com uma ampliação de 50 \times e abertura numérica de 0.45. O feixe de um laser de diodo de 532nm de alta potência (200 mW na saída) foi utilizado para a excitação. A grade de difração utilizada tinha 1200 linhas por milímetro. A aquisição do sinal foi configurada para realizar uma acumulação de 1s para cada espectro.

As análises foram realizadas no Laboratório de Caracterização e Microscopia de Materiais (LCMMAT) – IF, UFAL.

4.5.2.5. Análise térmica

Para TG, utilizou-se instrumento TGA50 (Shimadzu) e para DSC foi utilizado DSC-60 Plus (Shimadzu). Em ambas as análises, utilizou-se uma faixa de temperatura de 25 a 600°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min. As análises foram realizadas em atmosfera de N₂ com vazão de 20 mL/min para TG e 50 mL/min para DSC.

As análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia e Controle de Qualidade de Medicamentos (LABTCOM) – ESENFAR, UFAL.

4.5.2.6. SEM

As imagens obtidas foram feitas em um microscópio eletrônico de varredura com filamento de tungstênio com resolução de 3nm modelo VEGA3 XMU. A amostra foi preparada de duas formas. Uma com dispersão em álcool isopropílico em ultrassom e posteriormente gotejada sobre uma grade de transmissão com filme de carbono.

Utilizou-se também SEM acoplado ao detector STEM, no qual a amostra foi preparada depositando diretamente o pó sobre a mesma grade de transmissão com filme de carbono, retirando o excesso com fluxo de argônio sob pressão.

As imagens foram feitas com aceleração de 30kV e 25kV com diversas ampliações.

As análises foram realizadas pela empresa TESCAN.

4.6. Avaliação da atividade antibacteriana

4.6.1. Síntese de NPAg-Conv

No intuito de comparar o perfil das nanopartículas de prata realizados a partir de síntese biogênica com as obtidas a partir de um método convencional de síntese química, optou-se por sintetizar NPAg convencional (NPAg-Conv) utilizando citrato de sódio como agente redutor.

A síntese foi realizada segundo Sileikaite et al. (2016) com modificações. Consistiu em levar 500 μM de AgNO_3 (50 mL) ao aquecimento até ebulição. Após isso, adicionou-se por gotejamento 5 mL de solução de citrato de sódio (1%) sob agitação. A solução foi aquecida até a mudança de coloração de incolor para amarelo. Os parâmetros utilizados para AgNO_3 e agitação foram os mesmos escolhidos no planejamento fatorial de NPAg-PVA para assegurar similares condições.

4.6.2. Determinação de atividade antibacteriana

A técnica utilizada para determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) foi a microdiluição, na qual 100 μL das amostras foram pipetadas em microplacas de poliestireno estéreis de 96 poços e solubilizadas em 100 μL do meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) em concentrações decrescentes. Em seguida foram adicionados os microrganismos numa concentração de 10 μL na escala McFarland (0,5%), obtendo em cada poço a concentração de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ bactérias.

A viabilidade dos espécimes microbiológicos utilizados foi conferida através da produção de uma fileira na microplaca chamada de Controle Positivo (C.P.) de crescimento, onde foram adicionados o meio de cultura e os espécimes microbiológicos. Para certificar-se da esterilidade da microplaca outra fileira contendo o meio de cultura foi reservada e esta chamada de Controle de Esterilidade (C.E.) de crescimento. Outra fileira foi adicionada ao experimento para confirmar que o agente solubilizante não estava inibindo o crescimento microbiológico, chamada de Controle Negativo (C.N.).

As microplacas foram acondicionadas em estufa bacteriológica a 36 °C por 24 horas. Para a leitura, foi adicionado 20 µL de uma solução de TTC (cloreto de 2, 3, 5-trifeniltetrazólio) na concentração de 1,0% em todos os poços. As microplacas foram novamente acondicionadas em estufa bacteriológica a 36°C por mais 3 horas proporcionando a reação colorimétrica do TTC sobre os microrganismos viáveis. Após o tempo determinado foi realizada a análise visual, qualitativa, onde os poços que apresentaram coloração vermelha foram considerados como crescimento microbiológico positivo, já os poços que não revelaram a coloração vermelha foram considerados como crescimento microbiológico negativo. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato em mg/mL capaz de impedir o crescimento microbiano.

Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (MBC) foram retiradas alíquotas da microplaca, aproximadamente 10 µL, na concentração igual e acima da MIC, sendo semeadas em placas de Petri contendo o meio de cultura ágar Mueller Hinton, depois foram acondicionadas em estufa bacteriológica a 36 °C por 24 horas. O crescimento de colônias sobre a placa de ágar Mueller Hinton indicava que o microrganismo ainda continuava viável. A MBC foi definida como a menor concentração da amostra em mg/mL capaz de eliminar totalmente o crescimento microbiológico dos espécimes microbiológicos após a semeadura em meio de cultura ágar Mueller Hinton.

As análises foram realizadas no Laboratório de pesquisa em Tratamento de Feridas (LpTF) – ESENFAR, UFAL.

5 RESULTADOS

5.1. Obtenção do extrato hidroalcoólico bruto de PVA

O extrato hidroalcoólico de PVA foi obtido com sucesso, possuindo como características a coloração vinho, com aspecto viscoso e rendimento de cerca de 40%.

5.2. Otimização de síntese de NPAg-PVA através de planejamento fatorial 2³

A síntese de NPAg-PVA foi realizada e otimizada com o intuito de se obter as melhores condições necessárias para se ter um menor raio hidrodinâmico como resposta. Os resultados podem ser visualizados na tabela 4 e na figura 13, com o gráfico de Pareto.

Na tabela 4 observou-se que os menores tamanhos de partículas foram obtidos nos experimentos 3 e 7, ambos com a agitação e concentração de AgNO₃ em comum, respectivamente, 650 rpm e 500 µM.

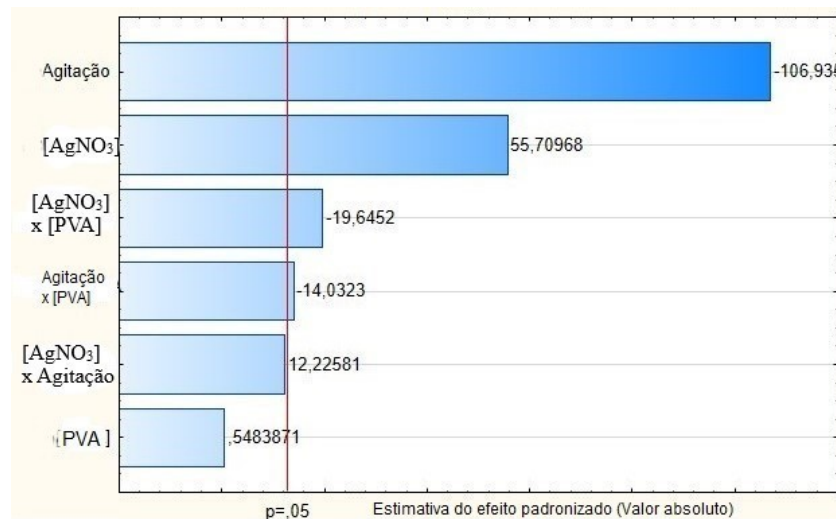
Tabela 4 - Planejamento fatorial com resposta obtida através de tamanho médio por DLS

EXPERIMENTO	VARIÁVEIS			RESPOSTA
	[AgNO ₃] (µM)	Agitação (rpm)	[PVA] (µg.mL ⁻¹)	Raio hidrodinâmico (nm)
1	500	200	30	183
2	2.500	200	30	232
3	500	650	30	102
4	2.500	650	30	169
5	500	200	50	210
6	2.500	200	50	228
7	500	650	50	106
8	2.500	650	50	144

Fonte: O autor (2018)

No que diz respeito ao gráfico de Pareto, este demonstra a análise estatística das três variáveis avaliadas nos experimentos separadamente (AgNO₃, agitação e PVA representadas pelos números de 1 a 3, respectivamente) bem como a comparação entre elas.

Figura 13 - Gráfico de Pareto obtido por análise de planejamento fatorial 2^3 ([AgNO₃], agitação e [PVA])



Fonte: O autor (2018)

Através do gráfico de Pareto, que considerou o intervalo de confiança de 95%, obteve-se que a variável agitação com valor absoluto de -106,934 é a que mais interferiu de forma inversamente proporcional (indicado pelo valor negativo) no tamanho das nanopartículas, ou seja, quanto maior for a agitação, menor o tamanho das nanopartículas formadas. Tais resultados concordam com Chan e Don (2013), que observaram velocidade de agitação de 150 a 250 rpm na formação de nanopartículas menores usando o fungo *Pycnoporus sanguineus* como material biológico.

A segunda variável que mais teve influência foi a concentração de AgNO₃ (~55,71), que demonstrou uma relação diretamente proporcional com o tamanho. O mesmo foi observado por Erjael, Rajain e Nazifi (2017), que utilizaram concentrações de 0,5 – 1 mmol.L⁻¹, porém a literatura diverge com tais resultados, quando outros estudos demonstraram a possibilidade de se encontrar o inverso (DON et al., 2014; POURMOTAVAZI et al., 2015).

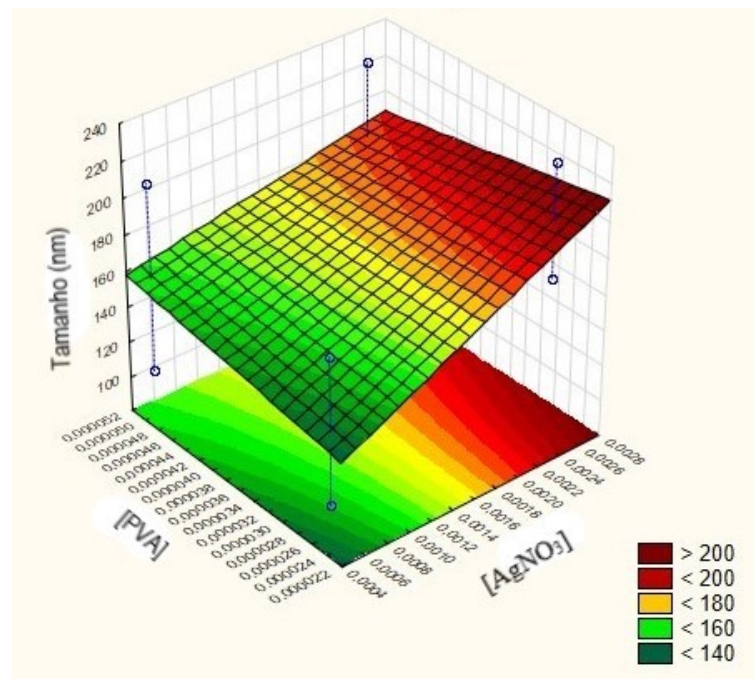
Quanto à terceira variável (concentração de PVA), esta não foi significativa. O mesmo foi observado em planejamento fatorial realizado por Pourmortavazi et al. (2015), que haviam assumido 90% de intervalo de confiança utilizando ANOVA.

Já quando se avaliou entre as variáveis, notou-se que o mais significativo foi a relação entre concentração de AgNO₃ e de PVA (-19,64), sendo que de forma inversamente

proporcional, seguida de agitação e concentração de PVA (-14,03). A relação entre a concentração de AgNO_3 e agitação não foi significativa.

No que diz respeito a relação significativa entre as variáveis, estas podem ser representadas através de gráficos de superfície de resposta, nos quais é possível verificar o ponto ótimo da variável na síntese, que podem ser verificados nas figuras 14 e 15. Na primeira, observa-se a relação entre concentração de AgNO_3 e de PVA, no qual quanto menor a concentração de cada um, menor o valor do tamanho médio das nanopartículas, enquanto na segunda, nota-se que quanto maior a agitação e menor concentração de PVA, menor o tamanho das mesmas.

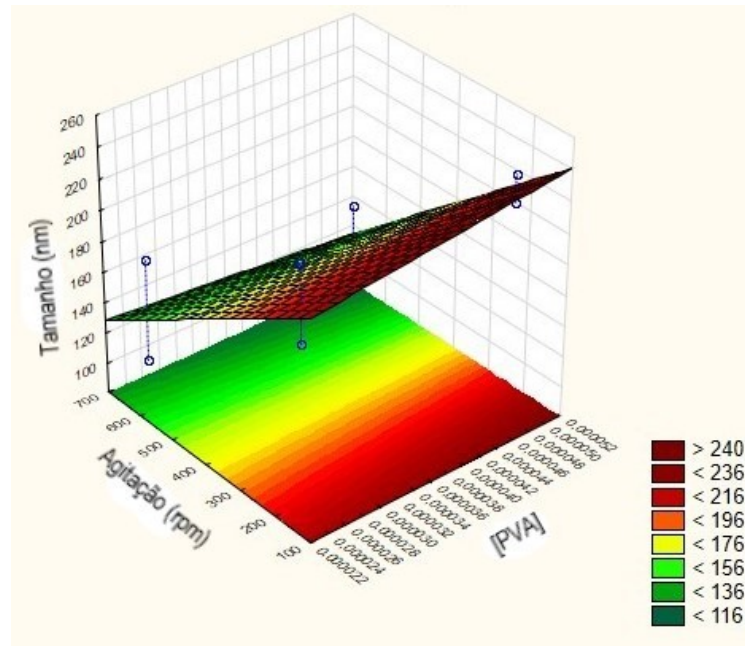
Figura 14 - Superfície de resposta relacionando a concentração de AgNO_3 e PVA



Fonte: O autor (2018)

Além disso, na figura 16, comparou-se os valores observados com os preditivos e pôde-se observar que o modelo aplicado foi eficiente, no qual os pontos se encontra com a reta, bem como foi obtido através do coeficiente de regressão um coeficiente de correlação (R) de 0,9999, confirmando novamente a predição do modelo.

Figura 15 - Superfície de resposta relacionando agitação e [PVA]

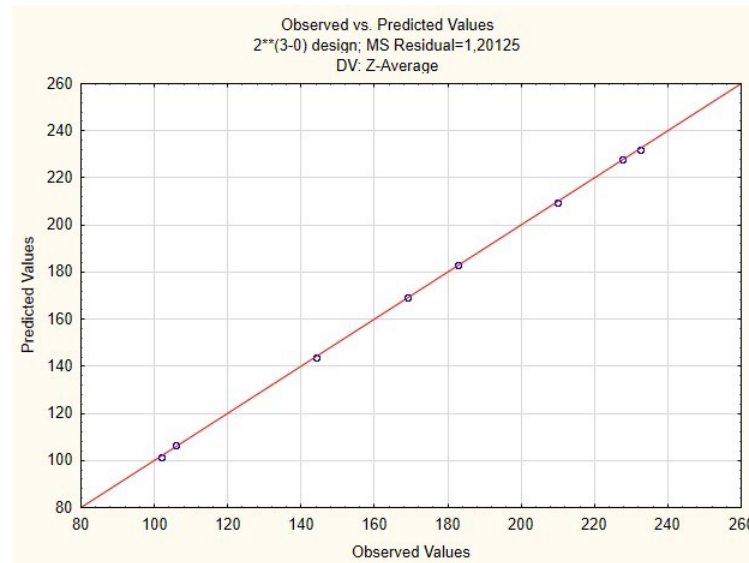


Fonte: O autor (2018)

Logo, diante do avaliado, constatou-se que as variáveis mais significativas para se obter um tamanho menor de nanopartícula seria uma menor concentração de AgNO_3 (500 μM) e uma agitação mais vigorosa (650 rpm), que foram utilizadas para dar continuidade ao trabalho. Como não houve diferença significativa com relação a concentração de PVA, optou-se pela concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, já que estudos demonstraram que uma maior concentração de extrato terá influência na capacidade de redução do sistema e aumento de estabilidade das nanopartículas (PARAMESHWARAN; KALAISELVAM; JAYAVEL, 2013), propriedade até então não avaliadas.

Assim, as variáveis testadas no experimento 7 foram escolhidas para dar continuidade as próximas etapas de caracterização.

Figura 16- Representação dos valores obtidos versus valores preditos no planejamento fatorial



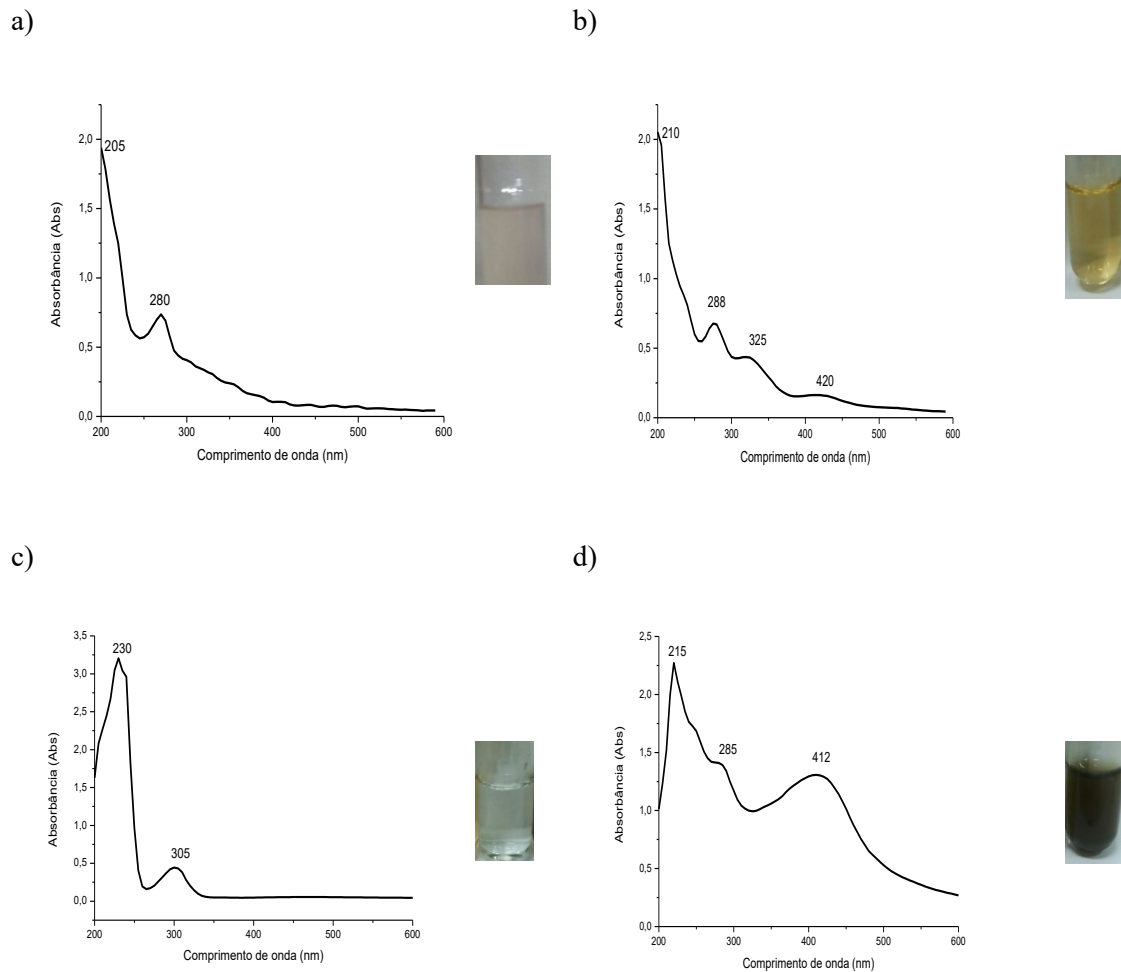
Fonte: O autor (2018)

5.3. Caracterização de NPAg-PVA em suspensão coloidal

Tendo sido realizada a síntese, a formação das nanopartículas de prata pôde ser visualizada devido a mudança de coloração de amarelo para marrom amarelado, que indica a redução da prata, como pode ser observado na figura 17, logo após adição de nitrato de prata, conforme já observado em literatura (PADALIA; MOTERIYA; CHANDA, 2014; POURMORTAZAVI et al., 2015). Segundo IBRAHIM (2015), essa coloração é atribuída a excitação da superfície de ressonância plasmônica.

Na figura 17a também pode-se visualizar as bandas de absorção na região do UV-Vis da própolis em meio aquoso em 205 e 280 nm, que tiveram um pequeno deslocamento, quando em meio básico, para 210 e 288 nm (Figura 17b). Esse deslocamento também ocorreu com a suspensão coloidal de NPAg-PVA de 215 para 285 nm (Figura 17d). Com a mudança de pH, a região próximo de 210 nm está relacionada a forte absorção de ligações peptídicas presentes no extrato, enquanto que em 280 nm indicam a presença de tirosina, triptofano e/ou resíduos de fenilalanina nas proteínas, que são conhecidas por interagirem com os íons prata (AHMAD et al., 2011; LI et al., 2007). No entanto, de acordo com Kothai e Jayanthi (2014), pico em 290 nm também pode ser atribuído à presença de fenóis e flavonoides presentes no extrato. Com relação ao nitrato de prata, observou-se a presença de banda característica que representa os íons prata em 305 nm (DONG et al., 2016) e em 230 nm, referente ao nitrato (ANDRADE et al., 2010).

Figura 17- Espectros UV-Vis de NPAg-PVA. Em a) PVA em meio aquoso; b) PVA em pH 10,6; c) AgNO₃; e d) NPAg-PVA após 30 minutos (A imagem indicativa de coloração de cada produto encontra-se inserida junto ao seu respectivo gráfico)



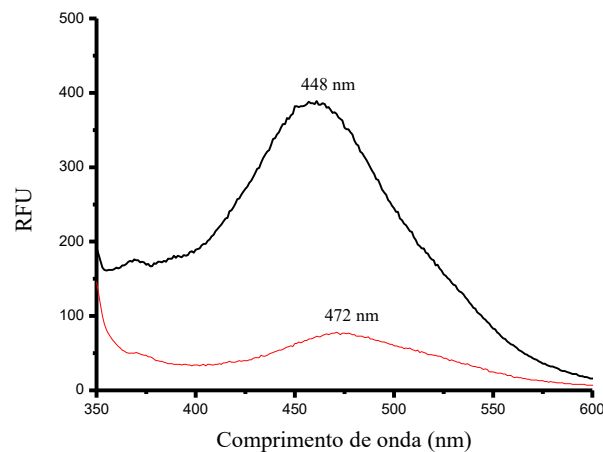
Fonte: O autor (2018)

Na mesma figura (Figura 17d), pode-se visualizar o aparecimento de absorção na região entre 350 a 450 nm (VELUSAMY et al., 2016; SHAMELI et al., 2012), com absorção máxima em 412 nm, referente as bandas de SPR das nanopartículas de prata esféricas, como já visto, esta consiste na oscilação coletiva da condução de elétrons excitados por um campo eletromagnético de luz (GARCIA, 2011). Com relação às nanopartículas de prata formadas com própolis indianas da região de Khanpur (ROY et al., 2010) e da região de Tamilhadu (JAYANTHI; KOTHAI, 2014), observou-se banda de SPR nos comprimentos de onda de 421 e 413 nm. De acordo com Mokhtari et al. (2009), baixos comprimentos de onda, como 412 nm, sugerem a formação de menores nanopartículas de prata.

Com relação ao estudo de fluorimetria das amostras (Figura 18), obteve-se que a própolis em meio básico apresentou emissão de intensidade bastante elevada em 448 nm.

Sugere-se que tal fato se dê diante da presença de flavonoides em sua composição, que quando em meio básico apresentam acentuada emissão de fluorescência (MONAGO-MARAÑA et al., 2016) e também de proteínas presentes no extrato (KUREK-GORECKA et al., 2014). De acordo com Cao et al. (2014), alguns flavonoides, como a quercetina, miricetina e kaempferol talvez permitam o processo de transferência de prótons do estado excitado, referente a emissão de fluorescência, devido a um equilíbrio tautomérico que ocorre devido a ligação de carbonila com hidroxilas.

Figura 18 - Emissão de fluorescência de PVA (preto) e NPAg-PVA (vermelho) após 30 minutos



Fonte: O autor (2018)

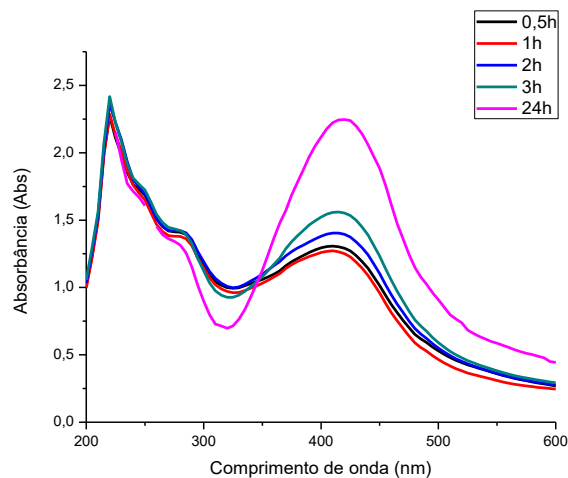
Sabe-se que as nanopartículas de prata possuem capacidade de emitir fluorescência (JIANG; YUAN; RAN, 2005). No entanto, quando ocorreu a formação de NPAg-PVA, a intensidade de fluorescência diminuiu consideravelmente, o que é denominado *quenching*. Tal fenômeno já é observado na literatura, no qual é visto que nanopartículas metálicas têm mostrado alta capacidade de *quenching* frente à substâncias cromóforas, como, por exemplo, as proteínas (ALI; ALTAF; AL-LOHEDAN, 2017).

Segundo Ali; Altaf; Al-Lohedan (2017), o *quenching* pode ocorrer de forma estática, com o processo de formação de um complexo, ou de forma dinâmica, que envolveriam a colisão entre fluoróforo e *quencher*. Além disso, observou-se também um deslocamento no comprimento de emissão de 448 para 472 nm. Bar et al. (2009) encontraram resultados semelhantes com NPAg sintetizadas com extrato de sementes de *J. curcas*, no qual relatam que o *quenching* ocorreu devido à proximidade das espécies de emissão com as

nanopartículas, fazendo com que haja um processo de transferência de energia, o que também explicaria a função do extrato na estabilização das nanopartículas.

No que diz respeito à avaliação de NPAg-PVA por um período de 24 horas (Figura 19), pôde-se perceber por UV-Vis, o aumento da absorbância ao longo do tempo, que está relacionado diretamente com a formação das NPAg-PVA, bem como um deslocamento referente à banda SPR de 412 nm nos tempos 30 minutos, 1 hora e 2 horas; 415 nm no tempo de 3 horas; e de 420 nm no tempo de 24 horas. O mesmo foi obtido por Erjaee, Rajain e Nazifi (2017), que encontraram valores de 414 nm em 2 horas e aumento para 422 em 24 horas. Tais deslocamentos são denominados desvios para a região do vermelho, ou seja, para comprimentos de onda maiores, que acontecem quando há aumento no tamanho de partícula (PENG et al., 2010; AMALADHAS et al., 2012; PRATHNA et al., 2011). Além disso, o aumento na largura do pico indica tendência à polidispersão das amostras (LOPES et al., 2017).

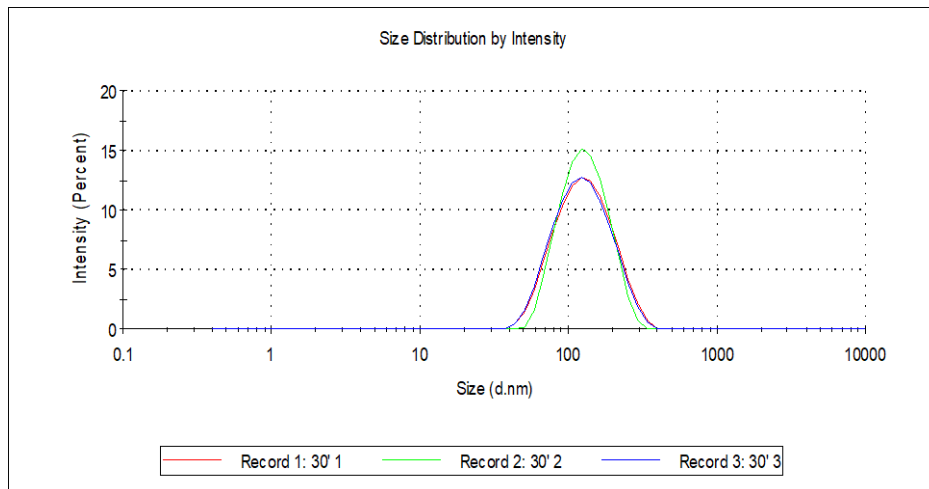
Figura 19 - Espectros UV-Vis de NPAg-PVA em função do tempo



Fonte: O autor (2018)

Embora resultados de UV-Vis indiquem a formação de nanopartículas pequenas, foi observado na figura 20, através de DLS, um diâmetro médio de 109 nm, de característica unimodal em um período de 30 minutos.

Figura 20 - Tamanho médio do raio hidrodinâmico de NPAg-PVA após 30 minutos por DLS



Fonte: O autor (2018)

Devido à medida de DLS ser feita através do tamanho hidrodinâmico das partículas em suspensão, esta leva em consideração não só o diâmetro da mesma, mas também, os íons ou moléculas que podem estar em sua superfície ou que esteja se movendo juntamente com a mesma (CUMBERLAND; LEAD, 2009). Diversos estudos encontraram tamanhos conflitantes quando utilizaram técnicas diferentes. Sudha, Jeyakanthan e Srinivasan (2017) obtiveram por DLS uma média de 143,7 nm, enquanto resultados de MET indicaram uma média de 30 a 60 nm. O mesmo ocorreu com Ravichandran et al. (2016) com valores para DLS e MET de 162 e 38 nm, respectivamente.

De acordo com os estudos de nanopartículas de prata envolvendo própolis indiana, Roy et al. (2010), com a própolis de Khunpar, não realizaram análises de DLS, mas com MET afirmaram a formação de NPAg esférica, de tamanho variado, formando pequenos agregados quando comparada aos flavonoides isolados na formação de nanopartículas, o que seria explicado devido à presença de diversos componentes na própolis. Os mesmos viram ainda que a formação de sistemas monodispersos com este material ainda estava em processo de estudo (ROY et al., 2010). Já Jayanthi e Kothai (2014), observaram que a própolis de Tamilhadu proporcionou a formação de NPAg esféricas de tamanho de 91 nm por DLS, que compreendeu 98% de seu total e de 66 a 84 nm por SEM.

Outro dado obtido foi o índice de polidispersão (PDI) de 0,207, considerado um valor baixo. Este dado é considerado um parâmetro que descreve a distribuição de tamanho de nanopartículas. Quando este valor está abaixo de 0,3, indica a ausência de agregados, sendo considerado um sistema monodisperso (GREULICH et al., 2011).

Quando observada a formação da NPAg-PVA ao longo do tempo, diferentemente da tendência vista no UV-Vis, o raio hidrodinâmico da NPAg-PVA, obtido por DLS (Tabela 5) demonstrou uma diminuição de aproximadamente 28 nm de tamanho médio ao longo do tempo com 109 nm em 30 minutos e 81,19 nm em 24 horas, no entanto, neste último, apresentou-se de forma bimodal, o que foi ratificado pelos valores de PDI, nos quais, até 3h, obtiveram-se valores menores que 0,3, enquanto que em 24h, observou-se um valor de 0,351. O aumento dos valores de PDI corroborou com o aumento da largura da banda de SPR.

Tabela 5 - Avaliação da estabilidade de NPAg através de tamanho de partícula e PDI

Tempo (h)	Tamanho do raio hidrodinâmico das partículas (nm)	PDI
0,5	109	0,207
1	116	0,253
2	102	0,239
3	98	0,255
24	81 (bimodal)	0,351

Fonte: O autor (2018)

De acordo com Ortiz, Torres e Paredes (2014), uma alta agitação (800 rpm) levou a presença de agregação, com formação de grandes “clusters” de nanopartículas, o que foi explicado pela influência da presença de forças coalescentes com uma alta agitação, assim, sugere-se que a polidispersão observada na NPAg-PVA a partir de 24 horas pode ter acontecido devido à alta agitação utilizada de 650 rpm. Além disso, sugere-se que o processo de amadurecimento de Ostwald esteja acontecendo no sistema, fazendo com que parte das nanopartículas estejam se agregando e tenham formado um novo grupo de tamanhos em função do tempo.

Assim, concluiu-se que a partir de 24h já existe uma tendência à polidispersão de NPAg-PVA nas condições avaliadas, o que sugere uma gradual perda de estabilidade em função do tempo. Dessa forma, optou-se pela utilização de NPAg-PVA em suspensão coloidal em até três horas no intuito de evitar problemas relacionados à instabilidade após esse tempo. No entanto, como tal fato não iria influenciar na caracterização do pó e observou-se uma maior formação de NPAg-PVA na absorção máxima na região do UV-Vis nesse período, optou-se este tempo (24h) para as demais caracterizações e rendimento.

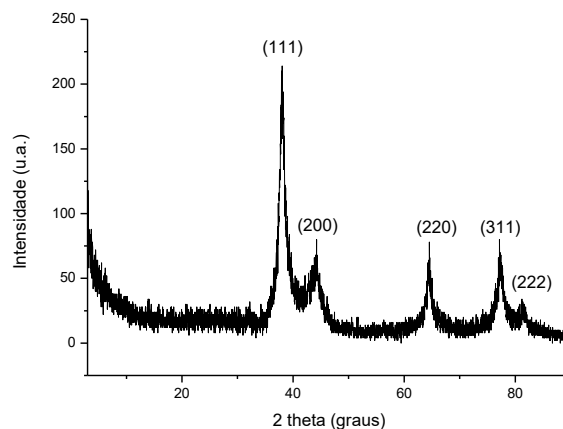
5.4. Caracterização de NPAg-PVA na forma de pó

Após sintetizada a NPAg-PVA na forma de suspensão coloidal, seguiu-se caracterização do pó.

Inicialmente, através de análise de ICP-OES obteve-se o rendimento em função de quantidade de prata reduzida na síntese de aproximadamente 55% após 24 horas de formação de NPAg-PVA, o que foi considerado relativamente baixo quando comparado a alguns estudos, como de Rastogi; Arunachalam (2011), que encontraram valores de 85% por exemplo. No entanto, o mesmo estudo observou que o rendimento em nanopartículas aumenta linearmente com o aumento da concentração do extrato, devido provavelmente a maior disponibilidade das biomoléculas redutoras ali presentes para redução de prata (RASTOGI; ARUNACHALAM, 2011). Além disso, o tempo de formação também se mostrou importante para calcular o rendimento em nanopartículas de prata por síntese biogênica, segundo Shams, Pourseyedi e Rafsanjani (2014) foram necessários 60 dias a partir da formação das nanopartículas para se calcular o valor do rendimento, resultando em 95%.

Após a caracterização da suspensão coloidal, seguiu-se a do pó. O PXR (Figura 21) demonstrou picos nos ângulos 2θ em $38,04^\circ$, $44,80^\circ$, $64,54^\circ$ e $77,26^\circ$ e $81,32^\circ$, correspondentes, respectivamente, aos principais planos de estrutura cristalina cúbica de face centrada da prata metálica (JCPDS 96-901-3051): (111), (200), (220), (311), (222), encontrados semelhantemente em literatura (GOMAA et al., 2017; SUN et al., 2014) e com uma cristalinidade de 50,32%.

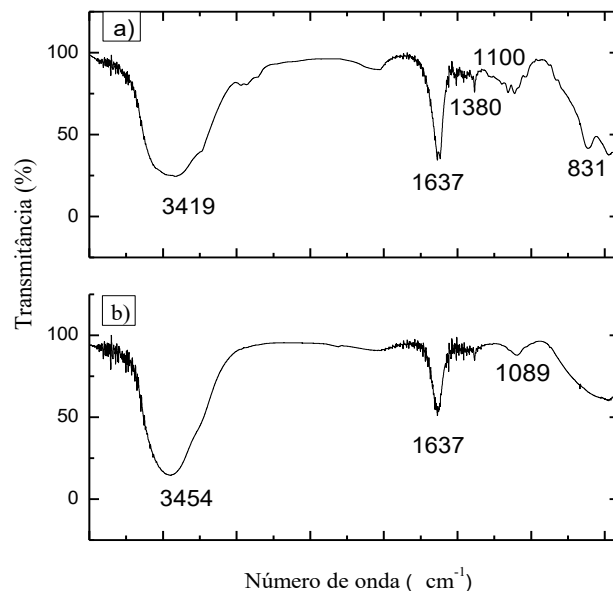
Figura 21 - Difratoograma representando a estrutura cristalina de NPAg-PVA



Fonte: O autor (2018)

Com relação ao FT-IR, o espectro pode ser visualizado na figura 22. Embora não existam grandes diferenças entre eles, no espectro referente ao extrato de PVA, observam-se as principais bandas em 3419 cm^{-1} referentes a hidroxilas (AMALADHAS et al., 2012), 1637 cm^{-1} representando as carbonilas e carboxilas (IBRAHIM et al., 2015), 1380 cm^{-1} indicando proteínas do extrato (RASTOGI; ARUNACHALAM, 2011), 1100 cm^{-1} , que estaria relacionada a compostos heterocíclicos (C-O-C) encontrados em alcaloides e flavonas (SHAMELI et al., 2012) e em 831 cm^{-1} relativo a presença de glicosídeos.

Figura 22 - Espectros FT-IR de: em a) PVA e em b) NPAg-PVA



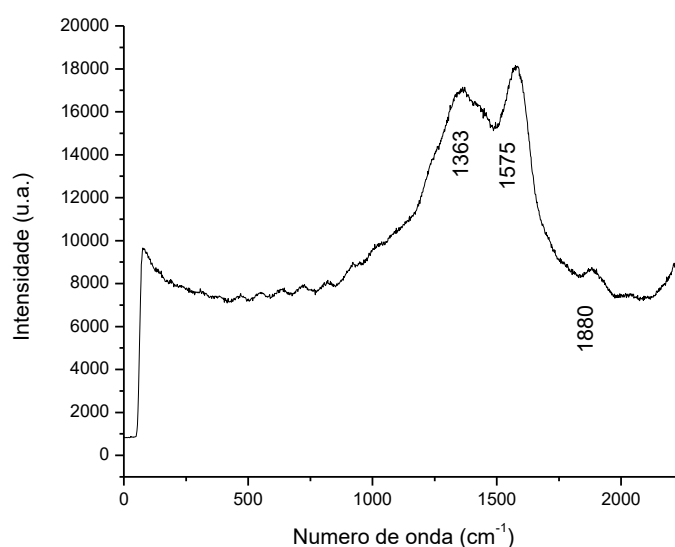
Fonte: O autor (2018)

Quanto ao espectro de NPAg-PVA, nota-se um deslocamento da banda na região das hidroxilas para 3454 cm^{-1} , já a região referente a carbonilas e carboxilas apresentou uma pequena redução de intensidade, talvez indicando a sua participação na formação de ligações com as bandas de peptídeos (SINGHAL et al., 2011). Tal fato entra em acordo com o esperado já que tais grupos estão presentes nos flavonoides, substâncias já vistas como participantes da composição da própolis e de característica redutora. Por fim, também há deslocamento da região de compostos heterocíclicos de 1110 para 1089 cm^{-1} , bem como desaparecimento da banda referente aos glicosídeos. Tais deslocamentos também sugerem a possibilidade de participação desses compostos na redução da prata para formação de NPAg-PVA.

No que diz respeito à espectroscopia de Raman, as principais bandas encontradas foram em 1363, 1575 e 1880 cm^{-1} , sendo as duas primeiras mais acentuadas, como pode ser observado na figura 23. De acordo com a literatura, os grupos mais encontrados em nanopartículas de prata realizados por síntese biogênica estão em 240, 1351 e 1565 cm^{-1} , referentes, respectivamente, às ligações Ag-N e Ag-O, ligações simétricas e ligações assimétricas das vibrações de carbonilas (C=O) (MURKERJEE et al., 2008; KORA; BEEDU; JAYARAMAN, 2012).

A banda em 240 cm^{-1} representa evidência na formação de ligação química entre as nanopartículas de prata e o nitrogênio presente nos aminoácidos, porém não foi encontrada no espectro, no entanto, bandas próximas às vibrações de carbonila aparecem, que indicam a participação de carboxilas na estabilização de NPAg-PVA. Novas investigações como produto na forma líquida serão realizadas a fim de confirmar tais resultados.

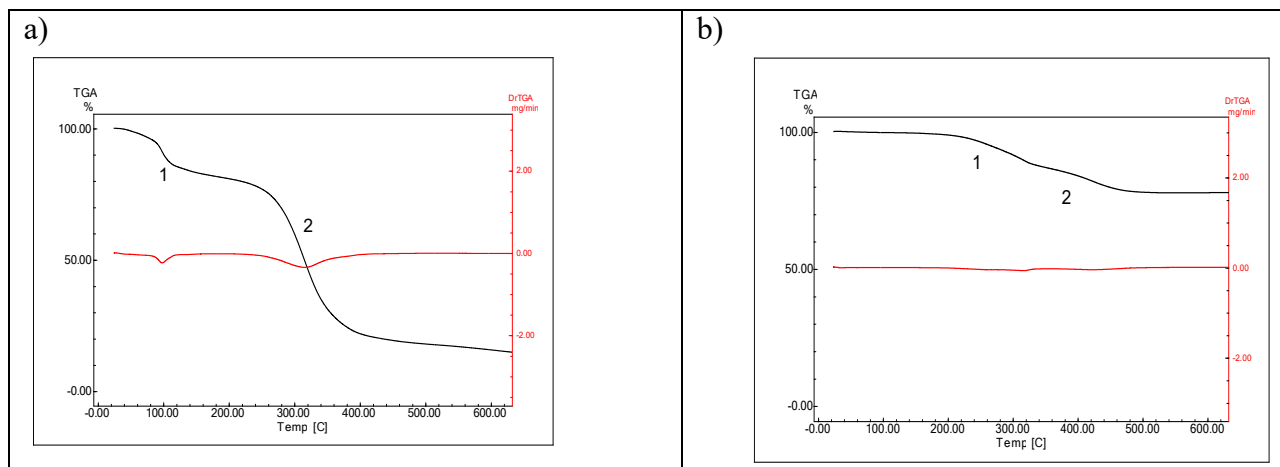
Figura 23 - Espectro Raman de NPAg-PVA



Fonte: O autor (2018)

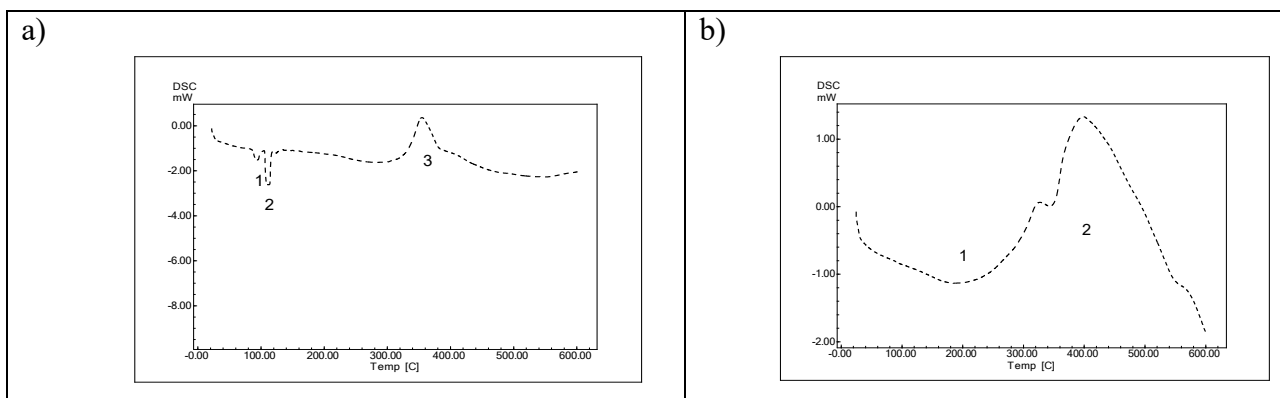
A respeito da análise térmica, tanto os materiais precursores, quanto o produto final foram analisados, os dados obtidos na análise de TG encontram-se na figura 24 e tabela 6 e de DSC na figura 25 e tabela 7.

Figura 24 - Curvas TG (preto) com derivadas (vermelho) da decomposição dos produtos utilizando uma taxa de aquecimento de 10 °C/ min.



Fonte: O autor (2018)

Figura 25 - Curvas DSC da decomposição dos produtos utilizando uma taxa de aquecimento de 10 °C/ min



Fonte: O autor (2018)

Tabela 6 - Resultados obtidos experimentalmente dos produtos por TG

Amostra	Evento	Intervalo de temperatura (°C)	Pico (°C)	Perda de massa (%)
PVA	1	80,10 – 107,80	93,07	-14,64
	2	274,89 – 355,20	312,36	-66,21
NPAg-PVA	1	257,20 – 322,16	269,69	-11,45
	2	324,94 – 444,71	411,88	-10,878

Fonte: O autor (2018)

Tabela 7- Resultados obtidos experimentalmente dos produtos por DSC

Amostra	Evento	Intervalo de temperatura (°C)	Pico (°C)	ΔH (J/g)
PVA	1	87,58 – 99,44	94,76	-10,42
	2	106,46 – 116,37	112,55	-35,95
	3	335,02 – 383,27	355,48	+256,79
NPAg-PVA	1	26,75 – 301,60	189,21	-485,29
	2	372 – 485,10	397,81	+795,58

Fonte: O autor (2018)

A PVA apresentou dois eventos no TG (Figura 24a), que representaram juntos aproximadamente 80% de perda de massa até 600°C, corroborados por DSC (Figura 25b), que demonstrou dois pequenos eventos endotérmicos com picos em 94,86 e 112,55 °C e um exotérmico em 355,48 °C. De acordo com Nascimento et al. (2016), o extrato de própolis vermelha evidenciou quatro eventos endotérmicos nas temperaturas de 81,7; 92,0; 107,0 e 135 °C, no qual os três primeiros representaram volatilização da água e o quarto indicaria processos de fusão de compostos de baixo peso molecular como flavonoides e outros compostos fenólicos presentes no extrato. Diante dessas informações, acredita-se que o primeiro evento endotérmico encontrado corresponda a volatilização da água, o segundo represente sua decomposição a partir de processos de fusão de suas substâncias e o pico exotérmico possa estar relacionado a possíveis subprodutos formados por tais processos.

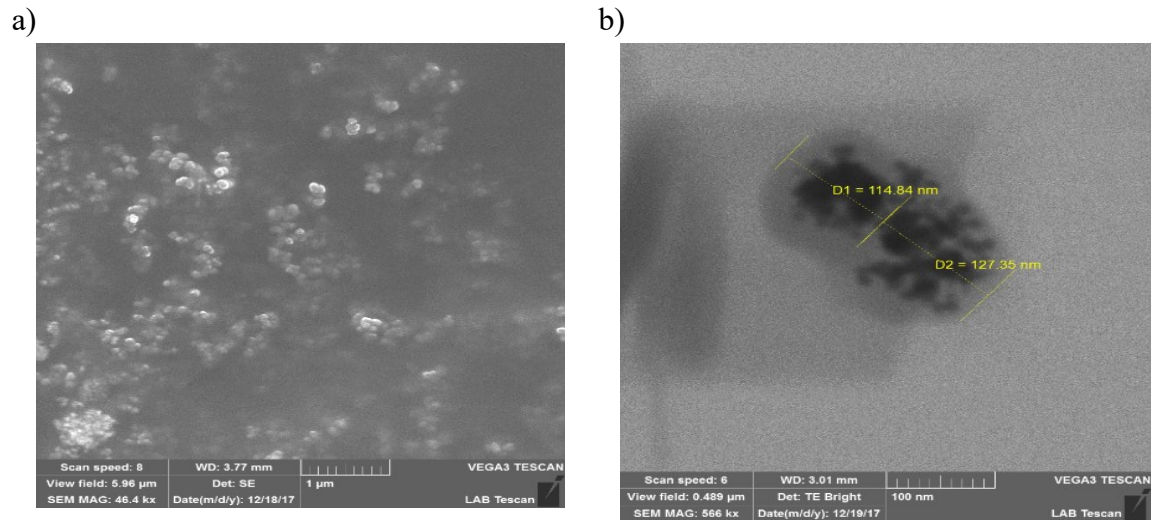
No que concerne ao TG de NPAg-PVA (Figura 24b), foram constatadas duas pequenas perdas de massa em 269,69°C e outra em 411,88°C, que correspondem a cerca de 22,33% da amostra. Tendo em vista a comparação com seus precursores, o produto demonstrou uma excelente estabilidade térmica relacionada a prata metálica presente. Tais perdas se referem à parte biorgânica contida na amostra, representando as moléculas

responsáveis pela redução do íon metálico e estabilizar as partículas em solução, conforme visto por Mani et al. (2013), que encontrou um valor próximo de 28,51% através de síntese biogênica com extrato de *Ricinus communis* (Mamona) em 3h de reação. No entanto, esses valores podem variar a depender do material biológico utilizado na síntese, como Mata; Nakkala; Sadras (2015), que encontraram uma perda de 36% (30 minutos), utilizaram extrato de flores de *Plumeria alba*, e Khalil et al. (2014), que obtiveram 42% com NPAg sintetizadas através de extrato de folhas de oliveira.

Com relação ao DSC de NPAg-PVA, na figura 25b, observaram-se dois processos térmicos, um endotérmico em 189,21 °C, que representou uma variação alta de entalpia de -485,29 J/g e um exotérmico em 397,81°C, com variação ainda maior de +795,58 J/g. De acordo com Mani et al. (2013), a entalpia de desnaturação das nanopartículas de prata está relacionada aos estágios iniciais de decomposição da curva termogravimétrica. Considerando-se que a primeira perda de massa de NPAg-PVA teve pico em cerca de 269°C e seu pico endotérmico foi de 189,21 °C, pode-se considerar que o estudo termogravimétrico e a temperatura de desnaturação estão de acordo, sugerindo que os fitoquímicos responsáveis pela redução Ag^+ para Ag^0 podem ser compostos pouco estáveis, que podem ser extraídos em água (MANI et al., 2013; MATA; NAKKALA; SADROS, 2015).

A avaliação microscópica da NPAg-PVA se deu por SEM. Por SEM (Figura 26a), podem ser observadas nanopartículas esféricas de tamanho de aproximadamente 100 nm, semelhantes às imagens encontradas por Kothai e Jayanthi (2015) na síntese com própolis de Tamilhadu. Tais resultados corroboram com o que foi exposto no UV-Vis e tamanho de partícula por DLS. Imagens de SEM com detector STEM (Figura 26b), demonstraram, ainda, possíveis aglomerados com tamanho médio de 100 nm, mas notou-se um material mais leve revestindo essas nanopartículas, representados por uma cor mais cinza. De acordo com Fatimah (2016), através de análise de TEM, demonstrou-se que essa fina camada corresponde ao material orgânico do material biológico utilizado na síntese da nanopartícula metálica, que neste caso corresponde a PVA, confirmando a sua função além de redutora de encapsulante auxiliando nos processos de estabilização das mesmas.

Figura 26 - Imagens de microscopia de NPAg-PVA. Em a) obtidas por SEM com filamento de tungstênio; b) obtidas por SEM com filamento de tungstênio usando detector STEM



Fonte: O autor (2018)

5.5. Avaliação antibacteriana

Tendo caracterizado o produto, realizou-se ensaio para determinação de atividade antibacteriana dos produtos. Os resultados obtidos encontram-se expostos no quadro 2.

Quadro 2 - Valores de MIC (cinza claro) e MBC (cinza escuro) obtidos por microdiluição em caldo. (Os valores entre parênteses são relativos a concentração de Ag presente nos produtos)

Amostra	Gram +				Gram -			
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Escherichia Coli</i>	
	MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	MBC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	MBC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	MBC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	MBC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
PVA	4.162	8.325	8.325	16.650	16.650	16.650	16.650	16.650
NPAg-PVA	8 (5)	32 (18)	2.081 (1.160)	2.081 (1.160)	260 (145)	8.325 (4.640)	520 (290)	16.650 (9.270)

NPAg- Conv	8.325 (7.680)	>16.650 (15.370)	16.650 (15.370)	16.650 (15.370)	8.325 (7.680)	8.325 (7.680)	8.325 (7.680)	8.325 (7.680)
---------------	------------------	---------------------	--------------------	--------------------	------------------	------------------	------------------	------------------

Fonte: O autor (2018)

A própolis demonstrou atividade antibacteriana com valores de MIC de $4.162 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (*S. aureus*), $8.325 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (*S. epidermidis*) e $16.650 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (*P. aeruginosa* e *E. coli*). De acordo com a literatura, foram evidenciados valores mais baixos de MIC para o mesmo tipo de própolis: $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S. aureus* e *S. epidermidis*, $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *P. aeruginosa* e entre 25 e $>200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para diferentes estirpes de *E. coli* por Lopez et al. (2015) e $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (*P. aeruginosa*) e $512 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (*E. coli*) por Righi e colaboradores (2011). De acordo com Regueira et al. (2017) os possíveis mecanismos de ação da própolis são: inibição da síntese de ácidos nucleicos, mecanismo inibitório da DNA girase, inibição da função da membrana citoplasmática, inibição do metabolismo energético e inibição da formação de biofilme.

Com relação à NPAg-PVA, suas MICs foram de 8, 2.081, 260 e $520 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e MBC foram de 32, 2.081, 8.325 e $16.650 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e *E.coli*, respectivamente. Nota-se que comparadas aos outros produtos, este foi o que obteve melhor atividade antibacteriana e, além do mais, bactericida.

Todavia, tais valores distinguiram do estudo de Chahardoli; Karimi; Fattahi (2018), com exceção dos valores para *S. aureus*, que observaram que o MIC de NPAg sintetizada usando *Nigella arvensis* para *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E.coli*, foi de $7,82 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e para *P. aeruginosa* foi de $15,63 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O mesmo aconteceu com a utilização de goma *rhamnogalacturonan* na síntese de NPAg, de Kora et al. (2014), que obtiveram como valores de MIC 10, 5 e $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e MBC 12, 2 e $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, respectivamente. Enquanto que a utilização de extrato da casca de *Ficus benghalensis* and *Azadirachta indica* obtiveram valores um pouco maiores entre 12,5 e $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *E. coli*, *P. aeruginosa* e *V. cholerae* e $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contra *Bacillus subtilis* para ambas as NPAg. Observou-se ainda que o valor de MBC foi de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a maioria das bactérias avaliadas (NAYAK et al., 2016). Diante disso, estudos afirmam que diferentes respostas de bactérias frente às nanopartículas biosintetizadas podem acontecer devido a diversos fatores, como diferentes unidades formadoras de colônias (UFC) iniciais usadas para as bactérias, diferentes origens de estirpes bacterianas, material precursor para a síntese e também diferentes tamanhos e formatos de NPAg (CHAHARDOLI; KARIMI; FATTAHI, 2018).

Um outro aspecto a ser notado é que, no geral, os menores valores de MIC ($8 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e de MBC ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) encontrados foram para *S. aureus*, demonstrando uma sensibilidade maior desses microrganismos frente à NPAg-PVA, fazendo com que este material ganhe destaque frente a essa espécie de microrganismo.

Comparando-se, ainda, NPAg-PVA e NPAg-Conv pode-se notar que os valores de MIC e MBC para esta última são maiores que a primeira, confirmando a potencialização da presença de material biológico na atividade antibacteriana da nanopartícula. Isso talvez se dê porque as nanopartículas metálicas junto aos metabólitos secundários presentes no material biológico utilizado na síntese podem mostrar efeitos sinérgicos e causar eliminação das bactérias (CHAHARDOLI; KARIMI; FATTAHI, 2018). No entanto, Dey et al. (2015), com a síntese química usando citrato de sódio, encontraram valores mais baixos para MIC e MBC, que os do presente estudo. O MIC foi de 26,75 e 13,48 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente e o MBC de 53 e 26,75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, seguindo a mesma ordem (DEY et al., 2015).

Por fim, no que se refere ao mecanismo de ação das nanopartículas de prata, acredita-se que sua capacidade antibacteriana seja ampliada devido a ampla área de superfície das mesmas, no qual a liberação de íons Ag carregados positivamente se ligam a parede negativa da bactéria causando rompimento da parede celular, desativação de enzimas e causando mudanças na permeabilidade da membrana (CHAHARDOLI; KARIMI; FATTAHI, 2017). Tal efeito pode ser influenciado pelo tamanho das nanopartículas, no qual as menores interagem diretamente com a bactéria, aumentando sua reatividade (MATA; NAKKALA; SADROS, 2015).

6. CONCLUSÃO

Ante o exposto, as análises de NPAg-PVA demonstraram que, através do planejamento fatorial 2^3 com as variáveis avaliadas, foram obtidas as melhores condições para um menor tamanho de partícula de NPAg-PVA, que foram 500 μM de AgNO_3 , 650 rpm de agitação e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de PVA.

Na caracterização da mesma em suspensão coloidal, a formação de NPAg-PVA de formato esférico foi confirmada através do surgimento de banda SPR e teve como raio hidrodinâmico um tamanho de 109 nm. Com 24 horas foram observados indícios de gradual perda de estabilidade, indicada por valores de PDI acima de 0,3. Quanto à caracterização do pó, foi constatado um rendimento na síntese em função da prata de aproximadamente 55%. A presença de planos cristalinos relativos a prata metálica foi demonstrada por PXRD, enquanto que os principais grupos responsáveis pela redução da prata foram identificados, como carbonilas e carboxilas através de FTIR e Raman. Tais grupos contidos na PVA demonstraram sensibilidade à temperatura, representados pela perda de cerca de 22% em massa por análise térmica.

Por fim, NPAg-PVA se destacou quanto à atividade antibacteriana, comprovando o sinergismo esperado entre os seus componentes. Sabendo-se que o microrganismo *S. aureus* é um dos mais importantes patógenos humano, causador de um amplo espectro de infecções clínicas e possível causa de bacteremias e endocardites infectivas, bem como infecções na pele, o composto obtido no presente trabalho (NPAg-PVA) representa um promissor composto nanobiotecnológico de atividade antibacteriana, em especial para aplicações tópicas.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, N. et al. Biosynthesis of Silver Nanoparticles from *Desmodium triflorum*: A Novel Approach Towards Weed Utilization. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 1-8, 2011.
- AHMED, S. et al. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. **Journal of Advanced Research Cairo University Journal of Advanced Research**, v. 7, p. 17–28, 2016.
- AHMED, S.; IKRAM, S.; YUDHA, S. S. Biosynthesis of gold nanoparticles: A green approach. 2016. ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 278–283, 2007.
- AKMAN et al. Effect of femtosecond Ti:Sapphire laser wavelengths on plasmonic behaviour and size evolution of silver nanoparticles. **Photonics and Nanostructures - Fundamentals and Applications**, v. 9, n. 3, p. 276–286, 2011.
- ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278–283, 2007.
- ALI, M. S.; ALTAF, M.; AL-LOHEDAN, H. A. Green synthesis of biogenic silver nanoparticles using *Solanum tuberosum* extract and their interaction with human serum albumin: Evidence of “corona” formation through a multi-spectroscopic and molecular docking analysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 173, p. 108–119, 2017.
- AMIN, M. et al. Green synthesis of silver nanoparticles through reduction with *Solanum xanthocarpum* L. berry extract: characterization, antimicrobial and urease inhibitory activities against *Helicobacter pylori*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 8, p. 9923–41, 2012.
- AUFFAN, M. et al. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. **Nature Nanotechnology**, v. 4, p. 634–641, 2009.

BALASHANMUGAM, P. et al. Phytogetic 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.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2, n. 1, p. 29–32, 2005.

BIROL, H. et al. Preparation of ceramic nanoparticles via cellulose-assisted glycine nitrate process: a review. **RSC Advances**, v. 3, n. 9, p. 2873–2884, 2013.

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, n. 1, p. 212–216, 2009.

BUENO-SILVA, B. et al. Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory process. **Phytomedicine**, v. 23, p. 1583–1590, 2016.

CAO et al. Highly sensitive analysis of flavonoids by zwitterionic microemulsion electrokinetic chromatography coupled with light-emitting diode-induced fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1358, p. 277–284, 5 set. 2014.

CAVENDISH, R. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 127–133, 2015.

CHAHARDOLI, A.; KARIMI, N.; FATTAHI, A. Nigella arvensis leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles: Their characteristic properties and biological efficacy. **Advanced Powder Technology**, v. 29, n. 1, p. 202–210, 2018.

CHAHARDOLI, A.; KARIMI, N.; FATTAHI, A. Biosynthesis, Characterization, Antimicrobial and Cytotoxic Effects of Silver Nanoparticles Using *Nigella arvensis* Seed Extract. **Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR**, v. 16, n. 3, p. 1167–1175, 2017.

CHAN, Y. S.; DON, M. M. Optimization of Process Variables for the Synthesis of Silver Nanoparticles by *Pycnoporus sanguineus* using Statistical Experimental Design. **J Korean Soc Appl Biol Chem**, v. 56, p. 11–20, 2013.

- CORREA, F. R. S. et al. Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-associated transcription factor NF κ B. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 86, p. 162–171, 2017.
- CUMBERLAND, S. A.; LEAD, J. R. Particle size distributions of silver nanoparticles at environmentally relevant conditions. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 52, p. 9099–9105, 2009.
- DAUGSCH, A. et al. Brazilian Red Propolis—Chemical Composition and Botanical Origin. **Advance Access Publication eCAM**, v. 5, n. 4, p. 435–441, 2007.
- DEVI, L. S.; JOSHI, S. Ultrastructures of silver nanoparticles biosynthesized using endophytic fungi. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 3, p. 29–37, 2015.
- DEY, A. et al. Evaluation of the antibacterial efficacy of polyvinylpyrrolidone (PVP) and tri-sodium citrate (TSC) silver nanoparticles. **International Nano Letters**, v. 5, n. 4, p. 223–230, 2015.
- DO NASCIMENTO, T. G. et al. Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. **Nanoscale research letters**, v. 11, n. 301, p. 1-16, 2016.
- DONG, C. et al. Facile and one-step synthesis of monodisperse silver nanoparticles using gum acacia in aqueous solution. **Journal of Molecular Liquids**, v. 196, p. 135–141, 2014.
- DUTTA, P. P. et al. Antimalarial silver and gold nanoparticles: Green synthesis, characterization and in vitro study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 567–580, 2017.
- CHERNOUSOVA, S.; EPPLE, M. Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle, and Metal. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 6, p. 1636–1653, 2013.
- ERJAEI, H.; RAJAIAN, H.; NAZIFI, S. Synthesis and characterization of novel silver nanoparticles using *Chamaemelum nobile* extract for antibacterial application. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 25004, 2017.
- FATIMAH, I. Green synthesis of silver nanoparticles using extract of *Parkia speciosa* Hassk pods assisted by microwave irradiation. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 6, p. 961–969, 2016.

FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. DO C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1860–1870, 2009.

FREIRES, I. A.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 110, p. 267–279, 2016.

GARCIA, M. A. Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications. **JOURNAL OF PHYSICS D: APPLIED PHYSICS**, v. 44, p. 1–20, 2011.

GOMAA, E. Z. Antimicrobial, antioxidant and antitumor activities of silver nanoparticles synthesized by Allium cepa extract: A green approach. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 2017.

GREULICH, C. et al. Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 347–354, 2011.

GUZMAN, M.; DILLE, J.; GODET, S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. **Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine**, v. 8, n. 1, p. 37–45, 2012.

HERRERA, G. M.; PADILLA, A. C.; HERNANDES-RIVERA, SP. Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) Studies of Gold and Silver Nanoparticles Prepared by Laser Ablation. **Nanomaterials (Basel)**, v. 3, n. 1, p. 2079–4991, 2013.

HAIDER, M. J.; MEHDI, M. S. Study of morphology and Zeta Potential analyzer for the Silver Nanoparticles. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v. 5, n. 7, 2014.

HUANG, H.-C. et al. Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 155, p. 344–357, 2011.

IBRAHIM, H. M. M. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 8, p. 265 e275, 2015.

IRAVANI, S. et al. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 6, p. 385–406, 2014.

- JACOB, S. J.; PRASAD, V. L.; SIVASANKAR, S.; MURALIDHARAN, P. Biosynthesis of silver nanoparticles using dried fruit extract of *Ficus carica* - Screening for its anticancer activity and toxicity in animal models. **Food and Chemical Toxicology**, 2017.
- JAIN, S.; MEHATA, M. Medicinal Plant Leaf Extract and Pure Flavonoid Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles and their Enhanced Antibacterial Property. **Nature – Scientific reports**, v. 7, p. 1-13, 2016.
- JASUJA, N. D. et al. Green Synthesis of AgNPs Stabilized with biowaste and their antimicrobial activities. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1325–1332, 2014.
- JIANG, Z.; YUAN, W.; PAN, H. Luminescence effect of silver nanoparticle in water phase. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 61, n. 11, p. 2488–2494, 2005.
- 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, n. 6, p. 1131–1139, 2014.
- KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. 2017.
- KIM, J. S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine**, v. 3, n. 1, p. 95–101, 2007.
- KORA, A. J.; SASHIDHAR, R. B.; ARUNACHALAM, J. Gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*): A template for the green synthesis and stabilization of silver nanoparticles with antibacterial application. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 670–679, 2010.
- KOTHAI, S.; JAYANTHI, B. Anti cancer activity of silver nano particles bio- synthesized using stingless bee propolis (*Tetragonula iridipennis*) of Tamilnadu **Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 40, p. 30–37, 2014.
- KUMAR, P. P. N. V. et al. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Boerhaavia diffusa* plant and their antibacterial activity. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 562–566, 2013.
- KUREK-GORECKA, A. et al. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 1, p. 78–101, 2013.

- LE, A.T. et al. Powerful colloidal silver nanoparticles for the prevention of gastrointestinal bacterial infection. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 3, p. 1-11, 2005.
- LOGESWARI, P.; SILAMBARASAN, S.; ABRAHAM, J. Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 19, p. 311–317, 2015.
- LOPEZ, B. G. -C. et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: an alert for its safe use. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 677–687, 2015.
- LOW, J. et al. Two-dimensional layered composite photocatalysts. **Chemical Communications**, v. 50, n. 74, p. 10768–10777, 2014.
- LUSTOSA, S. R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 447–454, 2008.
- MACHADO, B. A. S. et al. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0145954, 2016.
- MANI, U.; DHANASINGH, S.; ARUNACHALAM, R.; PAUL, E., SHANMUGAM, P.; ROSE, C.; MANDAL, A. B. A Simple and Green Method for the Synthesis of Silver Nanoparticles Using Ricinus Communis Leaf Extract. **Progress in Nanotechnology and Nanomaterials**, v. 2, n. 1, p. 21-25, 2013.
- MATA, R.; NAKKALA, J. R.; SADRAS, S. N. Catalytic and biological activities of green silver nanoparticles synthesized from Plumeria alba (frangipani) flower extract. **Materials Science and Engineering: C**, v. 51, p. 216–225, 2015.
- MELAIYE, A.; YOUNGS, W. J. Silver and its application as an antimicrobial agent. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 15, n. 2, p. 125–130, 2005.
- MITTAL, K. A.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 346–356, 2013.
- MITTAL, A. K. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles: Elucidation of prospective mechanism and therapeutic potential. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 415, p. 39–47, 2014.

- MONAGO-MARAÑA, O.; DURÁN-MERÁS, I.; GALEANO-DÍAZ, T.; MUÑOZ, P. A. Fluorescence properties of flavonoid compounds. Quantification in paprika samples using spectrofluorimetry coupled to second order chemometric tools. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1058–1065, 2016.
- MOORES, A.; GOETTMANN, F. The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications. **New J. Chem.**, v. 30, p. 1121–1132, 2006.
- MENDONÇA, I. C. et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, 2015.
- MOKHTARI, N. et al. Biological synthesis of very small silver nanoparticles by culture supernatant of *Klebsiella pneumoniae*: The effects of visible-light irradiation and the liquid mixing process. **Materials Research Bulletin**, v. 44, n. 6, p. 1415–1421, 2009.
- MUKHERJEE, P. et al. Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by a non-pathogenic and agriculturally important fungus *T. asperellum*. **Nanotechnology**, v. 19, n. 7, p. 1-7, 2008.
- NARENDAR, S.; GOPALAKRISHNAN, S. Nonlocal scale effects on ultrasonic wave characteristics of nanorods. **Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures**, v. 42, n. 5, p. 1601–1604, 2010.
- NATSUKI, J.; NATSUKI, T; Y. HASHIMOTO. A review of silver nanoparticles: Synthesis Methods, Properties and Applications. **International Journal of Materials Science and Applications**, v. 4, n. 5, p. 325–332, 2015.
- NAYAK, D. et al. Bark extract mediated green synthesis of silver nanoparticles: Evaluation of antimicrobial activity and antiproliferative response against osteosarcoma. **Materials Science and Engineering: C**, v. 58, p. 44–52, 2016.
- OLDONI, T. L. C. et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. *Separation and Purification Technology*, v. 77, n. 2, p. 208-213, 2011.
- OLIVEIRA, M. M.; UGARTE, D.; ZANCHET, D.; ZARBIN, A. J. G. Influence of synthetic parameters on the size, structure, and stability of dodecanethiol-stabilized silver nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 292, n. 2, p. 429–435, 2005.

ORTIZ, C.; TORRES, R.; PAREDES, D. Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effect of Ag nanoparticles against Escherichia coli O157:H7 and methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 1717, 2014.

PADALIA, H.; MOTERIYA, P.; CHANDA, S. Green synthesis of silver nanoparticles from marigold flower and its synergistic antimicrobial potential. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, p. 732–741, 2014.

PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium Escherichia coli. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1712–20, 2007.

PANDEY, P.; DAHIYA, M. A BRIEF REVIEW ON INORGANIC NANOPARTICLES. **Journal of Critical Reviews**, v. 3, n. 3, p. 18–26, 2016.

PARAMESHWARAN, R.; KALAISELVAM, S.; JAYAVEL, R. Green synthesis of silver nanoparticles using Beta vulgaris: Role of process conditions on size distribution and surface structure. **Materials Chemistry and Physics**, v. 140, p. 135–147, 2013.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. *Mensagem Doce*, v.58, n.9, p.2-7, 2000.

PENG, S. et al. Reversing the size-dependence of surface plasmon resonances. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 33, p. 14530–4, 2010.

PETER AMALADHAS, T. et al. Biogenic synthesis of silver nanoparticles by leaf extract of *Cassia angustifolia*. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 3, n. 4, p. 45006, 2012.

PILLAI; KAMAT, P. V. What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method? **J. Phys. Chem. B**, v. 108, n. 3, p. 945–951, 2003.

PINTO, V. V.; FERREIRA, M. J.; SILVA, R.; SANTOS, H. A.; SILVA, F; PEREIRA, C. M. Long time effect on the stability of silver nanoparticles in aqueous medium: Effect of the synthesis and storage conditions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 364, n. 1–3, p. 19–25, 2010.

- POURMORTAZAVI, S. M. et al. Procedure optimization for green synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of *Eucalyptus oleosa*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 136, p. 1249–1254, 2015.
- PRIYADARSHINI, S. et al. Synthesis of anisotropic silver nanoparticles using novel strain, *Bacillus flexus* and its biomedical application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2012.
- RADHAKRISHNAN, K. et al. Synthesis of silver nanoparticles using flavonoid : apigenin and its antibacterial effect. **European Journal of pharmaceutical and medical research**, v. 4, n. 1, p. 422–426, 2017.
- RAJA, S.; RAMESH, V.; THIVAHARAN, V. Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Calliandra haematocephala* leaf extract, their antibacterial activity and hydrogen peroxide sensing capability. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 253–261, 2017.
- RAO, K. J.; PARIA, S. Green synthesis of silver nanoparticles from aqueous *Aegle marmelos* leaf extract. **Materials Research Bulletin**, v. 48, n. 2, p. 628-634, 2013.
- RASTOGI, L.; ARUNACHALAM, J. Sunlight based irradiation strategy for rapid green synthesis of highly stable silver nanoparticles using aqueous garlic (*Allium sativum*) extract and their antibacterial potential. **Materials Chemistry and Physics**, v. 129, p. 558–563, 2011.
- RAVICHANDRAN, V. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Atrocarpus altilis* leaf extract and the study of their antimicrobial and antioxidant activity. **Materials Letters**, v. 180, p. 264–267, 2016.
- REDDY N. J. et al. Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of green synthesized silver nanoparticles by *Piper longum* fruit. **Materials Science and Engineering C**, v. 34, p. 115–122, 2014.
- REGUEIRA, M. S. et al. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 572–580, 2017.
- RIGHI, A. A. et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2363–2370, 2011.

ROY, N. et al. Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles by Indian propolis and its constituents. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, p. 317–325, 2010.

SALEH, T. A.; ALAQAD, K. Environmental & Analytical Toxicology Gold and Silver Nanoparticles: Synthesis Methods, Characterization Routes and Applications towards Drugs. **J Environ Anal Toxicol**, v. 6, 2016.

SCHRÖFEL, A. et al. Applications of biosynthesized metallic nanoparticles - A review. **Acta Biomaterialia**, v. 10, p. 4023–4042, 2014.

SEABEAN. Disponível em: http://www.seabean.com/guide/Dalbergia_ecastaphyllum/. Acesso em 17 de novembro de 2017.

SHAIK, M. et al. “Miswak” Based Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Evaluation and Comparison of Their Microbicidal Activities with the Chemical Synthesis. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1478, 2016.

SHAMELI, K. et al. Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Curcuma longa* tuber powder. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5603–5610, 2012.

SHAMS, S.; POURSEYEDI, S.; RAFSANJANI, H.H. Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Eco-Friendly and Antibacterial. **Iranian Nanotechnology Society**, v. 10, n. 2, p. 127–132, 2014.

SHAW, D. J. Introdução à química dos colóides e de superfícies. Tradução: Juergen Heinrich Maar. Edgard Blücher, Ed. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1975.

SIERRA, J. A. et al. Biogenic approaches using citrus extracts for the synthesis of metal nanoparticles: the role of flavonoids in gold reduction and stabilization. **New J. Chem. New J. Chem**, v. 40, p. 1420–1429, 2016.

SIGNORI, A.M et al. Formation of Catalytic Silver Nanoparticles Supported on Branched Polyethyleneimine Derivatives. **Langmuir**, v. 26, n. 22, p. 17772–17779, 2010.

ŠILEIKAITĖ, A. et al. Investigation of Silver Nanoparticles Formation Kinetics During Reduction of Silver Nitrate with Sodium Citrate. **Materials Science**, v. 15, p. 21-27, 2016.

SILVA, B. B. et al. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. **Advance Access Publication eCAM**, v. 5, n. 3, p. 313–316, 2007.

SILVER, S.; PHUN, L. T.; SILVER, G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 33, p. 627–634, 2006.

SREEPRASAD T.S., PRADEEP T. **Noble Metal Nanoparticles**. In: Vajtai R. (eds) Springer Handbook of Nanomaterials. Springer, Berlin, 2013.

SRIKAR, S. H. et al. Green Synthesis of Silver Nanoparticles: A Review. **Green and Sustainable Chemistry**, v. 6, n. 6, p. 34–56, 2016.

SUDHA, A. JEYAKANTHAN, J.; SRINIVASAN, P. Green synthesis of silver nanoparticles using *Lippia nodiflora* aerial extract and evaluation of their antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects. **Resource-Efficient Technologies**, v. 3, n. 4, p. 506-515, 2017.

SUN, Y.; XIA, Y. Gold and silver nanoparticles: A class of chromophores with colors tunable in the range from 400 to 750 nm. **The Royal Society of Chemistry**, v. 128, p. 686-691, 2003.

SUN, Q. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using tea leaf extract and evaluation of their stability and antibacterial activity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 444, p. 226–231, 2014.

TAHERINIYA, S.; BEHBOODI, Z. Comparing green chemical methods and chemical methods for the synthesis of titanium dioxide nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 7, n. 12, p. 4927–4932, 2016.

TELES, F. et al. Brazilian Red Propolis Attenuates Hypertension and Renal Damage in 5/6 Renal Ablation Model. **PLOS ONE**, v. 10, n. 1, p. e0116535, 2015.

THAKKAR, K. N.; MHATRE, S. S.; PARIKH, R. Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 2, p. 257–262, 2010.

TIPPAYAWAT, P. et al. Green synthesis of silver nanoparticles in aloe vera plant extract prepared by a hydrothermal method and their synergistic antibacterial activity. **PeerJ**, v. 4, p. e2589, 2016.

TOMASZEWSKA, E. et al. Detection Limits of DLS and UV-Vis Spectroscopy in Characterization of Polydisperse Nanoparticles Colloids. **Journal of Nanomaterials**, v. 2013, p. 1–10, 2013.

VELU, M. et al. Fabrication, optimization, and characterization of noble silver nanoparticles from sugarcane leaf (*Saccharum officinarum*) extract for antifungal application. **3 Biotech**, v. 7, n. 2, p. 1-9, 2017.

VELUSAMY, P. et al. Biopolymers Regulate Silver Nanoparticle under Microwave Irradiation for Effective Antibacterial and Antibiofilm Activities. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1-14, 2016.

WAGH, V. D.; D., V. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. **Advances in pharmacological sciences**, v. 2013, p. 308249, 2013.

WEBER. Disponível em

<https://www.weberexport.com.br/portugu%C3%AAs/produtos/propolis>. Acesso em: 17 de novembro de 2017.

YOKSAN, R.; CHIRACHANCHAI, S. Silver nanoparticle-loaded chitosan-starch based films: Fabrication and evaluation of tensile, barrier and antimicrobial properties. **Materials Science and Engineering: C**, v. 30, n. 6, p. 891-89, 2010.

ZABAIYOU, N. et al. Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. **Chem Phys Lipids**, v. 207, p. 214-222, 2017.

ZHANG, J. Z.; NOGUEZ, C. Plasmonic Optical Properties and Applications of Metal Nanostructures. **Plasmonics**, v. 3, n. 4, p. 127–150, 2008.