



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

CAMPUS DARCY RIBEIRO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANBIOTECNOLOGIA

TESE DE DOUTORADO

**FITOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR *Ilex paraguariensis*:
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOATIVIDADES**

ARIANE PANDOLFO SILVEIRA

Brasília-DF

2019

ARIANE PANDOLFO SILVEIRA

**FITOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR *Ilex paraguariensis*:
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOATIVIDADES**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientador: Dr. Luciano Paulino da Silva

Brasília-DF

2019

ARIANE PANDOLFO SILVEIRA

**FITOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR *Ilex paraguariensis*:
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOATIVIDADES**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Nanociência e Nanobiotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Luciano Paulino da Silva (Presidente - Orientador)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dr. Paulo Cesar de Moraes
Universidade de Brasília – UnB

Dra. Sonia Maria de Freitas
Universidade de Brasília – UnB

Dr. Marcelo Henrique Soller Ramada
Universidade Católica de Brasília – Campus Avançado Asa Norte

Dra. Cíntia Caetano Bonatto
TecSinapse – Tecnologia da Informação

Brasília-DF, 25 de fevereiro de 2019.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

REITORA

Dra. Márcia Abrahão Moura

VICE-REITOR

Dr. Enrique Huelva

DECANA DE PÓS-GRADUAÇÃO

Dra. Helena Eri Shimizu

DECANA DE PESQUISA E INOVAÇÃO

Dra. Maria Emília Machado Telles Walter

DIRETOR DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Dr. Jaime Martins de Santana

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA**

Dr. Ricardo Bentes de Azevedo

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Luciano Paulino da Silva, pela disponibilidade e orientação. Obrigada por me receber no grupo de pesquisa e me reapresentar o universo da nanociência, juntamente com as diversas possibilidades frente a ele.

À Dra. Cíntia Caetano Bonatto, pelos primeiros ensinamentos experimentais relacionados à fitossíntese de nanopartículas e caracterização dos materiais, além das inúmeras contribuições científicas ao longo deste período.

À Dra. Vera Lúcia Perussi Polez, pelas colaborações e ensinamentos relacionados aos ensaios bioquímicos e bioensaio de citotoxicidade; e por disponibilizar a infraestrutura do Laboratório de Prospecção e Compostos Bioativos da Embrapa Cenargen, para a realização dos experimentos.

Ao Professor Dr. Marcelo Henrique Sousa, por disponibilizar o equipamento e fornecer instruções para a aquisição dos difratogramas de raios X, além de contribuir com novas abordagens e interpretação dos resultados para esta técnica.

Ao Dr. Cláudio Afonso Pinho Lopes, pelo auxílio no preparo das amostras e nas aquisições das imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Dr. Clenilson Martins Rodrigues e à MSc. Flávia Soares Vieira, pela disposição em realizar os experimentos de cromatografia e espectrometria de massas; além da colaboração quanto à interpretação dos resultados.

Ao Hermano Dantas Farias, pela colaboração nas aquisições dos espectros de infravermelho.

À Dra. Marlinda Lobo de Souza, por fornecer a linhagem celular utilizada no bioensaio de citotoxicidade.

Ao Doutorando Lucio de Assis Araujo Neto, pela contribuição teórica e experimental relacionada ao bioensaio antibacteriano.

À Valdina Ferreira de Paiva e ao Murillo Georgio Pereira, do Jardim Botânico de Brasília, por disponibilizarem a planta para este estudo e tornar possível parte da investigação desta Tese.

Aos Professores Dr. Paulo Cesar de Moraes e Dr. Marcelo Henrique Soller Ramada, pela recepção em seus laboratórios, atenção e sugestões sobre possíveis maneiras de investigar os materiais/ nanopartículas.

Ao Dr. Luis Miguel Ramirez Rivera, ao Dr. Rodrigo Meneses de Barros, à Biotecnologista Ivy Garcez Reis e ao Analista de Sistemas Rafael Pirolla, pelas infindáveis discussões (nem sempre científicas) sobre o universo (nem sempre nano) e tudo o mais.

À equipe do Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO), pelas construções científicas, apresentações de novas ideias e por me permitir crescer mais a cada simpósio, seminário, cafés e eventos acadêmicos.

Ao Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO), à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, à Embrapa Agroenergia e à Universidade de Brasília, pela infraestrutura e recursos necessários para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF), pelo aporte financeiro e bolsa.

SILVEIRA, A.P. **Fitossíntese de nanopartículas de prata por *Ilex paraguariensis*: propriedades físico-químicas e bioatividades.** 2019. 107p. Tese de doutorado - Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília - UnB, Brasília-DF, 2019.

RESUMO

O método de fitossíntese (síntese via plantas) permite que os metabólitos secundários presentes em uma planta atuem simultaneamente como agente redutor dos íons metálicos e estabilizante de nanopartículas de prata (AgNPs). Neste estudo, sete extratos de *Ilex paraguariensis*, advindos das fitorregiões A, B e C, respectivamente Erechim, Canoinhas e Brasília, foram utilizados para produção de AgNPs, objetivando investigar a influência (i) da concentração do extrato aquoso em relação a temperatura reacional, (ii) do método de cultivo da planta, (iii) do aspecto do material e diferentes partes da planta utilizadas na reação, quanto às características dos extratos, propriedades físico-químicas das AgNPs e (iv) quanto às bioatividades antibacteriana e citotóxica em células de insetos, as quais algumas destas nanoformulações foram submetidas. Nesse contexto, os materiais foram caracterizados por espectrofotometria na região do UV-visível que indicou formação de AgNPs para cinco dos sete extratos; por espalhamento de luz dinâmico sugerindo AgNPs com diâmetro hidrodinâmico na faixa nanométrica para maioria das formulações; índices de polidispersividade baixos a moderados; e potencial Zeta negativo e sugestivo de instabilidade incipiente. As microscopias de força atômica e eletrônica de transmissão foram utilizadas para determinação das morfologias das AgNPs que forneceram resultados distintos, mostrando AgNPs esféricas ou quase-esféricas na primeira abordagem e com formas variadas na segunda. A difração de raios X confirmou as reflexões e perfis característicos da prata nanoestruturada. Os ensaios bioquímicos apontaram uma composição rica em compostos fenólicos e antioxidantes na *I. paraguariensis*. A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier indicou a presença do sal metálico de prata e de alguns dos grupamentos funcionais correspondentes aos fitoquímicos tipicamente encontrados na planta; os quais também foram identificados em função das possíveis classes e compostos químicos, utilizando a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com ionização por *electrospray* e ao detector de arranjo de fotodiodos. Em adição, as nanoformulações foram avaliadas contra *E. coli* e *S. aureus*, exibindo, no mínimo, atividade bacteriostática; e em linhagem celular de *Spodoptera frugiperda* (Sf21), demonstrando manutenção da viabilidade celular. Os resultados correspondentes às variáveis aqui exploradas mostraram-se potenciais para a contribuição do desenvolvimento de estudos relacionados aos eventos envolvidos na fitossíntese de AgNPs.

Palavras-chave: plantas, bioconversão, nanossíntese, nanocaracterização.

SILVEIRA, A.P. **Phytosynthesis of silver nanoparticles by *Ilex paraguariensis*: physicochemical properties and bioactivities.** 2019. 107p. Doctoral thesis - Postgraduate Program in Nanoscience and Nanobiotechnology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília - UnB, Brasília-DF, 2019.

ABSTRACT

The phytosynthesis method (synthesis using plants) allows the secondary metabolites present in a plant to act simultaneously as a metal ion reducing agent and silver nanoparticle stabilizer (AgNPs). In this study, seven extracts of *Ilex paraguariensis*, from the phytoregions A, B and C, respectively Erechim, Canoinhas and Brasília, were used to produce AgNPs, aiming to investigate the influence (i) of aqueous extract concentration regarding reaction temperature, (ii) plant cultivation method, (iii) material aspect and different parts of the plant used in the reaction, as to the extract characteristics, physicochemical properties of the AgNPs and (iv) as to the antibacterial and cytotoxic (insect cells) bioactivities to which some of these nanoformulations were submitted. In this context, the materials were characterized by spectrophotometry in the UV-visible region that indicated the formation of AgNPs for five of the seven extracts; by dynamic light scattering suggesting AgNPs with hydrodynamic diameter in the nanometric range for most formulations; low to moderate polydispersity indices; and Zeta potential negative and suggestive of incipient instability. Atomic force and transmission electron microscopy were used to determine the morphologies of the AgNPs that provided different results, showing spherical or quasi-spherical AgNPs in the first approach and with different forms in the second. X ray diffraction confirmed the reflections and characteristic profiles of nanostructured silver. The biochemical assays indicated a composition rich in phenolic compounds and antioxidants in *I. paraguariensis*. Fourier transform infrared spectroscopy indicated the presence of silver metallic salt and some of the functional groups correspondents to the phytochemicals typically found in the plant; which were also identified according to possible chemical classes and compounds, using ultra-high performance liquid chromatography coupled to *electrospray* ionization mass spectrometry and photodiode array. In addition, nanoformulations were evaluated against *E. coli* and *S. aureus*, exhibiting at least bacteriostatic activity; and in the cell line of *Spodoptera frugiperda* (Sf21), demonstrating maintenance of cellular viability. The corresponding results to the variables here explored showed potential for the contribution of the studies development related to the events involved in the phytosynthesis of AgNPs.

Keywords: plants, bioconversion, nanosynthesis, nanocharacterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo da organização desta Tese, indicando o material de *Ilex paraguariensis* e o contexto abordado em cada seção.

Figura 2: Árvore de *Ilex paraguariensis* situada no Jardim Botânico de Brasília- DF.

Figura 3: Esquema representativo do Extrato A1, proveniente da fitorregião A (Rio Grande do Sul) e a partir de quatro concentrações distintas. O material bruto da planta, constituída por folhas, pecíolos e ramos foi adquirido comercialmente em sua forma pulverizada.

Figura 4: Curvas de monitoramento das reações durante (a) 3,5 h e (b) 24 h após o início das reações com extrato aquoso de *I. paraguariensis*, em 450 nm. Para as concentrações finais de extrato aquoso 0,1; 1; 10 mg/mL foram aplicados ajustes exponenciais utilizando a função *MnMolecular1* e para a concentração de 50 mg/mL foi aplicado um ajuste sigmoidal (*sigmoidal/ boltzmann*), ambos disponíveis no software OriginPro 2015.

Figura 5: Curvas de absorção na região do UV-Vis e tubos das reações a 50°C com extrato aquoso de *I. paraguariensis*. Materiais provenientes do Extrato A1 nas concentrações finais de (a,b) 50 mg/mL, (c,d) 10 mg/mL, (e,f) 1 mg/mL e (g,h) 0,1 mg/mL. As linhas em cinza referem-se aos controles de extrato. As linhas pretas referem-se à solução de AgNO₃.

Figura 6: Cinéticas das reações em diferentes temperaturas, avaliadas por 3,5 h e velocidade média da reação (k) das AgNPs obtidas utilizando extrato aquoso de *I. paraguariensis*: (a,b) A1(1) e (c,d) A1(10).

Figura 7: Lote 1 das AgNPs sintetizadas a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C utilizando extrato aquoso de *I. paraguariensis*: (a) Distribuição das absorbâncias mensuradas entre 350 e 550 nm e (b) seus respectivos máximos apresentados nos histogramas, para o grupo de amostras A1(1).

Figura 8: Lote 1 das AgNPs sintetizadas a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C utilizando extrato aquoso de *I. paraguariensis*: (a) Distribuição das absorbâncias mensuradas entre 350 e 550 nm e (b) seus respectivos máximos apresentados nos histogramas, para o grupo de amostras A1(10).

Figura 9: Curvas de distribuição de diâmetros hidrodinâmicos (dados em intensidade (%)) das AgNPs sintetizadas com extrato aquoso de *I. paraguariensis*: (a) A1(1) e (b) A1(10), monitoradas ao longo de 365 dias.

Figura 10: Curvas de absorção das AgNPs sintetizadas a 50°C utilizando extrato aquoso de *I. paraguariensis* produzidas em cinco lotes, sendo os Lotes 1, 2, 3 e 4 produzidos a partir do material bruto armazenado a temperatura ambiente e o Lote 5 produzido a partir do material bruto armazenado sob congelamento: (a) A1(1) e (b) A1(10).

Figura 11: Curvas de distribuição de diâmetros hidrodinâmicos (dados em intensidade (%)) obtidas nos dias das sínteses das AgNPs produzidas com extrato de *I. paraguariensis* em cinco lotes distintos, sendo os Lotes 1, 2,3 e 4 produzidos a partir do material bruto armazenado a temperatura ambiente e o Lote 5 produzido a partir do material bruto armazenado sob congelamento: (a) A1(1) e (b) A1(10).

Figura 12: Curvas de absorção das AgNPs sintetizadas a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C utilizando extrato aquoso de *I. paraguariensis* para os grupos de amostras: (a) A1(1) e (b) A1(10), em dois lotes distintos, sendo as do Lote 1 representadas pelas linhas contínuas e do Lote 2 pelas linhas tracejadas.

Figura 13: Curvas de distribuição de diâmetros hidrodinâmicos (dados em intensidade (%)) (obtidas nos dias das sínteses) das AgNPs produzidas com extrato de *I. paraguariensis* nas temperaturas de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C em dois lotes distintos, sendo o Lote 1 representado pelas linhas contínuas e o Lote 2 pelas linhas tracejadas: (a) A1(1) e (b) A1(10).

Figura 14: Micrografias obtidas por MET das AgNPs sintetizadas utilizando o extrato aquoso de *I. paraguariensis*. (a-c) A1(1) e (d-f) A1(10), com variedade de tamanhos e morfologias.

Figura 15: Distribuições de diâmetros secos, dados em altura, das AgNPs (Lote 1) sintetizadas com extrato aquoso de *I. paraguariensis* na temperatura de 50°C (histogramas) e as respectivas topografias representativas de (a-c) A1(1) e (b-d) A1(10), obtidas por MFA. Os ajustes aplicados nos histogramas foram realizados a partir da função de densidade de probabilidade com distribuição *Log-normal*, utilizando o software OriginPro 2015.

Figura 16: Imagens topográficas, obtidas por MFA, das AgNPs sintetizadas com extrato aquoso de *I. paraguariensis* na concentração final de extrato aquoso de 10 mg/mL e nas temperaturas de (a) 20°C e (b) 80°C, também representativas para as demais temperaturas avaliadas (10, 30, 40, 60 e 70°C).

Figura 17: Distribuições dos diâmetros secos, em altura, das AgNPs sintetizadas com extrato aquoso de *I. paraguariensis* a 10, 20, 30 e 40°C (Lote 1), obtidos por MFA: (a, c, e, g) A1(1) e (b, d, f, h) A1(10). Os ajustes aplicados nos histogramas foram realizados a partir da função de densidade de probabilidade com distribuição *Log-normal*, utilizando o software OriginPro 2015.

Figura 18: Distribuições dos diâmetros secos, em altura, das AgNPs sintetizadas com extrato aquoso de *I. paraguariensis* a 50 (Lote 2), 60, 70 e 80°C (Lote 1), obtidos por MFA: (a, c, e, g) A1(1) e (b, d, f, h) A1(10). Os ajustes aplicados nos histogramas foram realizados a partir da função de densidade de probabilidade com distribuição *Log-normal*, utilizando o software OriginPro 2015.

Figura 19: Difractogramas de raios X das AgNPs e possíveis AgCl-NPs sintetizadas utilizando extrato aquoso de *I. paraguariensis* na concentração final de 10 mg/mL [A1(10)] e a partir das temperaturas de 20, 50 e 80°C.

Figura 20: Espectros obtidos por FTIR das amostras sintetizadas utilizando extrato aquoso de *I. paraguariensis* obtidas: nitrato de prata (linha preta), extrato puro (linha verde), A1(1) (linha vermelha) e A1(10) (linha azul).

Figura 21: Esquema representativo do Extrato A1 (método tradicional), proveniente da Região A (Rio Grande do Sul) e Extrato B1 (método orgânico), proveniente da Região B (Santa Catarina). As plantas, constituídas por folhas, pecíolos e ramos foram adquiridas comercialmente em sua forma pulverizada.

Figura 22: UHPLC-PDA do extrato aquoso de *I. paraguariensis* proveniente da fitorregião A e obtido pelo método de cultivo tradicional: (a) frações eluídas por UHPLC e (b) os respectivos espectros UV.

Figura 23: UHPLC-PDA do extrato aquoso de *I. paraguariensis* proveniente da fitorregião B e obtido pelo método de cultivo orgânico: (a) frações eluídas por UHPLC e (b) os respectivos espectros UV.

Figura 24: Cromatogramas obtidos por UHPLC-ESI(+)-MS dos extratos aquosos de *I. paraguariensis*. (a) extrato A1 e (b) extrato B1.

Figura 25: Curvas cinéticas de absorção dos extratos de plantas de *I. paraguariensis* cultivadas tradicionalmente [A1(10)] (linha azul) e organicamente [B1(10)] (linha verde), do controle interno (DPPH+água) (linha preta), do controle negativo (DPPH+metanol) (linha cinza claro) e do antioxidante padrão de BHT (linha cinza escuro), com leitura espectrofotométrica a 517 nm.

Figura 26: Curva padrão do ácido gálico com leitura espectrofotométrica a 750 nm, utilizada para quantificação de fenóis totais.

Figura 27: (a) Cinética das reações e (b) curvas de absorção indicativas de RPS para A1(10) e B1(10), com seus respectivos controles contendo somente extrato aquoso de *I. paraguariensis*.

Figura 28: (a) Curvas de distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos (dados em intensidade (%)) e (b) espectros FT-IR para A1(10) e B1(10) de *I. paraguariensis*.

Figura 29: Difractogramas de raios X das AgNPs e possíveis AgCl-NPs sintetizadas a 50°C utilizando extratos aquosos de *I. paraguariensis* cultivadas a partir dos métodos tradicional [A1(10)] e orgânico [B1(10)].

Figura 30: *I. paraguariensis* proveniente do Jardim Botânico de Brasília: a) *in natura*, antes do processo de confecção de exsicata e b) depois da confecção de exsicata, contendo as informações oficiais de número de tombo, espécie, família, nome popular, finalidade com a qual a planta foi coletada (fins acadêmicos) e identificação da responsável pelo estudo (Silveira, AP).

Figura 31: Esquema representativo dos Extratos C1, C2, C3, C4 e C5, provenientes da Região C (Jardim Botânico de Brasília). A planta, constituída por folhas, pecíolos e ramos, foi coletada, assepsiada e separada por partes, em suas formas fragmentadas e pulverizadas.

Figura 32: UHPLC-PDA do extrato aquoso de *I. paraguariensis* C1 (folhas e pecíolos *in natura* fragmentados): (a) frações eluídas por UHPLC e (b) os respectivos espectros UV.

Figura 33: UHPLC-PDA do extrato aquoso de *I. paraguariensis* C2 (folhas e pecíolos *in natura*, mantido sob congelamento e posteriormente pulverizado): (a) frações eluídas por UHPLC e (b) os respectivos espectros UV.

Figura 34: Cromatogramas obtidos por UHPLC-ESI(+)-MS a partir dos extratos aquosos de *I. paraguariensis*. a) extrato C1 e b) extrato C2.

Figura 35: Cinéticas das reações antioxidantes para as amostras de *I. paraguariensis* provenientes da fitorregião C. O ensaio foi monitorado por 30 min com leitura espectrofotométrica a 517 nm.

Figura 36: UHPLC-PDA do extrato aquoso de *I. paraguariensis* C3 (folhas e pecíolos *in natura* pulverizados): (a) frações eluídas por UHPLC e (b) os respectivos espectros UV.

Figura 36: UHPLC-PDA do extrato aquoso de *I. paraguariensis* C3 (folhas e pecíolos *in natura* pulverizados): (a) frações eluídas por UHPLC e (b) os respectivos espectros UV.

Figura 37: Cromatograma obtido por UHPLC-ESI(+)-MS do extrato aquoso de *I. paraguariensis* C3.

Figura 38: UHPLC-PDA do extrato aquoso de *I. paraguariensis* C4 (ramos *in natura* pulverizados): (a) frações eluídas por UHPLC e (b) os respectivos espectros UV.

Figura 39: Cromatograma obtido por UHPLC-ESI(+)-MS do extrato aquoso de *I. paraguariensis* C4.

Figura 40: UHPLC-PDA do extrato aquoso de *I. paraguariensis* C5 (folhas, pecíolos e ramos *in natura* pulverizados): (a) frações eluídas por UHPLC e (b) os respectivos espectros UV.

Figura 41: Cromatograma obtido por UHPLC-ESI(+)-MS do extrato aquoso de *I. paraguariensis* C5.

Figura 42: (a) Curvas de absorção indicativas de RPS e (b) seus respectivos controles contendo somente extrato aquoso de *I. paraguariensis*, para as amostras C1(10), C2(10), C3(10), C4(10) e C5(10).

Figura 43: (a) Curvas de distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos (dados em intensidade (%)) e (b) espectros FT-IR para C3(10), C4(10) e C5(10).

Figura 44: Difratogramas de raios X das AgNPs e possíveis AgCl-NPs sintetizadas a 50°C utilizando extrato aquoso de *I. paraguariensis* obtidos a partir de partes distintas da planta C3(10), C4(10), C5(10).

Figura 45: Esquema representativo dos Extratos A1, B1, C5, provenientes das Regiões A (Rio Grande do Sul), B (Santa Catarina) e C (Jardim Botânico de Brasília). As plantas, constituídas por folhas, pecíolos e ramos, foram adquiridas comercialmente (A e B) e processada manualmente (C), em suas formas pulverizadas.

Figura 46: Topografias representativas obtidas por MFA das AgNPs produzidas utilizando extratos aquosos de *I. paraguariensis*: a) A1(10), b) B1(10) e c) C5(10), indicando morfologias esféricas ou quase-esféricas.

Figura 47: Ensaio de viabilidade celular (MTT) das AgNPs sintetizadas com os extratos aquosos de *I. paraguariensis* na concentração final de 10 mg/mL. Materiais provenientes das fitorregiões A, B e C: A1(10), B1(10) e C5(10), com seus respectivos controles Ctrl A1(10), Ctrl B1(10) e Ctrl C5(10). Para a análise estatística, foi aplicado o teste de Tukey ($p < 0,05$), com diferenças significativas descritas por símbolos correspondentes aos conjuntos de AgNPs [α =A1(10); β = B1(10); γ = C5(10)], dos respectivos controles contendo somente extratos aquosos [δ = Ctrl A1(10); ε = Ctrl B1(10); ζ = Ctrl C5(10)] e dos controles positivo [η = C⁺], negativo [θ = C⁻] e de sal metálico [φ = Ag⁺].

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1: Materiais de *I. paraguariensis* classificados de acordo com a fitorregião de origem (A=Erechim, RS; B= Canoinhas, SC e C= Brasília, DF), parte da planta utilizada na reação, aspecto do material e nome de referência do respectivo extrato aquoso obtido.

Tabela 2: Etapas referentes às reações indicando as concentrações de extratos aquosos, AgNO₃ e as temperaturas utilizadas, respectivamente a cada material bruto (A, B e C) de *Ilex paraguariensis*.

Tabela 3: Z-average, PDI e potencial Zeta de superfície das A1(1) e A1(10) sintetizadas com o extrato aquoso de *I. paraguariensis* a 50°C e monitoradas ao longo de 365 dias. Os valores estão representados como a média ± desvio padrão da média das medidas obtidas a partir de três leituras individuais. Para a análise estatística, foi aplicado o teste de Tukey ($p < 0,05$), com diferenças significativas descritas por símbolos correspondentes a cada dia de monitoramento (0=α; 60=β; 90=γ; 120=δ; 300=ε; 365=ζ) e cada concentração de extrato aquoso (representada por A1(1)=*).

Tabela 4: Z-average, PDI e potencial Zeta de superfície das amostras A1(1) e A1(10), sintetizadas com extrato aquoso de *I. paraguariensis* a 50°C e em cinco lotes distintos, obtidos no dia da síntese. Os valores estão representados como a média ± erro padrão da média das medidas obtidas a partir de três leituras individuais. Para a análise estatística foi aplicado o teste de Tukey ($p < 0,05$), com diferenças significativas descritas por símbolos correspondentes a cada lote sintetizado (Lote 1=α; Lote 2=β; Lote 3=γ; Lote 4=δ).

Tabela 5: Z-average, PDI e potencial Zeta de superfície da amostra A1(1) obtidos no dia da síntese com extrato aquoso de *I. paraguariensis* em diferentes temperaturas sob as mesmas condições. Os valores estão representados como a média ± desvio padrão (para o mesmo lote) e a média ± erro padrão (entre lotes distintos) da média das medidas obtidas a partir de três leituras. Para análise estatística foi aplicado o teste de Tukey ($p < 0,05$), com diferença significativa, entre os lotes, descrita pelo símbolo correspondente ao Lote 1 das AgNPs sintetizadas (Lote 1=α) e, para o mesmo lote, em relação a estabilidade, avaliada 365 dias após a síntese, descrita pelo símbolo correspondente ao Lote comparativo (Lote comparativo=β).

Tabela 6: Z-average, PDI e potencial Zeta de superfície da amostra A1(10) obtidos no dia da síntese com extrato aquoso de *I. paraguariensis* em diferentes temperaturas sob as mesmas condições. Os valores estão representados como a média ± desvio padrão (para o mesmo lote) e a média ± erro padrão (entre lotes distintos) da média das medidas obtidas a partir de três leituras. Para análise estatística foi aplicado o teste de Tukey ($p < 0,05$), com diferença significativa, entre os lotes, descrita pelo símbolo correspondente ao Lote 1 das AgNPs sintetizadas (Lote 1=α) e, para o mesmo lote, em relação a estabilidade, avaliada 365 dias após a síntese, descrita pelo símbolo correspondente ao Lote comparativo (Lote comparativo=β).

Tabela 7: Reflexões (índices de Miller) e os respectivos ângulos dos picos característicos da prata nanoestruturada e da possível presença de nanopartículas de cloreto de prata, obtidas por fitossíntese utilizando extrato aquoso de *I. paraguariensis* a partir das temperaturas de 20, 50 e 80°C.

Tabela 8: Compilação dos tempos de retenção (T_R) referentes às frações eluídas por UHPLC-PDA dos extratos A1 e B1 de *I. paraguariensis*. Cada T_R corresponde a uma classe de fitoquímicos identificados a partir dos padrões experimentais.

Tabela 9: Compilação dos tempos de retenção (T_R) referentes às frações eluídas por UHPLC-ESI(+)-MS dos extratos A1 e B1 de *I. paraguariensis*. Cada T_R corresponde a uma classe de fitoquímicos identificados a partir dos padrões experimentais.

Tabela 10: Comparação entre os métodos de cultivo tradicional e orgânico de *I. paraguariensis*: Quantificação de antioxidantes e fenóis totais. Os valores estão representados como a média ± desvio padrão da média das medidas realizadas em triplicata.

Tabela 11: Comparação entre os métodos de cultivo tradicional e orgânico: Z-average, PDI e potencial Zeta de superfície das amostras A1(10) e B1(10) de *I. paraguariensis*, obtidos no dia da síntese a 50°C, sob as mesmas condições. Os valores estão representados como a média ± erro padrão da média das medidas obtidas a partir de três leituras individuais.

Tabela 12: Comparação entre os aspectos e partes de *I. paraguariensis* quanto à quantificação de antioxidantes e fenóis totais. Os valores estão representados como a média \pm desvio padrão da média das medidas realizadas em triplicata.

Tabela 13: Compilação dos tempos de retenção (T_R) referentes às frações eluídas por UHPLC-PDA dos extratos aquosos de *I. paraguariensis* C1, C2, C3, C4 e C5. Cada T_R corresponde a uma classe de fitoquímicos identificados a partir dos padrões experimentais.

Tabela 14: Compilação dos tempos de retenção (T_R) referentes às frações eluídas por UHPLC-ESI(+)-MS dos extratos aquosos de *I. paraguariensis* C1, C2, C3, C4 e C5. Cada T_R corresponde a uma classe de fitoquímicos identificados a partir dos padrões experimentais.

Tabela 15: Comparação entre as partes de *I. paraguariensis* utilizadas na síntese de AgNPs, proveniente da fitoregião C: Z-average, PDI e potencial Zeta de superfície das amostras C3(10), C4(10) e C5(10), obtidos no dia da síntese a 50°C, sob as mesmas condições. Os valores estão representados como a média \pm erro padrão da média das medidas obtidas a partir de três leituras individuais.

Tabela 16: Ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) das amostras de AgNPs sintetizadas com extrato aquoso de *I. paraguariensis* [A1(1) e A1(10)], seus respectivos controles de extrato (Ctrl(1) e Ctrl(10)) e o controle do sal metálico AgNO₃, avaliados contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os sinais positivos indicam o efeito antibacteriano provocado pelas amostras. Os sinais negativos indicam que não houve qualquer atividade.

Tabela 17: Z-average, PDI e potencial Zeta de superfície dos materiais de *I. paraguariensis* provenientes das fitoregiões A (RS), B (SC) e C (DF): AgNPs A1(10), AgNPs B1(10), AgNPs C5(10) e seus respectivos controles contendo somente extrato aquoso Ctrl A1(10), Ctrl B1(10) e Ctrl C5(10), apresentados comparativamente. Os valores estão representados como a média \pm erro padrão da média das medidas obtidas a partir de três leituras individuais.

Quadro 1: Compilação das seções indicando os materiais brutos, parâmetros reacionais, teor total de antioxidantes (dado em função do percentual de inibição) e compostos fenólicos presentes em cada extrato aquoso avaliado; além do potencial formador de AgNPs e bioatividades conferidas às mesmas. Todos os bioensaios foram conduzidos a partir das AgNPs sintetizadas na temperatura de 50°C.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

Ag – prata

AgCl – cloreto de prata

AgNO₃ – nitrato de prata

AgNPs – nanopartículas de prata

AgCl-NPs – nanopartículas de cloreto de prata

A1 – extrato aquoso proveniente da fitorregião A na condição 1

A1(0,1) – extrato aquoso A1 na concentração final de 0,1 mg/mL com adição de AgNO₃

Ctrl A1(0,1) – extrato aquoso A1 na concentração final de 0,1 mg/mL sem adição de AgNO₃

A1(1) – extrato aquoso A1 na concentração final de 1 mg/mL com adição de AgNO₃

Ctrl A1(1) extrato aquoso A1 na concentração final de 1 mg/mL sem adição de AgNO₃

A1(10) – extrato aquoso A1 na concentração final de 10 mg/mL com adição de AgNO₃

ctrl A1(10) – extrato aquoso A1 na concentração final de 10 mg/mL sem adição de AgNO₃

A1(50) – extrato aquoso A1 na concentração final de 50 mg/mL com adição de AgNO₃

ctrl A1(50) – extrato aquoso A1 na concentração final de 50 mg/mL sem adição de AgNO₃

B1 – extrato aquoso proveniente da fitorregião B na condição 1

B1(10) – extrato aquoso B1 na concentração final de 10 mg/mL com adição de AgNO₃

ctrl B1(10) - extrato aquoso B1 na concentração final de 10 mg/mL sem adição de AgNO₃

C1 – extrato aquoso proveniente da fitorregião C na condição 1

C1(10) – extrato aquoso A1 na concentração final de 10 mg/mL com adição de AgNO₃

ctrl C1(10) - extrato aquoso C1 na concentração final de 10 mg/mL sem adição de AgNO₃

C2 – extrato aquoso proveniente da fitorregião C na condição 2

C2(10) – extrato aquoso C2 na concentração final de 10 mg/mL com adição de AgNO₃

ctrl C2(10) - extrato aquoso C2 na concentração final de 10 mg/mL sem adição de AgNO₃

C3 – extrato aquoso proveniente da fitorregião C na condição 3

C3(10) – extrato aquoso A1 na concentração final de 10 mg/mL com adição de AgNO₃

ctrl C3(10) - extrato aquoso C3 na concentração final de 10 mg/mL sem adição de AgNO₃

C4 – extrato aquoso proveniente da fitorregião C na condição 4

C4(10) – extrato aquoso C4 na concentração final de 10 mg/mL com adição de AgNO₃

ctrl C4(10) - extrato aquoso C4 na concentração final de 10 mg/mL sem adição de AgNO₃

C5 – extrato aquoso proveniente da fitorregião C na condição 5

C5(10) – extrato aquoso C5 na concentração final de 10 mg/mL com adição de AgNO₃

ctrl C5(10) - extrato aquoso C5 na concentração final de 10 mg/mL sem adição de AgNO₃

ACN – acetonitrila

ATCC – coleção de cultura tipo americana (do inglês: American Type Culture Collection)

BHT – hidroxitolueno butilado

CFC – cúbica de face centrada

Cu-K α – ânodo de cobre com radiação característica K-alfa

DH – diâmetro hidrodinâmico

DCE – diâmetro circular equivalente

DLS – espalhamento dinâmico de luz

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

DRX – difração de raios X

FTIR – espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

He-Ne – Hélio-Neônio

HSS – sílica de alta resistência (do inglês: High Strength Silica)

IPB – intensidade do pico base (do inglês: base peak intensity)

JCPDS – Comitê Conjunto sobre Padrões de Difração de Pó (do inglês: Joint Committee on Powder Diffraction Standards)

MET – microscopia eletrônica de transmissão

MFA – microscopia de força atômica

NPMs – nanopartículas metálicas

PdI – índice de polidispersividade

RPS – ressonância plasmônica de superfície

TFA – trifluoroacético

TNM-FH – meio de cultura para células de insetos

T_R – tempo de retenção

UHPLC-ESI(+)-MS-PDA – cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com ionização por *electrospray* e aos arranjo de fotodiodos

UV – ultravioleta

APRESENTAÇÃO DA TESE

Os resultados desta Tese são apresentados de forma organizada ao longo de quatro seções, onde cada material de *Ilex paraguariensis*, proveniente de uma fitorregião específica (A, B e C), foi utilizado de acordo com a finalidade da respectiva seção (Figura 1).

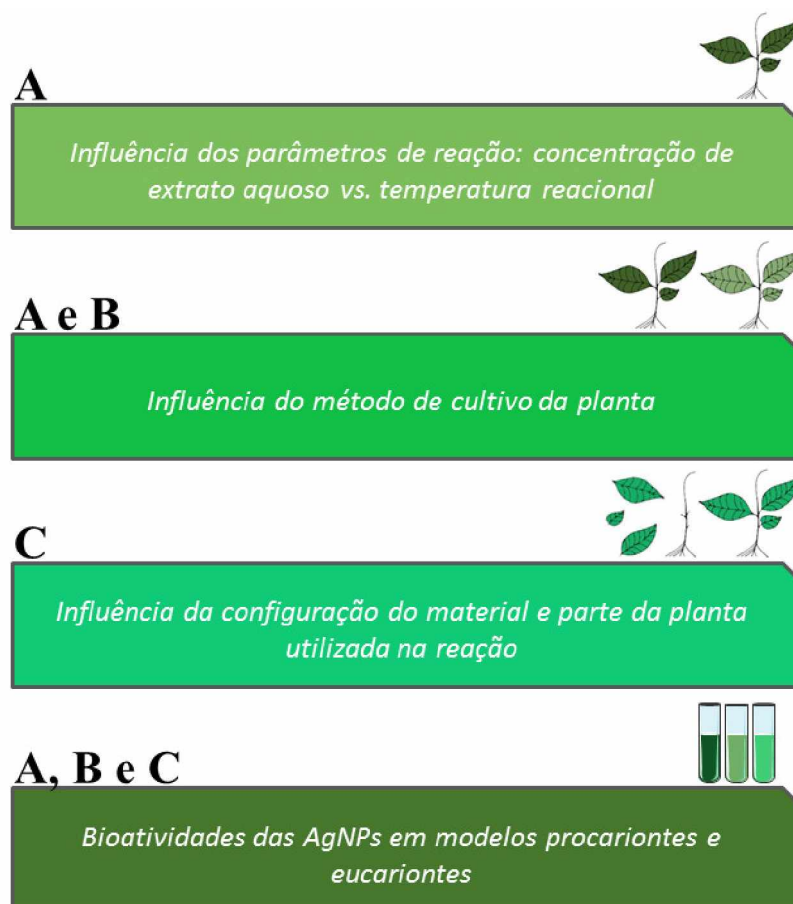


Figura 1: Esquema representativo da organização desta Tese, indicando o material de *Ilex paraguariensis* e o contexto abordado em cada seção.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Produção de nanopartículas metálicas: vantagens e desafios da fitossíntese	17
1.1.1. Possíveis influências da fitossíntese nas propriedades físico-químicas das NPMs	18
1.2. Fitossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs): utilização de nitrato de prata	19
1.3. <i>Ilex paraguariensis</i> e seu contexto na engenharia de AgNPs	20
1.3.1. Processo de produção da <i>Ilex paraguariensis</i> e possíveis influências na fitossíntese	22
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVOS	24
3.1. Objetivo geral	24
3.2. Objetivos específicos	24
4. METODOLOGIA	25
4.1. Materiais de <i>Ilex paraguariensis</i>	25
4.1.1. Materiais brutos e extratos aquosos de <i>Ilex paraguariensis</i>	25
4.2. Síntese de AgNPs	26
4.2.1. Ambiente de armazenamento do material bruto sólido	27
4.3. Técnicas de caracterização	27
4.3.1. Espectrofotometria de Absorção na região do UV-Vísível	27
4.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	27
4.3.3. Microscopia de Força Atômica (MFA)	28
4.3.4. Espectroscopia por Correlação de Fótons e Mobilidade Eletroforética	28
4.3.5. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	28
4.3.6. Difração de Raios X (DRX)	29
4.3.7. Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i> e ao detector de arranjo de fotodiodos (UHPLC-ESI(+)-MS-PDA)	29
4.3.8. Quantificação de fenóis totais	30
4.3.9. Atividade antioxidante	30
4.3.10. Ensaio de atividade antibacteriana	30
4.3.11. Ensaio de citotoxicidade	31
4.3.12. Análises Estatísticas	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
Fitorregião A	32
5.1. Influência dos parâmetros de reação: concentração de extrato aquoso vs. temperatura reacional	32
5.1.1. Análise espectrofotométrica da formação de AgNPs	32

5.1.1.2. Fase I.....	33
5.1.1.3. Fase II	37
5.1.2. Espectroscopia por correlação de fótons, Mobilidade eletroforética e reprodutibilidade dos processos de síntese	41
5.1.2.1. Fase I.....	41
5.1.2.2. Fase II	45
5.1.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Microscopia de Força Atômica (MFA)	49
5.1.4. Difratometria de Raios X (DRX).....	54
5.1.5. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	56
Fitorregiões A e B	57
5.2. Influência do método de cultivo da planta	57
5.2.1. Caracterização molecular dos extratos aquosos A1 e B1	58
5.2.1.1. UHPLC-ESI(+)-MS-PDA.....	58
5.2.1.2. Quantificação de antioxidantes e fenóis totais.....	64
5.2.2. Análise Espectrofotométrica, Espectroscopia por correlação de fótons, Mobilidade eletroforética, Difração de Raios X e Espectroscopia FT-IR das AgNPs	66
Fitorregião C	69
5.3. Influência do aspecto do material e parte da planta utilizada na reação	69
5.3.1. Caracterização dos extratos aquosos C1, C2, C3, C4 e C5	70
5.3.1.1. UHPLC-ESI(+)-MS-PDA, quantificação de antioxidantes e fenóis totais.....	70
5.3.2. Análise Espectrofotométrica, Espectroscopia por correlação de fótons, Mobilidade eletroforética, Difração de Raios X e Espectroscopia FT-IR das AgNPs	79
Fitorregiões A, B e C	82
5.4. Bioatividades das AgNPs em modelos procariontes e eucariontes.....	82
5.4.1. Avaliação antibacteriana das AgNPs sintetizadas com <i>I. paraguariensis</i> proveniente da fitorregião A contra <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	82
5.4.2. Investigação da citotoxicidade das AgNPs sintetizadas com <i>I. paraguariensis</i> provenientes das fitorregiões A, B e C sobre linhagem celular de <i>Spodoptera frugiperda</i>	84
6. CONCLUSÕES.....	88
7. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	89
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produção de nanopartículas metálicas: vantagens e desafios da fitossíntese

O conhecimento da matéria em escala nanométrica permite a geração de materiais com comportamentos e propriedades distintos daquelas quando em micro- ou macro escala [1]. Dentre os nanomateriais que vem sendo amplamente desenvolvidos, a produção de nanopartículas metálicas (NPMs) apresenta expressivo destaque, sendo que esta pode ser realizada seguindo duas abordagens: *top-down* e *bottom-up* [2]. Em estratégias *top-down*, as NPMs são obtidas a partir de sólidos massivos (*bulk*) – geralmente em dimensões micrométricas – até atingir a escala nanométrica. Em *bottom-up*, as NPMs são formadas a partir de átomos ou moléculas até sua nucleação, crescimento e estabilização coloidal. Na primeira abordagem, as NPMs podem ser obtidas por síntese física, empregando-se as técnicas de moagem mecânica [3], litografia [4], ablação a laser [5], entre outras. Na segunda, podem ser utilizados dois métodos distintos: (i) síntese química, com aplicação do método poliol [6], hidrotérmico [7], processo sol-gel [8], de radiólise [9], redução química [10], etc; ou (ii) síntese verde ou biológica, utilizando recursos da biodiversidade, e.g., cogumelos [11], fungos [12], bactérias [13] ou plantas [14].

Não há unanimidade (entre os pesquisadores) sobre qual método de síntese é o mais indicado, uma vez que todos apresentam vantagens e desvantagens [15]. A síntese química permite o controle do tamanho e forma das NPMs, no entanto, são utilizados reagentes ou solventes potencialmente tóxicos [16][17]. Por outro lado, a síntese física não faz uso de agentes químicos nocivos, porém, a produção é onerosa [18]. Como alternativa, os métodos de síntese verde são ecologicamente corretos e de custo acessível. Geralmente são métodos simples, rápidos e realizados em uma única etapa; além de serem rentáveis e utilizarem pouca quantidade de material biológico e fazerem uso de solventes de toxicidade baixa [19][20].

Na síntese verde, a produção de NPMs normalmente ocorre quando íons metálicos sofrem reações de oxidação-redução (redox) e são estabilizados eletrostática e/ou estericamente [21] na presença de organismos já mencionados ou componentes moleculares presentes em extratos de plantas, em meio reacional aquoso. Neste último, síntese via plantas (fitossíntese), um determinado extrato – não necessariamente os mesmos componentes – pode promover todas as etapas de produção das NPMs (biorredução, nucleação, crescimento e estabilização), prevenindo ou minimizando a agregação indesejada, e consequentemente tornando-as estáveis (em relação às características físico-químicas) por períodos longos

[22][23]. Todavia, a fitossíntese de NPMs apresenta seus próprios desafios. As características qualitativas e quantitativas do perfil molecular de uma planta podem ser alteradas em função de agentes estressores bióticos (patógenos como bactérias, vírus, insetos, fungos e plantas daninhas) e abióticos característicos de sua região fitogeográfica (luminosidade, temperatura, salinidade, pluviosidade e seca); além de agentes não naturais como o modo de cultivo e processamento da planta, os quais podem modificar os constituintes químicos e redirecionar suas vias metabólicas [24][25][26][27][28][29][30][31]; podendo influenciar diretamente os processos de síntese, bem como nas propriedades finais das NPMs produzidas utilizando extratos aquosos de plantas.

1.1.1. Possíveis influências da fitossíntese nas propriedades físico-químicas das NPMs

A caracterização físico-química das NPMs pode envolver a investigação das suas propriedades ópticas, dimensionais, morfológicas, elétricas, estruturais, composicionais, entre outras. Além das condições/fatores mencionados na seção 1.1 (os quais podem interferir no perfil fitoquímico da planta e conseqüentemente nas propriedades das NPMs) a literatura reporta outras possíveis influências relativas aos parâmetros utilizados na reação, visando a síntese de NPMs utilizando plantas.

A concentração do extrato aquoso da planta, e.g, pode influenciar nas propriedades dimensionais e ópticas das NPMs. Ao aumentar a concentração de extrato aquoso de *Prunus persica* (pessegueiro), verificou-se que o tamanho e absorvância relativa das AgNPs (indicando maior formação) também aumentaram [32]. NPMs de ouro (AuNPs) sintetizadas com *Camellia sinensis* (chá-da-índia) também tenderam para maiores tamanhos com o acréscimo de extrato [33]. Por outro lado, AgNPs sintetizadas com extrato aquoso de *Aloe vera* (babosa) apresentaram ligeira tendência de diminuição do tamanho com o aumento de extrato na reação [34].

A temperatura de reação é outro parâmetro que exerce influência sobre a formação de NPMs sintetizadas via plantas. De modo geral, a elevação da temperatura tende a aumentar a taxa de reação e a eficiência da síntese de NPMs. AgNPs produzidas com extrato de *Ocimum sanctum* (manjerição santo) foram submetidas às temperaturas de 5, 15, 25 e 35°C, onde a absorvância relativa aumentou com a temperatura, indicando maior formação de AgNPs; além de apresentar curvas de absorção com deslocamentos para máximos com menores comprimentos de onda (*blueshift*), indicando variações sobre as propriedades ópticas [35]. A temperatura reacional também pode afetar o tamanho e a fase cristalina (propriedade estrutural) das NPMs. Um estudo envolvendo AgNPs sintetizadas com extrato

aquoso de *Torreya nucifera* (Kaya) e submetidas às temperaturas de 20, 35, 50 e 65°C, identificou ligeiras variações nos tamanhos das AgNPs, reflexões e fases cristalinas (dadas pelos difratogramas de raios X) entre as temperaturas; além de diferenças expressivas nas intensidades dos picos. Apesar dos efeitos descritos, a morfologia das AgNPs permaneceu inalterada, com formas esféricas ou quase-esféricas [36]. NPMs de óxido de zinco (ZnO-NPs) sintetizadas utilizando *Hibiscus sabdariffa* (caruru-azedo) também foram avaliadas quanto à estrutura cristalina. As ZnO-NPs, submetidas às temperaturas de 30, 60 e 100°C, apresentaram difratogramas com variações expressivas nas intensidades dos picos e índices de Miller [37].

O perfil fitoquímico (composição) de uma planta pode variar de acordo com a parte desta planta; podendo interferir nas propriedades ópticas, dimensionais e composicionais das NPMs. AgNPs sintetizadas a partir de diferentes partes (folhas, ramos, raízes e sementes) de *Macrotyloma uniflorum* (grama de cavalo) apresentaram composições variadas e curvas de absorção com comprimentos de onda/ máximos distintos entre si, situados em 420 e 400 nm; com maior indicativo de formação de AgNPs, em ordem crescente, para as reações de síntese utilizando folhas, ramos, raízes e sementes. Para as três primeiras partes da planta foram encontradas AgNPs com tamanhos variando entre 50-100 nm e para a última tamanhos entre 20-100 nm [38].

Inúmeras variáveis e possíveis combinações entre elas podem influenciar nas propriedades físico-químicas de NPMs fitossintetizadas, implicando na previsibilidade destas propriedades [39], uma vez que não é possível certificar de que a planta terá os mesmos e/ou quantidade equivalente de metabólitos envolvidos na síntese, assim como na reprodutibilidade e produção em larga escala.

1.2. Fitossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs): utilização de nitrato de prata

Entre as NPMs, destacam-se as nanopartículas de prata (AgNPs). A prata (Ag), derivado do latim *Argentum*, é um metal nobre e pode ser obtida em sua forma natural, industrial e/ou sintética a partir de processos hidro-, eletro- ou pirometalúrgicos [40][41][42][43][44][45][46]. Sua aplicação na medicina é bastante comum por apresentar maior toxicidade contra células procarióticas (como as das bactérias) em comparação às eucarióticas (como as de animais e plantas).

No que tange ao sal metálico, o nitrato de prata (AgNO_3) – um dos possíveis precursores para a produção de AgNPs – apresenta massa molar igual a 169,8731 g/mol, resultante das massas atômicas da prata (107,8682 u), do nitrogênio (14,0067 u) e do oxigênio

(15,9994 u). Quando dissolvido em água, o AgNO_3 se dissocia no cátion Ag^+ (prata iônica) e no ânion NO_3^- (nitrato) [47]. Esse processo aumenta a reatividade da prata, permitindo a redução dos íons Ag^+ para Ag^0 (prata metálica), quando decorrente da reação com agentes redutores [48][10]; possibilitando a formação de núcleos estáveis e a formação de AgNPs [49]. Adicionalmente, a Ag^+ é um forte agente oxidante (que sofre redução ao ganhar elétrons), com potencial de redução de +0,79 na série eletroquímica, sendo mais forte do que o cobre (+0,34) e mais fraca do que o ouro (+1,69) [50].

Estudos prospectivos relacionados à produção de AgNPs utilizando plantas como *Jatropha curcas* (mandubiguaçu) [51], *Olea europaea* (oliveira) [52], *Abrus precatorius* (ervilha-do-rosário) [53], *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira) [54], *Brosimum gaudichaudii* Trécul (bureré) [55], *Azadirachta indica* (amargosa) [56], chá-verde e chá-preto [57], e mais recentemente *Ilex paraguariensis* [23], sugerem resultados satisfatórios em relação à interação entre os metabólitos secundários dos extratos aquosos e o AgNO_3 ; além de atividades biológicas (e.g., nematicida, larvicida, antibacteriana, entre outras) com respostas diferenciadas daquelas utilizando somente extratos ou somente o sal metálico.

Dessa forma, o AgNO_3 contempla as necessidades do presente estudo, em função de suas propriedades, custo acessível e por ser reportado com êxito para a fitossíntese de AgNPs.

1.3. *Ilex paraguariensis* e seu contexto na engenharia de AgNPs

A erva-mate (*I. paraguariensis* St. Hillaire) foi classificada originalmente pelo naturalista francês Auguste de Saint Hillaire. Hillaire enviou amostras coletadas no Brasil para o Museu de História Natural de Paris, onde a planta teve seu nome científico registrado em 1822 [55]. A *I. paraguariensis* (Figura 2) é naturalmente encontrada nas regiões subtropicais da América do Sul [58]: Argentina, Paraguai e Brasil, principalmente no Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul; no entanto, em condições favoráveis de plantio, é possível cultivá-la em outros biomas, como o Cerrado, por exemplo.

O gênero *Ilex* possui mais de 600 espécies [59], das quais aproximadamente 60 são nativas no Brasil. As plantas desse gênero são conhecidas por seu contexto cultural e socioeconômico [60]. Além do uso tradicional (como chimarrão ou tereré), também é destinada à indústria gastronômica em outras bebidas como chás/cervejas, como aditivo nutricional para humanos e animais, e na preservação de alimentos; para a produção de cosméticos, na composição de sabonetes, xampus, desodorantes, hidratantes, entre outros; e nas indústrias médica e farmacêutica, como antioxidantes, estimulantes, anti-inflamatório,

antimicrobiano, ansiolítico, etc, compondo uma gama de aplicações com inúmeros princípios ativos descritos, conforme disponíveis na literatura atual [61][62].



Figura 2: Árvore de *Ilex paraguariensis* situada no Jardim Botânico de Brasília- DF.

Na nanotecnologia, a planta foi recentemente relatada como um potencial componente na engenharia de NPMs [63][64][23], devido à sua composição fitoquímica elaborada, constituída, em sua maioria, por compostos fenólicos, metilxantinas e ácidos orgânicos. Entre eles podem ser destacados os ácidos clorogênico e quínico, juntamente com seus taninos derivados, como os ácidos 3-cafeoilquínico (3-CQA), 4-cafeoilquínico (4-CQA), 5-cafeoilquínico (5-CQA), 3,4-dicafeoilquínico (3,4-diCQA), 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQA) e 4,5-dicafeoilquínico (4,5-diCQA). Os ácidos hidroxicinâmicos, como os ácidos ferúlico, p-cumárico, cafeico e sinapínico também estão presentes, além dos flavonóis como a quercetina, o kaempferol, a mirecetina e a rutina; e os alcalóides purínicos como a cafeína e seus derivados teobromina, teofilina e paraxantina [65][66][61][67][68][69].

Nestes compostos são amplamente frequentes os grupos hidroxila (OH), os quais foram unanimamente relatados em outras espécies, entre os pesquisadores, por estarem diretamente envolvidos no processo de redução dos íons Ag^+ ; e atuarem concomitantemente (essas mesmas biomoléculas ou outras presentes no extrato da planta) na estabilização das

AgNPs recém-formadas; além de permitir que suas características físico-químicas sejam mantidas mesmo após um período consideravelmente longo (eventualmente meses ou anos).

1.3.1. Processo de produção da *Ilex paraguariensis* e possíveis influências na fitossíntese

A *I. paraguariensis* pode ser utilizada *in natura* ou processada para as várias finalidades com aplicações reconhecidas. O processamento industrial da *I. paraguariensis* segue uma série de eventos [70][71]: (i) as folhas, pecíolos e ramos são coletados nos ervais, levadas ao local de processamento, (ii) passam por uma etapa de sapeco, para retirar a umidade superficial do material; nesta etapa ocorre a desativação enzimática (peroxidase e polifenoloxidase), para evitar a oxidação precoce, escurecimento e amargor desproporcional. O procedimento subsequente é o de (iii) pré-secagem, onde o material é desidratado – aproximadamente 80% – até que se torne quebradiço, seguido da (iv) secagem, onde é levado a esteiras e recebe calor de forma uniforme; ambos (iii e iv) são executados com o objetivo de evitar a perda dos compostos e degradação por microrganismos, devido ao teor de água. Por fim, é realizado o (v) cancheamento, onde o insumo resultante é fragmentado e (vi) armazenado/estacionado até que atinja as características desejáveis de cor e sabor, e posteriormente (vii) empacotado e disponibilizado ao consumidor.

Ainda que as ervateiras sigam processos de produção similares, variações em todas as etapas envolvidas nestes processos podem acarretar em mudanças nas características da matéria-prima final, assim como as condições climáticas e fatores já mencionados na seção 1.1; incluindo o método de cultivo, em que usualmente é feita a aplicação de insumos químicos, agrotóxicos e/ou conservantes para a proteção da planta (método tradicional); assim como podem ser cultivadas sem qualquer uso destas ações protetivas (método orgânico). Dessa forma, este (processo de produção – do cultivo ao empacotamento) se torna um desafio a mais para a fitossíntese de NPMs utilizando *I. paraguariensis*, onde é necessária a conservação e disponibilidade dos metabólitos secundários da planta para que desempenhem as funções desejadas (biorredução dos íons, estabilização das NPMs e manutenção das propriedades físico-químicas) quanto a essa rota de engenharia.

2. JUSTIFICATIVA

A ampliação expressiva no número de publicações de pesquisas científicas envolvendo os termos “síntese verde”, “síntese biológica” ou “biossíntese” de nanopartículas é um fato constatado [15][72][73]. Notavelmente, as vantagens dessa rota de engenharia são

convidativas e não permitem que seus desafios intimidem os pesquisadores da área. Como já exposto, inúmeros trabalhos que utilizaram plantas visando a síntese de nanopartículas, incluindo AgNPs, foram relatados com êxito, seja a partir da planta *in natura* [74][75] ou processada [76][77][78].

No que tange a *I. paraguariensis*, ainda que tenham sido relatados numerosos estudos a respeito da composição, benefícios e aplicações, o uso da planta na área nanotecnológica (via química verde [79]) é recente (2017/2018). Artigos relataram a utilização da planta na engenharia de nanopartículas magnéticas [80][81], poliméricas [82][83] e metálicas [64][84][23] – os quais fizeram uso de AgNO_3 como precursor – sendo parte do estudo desenvolvido ao longo desta Tese, o primeiro artigo publicado em periódico científico relatando a aplicação desta planta em sinergia com este sal metálico, sem outros componentes e em etapa única [23]. Complementarmente e ao contrário deste, os demais estudos com AgNPs e *I. paraguariensis* envolveram etapas adicionais, como ajuste de pH [84], agitação [64], centrifugação [64] e aquecimento do extrato previamente à reação com o AgNO_3 [84].

Nesse sentido, propõe-se nessa Tese uma investigação sistemática, não com o objetivo de indicar as melhores condições de síntese e sim a fim de adquirir conhecimento a respeito da interação entre o extrato aquoso da planta e o AgNO_3 , considerando: (i) a influência dos parâmetros da reação (concentração de extrato aquoso *versus* temperatura reacional), (ii) o ambiente de armazenamento do extrato bruto (sólido) (temperatura ambiente *versus* congelamento), (iii) o método de cultivo da planta (tradicional *versus* orgânico), (iv) o aspecto do material (*in natura* fresco fragmentado *versus in natura* congelado pulverizado *versus in natura* fresco pulverizado), (v) as partes da planta (folhas, pecíolos e ramos *versus* folhas e pecíolos *versus* ramos) utilizadas na reação e (vi) as bioatividades das AgNPs produzidas.

Com isso, levanta-se a seguinte hipótese: *As variáveis consideradas influenciam nas características dos extratos aquosos e propriedades físico-químicas e biológicas das AgNPs produzidas utilizando materiais de I. paraguariensis*. Sendo necessário para verificar tal hipótese, realizar a avaliação das amostras resultantes em relação às propriedades ópticas (inspeção visual e curvas de absorção), dimensionais (tamanho), elétricas (carga de superfície), morfológicas (forma), estruturais (fase cristalina) e composicionais (grupamentos funcionais, classes e compostos) dos materiais (quando aplicável) e das AgNPs sintetizadas; além da investigação em relação às bioatividades antibacteriana e citotóxica, dado que a Ag^+ e alguns dos constituintes da planta foram relatados por apresentarem efeitos colaterais.

Por fim, é importante ressaltar que (1) nenhum dos estudos anteriores reportou a influência das variáveis aqui exploradas; assim como (2) não há relatos da utilização de diferentes partes isoladas na síntese de AgNPs com esta planta. (3) Sínteses com AgNO₃ e estas plantas de *I. paraguariensis* pertencentes às regiões do Rio Grande do Sul e Santa Catarina também não foram mencionadas na literatura quanto a reação com este precursor metálico. Adicionalmente, é de relevância evidenciar que (4) este estudo é pioneiro em investigações científicas com uma *I. paraguariensis* plantada no bioma Cerrado, sendo que estes aspectos fitorregionais poderiam influenciar nos processos de síntese de AgNPs.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar o potencial de formação, propriedades físico-químicas e bioatividades *in vitro* de AgNPs produzidas utilizando materiais de *Ilex paraguariensis* advindos de diferentes fitorregiões, ambiente de armazenamento, métodos de cultivo, aspectos e partes da planta.

3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar AgNPs a partir de concentrações finais variáveis de extrato aquoso de *I. paraguariensis* e em diferentes temperaturas reacionais;
- Avaliar a influência da síntese de AgNPs a partir de materiais de *I. paraguariensis* mantidos sob temperatura ambiente e congelado;
- Investigar a reprodutibilidade dos processos de fitossíntese para obtenção das AgNPs;
- Avaliar a estabilidade coloidal das partículas obtidas ao longo de 365 dias;
- Avaliar a influência do método de cultivo de *I. paraguariensis* em relação aos extratos aquosos e às características físico-químicas das AgNPs;
- Investigar a influência do aspecto do material e as diferentes partes da planta em relação aos extratos aquosos resultantes e as características físico-químicas das possíveis AgNPs produzidas;
- Caracterizar as AgNPs obtidas por meio de técnicas de investigações físico-químicas visando à determinação de perfis indicativos de ressonância plasmônica de superfície (análise espectrofotométrica), diâmetro hidrodinâmico e polidispersividade (espectroscopia por correlação de fótons), potencial Zeta de superfície (mobilidade

eletroforética), fase cristalina (difração de raios X), diâmetro seco e morfologia (microscopias de força atômica e eletrônica de transmissão); além de investigar os possíveis grupamentos funcionais (espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier), teor total de antioxidantes e fenóis totais (ensaios bioquímicos), metabólitos secundários (classes) e os possíveis íons (cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com ionização por *electrospray* e ao detector de arranjo de fotodiodos) referentes aos constituintes dos extratos aquosos das plantas utilizadas;

- Avaliar as AgNPs quanto à ação antibacteriana (*E. coli* e *S. aureus*) e citotóxica *in vitro* em células de inseto (*Spodoptera frugiperda*).

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais de *Ilex paraguariensis*

4.1.1. Materiais brutos e extratos aquosos de *Ilex paraguariensis*

Os materiais brutos de *I. paraguariensis* foram obtidos a partir de três fitorregiões de origem: Erechim, RS (A); Canoinhas, SC (B) e Brasília, DF (C), e separados por diferentes partes da planta e aspecto do material (Tabela 1).

Tabela 1: Materiais de *I. paraguariensis* classificados de acordo com a fitorregião de origem (A=Erechim, RS; B= Canoinhas, SC e C= Brasília, DF), parte da planta utilizada na reação, aspecto do material e nome de referência do respectivo extrato aquoso obtido.

Fitorregião de origem	Parte da planta utilizada na reação	Aspecto do material	Referência do extrato
A	Folhas, pecíolos e ramos		A1
B	Folhas, pecíolos e ramos		B1
	Folhas e pecíolos	Processado (Pulverizado fresco)	C3
	Ramos		C4
C	Folhas, pecíolos e ramos		C5
	Folhas e pecíolos	<i>In Natura</i> (Fragmentado fresco)	C1
		Processado (Pulverizado congelado)	C2

A e B são plantas comerciais, cultivadas e processadas industrialmente pelas ervateiras Ouro Verde (método de cultivo tradicional) e Yacuy (método de cultivo orgânico), respectivamente. C foi cultivada *ex situ* no Jardim Botânico de Brasília e processada manualmente nas dependências da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - DF. De acordo com os responsáveis pela manutenção dos espécimes vegetais no local de coleta, a contenção dos insetos é realizada somente com o uso de compostos naturais.

O material de C (folhas, pecíolos e ramos) foi coletado, assepsiado com extran[®] e água destilada (tipo III) (com lavagem única) e separado a partir das seguintes condições: (1) *In natura*, onde folhas/pecíolos foram fragmentados em partes de aproximadamente 1,5 mm. (2) Processado, onde folhas/pecíolos e ramos foram acondicionados em uma bandeja, levados até uma estufa de secagem com circulação de ar (Marconi) e mantidos por 24 h a 38°C. Após adquirir um aspecto seco e quebradiço, o material resultante foi pulverizado em partes distintas da planta, sendo elas: (i) folhas, pecíolos e ramos, (ii) folhas e pecíolos, e (iii) ramos, em moinho analítico (IKA A11). (3) Processado após congelamento, onde folhas e pecíolos frescos foram armazenados em temperaturas na faixa de $-40 \pm 2^\circ\text{C}$, por 30 dias, assepsiados, secados e pulverizados.

O preparo de cada extrato aquoso envolveu a diluição de 1 g de material bruto de *I. paraguariensis* em 10 mL de água ultrapura tipo I (Milli-Q) fervente. A mistura foi submetida a filtração com auxílio de papel filtro qualitativo (J Prolab[®]) com a maioria dos poros de 14 μm , utilizando funil. Os extratos foram utilizados imediatamente após o preparo.

4.2. Síntese de AgNPs

As reações e possíveis sínteses de AgNPs foram investigadas em três etapas (Tabela 2). A primeira, realizada a partir do extrato proveniente da fitorregião A, considerou quatro diferentes concentrações de extrato e uma temperatura de síntese. A segunda, realizada também a partir do extrato proveniente da fitorregião A, considerou duas concentrações de extrato e sete temperaturas adicionais. E a terceira etapa, realizada a partir dos extratos provenientes das fitorregiões B e C, considerando uma concentração de extrato e uma temperatura reacional, previamente selecionados.

Para cada concentração de extrato utilizado na reação com o AgNO_3 (Sigma Aldrich, Brasil) em solução aquosa, foi preparado um respectivo controle na mesma concentração, sem adição do precursor metálico. Adicionalmente, um controle de AgNO_3 foi preparado sem adição de extrato. As reações transcorreram na ausência de luz por 3,5 h, nas temperaturas descritas.

Tabela 2: Etapas referentes às reações indicando as concentrações de extratos aquosos, AgNO₃ e as temperaturas utilizadas, respectivamente a cada material bruto (A, B e C) de *Ilex paraguariensis*.

Etapa	Fitorregião de origem	Concentração de extrato [mg/mL]	Concentração final de AgNO ₃ [mM]	Temperatura de reação (°C)
1 ^a	A	50, 10, 1 e 0,1	1	50
2 ^a	A	10 e 1	1	10, 20, 30, 40, 60, 70 e 80
3 ^a	B C	10	1	50

4.2.1. Ambiente de armazenamento do material bruto sólido

Esta avaliação foi realizada utilizando materiais provenientes das fitorregiões A e C.

Os materiais brutos advindos de A foram estocados no mesmo dia em duas condições ambientais distintas: (1) a primeira alíquota foi mantida em tubo tipo Falcon sob temperatura ambiente. (2) a segunda alíquota foi mantida em tubo tipo Falcon sob congelamento. Os Lotes 1, 2, 3 e 4 foram submetidos a reação com AgNO₃ a partir do material descrito na condição 1 (visando também à avaliação da reprodutibilidade dos processos de síntese). O Lote 5 foi submetido à reação com AgNO₃ a partir do material descrito na condição 2.

Os materiais brutos advindos da fitorregião C foram avaliados também a partir de duas condições distintas: (1) coletado, assepsiado, pulverizado e submetido à reação com AgNO₃; e (2) coletado, estocado sob congelamento e posteriormente assepsiado, pulverizado e submetido à reação com AgNO₃. Esta etapa visou verificar a influência do ambiente de armazenamento em relação ao perfil molecular do extrato e às características físico-químicas das possíveis AgNPs produzidas.

4.3. Técnicas de caracterização

4.3.1. Espectrofotometria de Absorção na região do UV-Vísível

Os espectros de absorbância foram adquiridos em espectrofotômetro Q798U (Quimis, Brasil). O monitoramento das reações foi realizado por leituras da absorbância das amostras a cada 30 min por 3,5 h (*plateau*) a 450 nm. Após 24 h, foi adquirida uma curva de absorção na faixa de 350 a 550 nm para cada amostra. As diluições foram fixadas em 1:10.

4.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As AgNPs sintetizadas foram submetidas a análises por MET para identificação da morfologia. Após diluição (1:10), as amostras foram depositadas em uma tela de cobre de 200

malhas recoberta por película de Formvar. As imagens de MET foram adquiridas utilizando um microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 (JEOL, Japão) com filamento de tungstênio e acoplado com câmera CCD (Gatan, EUA). As AgNPs nas imagens foram analisadas com o auxílio do software Image Pro Plus (Media Cybernetics, EUA).

4.3.3. Microscopia de Força Atômica (MFA)

As análises por MFA foram realizadas à temperatura ambiente utilizando um microscópio de força atômica SPM-9600 (Shimadzu Corporation, Japão). O preparo das amostras seguiu uma diluição (1:20) com posterior deposição de 1 μ L da suspensão em uma superfície recém clivada de mica muscovita. Foi empregado um cantilever retangular integrado com uma ponteira cônica de silício, com frequência de varredura de 1 Hz. As imagens foram obtidas analisando áreas de 10 μ m \times 10 μ m em modo dinâmico, com resolução de 512 \times 512 linhas. As imagens foram então processadas no software SPM Manager do mesmo fabricante para determinar o diâmetro seco (em altura) das AgNPs.

4.3.4. Espectroscopia por Correlação de Fótons e Mobilidade Eletroforética

O diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersividade (Pdl) foram adquiridos por espectroscopia por correlação de fótons, também denominada espalhamento de luz dinâmico (DLS); enquanto o potencial Zeta de superfície foi adquirido pela técnica de mobilidade eletroforética. Ambos foram medidos a partir do mesmo instrumento, um ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido), com laser de He-Ne com $\lambda = 632,8$ nm em 173°. As amostras foram diluídas em água Milli-Q (1:10). Foram realizadas três leituras para cada amostra, em modo manual. Os dados foram processados no software ZetaSizer (versão 7.11), desenvolvido pelo mesmo fabricante.

4.3.5. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho foram adquiridos utilizando um espectrômetro Vertex 70 (Bruker Corporation, EUA) no modo refletância total atenuada (ATR) com as amostras em estado líquido. Para análise, foram depositados 2 μ L de cada amostra (sem diluição) em um cristal de diamante e os espectros foram obtidos na região entre 4.000 a 350 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 scans. Os dados foram adquiridos e processados com o software OPUS 7.2 (Bruker Corporation, EUA).

4.3.6. Difração de Raios X (DRX)

Para as análises de difração de raios X (DRX), foi utilizado um difratômetro do modelo MiniFlex 600 (Rigaku, Japão). O equipamento foi ajustado na faixa de 2θ (graus) variando de 30 a 80°, com intervalos de leitura de 0,05°. Como fonte de radiação foi utilizado um feixe de raios X Cu-K α com $\lambda=1,5418 \text{ \AA}$, operado com tensão de 40 kV e corrente de 30 mA. As amostras foram previamente liofilizadas, a partir de um volume final líquido de 10 mL. Cada amostra foi depositada na superfície de discos (porta-amostra) constituídos por silício, fixado com auxílio de álcool isopropílico e levado ao difratômetro.

4.3.7. Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com ionização por *electrospray* e ao detector de arranjo de fotodiodos (UHPLC-ESI(+)-MS-PDA)

(1) UHPLC-PDA: As análises foram realizadas utilizando um UHPLC (modelo Acquity H-Class, Waters) com sistema de bombeamento quaternário de solventes, degaseificador a vácuo, forno de coluna equipado com pré-aquecedor de solvente (pre-heater) e detector de arranjos de fotodiodos (PDA). (2) UHPLC-ESI(+)-MS: De acordo com os espectros obtidos por (1), foram realizadas análises para investigar as massas moleculares das classes e possíveis compostos identificados. As análises foram realizadas em espectrômetro de massas (modelo Acquity Xevo TQD, Waters) equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e analisador de massa do tipo triplo quadrupolo (QqQ, TQD, Waters), no modo positivo de ionização (ESI(+)-MS), nas seguintes configurações: voltagem do capilar igual a 3,5 kV, temperatura de solvatação de 400°C, temperatura da fonte de 150°C, vazão do gás do cone a 20 L/h e vazão do gás de solvatação a 650 L/h. Ambas as abordagens empregaram separação cromatográfica com a coluna de fase reversa HSS T3 1,8 μm (2,1 x 150 mm), com temperatura de 30°C. Os solventes utilizados nas análises por (1) foram água + 0,1% ácido trifluoroacético (TFA); e acetonitrila (ACN) + 0,1% TFA. Para as análises por (2) foram utilizados água + 0,1% ácido fórmico; e ACN + 0,1% ácido fórmico. As amostras foram liofilizadas e diluídas em água para se obter soluções na concentração de 5 mg/mL e então foram analisadas no sistema (1) a 210 nm. Para as análises por (2), as amostras foram liofilizadas, diluídas e analisadas na concentração de 0,1 mg/mL. Os padrões comerciais utilizados foram o ácido furóico, ácido cumárico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido quínico, ácido ferúlico, ácido clorogênico e vanilina, elencados com base no perfil dos espectros UV (análise por (1)).

4.3.8. Quantificação de fenóis totais

A quantificação de compostos fenólicos foi determinada pelo método colorimétrico, via reagente Folin-Ciocalteu 2N (Sigma Aldrich); que na presença de alguns agentes redutores permite determinar a concentração total destes componentes. Para a construção da curva padrão foi utilizado o ácido gálico (Dinâmica), além de uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) (200 mg/mL) e água milli-Q. O ensaio foi realizado em triplicata em uma microplaca de 96 poços. A curva foi construída considerando oito concentrações distintas do padrão, com volume final de 300 μL . Os extratos aquosos foram utilizados logo após o preparo (solução estoque de 100 g/L). Dadas as variações entre as amostras, foram adotadas diluições distintas, as quais foram normalizadas para a obtenção do resultado final. As amostras foram incubadas, na ausência de luz, por 2 h e a leitura foi realizada em um espectrofotômetro (SPECTRAMax Plus) a 765 nm.

4.3.9. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos aquosos de *I. paraguariensis* foi avaliada a partir do método de sequestro de radicais livres utilizando o reagente (oxidante) 2,2- difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) (Sigma Aldrich). A transformação do DPPH pode ser observada pelo decréscimo da absorbância. Este protocolo é uma otimização do procedimento descrito por Blois [85]. Como padrão foi utilizando o antioxidante hidroxitolueno de butila (BHT). Este método de coloração permite realizar uma correlação entre a cor, após a reação, com a quantidade de compostos antioxidantes presentes no meio reacional. Como controles negativo (interno) e negativo foram utilizados, respectivamente, DPPH+água e DPPH+metanol, dado que o padrão foi diluído em metanol, visando com isso verificar a possível influência deste em relação ao resultado do padrão. Os extratos foram utilizados prontamente após o preparo. O ensaio foi realizado em triplicata em uma microplaca de 96 poços. As amostras foram incubadas, na ausência de luz (recoberto com papel alumínio), por 30 min e a leitura foi realizada em um espectrofotômetro (SPECTRAMax Plus) a 517 nm. A cinética das reações foi monitorada durante todo o tempo de incubação.

4.3.10. Ensaio de atividade antibacteriana

As amostras obtidas a partir do Extrato A1, ou seja, as AgNPs [A1(1) e A1(10)], e seus respectivos controles contendo somente extratos aquosos [Ctrl A1(1) e Ctrl A1(10)], juntamente com o controle de prata (solução de AgNO_3), foram avaliadas contra *Escherichia*

coli (ATCC 8739) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 2593) pelo método da concentração inibitória mínima (CIM). O caldo LB (Luria Bertani) foi utilizado para o crescimento e desenvolvimento das bactérias para o meio líquido, ou com adição de ágar, para o meio sólido; o qual foi escolhido por não apresentar aglutinação nas AgNPs. As amostras foram diluídas em seis concentrações (256, 128, 64, 32, 16 e 8 μM equivalente em nitrato de prata) em uma microplaca de 96 poços contendo as células de *E. coli* e *S. aureus*, com a mesma quantidade para cada amostra (em uma concentração final de 1×10^6 UFC/mL, com OD 0,05 a 600 nm). Os ensaios foram realizados em triplicatas experimentais. Como controle positivo foram utilizados penicilina/estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$ em cada poço) e como controle negativo água Milli-Q. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 h e os resultados foram obtidos por inspeção visual de acordo com a turbidez das amostras presentes nos poços.

4.3.11. Ensaio de citotoxicidade

As amostras foram obtidas a partir dos extratos A1, B1 e C5. As AgNPs [A1(10), B1(10) e C5(10)], com seus respectivos controles contendo somente extrato aquoso [Ctrl A1(10), Ctrl B1(10) e Ctrl C5(10)], e juntamente com o controle de prata (solução de AgNO_3), foram avaliados em relação à citotoxicidade em linhagem celular do inseto *Spodoptera frugiperda* (IPLB-SF21), utilizadas como modelo de células eucariótica. Para realização deste ensaio, as AgNPs foram sintetizadas, armazenadas e caracterizadas em dias iguais. As células SF21 foram sedimentadas em placas de 96 poços, na concentração de 2×10^4 células/poço, em meio de cultura TNM-FH. Após sedimentação, as amostras (controle água, controle DMSO, AgNPs, extratos e solução de AgNO_3) foram adicionadas às células. A avaliação da viabilidade celular foi realizada com base no teste colorimétrico MTT com brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio. As células foram incubadas a 27°C durante 24 horas. Em seguida, os meios de cultura, contendo as amostras e os controles, foram removidos dos poços sendo adicionado MTT na razão 1:10 (5 mg/mL) e 90 μL de meio de cultura por poço. Após 2h de incubação, a solução de MTT/meio de cultura foi removido e adicionado 100 μL de DMSO por poço. A leitura das amostras em espectrofotômetro (SPECTRA max Plus) a 595nm.

4.3.12. Análises Estatísticas

Os dados quantitativos das AgNPs sintetizadas em todas as temperaturas e caracterizados por DLS e potencial Zeta foram realizados a partir de três leituras individuais e

estão apresentados como a média \pm desvio padrão ou média \pm erro padrão da média. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software PAST (versão 2.17b) [86] e as possíveis diferenças estatísticas entre os lotes foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey. O nível de significância foi ajustado para $p < 0,05$. O mesmo foi aplicado para a análise estatística em relação ao bioensaio de citotoxicidade, realizado em triplicatas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fitorregião A

5.1. Influência dos parâmetros de reação: concentração de extrato aquoso vs. temperatura reacional

Esta primeira etapa do estudo avaliou o material bruto de *I. paraguariensis* advindo da fitorregião A, objetivando investigar a influência da concentração de extrato (com as variações representadas pelo esquema exibido na Figura 3) e temperatura de reação nas características físico-químicas das possíveis AgNPs formadas.

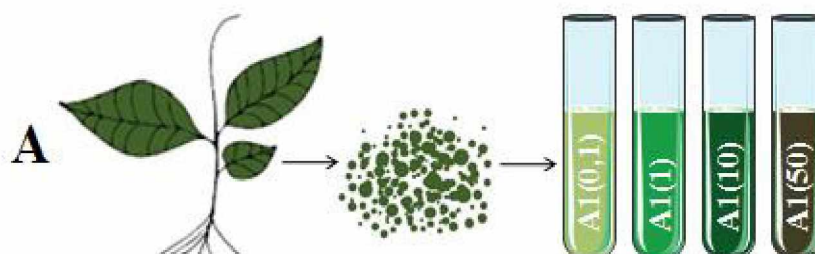


Figura 3: Esquema representativo do Extrato A1, proveniente da fitorregião A (Rio Grande do Sul) e a partir de quatro concentrações distintas. O material bruto da planta, constituída por folhas, pecíolos e ramos foi adquirido comercialmente em sua forma pulverizada.

5.1.1. Análise espectrofotométrica da formação de AgNPs

As propriedades ópticas relacionadas ao potencial de formação de AgNPs foram analisadas em duas fases: I) a partir de quatro concentrações de extrato aquoso [0,1; 1; 10 e 50 mg/mL] e uma temperatura de reação [50°C]; e II) a partir de duas concentrações de extrato aquoso [1 e 10 mg/mL] e sete temperaturas [10, 20, 30, 40, 60, 70 e 80°C]. Para isto, a espectrofotometria UV-Visível foi utilizada com o objetivo de (i) monitorar a cinética das reações; (ii) investigar a possível correlação entre a formação de AgNPs (indicada pela absorbância) vs. a concentração de extrato aquoso e a temperatura reacional; e (iii) avaliar as curvas de distribuição indicativas da nanoestruturação da Ag.

5.1.1.2. Fase I

As cinéticas das reações para as concentrações de extrato de 50; 10; 1 e 0,1 mg/mL a 50°C foram monitoradas por 3,5 h (Figura 4a) a 450 nm. As amostras foram nomeadas A1(50); A1(10); A1(1); e A1(0,1). A absorbância foi novamente aferida após 24 h (i) no mesmo comprimento de onda (450 nm) sem diluição (Figura 4b); e (ii) em comprimentos de onda variando na faixa de 350 a 550 nm a partir das amostras diluídas, a fim de obter as curvas de distribuição destas absorbâncias; as quais podem ser indicativas da formação de AgNPs, dadas pelos máximos (eixo y) situados entre 400 e 500 nm, característicos da prata nanoestruturada (metálica).

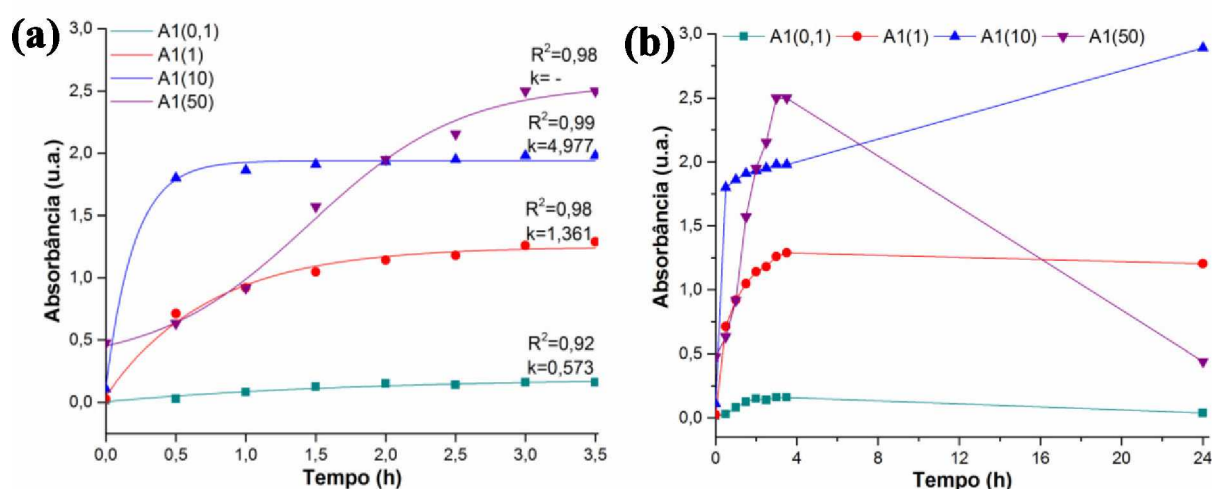


Figura 4: Curvas de monitoramento das reações durante (a) 3,5 h e (b) 24 h após o início das reações com extrato aquoso de *I. paraguariensis*, em 450 nm. Para as concentrações finais de extrato aquoso 0,1; 1; 10 mg/mL foram aplicados ajustes exponenciais utilizando a função *MnMolecular1* e para a concentração de 50 mg/mL foi aplicado um ajuste sigmoidal (*sigmoidal/boltzmann*), ambos disponíveis no software OriginPro 2015.

A partir das absorbâncias aferidas nos intervalos de tempo durante o monitoramento (Figura 4a), foram aplicados ajustes objetivando determinar uma possível correlação entre as absorbâncias das AgNPs e a concentração de extrato aquoso utilizada na reação; dado que, pela lei de Lambert-Beer [87], a absorbância de uma amostra, em um determinado comprimento de onda, é proporcional a concentração de espécies químicas (átomos, moléculas ou íons) contidas nesta amostra [88]. Os ajustes foram realizados utilizando o modelo de crescimento monomolecular [89], aplicando-se a função exponencial *MnMolecular1* dada pelo software OriginPro 2015,

$$A = A_{\infty} [1 - e^{-k_{obs} \cdot t}]$$

onde A corresponde a absorbância (dada em unidades arbitrárias) aferida em cada intervalo de tempo t (dado em h), A_{∞} representa a absorbância no tempo “infinito” de reação e k é um coeficiente de proporcionalidade (dado em h^{-1}), também conhecido como coeficiente da

velocidade (taxa) da reação, observada experimentalmente; e pode ser compreendido como a taxa de conversão de reagentes em produtos [90][91], ou seja, uma medida indireta da velocidade de formação de núcleos de Ag^0 . Ademais, é esperado para esse modelo um rápido crescimento (das AgNPs), seguido de estabilização [89].

Os perfis de absorvância das cinéticas (Figura 4a) apontaram que a velocidade média da reação (k) (obtida entre todos os pontos de cada curva) pode ser influenciada pela concentração final de extrato aquoso utilizada, aumentando proporcionalmente à essa concentração; com valores de k iguais a 0,573 ($R^2=0,92$); 1,361 ($R^2=0,98$) e 4,977 ($R^2=0,99$), respectivamente, para A1(0,1), A1(1) e A1(10). Os coeficientes de correlação R^2 indicam que este modelo é capaz de explicar os valores/comportamentos observados.

O mesmo ajuste (*MnMolecular1*) não pode ser aplicado para a amostra com a maior concentração final de extrato [A1(50)] dado o perfil da cinética da reação com comportamento diferenciado em relação às demais concentrações, sendo necessário um ajuste sigmoidal, obtido a partir da equação de Boltzmann,

$$A = A_{\infty} + \left[\frac{A_{-\infty} - A_{\infty}}{1 - e^{-\frac{(t-t_0)}{\alpha}}} \right]$$

também disponível no software OriginPro 2015 (*sigmoidal/ boltzmann*), onde α é o coeficiente que descreve o comportamento da inclinação da curva durante a transição das fases (inicial, crescimento e o *plateau*) [92] e identifica a continuidade ou descontinuidade das mesmas. Para este ajuste a correlação foi de $R^2=0,98$. Adicionalmente, para essa mesma concentração observou-se uma queda brusca na absorvância após 24 h (Figura 4b), sugerindo a possibilidade de formação de AgNPs apenas durante o período de imersão em banho-maria e monitoramento da reação (3,5 h), sendo portanto, fracamente estruturadas. Dessa forma, o extrato de *I. paraguariensis* nesta concentração, provavelmente tenha produzido AgNPs cinética e/ou termodinamicamente instáveis, sendo posteriormente dissolvidas.

Para a amostra com a menor concentração final de extrato [A1(0,1)] empregada no processo reacional, foi observado um comportamento regular durante o monitoramento, e indicando apenas ligeira queda da absorvância após 24 h; no entanto, essa concentração de extrato não foi suficiente para promover a formação de AgNPs, pelo menos, detectáveis. Estas observações (referentes à maior e menor concentração final de extrato) estão em consonância com as análises relacionadas às curvas de absorção obtidas (Figura 5a e Figura 5g) para as amostras; dado que quando AgNPs são sintetizadas, as curvas de absorção (plotadas de 350 a 550 nm) apresentam uma absorção máxima, situada entre 400 e 500 nm, característica da

prata nanoestruturada. Este máximo (ausente para as concentrações extremas de extrato) é evidenciado devido ao fenômeno de ressonância plasmônica de superfície (RPS), que pode ser entendido como oscilações coletivas de elétrons presentes na banda de condução do metal, e que ressoam no mesmo comprimento de onda da radiação (luz) incidente (fornecida pelo espectrofotômetro) [93]. Estas oscilações podem variar de acordo com o tamanho, forma, concentração de extrato aquoso, temperatura de reação, a constante dielétrica do meio circundante (água neste caso), além das biomoléculas envolvidas na reação [94].

Para as amostras com concentrações intermediárias [A1(1) e A1(10)] foram observadas curvas com comportamentos similares durante as 3,5 h e com estabilidade 24 h após o início da reação, Figura 4a e 4b, respectivamente. Além disso, distribuições bem definidas com máximos centrados em 440 [A1(1)] e 460 nm [A1(10)] (Figura 5c e 5e) foram observadas, sugerindo formação de AgNPs estáveis. Ademais, entre A1(1) e A1(10), a segunda apresentou maior intensidade relativa quando comparada à primeira; e, por permitirem a formação de AgNPs, estas foram consideradas as condições ótimas de síntese nesta temperatura e pertencem ao primeiro lote de amostras (Lote 1) utilizadas neste estudo.

Adicionalmente, ao término do monitoramento, as amostras referentes às quatro concentrações foram fotografadas (Figura 5b; 5d; 5f e 5h) para comparação/inspeção visual, onde: (1) refere-se à possível suspensão coloidal (água+AgNO₃+extrato aquoso); (2) ao controle do extrato (água+extrato aquoso); e (3) ao controle da prata (água+AgNO₃).

Foram observadas colorações variadas entre as concentrações quando comparados os tubos 1 e 2. Esta variação entre a possível suspensão coloidal e seu respectivo controle contendo somente extrato é relatada na literatura como sendo outro indício da formação de AgNPs (além da RPS), conhecido como efeito ou espalhamento Tyndall [95]. Neste espalhamento, alterações ópticas visuais são observadas quando a luz sofre desvios em função da reflexão provocada por nanoestruturas suspensas em meio aquoso. No entanto, dados os resultados de A1(50) – ausência de formação de partículas estáveis – é possível que estas variações entre 1 (marrom escuro) e 2 (amarelo) (Figura 5b) tenham outros fatores envolvidos quando na presença do sal metálico, que não apenas devido à formação de nanomateriais, tais como a formação de estruturas floculadas, coaguladas e/ou sedimentadas.

Posto isto, é preciso considerar a contribuição das energias térmica e cinética durante a reação, a alta concentração de extrato aquoso utilizada nesta condição e a pigmentação natural da planta. Frente a esse cenário, investigações analíticas, além de visuais, e por diferentes técnicas de caracterização são imprescindíveis para interpretação dos resultados.

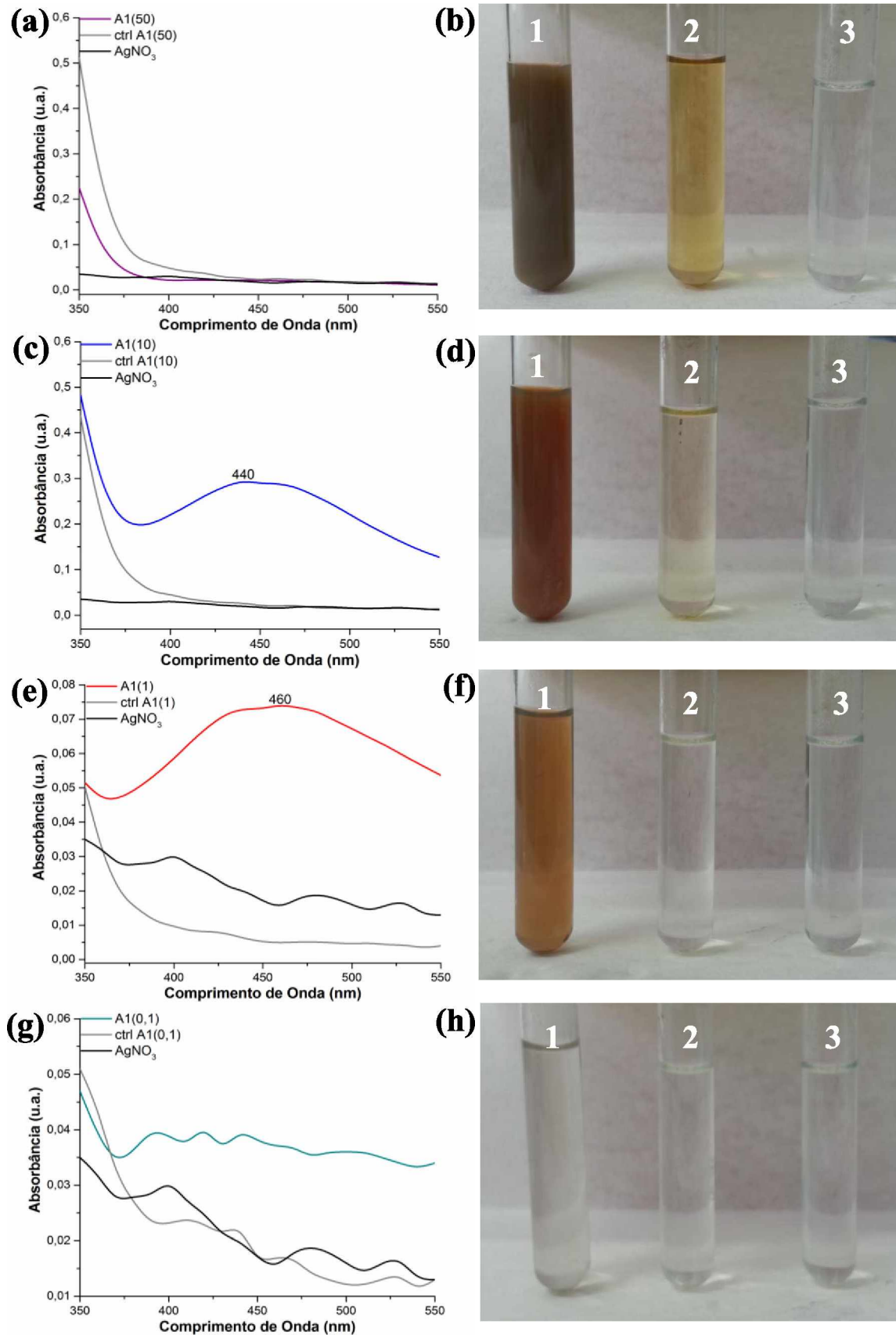


Figura 5: Curvas de absorção na região do UV-Vis e tubos das reações a 50°C com extrato aquoso de *I. paraguayensis*. Materiais provenientes do Extrato A1 nas concentrações finais de (a,b) 50 mg/mL, (c,d) 10 mg/mL, (e,f) 1 mg/mL e (g,h) 0,1 mg/mL. As linhas em cinza referem-se aos controles de extrato. As linhas pretas referem-se à solução de AgNO₃.

5.1.1.3. Fase II

As condições ótimas de síntese, a 50°C, foram almeçadas utilizando as concentrações finais de 1 [A1(1)] e 10 [A1(10)] mg/mL de extrato aquoso, como verificado na Fase I da seção 5.1.1.2. Nesse sentido, o presente estudo foi conduzido a partir de sete temperaturas adicionais (10, 20, 30, 40, 60, 70 e 80°C) – dado que a velocidade de reação e a quantidade de núcleos Ag⁰ formados também podem ser influenciadas pela temperatura [94].

As cinéticas das reações foram monitoradas por 3,5 h (Figura 6 a e 6c) e após a aquisição das medidas de absorvância aferidas nos intervalos de tempo, foram aplicados os ajustes a partir da função exponencial *MnMolecular 1* (descrita na seção 5.1.1.2), a fim de tentar obter alguma possível correlação (dada por k) entre as absorvâncias das AgNPs e a variação da temperatura reacional.

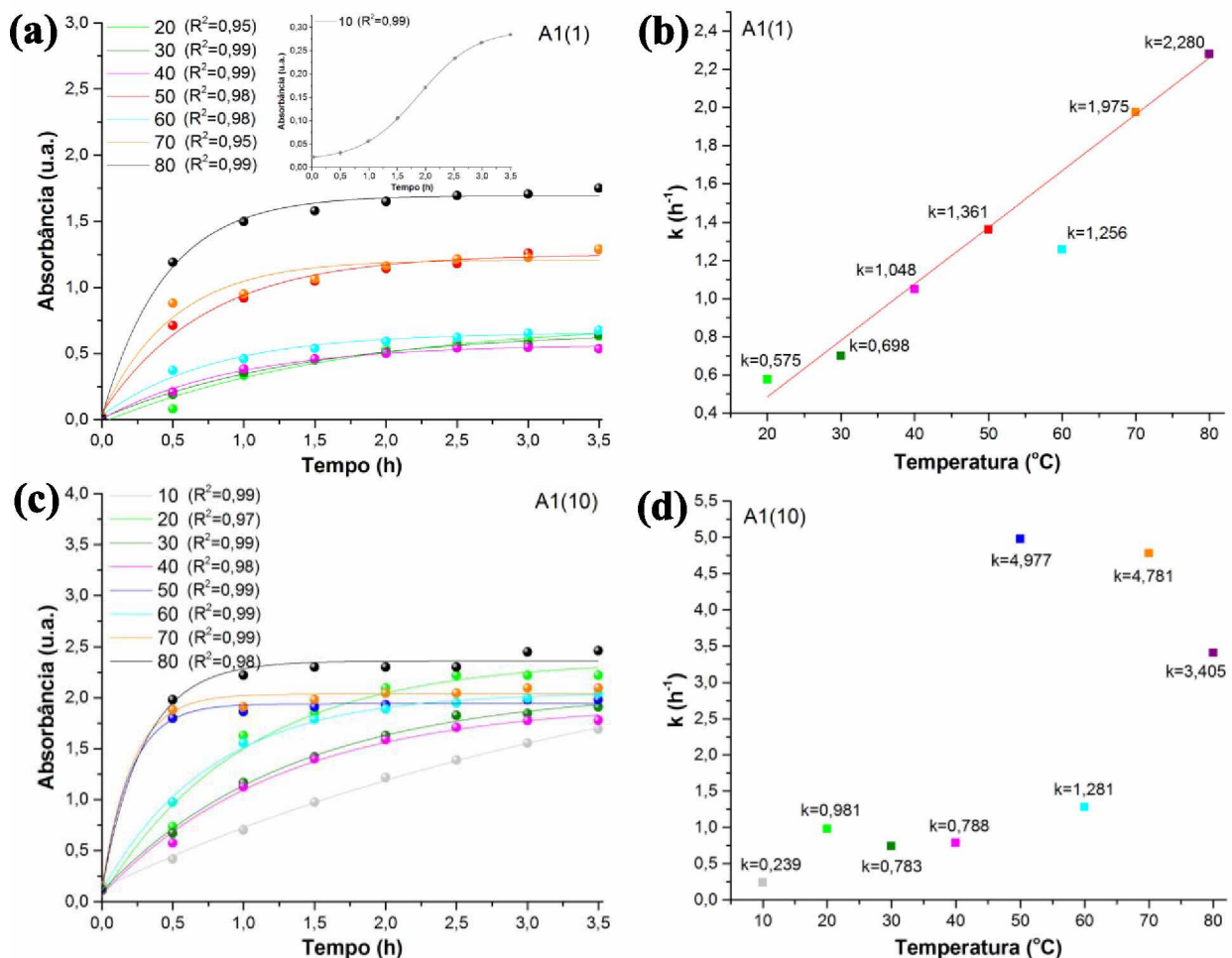


Figura 6: Cinéticas das reações em diferentes temperaturas, avaliadas por 3,5 h e velocidade média da reação (k) das AgNPs obtidas utilizando extrato aquoso de *I. paraguariensis*: (a,b) A1(1) e (c,d) A1(10).

De acordo com os dados observados (Figuras 6a e 6c) é possível sugerir que (i) a absorvância aumenta com o tempo de reação em todas as condições testadas e (ii) diferem

para ambas as concentrações de extrato e para todas as temperaturas avaliadas. Além disso, de acordo com as cinéticas das reações, (iii) não há uma relação direta entre temperatura de reação (e.g. 20 e 60°C) e absorvância mensurada, ainda que ocorra essa tendência para algumas destas condições.

Contudo, ao avaliar a velocidade média da reação (k) obtida para cada temperatura dentro do conjunto de AgNPs A1(1) (Figura 6b), foi verificado que k apresentou comportamento proporcional à temperatura reacional; com exceção de quando as reações ocorreram a 60°C e a 10°C. Para esta temperatura (10°C) a cinética da reação obteve melhor ajuste utilizando a função sigmoideal, descrita anteriormente, com $R^2=0,99$. Ao contrário deste, para o conjunto de AgNPs A1(10) (Figura 6d), as velocidades médias obtidas apresentaram comportamentos aleatórios, ou seja, não aumentaram de forma proporcional às temperaturas reacionais; com valores de k , em ordem crescente, correspondentes às temperaturas de 10, 30, 40, 20, 60, 80, 70 e 50°C.

As diferenças observadas entre A1(1) e A1(10) ao utilizar uma concentração de extrato aquoso dez vezes maior para o segundo conjunto, devem considerar a presença de um número muito maior de biomoléculas envolvidas na reação, potencializando ou mesmo inibindo os processos de redução dos íons, nucleação, crescimento e/ ou estabilização das AgNPs em uma dada temperatura, dado que o material bruto de *I. paraguariensis* (adquirido comercialmente) é composto por diferentes partes da planta (folhas, pecíolos e ramos); sendo necessários estudos adicionais para compreender este mecanismo.

As maiores velocidades médias, tanto para A1(1) quanto para A1(10), foram mais expressivas para as temperaturas de 50, 70 e 80°C, coincidindo também com maiores intensidades relativas dadas pelas distribuições indicativas de RPS (Figura 7a e 8a), com máximos dados entre 420 e 460 nm (Figuras 7b e 8b), sugerindo formação mais abundante de AgNPs para estas temperaturas. Para que nenhuma curva de absorção fosse suprimida por outras com maiores intensidades relativas e pretendendo que os perfis destas curvas para cada temperatura fossem conhecidos, foram adotados múltiplos eixos y.

Este resultado está em consonância com estudos [96][35] que indicaram uma forte tendência onde maiores absorvâncias e maior formação de AgNPs estão diretamente relacionadas a maiores temperaturas. Isto pode ocorrer devido ao aumento de colisões entre os núcleos formados, dadas pelo aumento da energia cinética fornecida pela elevação da temperatura. No entanto, em se tratando de recursos biológicos (entre eles as plantas) é necessário cautela ao indicar condições ótimas de síntese, especialmente no que tange a

parâmetros como temperatura e tempo de reação, nos quais a mistura (agente oxidante + agente redutor) ficará imersa. Diversos trabalhos apontam que tratamentos térmicos podem ocasionar a degradação e conseqüente diminuição do potencial das biomoléculas envolvidas nos processos de redução dos íons Ag^+ e/ou estabilização das AgNPs.

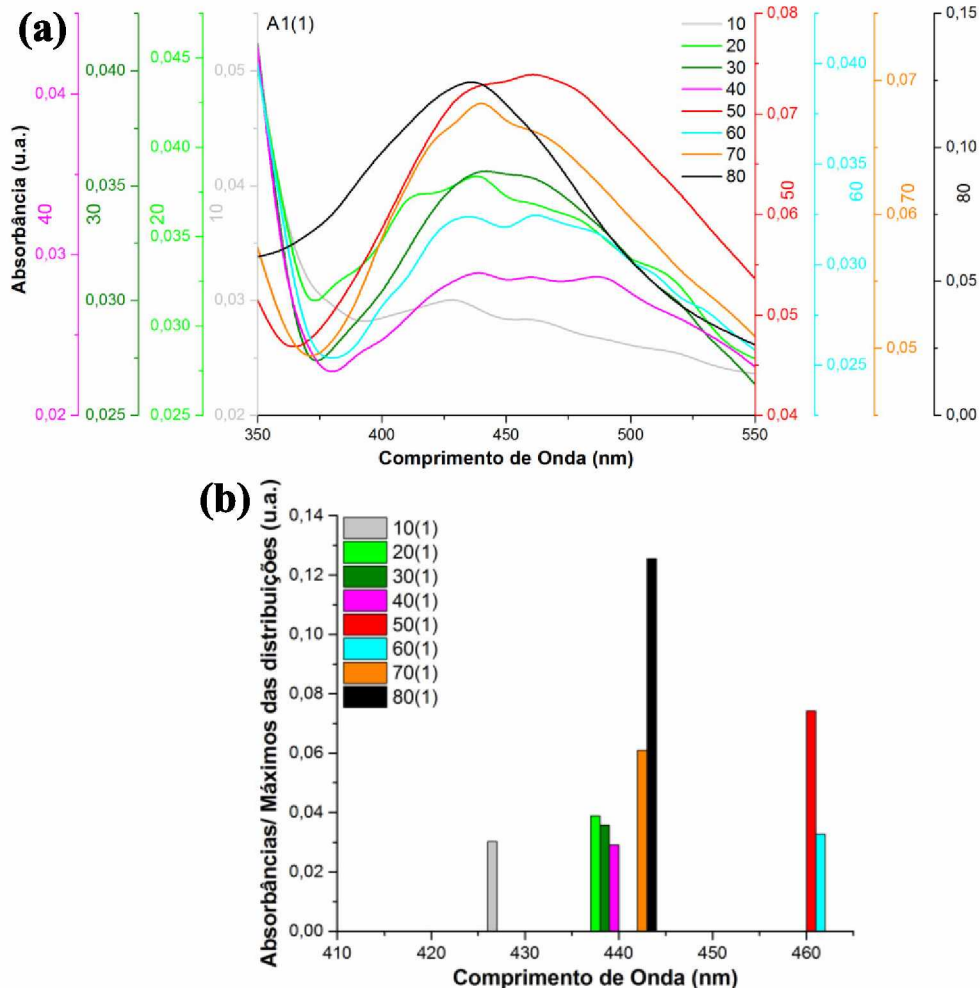


Figura 7: Lote 1 das AgNPs sintetizadas a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C utilizando extrato aquoso de *I. paraguariensis*: (a) Distribuição das absorbâncias mensuradas entre 350 e 550 nm e (b) seus respectivos máximos apresentados nos histogramas, para o grupo de amostras A1(1).

Um estudo conduzido por Da Silveira et al. [97], investigou o efeito do tempo e temperatura de infusão da rutina, um composto isolado da *I. paraguariensis*. O tempo de infusão variou de 3,8 a 15 min e entre temperaturas de 58,1 a 90°C. Os resultados indicaram que os níveis de rutina aumentam e mantêm estabilidade até 70°C. Ao aumentar a temperatura de infusão variando entre 81,9 e 90°C neste dado tempo (até 15 min), os níveis de rutina decaem bruscamente, inviabilizando sua quantificação.

Kopjar et al. [98], avaliaram a estabilidade térmica (em meio aquoso) de flavonoides presentes em suco de groselha fresco, com total de 50,85 mg de antocianinas em um volume final de 100 mL. O suco foi submetido às temperaturas de 30, 50, 70 e 90°C durante 1 h. Os

valores de flavonoides totais obtidos ao final do experimento foram, respectivamente, iguais a 50,41; 47,59; 43,96 e 37,95 mg. Outros relatos [99][100][101] corroboram com estes resultados, onde ocorre maior degradação para estes compostos quando submetidos a maiores temperaturas.

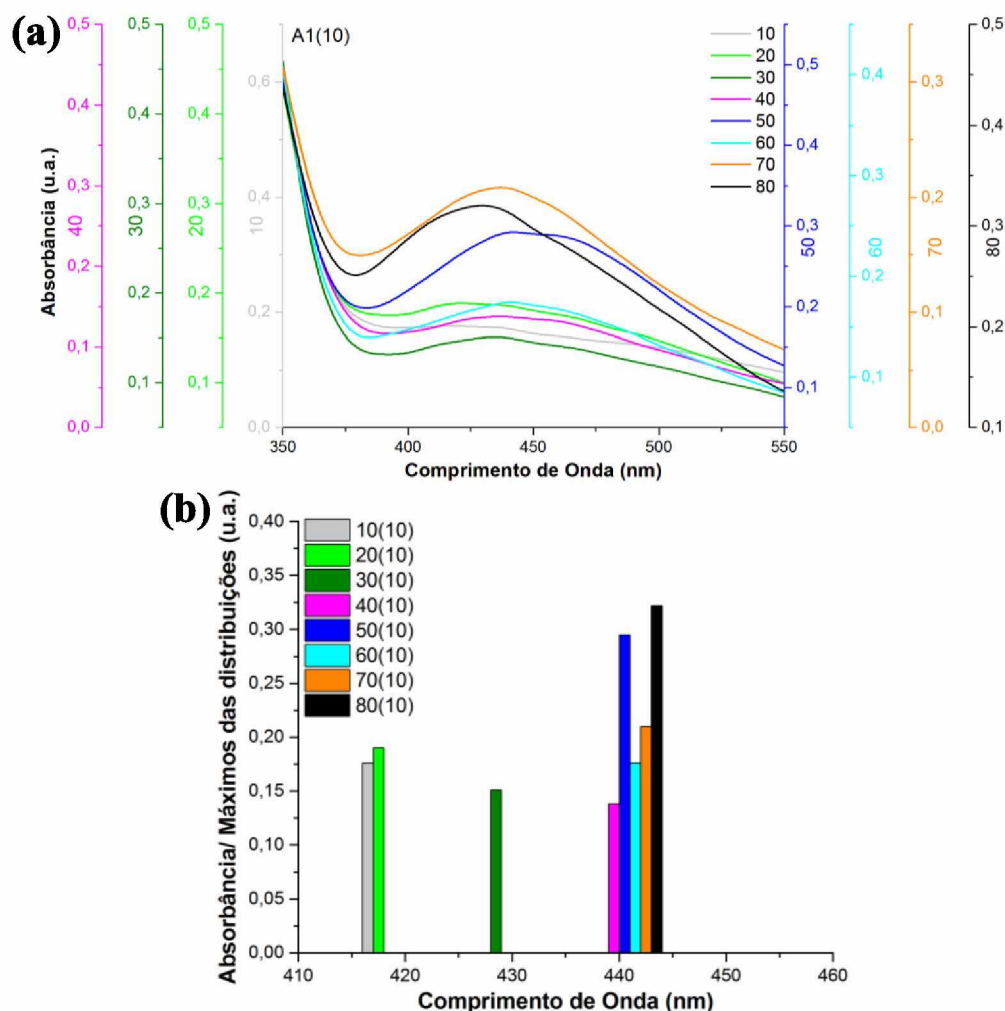


Figura 8: Lote 1 das AgNPs sintetizadas a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C utilizando extrato aquoso de *I. paraguariensis*: (a) Distribuição das absorbâncias mensuradas entre 350 e 550 nm e (b) seus respectivos máximos apresentados nos histogramas, para o grupo de amostras A1(10).

Kucner et al. [102] estudaram a degradação de compostos fenólicos pertencentes ao mirtilo. A análise se deu em função das temperaturas de 70, 80, 90, 100 e 115°C, durante 60 s. Para as temperaturas entre 70-115°C, 8,5% a 12,7% dos polifenóis foram degradados durante os primeiros 20 s. Após 60 s, o conteúdo de ácido clorogênico foi reduzido pela metade, similarmente ao total de antocianinas. Açúcares, como a pentose, foram descritos como mais sensíveis, sofrendo maior degradação térmica.

Chen et al. [103], investigaram três diferentes extratos de espécies de inhame (KL, MC e TN2). As amostras foram imersas em água nas temperaturas de 50, 60, 70, 80, 90 e 100°C

durante 10 min. Para todos os extratos avaliados ocorreu variação para menor quantidade de compostos fenólicos quando comparados ao controle (extrato cru). Para KL ocorreu uma tendência da degradação ser proporcional ao aumento da temperatura. Para MC os compostos permanecem estáveis em todas as temperaturas, mas bastante diferente do controle. E curiosamente, para TN2, ocorre maior degradação destes compostos nas temperaturas de 60°C e 70°C, quando comparadas as demais temperaturas testadas, sendo mais estável para 50°C. Resultado possivelmente análogo foi encontrado no presente trabalho, considerando a formação de AgNPs sintetizadas com *I. paraguariensis*, medida indiretamente pela absorção; onde as absorbâncias dadas pelas cinéticas de formação, pelas velocidades médias das reações e pelos máximos das distribuições indicativas de RPS a 60°C foi notavelmente diminuída em relação a 50°C, voltando a aumentar em 70 e 80°C.

Considerando os estudos descritos, sugere-se que a síntese de AgNPs utilizando extratos vegetais seja realizada a partir de uma temperatura intermediária e que promova a produção destas AgNPs de forma a minimizar a degradação dos metabólitos secundários da planta, possivelmente envolvidos no processo de redução dos íons e estabilização das AgNPs recém formadas; pois ao longo da reação (3,5 h no presente estudo), é possível que estes metabólitos sejam termicamente degradados e a síntese ocorra, majoritariamente, devido a um efeito da energia cinética/ térmica; podendo comprometer a estabilidade e as possíveis bioatividades conferidas às AgNPs obtidas.

5.1.2. Espectroscopia por correlação de fótons, Mobilidade eletroforética e reprodutibilidade dos processos de síntese

5.1.2.1. Fase I

As propriedades dimensionais e elétricas das AgNPs obtidas a 50°C e a partir das concentrações de 1 [A1(1)] e 10 [A1(10)] mg/mL, foram monitoradas por um período de 365 dias (Tabela 3), em relação ao diâmetro hidrodinâmico (DH) (obtidos pelo Z-average – dadas as possíveis variações morfológicas), ao índice de polidispersividade (PdI) e ao potencial Zeta de superfície. Quanto menor for o PdI, maior é considerada a homogeneidade da suspensão de AgNPs e quanto maior o potencial Zeta (em módulo) maior será o indicativo de sua estabilidade coloidal, dado que este valor de potencial indica maior repulsão entre as partículas e menor propensão à aglomeração.

A utilização da menor concentração de extrato possibilitou a síntese de AgNPs com DH menor ($73,1 \pm 1,6$ nm) quando comparadas àquelas sintetizadas com concentração 10 vezes maior ($108,8 \pm 1,7$ nm), variando, nessa ordem, +4,4 nm e +21,4 nm ao longo de 365

dias. Adicionalmente, o DH para A1(1) apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) somente no dia da síntese, comparado aos demais (60, 90, 120, 300 e 365 dias), em contraposição à amostra A1(10), em que os diâmetros apresentaram diferenças significativas ao longo de todo o período observado.

As medidas de PdI obtidas no dia da síntese foram 0,259 e 0,249 para as A1(1) e A1(10), respectivamente. Estes valores estão de acordo com outros encontrados na literatura para AgNPs obtidas por síntese verde utilizando extrato de erva-mate e de outras plantas [104] e corroboram com os resultados obtidos por MFA, que apresentaram AgNPs com alturas variadas. Em relação à estabilidade coloidal, A1(1) apresentou potencial Zeta um pouco mais negativo ($-26,5 \pm 0,6$ mV) do que a amostra A1(10) ($-22,3 \pm 0,9$ mV), indicando uma maior estabilidade coloidal. É importante mencionar que as AgNPs sintetizadas em ambas as concentrações de extrato aquoso de *I. paraguariensis* apresentaram manutenção da homogeneidade em todo o período de monitoramento, como mostram as curvas de distribuição (em intensidade (%)) nas Figuras 9a e 9b.

Tabela 3: Z-average, PdI e potencial Zeta de superfície das A1(1) e A1(10) sintetizadas com o extrato aquoso de *I. paraguariensis* a 50°C e monitoradas ao longo de 365 dias. Os valores estão representados como a média \pm desvio padrão da média das medidas obtidas a partir de três leituras individuais. Para a análise estatística, foi aplicado o teste de Tukey ($p < 0,05$), com diferenças significativas descritas por símbolos correspondentes a cada dia de monitoramento (0= α ; 60= β ; 90= γ ; 120= δ ; 300= ϵ ; 365= ζ) e cada concentração de extrato aquoso (representada por A1(1)=*).

Tempo após a síntese (dias)	Amostra	Z-average (d.nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
0	A1(1)	73,1 \pm 1,6	0,259 \pm 0,008	-26,5 \pm 0,6
60	A1(1)	79,7 \pm 1,9 $^{\alpha}$	0,278 \pm 0,019	-20,8 \pm 0,6 $^{\alpha}$
90	A1(1)	78,5 \pm 0,4 $^{\alpha}$	0,271 \pm 0,007	-23,0 \pm 1,1 $^{\alpha}$
120	A1(1)	78,4 \pm 1,1 $^{\alpha}$	0,279 \pm 0,005	-22,8 \pm 1,2 $^{\alpha}$
300	A1(1)	78,5 \pm 0,7 $^{\alpha}$	0,261 \pm 0,002	-23,0 \pm 1,1 $^{\alpha}$
365	A1(1)	77,5 \pm 0,9 $^{\alpha}$	0,251 \pm 0,005 $^{\beta\delta}$	-23,2 \pm 0,7 $^{\alpha}$
0	A1(10)	108,8 \pm 1,7 *	0,249 \pm 0,009	-22,3 \pm 0,9
60	A1(10)	120,6 \pm 4,6 $^{\alpha*}$	0,338 \pm 0,042	-21,7 \pm 0,5 *
90	A1(10)	118,5 \pm 1,4 $^{\alpha*}$	0,298 \pm 0,034	-20,7 \pm 0,6 *
120	A1(10)	117,8 \pm 2,2 $^{\alpha*}$	0,308 \pm 0,029	-20,3 \pm 0,7 $^{\alpha*}$
300	A1(10)	130,8 \pm 1,3 $^{\alpha\beta\gamma\delta*}$	0,375 \pm 0,021 $^{\alpha*}$	-20,6 \pm 0,6 *
365	A1(10)	130,2 \pm 0,9 $^{\alpha\beta\gamma\delta*}$	0,347 \pm 0,049 $^{\alpha*}$	-21,7 \pm 0,9

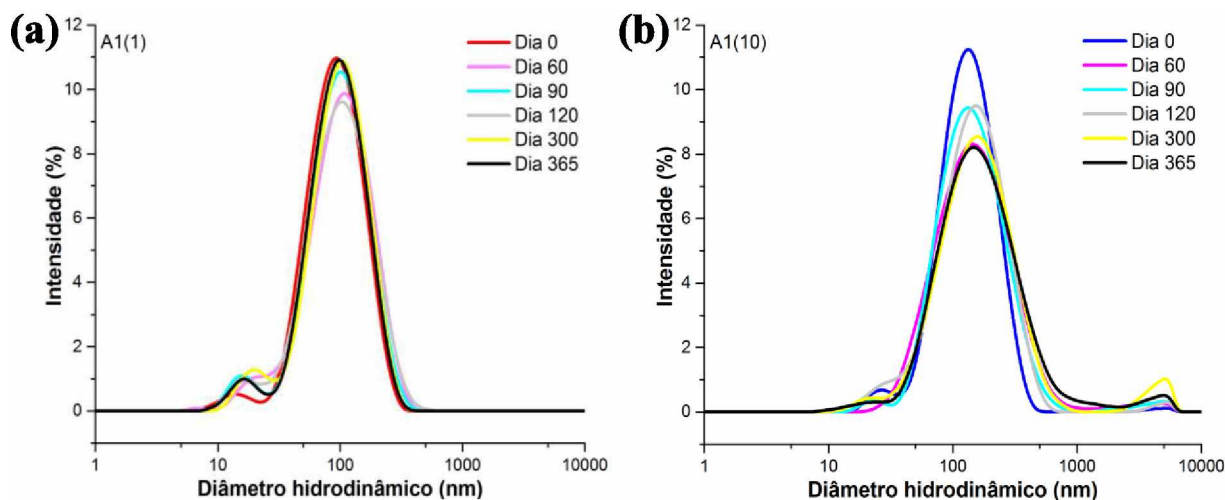


Figura 9: Curvas de distribuição de diâmetros hidrodinâmicos (dados em intensidade (%)) das AgNPs sintetizadas com extrato aquoso de *I. paraguariensis*: (a) A1(1) e (b) A1(10), monitoradas ao longo de 365 dias.

Para avaliar a reprodutibilidade dos processos de síntese foram desenvolvidas quatro reações adicionais (Lotes 2, 3, 4 e 5), sob as mesmas condições (concentração de extrato, tempo e temperatura de reação, diluições utilizadas na análise, nível de água do banho-maria, entre outros procedimentos padrões) (Figura 10a e 10b). Os Lotes 2, 3 e 4 foram preparados a partir do material bruto pulverizado e armazenado à temperatura ambiente, e o Lote 5 foi preparado a partir do material bruto pulverizado e submetido ao congelamento (ambos estocados no mesmo dia), visando avaliar a possível influência do ambiente de armazenamento do material, em relação às características físico-químicas das AgNPs.

Os resultados indicaram que para ambos os grupos, A1(1) e A1(10), ocorrem variações nas intensidades relativas para todos os Lotes, sendo maiores ou menores quando comparadas ao Lote 1. Nesse tipo de síntese, e se tratando de uma planta comercial composta por diferentes partes (folhas, pecíolos e ramos) – como a utilizada nessa etapa do estudo – é inviável saber quanto de cada parte está presente no material bruto utilizado para o preparo de cada extrato aquoso e nem quais metabólitos estão envolvidos nesse processo, podendo variar a cada lote. Com isso, mais ou menos compostos podem estar envolvidos na reação, assim como em maiores ou menores quantidades.

Em relação ao ambiente de armazenamento (temperatura ambiente *versus* congelamento), foram observadas absorvâncias relativas diminutas, além de distribuições mais alongadas e menos definidas, como é o caso do Lote 5 para o A1(1) e para os Lotes 4 e 5 em A1(10). Como reportado na literatura, *I. paraguariensis* é uma planta altamente higroscópica, ou seja, o teor de água influencia na sua longevidade e na manutenção de suas propriedades.

Dessa forma, fatores como umidade, temperatura e tempo de estocagem podem ser os responsáveis pela diminuição do potencial redutor e/ou estabilizante do material biológico [105][25][106][107]. Por outro lado, os máximos de absorção das curvas indicativas de RPS, para A1(1) e A1(10), sugerem que independente da concentração de extrato utilizado nas sínteses, ocorre a predominância de picos de absorção em torno de 440 nm, característico da prata nanoestruturada.

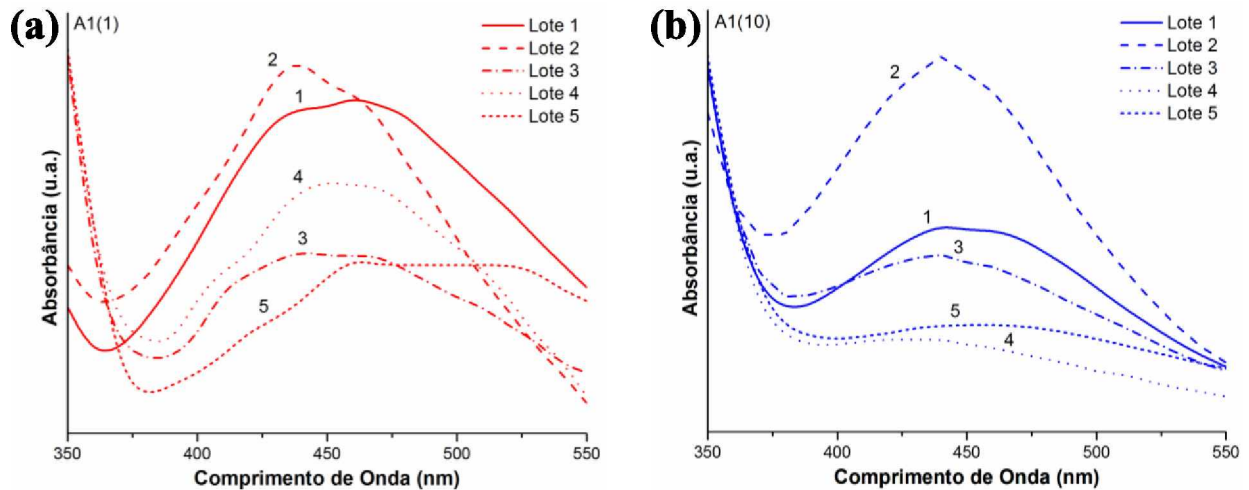


Figura 10: Curvas de absorção das AgNPs sintetizadas a 50°C utilizando extrato aquoso de *I. paraguariensis* produzidas em cinco lotes, sendo os Lotes 1, 2, 3 e 4 produzidos a partir do material bruto armazenado a temperatura ambiente e o Lote 5 produzido a partir do material bruto armazenado sob congelamento: (a) A1(1) e (b) A1(10).

Ademais, as AgNPs sintetizadas para cada lote adicional (2, 3, 4 e 5) apresentaram similaridades quanto ao DH (Figura 11), PdI e potencial Zeta de superfície, quando comparadas ao Lote 1 (Tabela 4).

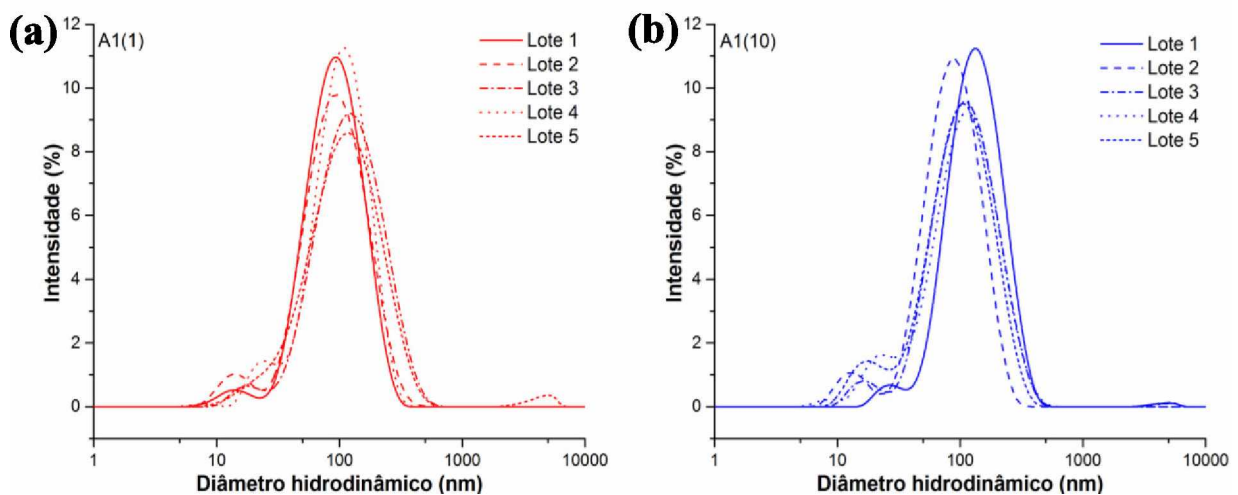


Figura 11: Curvas de distribuição de diâmetros hidrodinâmicos (dados em intensidade (%)) obtidas nos dias das sínteses das AgNPs produzidas com extrato de *I. paraguariensis* em cinco lotes distintos, sendo os Lotes 1, 2, 3 e 4 produzidos a partir do material bruto armazenado a temperatura ambiente e o Lote 5 produzido a partir do material bruto armazenado sob congelamento: (a) A1(1) e (b) A1(10).

Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram observadas entre os lotes de ambas as concentrações de extrato, principalmente em relação ao DH que apresentou variações de $|27,6|$ nm entre os quatro lotes das amostras A1(1) e $|41,3|$ nm entre os quatro lotes das amostras A1(10). Ainda que tais variações de diâmetros ocorram entre uma síntese e outra (realizadas sob as mesmas condições) estes DH encontram-se na mesma ordem de magnitude, e são esperadas variações para rotas síntese verde utilizando plantas; sendo, portanto, valores considerados reprodutíveis.

Tabela 4: Z-average, PDI e potencial Zeta de superfície das amostras A1(1) e A1(10), sintetizadas com extrato aquoso de *I. paraguariensis* a 50°C e em cinco lotes distintos, obtidos no dia da síntese. Os valores estão representados como a média \pm erro padrão da média das medidas obtidas a partir de três leituras individuais. Para a análise estatística foi aplicado o teste de Tukey ($p < 0.05$), com diferenças significativas descritas por símbolos correspondentes a cada lote sintetizado (Lote 1= α ; Lote 2= β ; Lote 3= γ ; Lote 4= δ).

Lote	Amostra	Z-average (d.nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
1	A1(1)	73,1 \pm 1,6	0,259 \pm 0,008	-26,5 \pm 0,6
2	A1(1)	71,2 \pm 0,7	0,282 \pm 0,005	-23,1 \pm 0,6 ^{α}
3	A1(1)	98,8 \pm 0,3 ^{$\alpha\beta$}	0,279 \pm 0,003 ^{α}	-27,3 \pm 0,4 ^{β}
4	A1(1)	81,6 \pm 0,8 ^{$\alpha\beta\gamma$}	0,252 \pm 0,008 ^{γ}	-24,9 \pm 1,2 ^{γ}
5	A1(1)	86,7 \pm 2,5	0,363 \pm 0,006	-21,7 \pm 1,4
1	A1(10)	108,8 \pm 1,7	0,249 \pm 0,009	-22,3 \pm 0,9
2	A1(10)	67,5 \pm 0,1 ^{α}	0,271 \pm 0,001	-21,6 \pm 0,6
3	A1(10)	85,8 \pm 0,2 ^{$\alpha\beta$}	0,313 \pm 0,045	-23,7 \pm 1,4
4	A1(10)	78,3 \pm 2,4 ^{$\alpha\beta\gamma$}	0,386 \pm 0,020 ^{$\alpha\beta\gamma$}	-25,4 \pm 3,9
5	A1(10)	72,6 \pm 1,8	0,347 \pm 0,030	-23,0 \pm 1,0

5.1.2.2. Fase II

Os DH, PDI e potencial Zeta de superfície também foram investigados em relação às sínteses realizadas nas temperaturas de 10, 20, 30, 40, 60, 70 e 80°C. Em adição, para cada temperatura foi realizada uma reação de síntese adicional (Lote 2), com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade dos processos.

As curvas de distribuição da absorção das reações variando de 10 a 80°C para A1(1) e A1(10) são apresentadas nas Figuras 12a e 12b (Lote 1 e Lote 2); ressaltando que o Lote 1 para cada temperatura foi anteriormente apresentado na Fase II da seção 5.1.1.3 (Figuras 7 e

8). Para ambos os Lotes foram adotados valores independentes no eixo das ordenadas (y) referentes a cada temperatura.

Como verificado, diferentes concentrações de extrato aquoso podem influenciar nas propriedades ópticas das AgNPs. Ao comparar as amostras em A1(1) e A1(10), nota-se irregularidades nas curvas de absorção, presentes em A1(1). Este efeito pode ocorrer devido a anisotropias morfológicas e distribuições de tamanhos variados das AgNPs, ou mesmo a formação de pequenos agregados ou aglomerados.

Assim como ocorre entre os diferentes Lotes produzidos a partir da temperatura de 50°C, para as demais temperaturas também ocorrem variações nas intensidades relativas e nos deslocamentos dos máximos das curvas de absorção; apresentando também valores de DH na mesma ordem de grandeza para ambas as concentrações de extrato (Figuras 13a e 13b; Tabela 5 e 6).

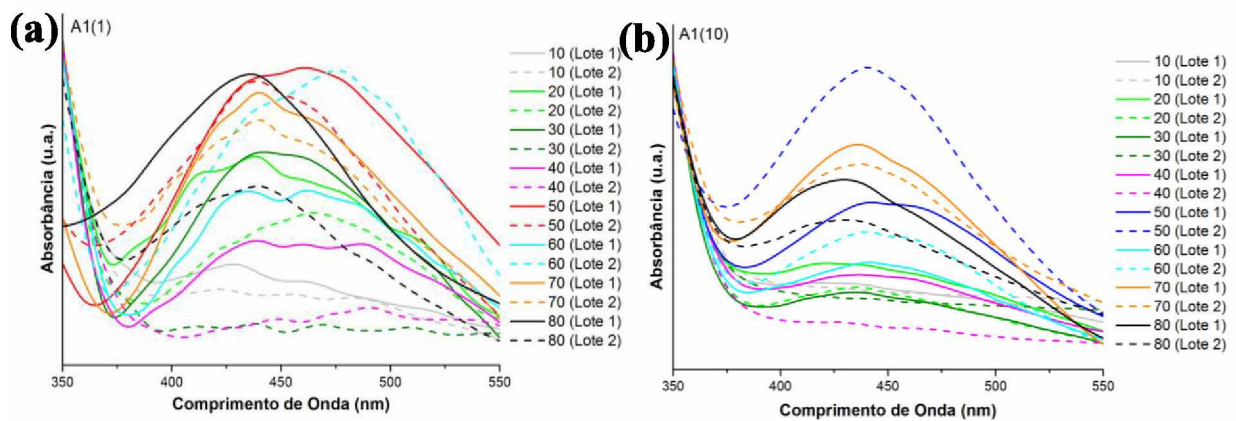


Figura 12: Curvas de absorção das AgNPs sintetizadas a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C utilizando extrato aquoso de *I. paraguariensis* para os grupos de amostras: (a) A1(1) e (b) A1(10), em dois lotes distintos, sendo as do Lote 1 representadas pelas linhas contínuas e do Lote 2 pelas linhas tracejadas.

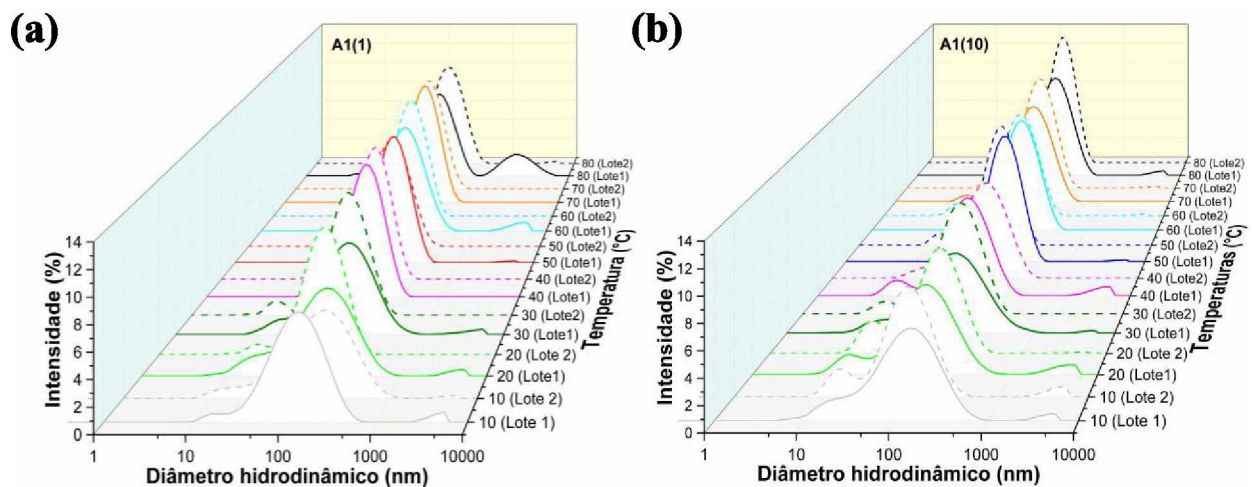


Figura 13: Curvas de distribuição de diâmetros hidrodinâmicos (dados em intensidade (%)) (obtidas nos dias das sínteses) das AgNPs produzidas com extrato de *I. paraguariensis* nas temperaturas de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C em dois lotes distintos, sendo o Lote 1 representado pelas linhas contínuas e o Lote 2 pelas linhas tracejadas: (a) A1(1) e (b) A1(10).

Tabela 5: Z-average, PdI e potencial Zeta de superfície da amostra A1(1) obtidos no dia da síntese com extrato aquoso de *I. paraguariensis* em diferentes temperaturas sob as mesmas condições. Os valores estão representados como a média \pm desvio padrão (para o mesmo lote) e a média \pm erro padrão (entre lotes distintos) da média das medidas obtidas a partir de três leituras. Para análise estatística foi aplicado o teste de Tukey ($p < 0,05$), com diferença significativa, entre os lotes, descrita pelo símbolo correspondente ao Lote 1 das AgNPs sintetizadas (Lote 1= α) e, para o mesmo lote, em relação a estabilidade, avaliada 365 dias após a síntese, descrita pelo símbolo correspondente ao Lote comparativo (Lote comparativo= β).

T (°C)	Amostra	Lotes	Z-average (d.nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
10	A1(1)	Lote 1	102,1 \pm 1,6	0,401 \pm 0,020	-21,4 \pm 0,4
		Lote 2	105,9 \pm 3,1	0,520 \pm 0,028 $^{\alpha}$	-22,7 \pm 2,4
		Estabilidade 365 dias	Lote 2	97,2 \pm 1,4 $^{\beta}$	0,265 \pm 0,022 $^{\beta}$
20	A1(1)	Lote 1	82,3 \pm 0,9	0,421 \pm 0,005	-21,6 \pm 0,7
		Lote 2	72,5 \pm 0,5 $^{\alpha}$	0,264 \pm 0,006 $^{\alpha}$	-25,8 \pm 0,2 $^{\alpha}$
		Estabilidade 365 dias	Lote 2	117,8 \pm 0,2 $^{\beta}$	0,208 \pm 0,014 $^{\beta}$
30	A1(1)	Lote 1	85,3 \pm 1,6	0,459 \pm 0,020	-26,1 \pm 0,1
		Lote 2	70,9 \pm 0,5 $^{\alpha}$	0,293 \pm 0,002 $^{\alpha}$	-30,1 \pm 0,7 $^{\alpha}$
		Estabilidade 365 dias	Lote 2	72,2 \pm 1,5 $^{\beta}$	0,348 \pm 0,035 $^{\beta}$
40	A1(1)	Lote 1	93,1 \pm 1,0	0,231 \pm 0,010	-17,3 \pm 0,3
		Lote 2	80,6 \pm 2,1 $^{\alpha}$	0,251 \pm 0,018	-29,7 \pm 2,1 $^{\alpha}$
		Estabilidade 365 dias	Lote 2	123,2 \pm 2,8 $^{\beta}$	0,236 \pm 0,023
50	A1(1)	Lote 1	73,1 \pm 1,6	0,259 \pm 0,008	-26,5 \pm 0,6
		Lote 2	71,2 \pm 0,7	0,282 \pm 0,005	-23,1 \pm 0,6 $^{\alpha}$
		Estabilidade 365 dias	Lote 1	77,5 \pm 0,9 $^{\beta}$	0,251 \pm 0,005
60	A1(1)	Lote 1	101,6 \pm 1,4	0,255 \pm 0,005	-25,0 \pm 1,1
		Lote 2	76,9 \pm 0,7 $^{\alpha}$	0,242 \pm 0,006 $^{\alpha}$	-28,9 \pm 0,3 $^{\alpha}$
		Estabilidade 365 dias	Lote 2	93,3 \pm 1,2 $^{\beta}$	0,268 \pm 0,007
70	A1(1)	Lote 1	90,2 \pm 0,3	0,239 \pm 0,006	-21,4 \pm 0,9
		Lote 2	73,8 \pm 0,2 $^{\alpha}$	0,269 \pm 0,010 $^{\alpha}$	-32,1 \pm 1,1 $^{\alpha}$
		Estabilidade 365 dias	Lote 2	88,0 \pm 0,8	0,273 \pm 0,007
80	A1(1)	Lote 1	101,6 \pm 0,3	0,439 \pm 0,004	-20,7 \pm 1,5
		Lote 2	85,6 \pm 0,8 $^{\alpha}$	0,294 \pm 0,025 $^{\alpha}$	-26,3 \pm 0,8 $^{\alpha}$
		Estabilidade 365 dias	Lote 2	89,5 \pm 1,2 $^{\beta}$	0,267 \pm 0,007 $^{\beta}$

Tabela 6: Z-average, PDI e potencial Zeta de superfície da amostra A1(10) obtidos no dia da síntese com extrato aquoso de *I. paraguariensis* em diferentes temperaturas sob as mesmas condições. Os valores estão representados como a média \pm desvio padrão (para o mesmo lote) e a média \pm erro padrão (entre lotes distintos) da média das medidas obtidas a partir de três leituras. Para análise estatística foi aplicado o teste de Tukey ($p < 0,05$), com diferença significativa, entre os lotes, descrita pelo símbolo correspondente ao Lote 1 das AgNPs sintetizadas (Lote 1= α) e, para o mesmo lote, em relação a estabilidade, avaliada 365 dias após a síntese, descrita pelo símbolo correspondente ao Lote comparativo (Lote comparativo= β).

T (°C)	Amostra	Lotes	Z-average (d.nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
10	A1(10)	Lote 1	82,0 \pm 1,4	0,519 \pm 0,026	-21,9 \pm 1,0
		Lote 2	63,5 \pm 1,4 $^{\alpha}$	0,434 \pm 0,006 $^{\alpha}$	-24,2 \pm 3,7 $^{\alpha}$
	Estabilidade 365 dias	Lote 2	79,0 \pm 4,2 $^{\beta}$	0,414 \pm 0,029 $^{\beta}$	-23,7 \pm 0,2 $^{\beta}$
20	A1(10)	Lote 1	67,2 \pm 0,9	0,495 \pm 0,001	-26,4 \pm 1,8
		Lote 2	58,3 \pm 0,8 $^{\alpha}$	0,471 \pm 0,007 $^{\alpha}$	-22,5 \pm 0,2 $^{\alpha}$
	Estabilidade 365 dias	Lote 2	80,0 \pm 2,2 $^{\beta}$	0,318 \pm 0,050 $^{\beta}$	-23,3 \pm 0,6 $^{\beta}$
30	A1(10)	Lote 1	70,5 \pm 1,9	0,503 \pm 0,026	-23,5 \pm 1,0
		Lote 2	67,1 \pm 3,9 $^{\alpha}$	0,382 \pm 0,065 $^{\alpha}$	-31,0 \pm 6,7 $^{\alpha}$
	Estabilidade 365 dias	Lote 2	71,7 \pm 1,7	0,318 \pm 0,050 $^{\beta}$	-23,1 \pm 1,0
40	A1(10)	Lote 1	59,9 \pm 0,9	0,442 \pm 0,016	-23,1 \pm 1,2
		Lote 2	70,7 \pm 0,5 $^{\alpha}$	0,354 \pm 0,039 $^{\alpha}$	-32,6 \pm 8,7 $^{\alpha}$
	Estabilidade 365 dias	Lote 2	105,5 \pm 4,3 $^{\beta}$	0,363 \pm 0,025 $^{\beta}$	-24,9 \pm 1,8 $^{\beta}$
50	A1(10)	Lote 1	108,8 \pm 1,7	0,249 \pm 0,009	-22,3 \pm 0,9
		Lote 2	67,5 \pm 0,1 $^{\alpha}$	0,271 \pm 0,001	-21,6 \pm 0,6
	Estabilidade 365 dias	Lote 1	130,2 \pm 0,9 $^{\beta}$	0,347 \pm 0,049 $^{\beta}$	-21,7 \pm 0,9
60	A1(10)	Lote 1	92,0 \pm 0,8	0,373 \pm 0,004	-26,5 \pm 2,5
		Lote 2	67,9 \pm 1,4 $^{\alpha}$	0,298 \pm 0,009 $^{\alpha}$	-26,2 \pm 3,7
	Estabilidade 365 dias	Lote 2	73,2 \pm 1,9 $^{\beta}$	0,354 \pm 0,042	-25,3 \pm 2,1
70	A1(10)	Lote 1	83,1 \pm 0,7	0,274 \pm 0,005	-20,7 \pm 0,2
		Lote 2	78,8 \pm 2,0 $^{\alpha}$	0,264 \pm 0,003 $^{\alpha}$	-24,0 \pm 1,1 $^{\alpha}$
	Estabilidade 365 dias	Lote 2	94,1 \pm 2,5 $^{\beta}$	0,381 \pm 0,005 $^{\beta}$	-23,0 \pm 0,8 $^{\beta}$
80	A1(10)	Lote 1	102,8 \pm 0,7	0,288 \pm 0,037	-20,8 \pm 0,4
		Lote 2	104,0 \pm 0,9	0,220 \pm 0,012 $^{\alpha}$	-21,1 \pm 1,4
	Estabilidade 365 dias	Lote 2	129,0 \pm 0,3 $^{\beta}$	0,344 \pm 0,053 $^{\beta}$	-22,4 \pm 0,3 $^{\beta}$

Estes resultados corroboram com um estudo que avaliou AgNPs sintetizadas com extrato de *Lippia citriodora* [105], em que a concentração de extrato e a temperatura não alteraram os tamanhos das partículas (obtidas no dia da síntese); sendo que grande parte situa-se na faixa nanométrica. Os PdI apresentaram valores entre 0,2 e 0,5, característicos e documentados quando utiliza-se esse método para obtenção de AgNPs [108][109]; com potenciais Zeta de superfície sugestivos de instabilidade coloidal incipiente [110].

Em adição, a avaliação da estabilidade, realizada 365 dias após a síntese para cada temperatura (Tabela 5 e 6), indicou manutenção ou aumento do potencial Zeta de superfície e ligeiras oscilações nos PdI para todas as AgNPs produzidas em A1(1) e A1(10); ainda que os DH tenham apresentado variações em até |45,6| nm, em relação ao dia da síntese.

5.1.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Microscopia de Força Atômica (MFA)

As análises de MET e MFA permitiram investigar as morfologias e os diâmetros (dados em altura) das AgNPs. Os resultados advindos de ambas as técnicas e referentes às mesmas amostras foram divergentes. As micrografias obtidas por MET indicaram AgNPs com morfologias variadas (Figura 14), incluindo triangulares, hexagonais, esféricas ou quase-esféricas, em forma de bastões, entre outras menos definidas. Devido ao número limitado de AgNPs com a mesma morfologia, foi inviável inferir resultados quantitativos a respeito das distribuições dos seus diâmetros secos a partir da técnica de MET.

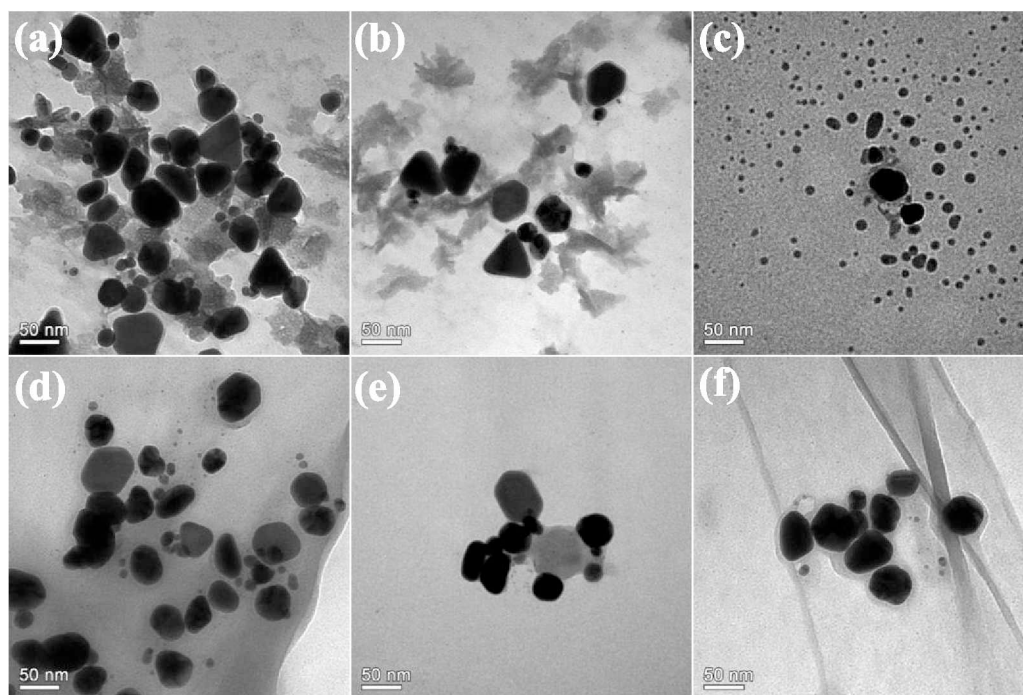


Figura 14: Micrografias obtidas por MET das AgNPs sintetizadas utilizando o extrato aquoso de *I. paraguariensis*. (a-c) A1(1) e (d-f) A1(10), com variedade de tamanhos e morfologias.

Por outro lado, as topografias representativas das AgNPs analisadas por MFA (Figura 15a e 15b), apontaram distribuições em alturas variadas (Figura 15c e 15d) para a mesma concentração e entre as duas concentrações de extrato.

A1(1) apresentou uma única população de AgNPs com diâmetros entre 4 e 30 nm com média da altura centralizada em $8,30 \pm 0,32$ nm (Figura 15c). Em contrapartida, a amostra A1(10) apresentou três subpopulações centralizadas em $29,74 \pm 0,37$ nm, $38,54 \pm 0,30$ nm e $45,94 \pm 0,34$ nm, com diâmetros variando de 24 a 60 nm (Figura 15d). Além disso, as AgNPs analisadas por MFA evidenciaram morfologias esféricas, quase-esféricas e/ou irregulares em ambas as amostras, de acordo com as imagens representativas de uma única área analisada de $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ (Figura 15a e 15b). Adicionalmente, é possível confirmar, para esta temperatura de síntese, que as AgNPs apresentam diâmetros maiores para a amostra A1(10) quando comparadas com a amostra A1(1), com menor concentração de extrato.

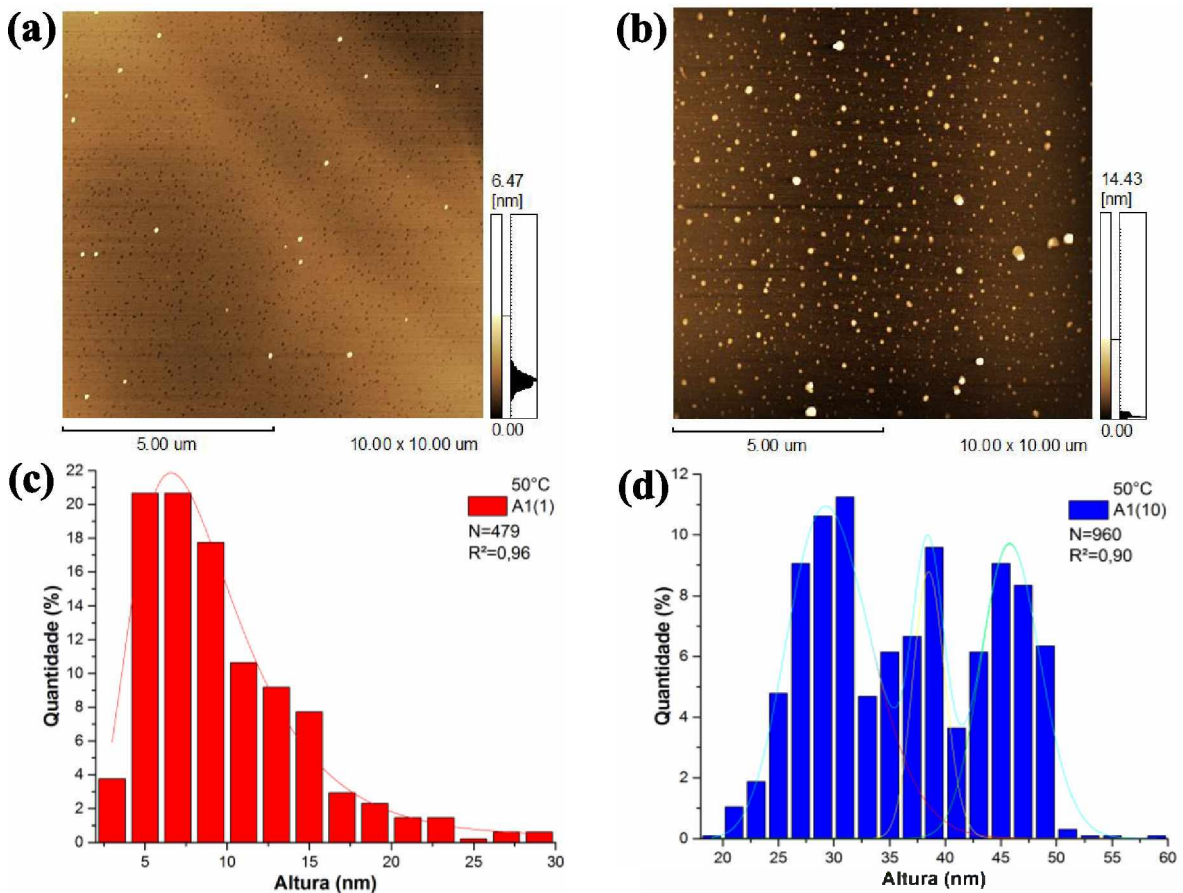


Figura 15: Distribuições de diâmetros secos, dados em altura, das AgNPs (Lote 1) sintetizadas com extrato aquoso de *I. paraguariensis* na temperatura de 50°C (histogramas) e as respectivas topografias representativas de (a-c) A1(1) e (b-d) A1(10), obtidas por MFA. Os ajustes aplicados nos histogramas foram realizados a partir da função de densidade de probabilidade com distribuição *Log-normal*, utilizando o software OriginPro 2015.

Assim como ocorre para as morfologias das AgNPs sintetizadas a 50°C, as AgNPs produzidas a partir das temperaturas de 10, 20, 30, 40, 60, 70 e 80°C apresentaram formatos

esféricos, quase-esféricos ou irregulares, e com padrões morfológicos similares entre si. Dessa forma, esse conjunto de temperaturas/AgNPs pode ser representado pelas imagens topográficas das AgNPs referentes às temperaturas de 20 e 80°C (Figuras 16a e 16b).

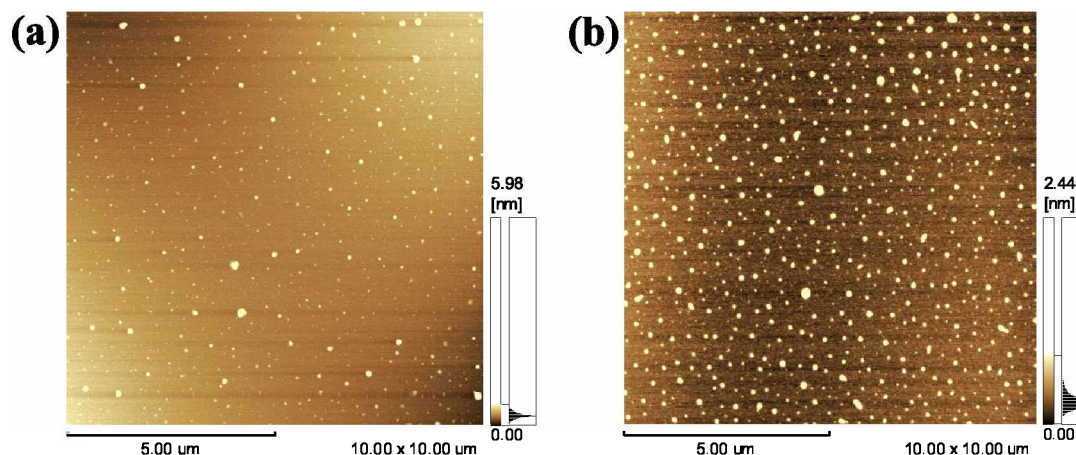


Figura 16: Imagens topográficas, obtidas por MFA, das AgNPs sintetizadas com extrato aquoso de *I. paraguariensis* na concentração final de extrato aquoso de 10 mg/mL e nas temperaturas de (a) 20°C e (b) 80°C, também representativas para as demais temperaturas avaliadas (10, 30, 40, 60 e 70°C).

Para comparação do efeito da temperatura em relação a altura das AgNPs sintetizadas, foram obtidos histogramas (Figuras 17 e 18); os quais foram plotados a partir do mesmo número de imagens adquiridas para cada temperatura e para cada concentração de extrato aquoso [A1(1) e A1(10)]. Entretanto, o número de partículas (N) contabilizadas difere para cada amostragem, assim como o coeficiente de correlação (R^2) entre estas AgNPs. Este coeficiente foi utilizado para indicar se as alturas estão fortemente ou fracamente correlacionadas entre si em cada amostra. Para a obtenção do R^2 foram aplicados ajustes nas curvas a partir da função de densidade de probabilidade com distribuição *Log-normal* nos histogramas gerados. É importante mencionar que N e R^2 não estão relacionados diretamente.

A partir dos resultados obtidos pelos histogramas, verificou-se que para a maioria das temperaturas foram identificadas subpopulações com distribuições bi- ou trimodais, em que as partículas com menores alturas foram de aproximadamente 1,5 nm – síntese realizada a 70°C – e as maiores em torno de 16 nm – sintetizadas a 80°C. Com exceção das AgNPs sintetizadas a 30°C [A1(10)] e a 70°C [A1(1)], que apresentaram R^2 fracos e com uma correlação negativa (respectivamente iguais a -0,29 e -0,72), indicando um comportamento assimétrico e aleatório entre as partículas; todas as demais apresentaram fortes coeficientes de correlação, variando de $R^2=0,88$ a $R^2=0,99$, indicando simetria entre os diâmetros das AgNPs.

Dados os resultados apresentados, sugere-se que as diferenças observadas entre as microscopias (MET e MFA) ocorram devido (i) a maior área imageada fornecida pela

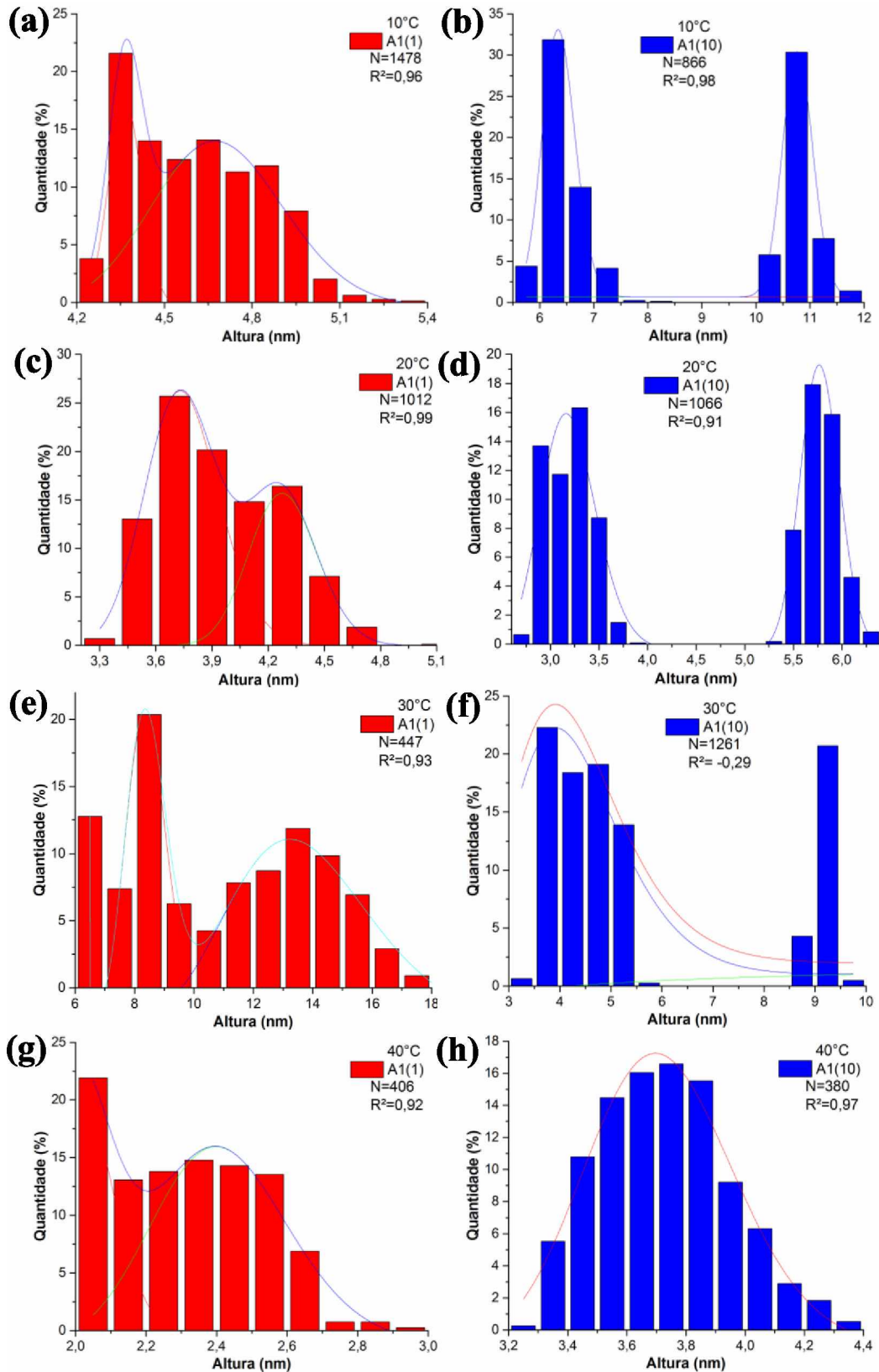


Figura 17: Distribuições dos diâmetros secos, em altura, das AgNPs sintetizadas com extrato aquoso de *I. paraguariensis* a 10, 20, 30 e 40°C (Lote 1), obtidos por MFA: (a, c, e, g) A1(1) e (b, d, f, h) A1(10). Os ajustes aplicados nos histogramas foram realizados a partir da função de densidade de probabilidade com distribuição *Log-normal*, utilizando o software OriginPro 2015.

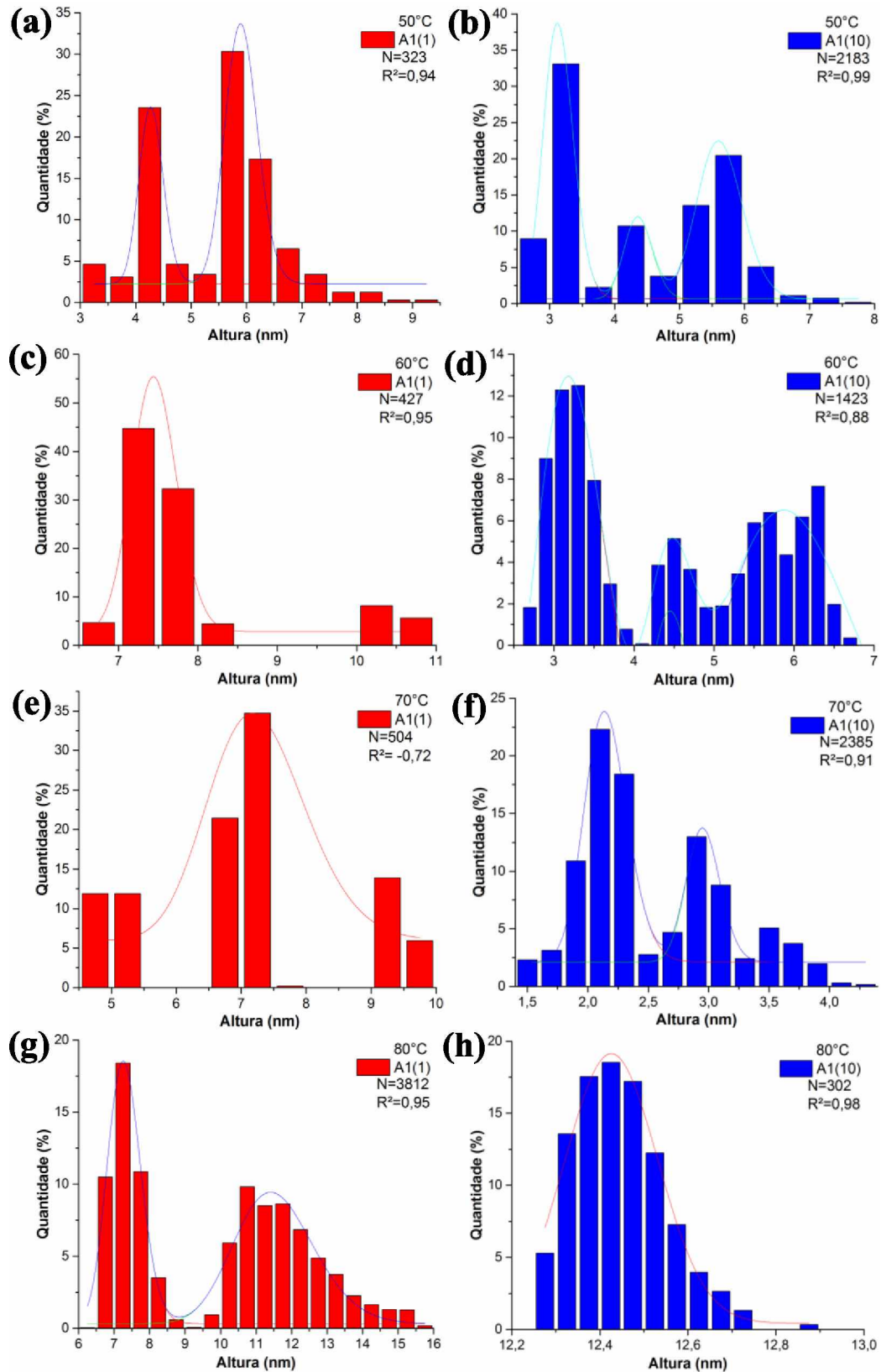


Figura 18: Distribuições dos diâmetros secos, em altura, das AgNPs sintetizadas com extrato aquoso de *I. paraguariensis* a 50 (Lote 2), 60, 70 e 80°C (Lote 1), obtidos por MFA: (a, c, e, g) A1(1) e (b, d, f, h) A1(10). Os ajustes aplicados nos histogramas foram realizados a partir da função de densidade de probabilidade com distribuição *Log-normal*, utilizando o software OriginPro 2015.

primeira (mm^2), em oposição à segunda técnica (μm^2), e dessa forma, observa-se uma maior variedade de estruturas representativas; (ii) ao fato da MET analisar a amostra em função do diâmetro circular equivalente (DCE) [111], enquanto a MFA avalia a mesma amostra - mas não necessariamente as mesmas partículas - em função da altura [112]; e que (iii) ao depositar a amostra, tanto na grade de cobre quanto na mica, pode ocorrer um efeito conhecido como anel de café (“*coffee ring*”), que é um padrão deixado por uma poça de líquido carregado de partículas depois que ele evapora [113], no qual estas partículas tendem a migrar para as extremidades da poça em função de um fluxo que ocorre durante o processo de evaporação e, conseqüentemente, podem gerar aglomerados de partículas ou mesmo que partículas maiores se concentram preferencialmente nas bordas, enquanto as menores convergem para o centro da gotícula (como pode ser visto entre as diferentes alturas das AgNPs sintetizadas a 50°C , e.g., apresentadas nos Lotes 1 (Figura 15 a e b) e 2 (Figura 18 a e b)). Tais fatores podem levar a disparidades em relação à distribuição de tamanho das AgNPs, bem como quando os resultados são comparados utilizando o DLS, em que as amostras são analisadas considerando o diâmetro hidratado [114], sendo superestimadas, como verificado na seção 5.1.2.

5.1.4. Difratomia de Raios X (DRX)

Materiais metálicos possuem átomos com arranjos geométricos bem definidos, formando uma estrutura cristalina. Essa estrutura pode ser identificada a partir de pontos de interseção do plano cristalino, dado por um sistema de coordenadas (dimensões x, y e z) de uma célula unitária, representados pelos índices de Miller (h,k,l, onde todos são números inteiros) [115]. Dentre as sete células unitárias conhecidas (ortorrômbica, monoclínica, triclínica, trigonal, tetragonal, hexagonal e cúbica) e suas catorze possíveis redes, conhecidas como rede de Bravais, a prata metálica contempla uma estrutura do tipo cúbica de face centrada (CFC), o que significa que as células unitárias desse metal estão organizadas dessa forma ao longo de uma estrutura tridimensional cúbica [116].

De acordo com um estudo conduzido por Cruz et al. [96], AgNPs sintetizadas a 25°C e a 95°C apresentaram padrões de cristalinidades distintos entre si. Nesse sentido, objetivou-se caracterizar as AgNPs sintetizadas utilizando extrato aquoso de *I. paraguariensis* quanto às suas cristalinidades. As AgNPs foram obtidas utilizando a concentração de 10 mg/mL de extrato [A1(10)] e nas temperaturas reacionais de 20°C , 50°C e 80°C . Os difratogramas obtidos (Figura 19) indicaram, para as três temperaturas, planos cristalinos típicos da estrutura CFC, e reflexões (Tabela 7) características da prata nanoestruturada (baseadas no arquivo JCPDS nº 04-0783) em torno de $38,05^\circ$ (111), $44,26^\circ$ (200), $64,39^\circ$ (220) e $77,26^\circ$ (311). Já as

reflexões em torno de $32,06^\circ$ (200), $46,16^\circ$ (220), $54,66^\circ$ (311) e $57,36^\circ$ (222), presentes nas sínteses a 20°C e 50°C , ainda que sejam reportadas por alguns autores como sendo relativas aos fitoquímicos constituintes do extrato da planta e possivelmente presentes na superfície das AgNPs [117][118], estas reflexões também podem ser características do cloreto de prata (AgCl) (baseadas no arquivo JCPDS n° 31-1238), o qual pode ser formado a partir da reação entre a Ag^+ e o Cl^- (cloreto), nutriente essencial para as plantas no que tange ao metabolismo, fotossíntese, crescimento, desenvolvimento, entre outras funções [119][120]. Adicionalmente, a presença do AgCl foi também detectada em difratogramas de AgNPs sintetizadas com *Crocus sativus L.* (açafraão) [121] e *Albizia julibrissin* (acácia de Constantinopla) [122].

Tabela 7: Reflexões (índices de Miller) e os respectivos ângulos dos picos característicos da prata nanoestruturada e da possível presença de nanopartículas de cloreto de prata, obtidas por fitossíntese utilizando extrato aquoso de *I. paraguariensis* a partir das temperaturas de 20, 50 e 80°C .

Índices de Miller (hkl)	Ângulos dos picos (θ)	
	Ag^0	AgCl
(111)	38,05	-
(200)	44,26	32,06
(220)	64,39	46,16
(311)	77,26	54,66
(222)	-	57,36

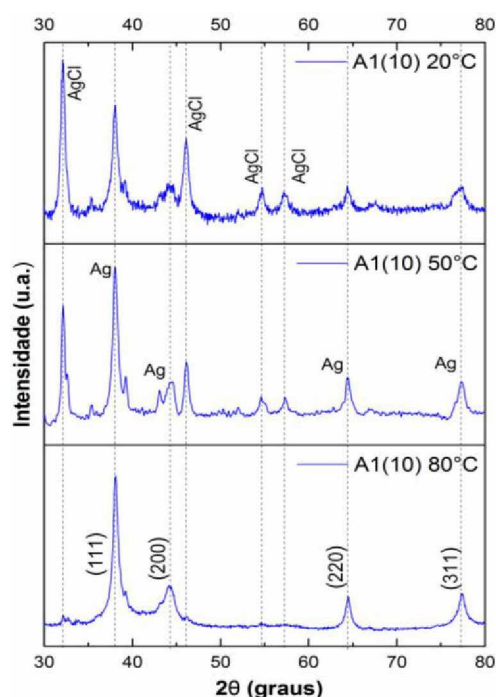


Figura 19: Difratogramas de raios X das AgNPs e possíveis AgCl-NPs sintetizadas utilizando extrato aquoso de *I. paraguariensis* na concentração final de 10 mg/mL [A1(10)] e a partir das temperaturas de 20, 50 e 80°C .

Complementarmente, a partir das reflexões dos picos de referência da Ag^0 (111) e AgCl (200), foi possível calcular os diâmetros médios dos cristalitos das AgNPs sintetizadas a 20, 50 e 80°C, utilizando a equação de Debye-Scherrer [123],

$$D = \frac{0,9 \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos\theta}$$

onde D é o diâmetro médio do cristalito, λ é o comprimento de onda da radiação (0,1541), β é a largura a meia altura extraída de cada pico e θ é o ângulo de difração correspondente a cada pico, obtidos utilizando o software OriginPro 2015.

Os diâmetros médios calculados por DRX para as AgNPs sintetizadas nas três temperaturas apresentaram valores na mesma ordem de grandeza dos diâmetros secos (dados em altura) obtidos pelos histogramas utilizando a MFA (seção 5.1.3); com AgNPs e AgCl-NPs de 11,60 nm (111) e 13,86 nm (200); 12,00 nm (111) e 18,35 nm (200); e 11,75 nm (111), respectivamente, para as temperaturas de 20, 50 e 80°C, com parâmetros de rede (comprimento entre as arestas da célula unitária) $a=4,092 \text{ \AA}$ (111) e $a=5,586 \text{ \AA}$ (200), calculados experimentalmente, a partir da equação proveniente da lei de Bragg [124],

$$a = d_{hkl} \cdot \sqrt{h^2 + k^2 + l^2}$$

onde a é o parâmetro de rede e d (com $d=\lambda \cdot \sin\theta$ e $\theta=38,05^\circ$) é a distância interplanar da estrutura, calculada considerando os índices de Miller (hkl) iguais a 111.

Os valores encontrados estão de acordo com a literatura (arquivos JCPDS n° 04-0783, com $a=4,086 \text{ \AA}$ e JCPDS n° 31-1238 com $a=5,549$) e podem ser aplicados para todo o sistema de coordenadas de uma estrutura CFC, dado que as arestas e os ângulos internos dessa estrutura cristalina são iguais [125].

5.1.5. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia no FTIR foi utilizada para identificar os possíveis grupos funcionais relacionados às biomoléculas constituintes do extrato de *I. paraguariensis* (A1), assim como os grupos funcionais característicos do sal metálico (AgNO_3). Os espectros obtidos são apresentados na Figura 20. O extrato puro (linha verde) apresenta uma variedade de bandas em função da complexidade composicional do mesmo, sendo em sua maioria, identificados como compostos fenólicos, ácidos orgânicos e metilxantinas [126][127][128][96], os quais podem estar envolvidos no processo de síntese, reduzindo os íons metálicos e/ou estabilizando as AgNPs recém formadas.

As bandas localizadas em $3,357\text{ cm}^{-1}$ e $2,930\text{ cm}^{-1}$ podem ser referentes as ligações O-H e vibrações C-H, respectivamente; $1,606\text{ cm}^{-1}$ pode ser associado aos grupos carbonil; $1,412\text{ cm}^{-1}$ indica ligações C-O-C; $1,273\text{ cm}^{-1}$ possivelmente se deve às vibrações dos grupos C-O ; 821 cm^{-1} pode representar as vibrações C-H dos anéis aromáticos; e $1,051\text{ cm}^{-1}$ sugere a presença de ligações C-O-. Todas as assinaturas identificadas foram relatadas como grupos químicos presentes em moléculas da *I. paraguariensis*. Além disso, o AgNO_3 apresenta banda característica próximo a $1,310\text{ cm}^{-1}$, referente ao estiramento do grupo nitro residual (NO_3^-) e está presente também nos espectros das AgNPs formadas a partir de 1 mg/mL [A1(1)] e 10 mg/mL [A1(10)] de extrato. Notam-se variações nas intensidades referentes a esta banda quando as duas concentrações são comparadas, possivelmente em função da quantidade de moléculas individuais que podem estar ligadas de maneiras ligeiramente diferentes, resultando na acentuação do sinal (pico) para amostra com maior concentração de extrato.

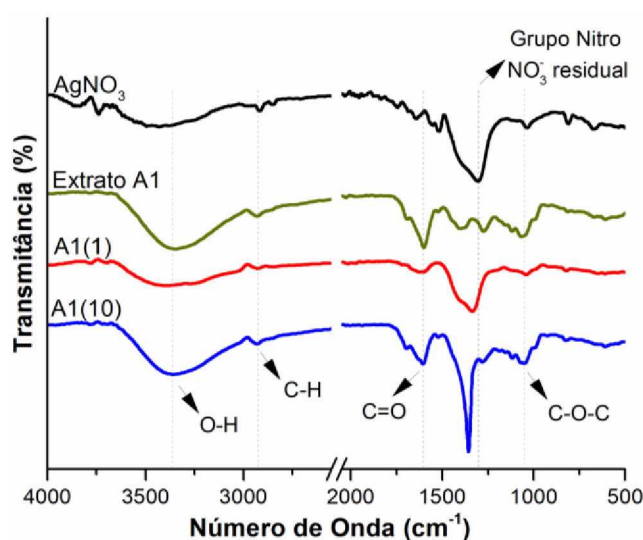


Figura 20: Espectros obtidos por FTIR das amostras sintetizadas utilizando extrato aquoso de *I. paraguariensis* obtidas: nitrato de prata (linha preta), extrato puro (linha verde), A1(1) (linha vermelha) e A1(10) (linha azul).

Fitorregiões A e B

5.2. Influência do método de cultivo da planta

Esta segunda etapa do presente estudo objetivou investigar possíveis variações na composição fitoquímica dos extratos aquosos de *I. paraguariensis*, assim como as características físico-químicas das AgNPs formadas; dados os diferentes métodos de cultivo da planta, representados pelo esquema exibido na Figura 21. A planta pertencente à fitorregião A foi cultivada seguindo o método tradicional (com aplicação de insumos químicos). Já a planta pertencente à fitorregião B, foi cultivada seguindo o método orgânico (onde não há aplicação destes insumos).

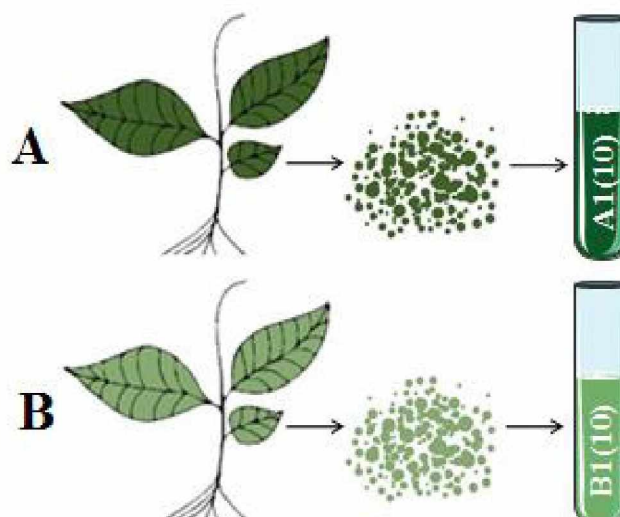


Figura 21: Esquema representativo do Extrato A1 (método tradicional), proveniente da Região A (Rio Grande do Sul) e Extrato B1 (método orgânico), proveniente da Região B (Santa Catarina). As plantas, constituídas por folhas, pecíolos e ramos foram adquiridas comercialmente em sua forma pulverizada.

5.2.1. Caracterização molecular dos extratos aquosos A1 e B1

5.2.1.1. UHPLC-ESI(+)-MS-PDA

A cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) permite a separação e identificação (qualitativa e quantitativa) de componentes químicos com polaridades, massas moleculares e grupos funcionais distintos, presentes em uma mistura homogênea [129]. As aquisições são realizadas em um tempo curto e podem apresentar alta resolução e sensibilidade. O equipamento de UHPLC pode ser acoplado a diferentes tipos de detectores, entre eles o de arranjo de fotodiodos (PDA). Este arranjo possibilita a detecção simultânea em vários comprimentos de onda, que podem variar de acordo com a quantidade de diodos individuais no dispositivo (um circuito integrado); e estes comprimentos de onda, por sua vez, resultam em espectros ultravioleta (UV), referentes às frações eluídas presentes nos cromatogramas em forma de picos [130][131].

A técnica de UHPLC-PDA pode ser utilizada para investigar matrizes complexas não biológicas como alimentos, fármacos, bebidas, águas contaminadas, etc [132][133][134]; e biológicas como sangue, urina, saliva, plantas, entre outros [135][136][130][137][138][139]. Em relação às plantas a UHPLC-PDA foi relatada com êxito na análise de compostos fenólicos, ácidos orgânicos, xantinas, ácidos aromáticos, flavonoides, polióis e polifenóis [130][137].

Além do PDA, a UHPLC pode ter outros equipamentos acoplados, visando a uma análise mais complexa do material. Dessa forma, a espectrometria de massa (MS) com ionização por *electrospray* (ESI) (operando no modo de ionização positivo), também foi

incorporada à investigação dos extratos de *I. paraguariensis*. A MS permite a detecção de biomoléculas presentes em uma amostra quando convertidas em íons ao serem ionizadas [140]. Nesse caso, a ionização é realizada por um líquido contendo o analito de interesse, que ao passar por um campo elétrico (fornecido no capilar do equipamento) se transforma em um aerossol, composto por gotículas carregadas, conhecido como *electrospray*. Aos poucos o solvente circundante destas gotículas evapora e restam somente os íons livres [141]. Esses íons são separados e detectados em razão da massa/carga (m/z) e abundância relativa.

Os resultados obtidos para os materiais de *I. paraguariensis* cultivados orgânica e tradicionalmente, utilizando primeiramente a UHPLC-PDA são apresentados nos cromatogramas e espectros UV (Figuras 22 e 23, respectivamente), os quais foram compilados na Tabela 8.

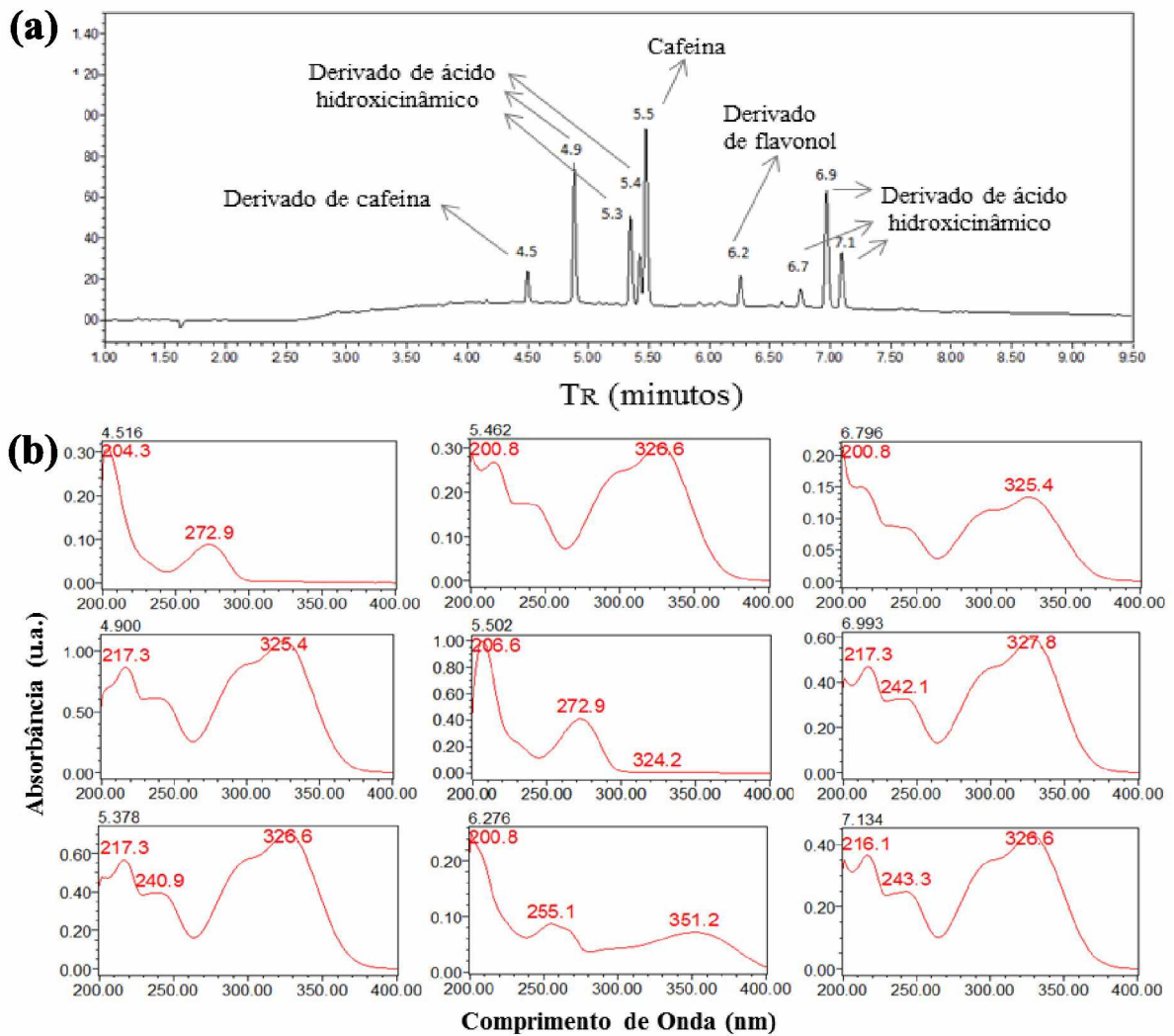


Figura 22: UHPLC-PDA do extrato aquoso de *I. paraguariensis* proveniente da fitoregião A e obtido pelo método de cultivo tradicional: (a) frações eluídas por UHPLC e (b) os respectivos espectros UV.

Os cromatogramas indicaram tempos de retenção (T_R) e frações eluídas similares entre A1 e B1, apresentando maior intensidade relativa (absorbância) para o método orgânico. Similaridades também foram observadas nos espectros UV, com perfis de absorção indicando ligeiras variações nos máximos ($\lambda_{m\acute{a}x}$) das distribuições. Ademais, as classes identificadas indicaram a presença de algum derivado de cafeína ($T_R = 4,5$ min), derivado de ácido hidroxicinâmico ($T_R = 4,9$ a $5,4$ min e $6,7$ a $7,1$ min), cafeína ($T_R = 5,5$ min) e derivado de flavonol ($T_R = 6,2$ min).

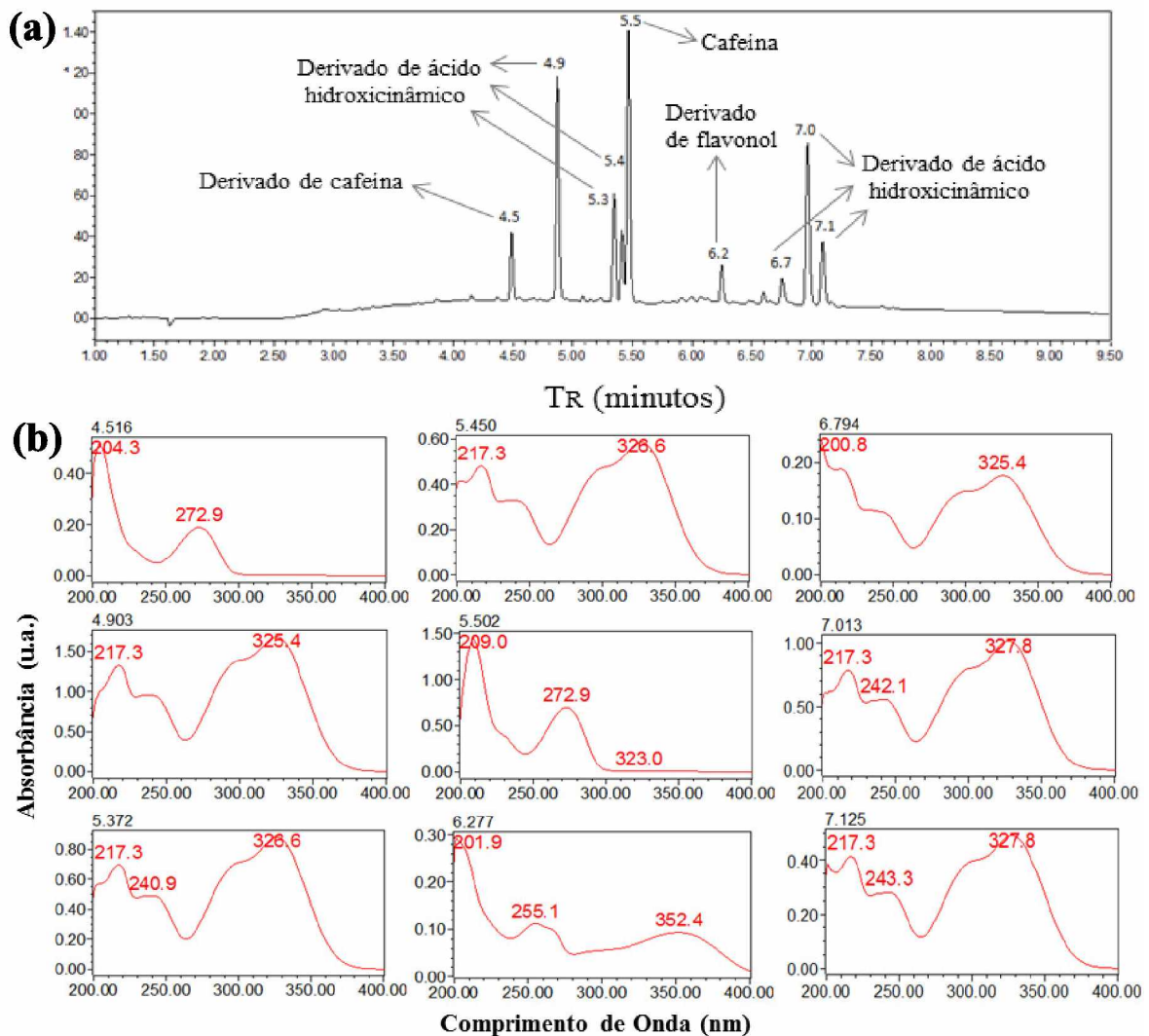


Figura 23: UHPLC-PDA do extrato aquoso de *I. paraguariensis* proveniente da fitoregião B e obtido pelo método de cultivo orgânico: (a) frações eluídas por UHPLC e (b) os respectivos espectros UV.

De acordo com os espectros obtidos por UHPLC-PDA, os extratos foram também investigados quanto a razão carga/massa (m/z) dos possíveis íons pertencentes às classes de fitoquímicos identificados. Os resultados adquiridos por ESI-MS são apresentados na Figura 24 a e b, e na Tabela 9; onde também foram detectados T_R e íons com m/z similares, com exceção de apenas um íon diferente em cada um dos extratos (com m/z 113,00 Da para A1 e

m/z 169,00 Da para B1), os quais não foram identificados (n.i.) a partir dos padrões utilizados no experimento; contudo, a literatura apresenta este íon (169,00 Da) como ácido gálico, também constituinte da *I. paraguariensis* [142]. Ainda que o T_R não seja um parâmetro fixo – o qual pode variar com os parâmetros utilizados para a análise – é possível correlacionar o T_R com a volatilidade, tamanho, polaridade e espécie molecular (identificada ou não) [143]; assim, de acordo com a literatura, moléculas de massa molecular mais baixa apresentam em geral (não regra) maior volatilidade (maior energia cinética) e menor T_R .

Tabela 8: Compilação dos tempos de retenção (T_R) referentes às frações eluídas por UHPLC-PDA dos extratos A1 e B1 de *I. paraguariensis*. Cada T_R corresponde a uma classe de fitoquímicos identificados a partir dos padrões experimentais.

A1		B1		Classe identificada	Grupo
UHPLC T_R (min)	UV $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	UHPLC T_R (min)	UV $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)		
4.516	204,3/ 272,9	4.516	204,3/ 272,9	Derivado de cafeína	Metilxantinas
4.900	217,3/ 325,4	4.903	217,3/ 325,4	Derivado de ácido hidroxicinâmico	Ácidos fenólicos aromáticos (fenilpropanóides)
5.378	217,3/ 240,9/ 326,6	5.372	217,3/ 240,9/ 326,6	Derivado de ácido hidroxicinâmico	
5.462	200,8/ 326,6	5.450	217,3/ 326,6	Derivado de ácido hidroxicinâmico	
5.502	206,6/ 272,9/ 324,2	5.502	209,0/ 272,9	Cafeína	Metilxantinas
6.276	200,8/ 255,1/ 351,2	6.277	201,9/ 255,1/ 352,4	Derivado de flavonol	Flavonóides
6.796	200,8/ 325,4	6.794	200,8/ 325,4	Derivado de ácido hidroxicinâmico	Ácidos fenólicos aromáticos (fenilpropanóides)
6.693	217,3/ 242,1/ 327,8	-	217,3/ 242,1/ 327,8	Derivado de ácido hidroxicinâmico	
-	-	7.013	217,3/ 242,1/ 327,8	Derivado de ácido hidroxicinâmico	
7.134	216,1/ 243,3/ 326,6	7.125	217,3/ 243,3/ 327,8	Derivado de ácido hidroxicinâmico	

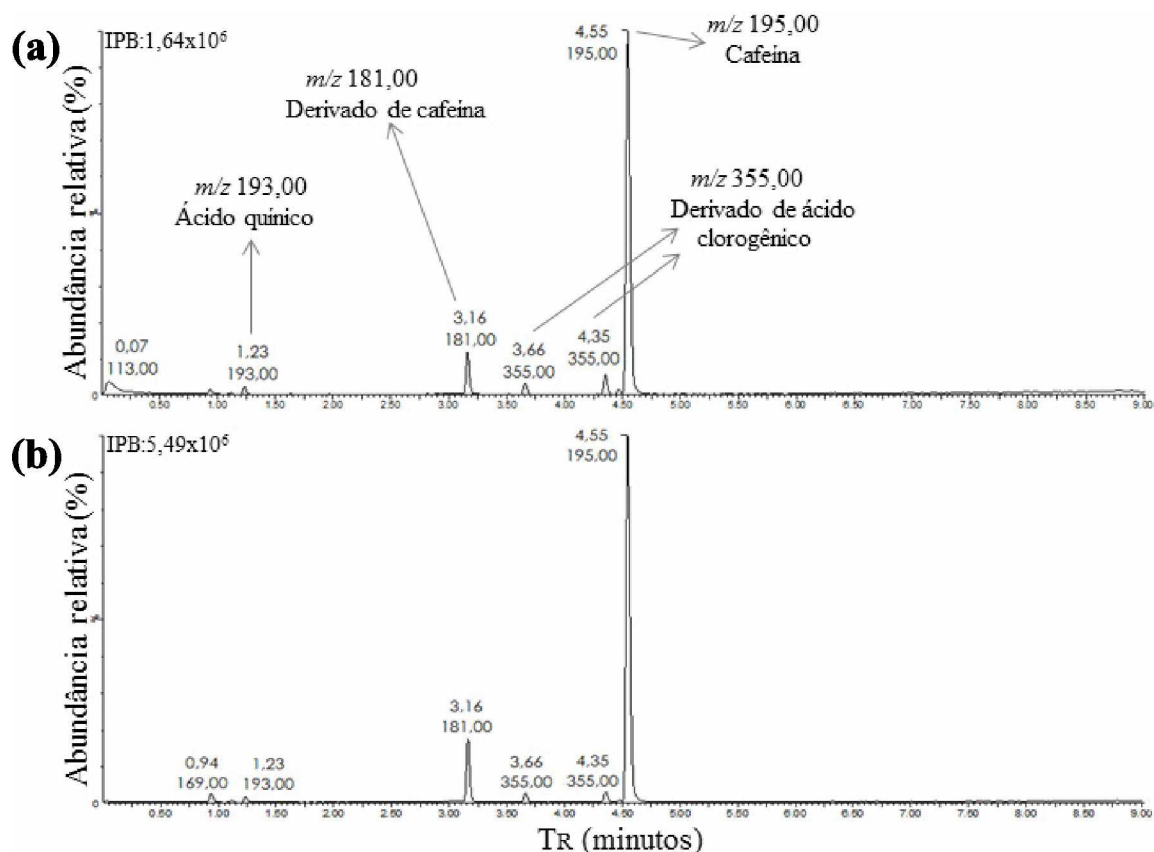


Figura 24: Cromatogramas obtidos por UHPLC-ESI(+)-MS dos extratos aquosos de *I. paraguariensis*. (a) extrato A1 e (b) extrato B1.

Tabela 9: Compilação dos tempos de retenção (T_R) referentes às frações eluídas por UHPLC-ESI(+)-MS dos extratos A1 e B1 de *I. paraguariensis*. Cada T_R corresponde a uma classe de fitoquímicos identificados a partir dos padrões experimentais.

A1		B1		Classe identificada	Grupo
T_R (min)	ESI-MS (m/z) (Da)	ESI-MS (m/z) (Da)			
0,07	113,00	-		n.i.	-
0,94	-	169,00		n.i.	-
1,23	193,00	193,00		Derivado de ácido quínico	Poliol cíclico
3,15	181,00	-		Derivado de cafeína	Metilxantina
3,16	-	181,00		Derivado de cafeína	Metilxantina
3,66	355,00	355,00		Derivado de ácido clorogênico	Polifenol
4,35	355,00	355,00		Derivado de ácido clorogênico	Polifenol
4,55	195,00	195,00		Cafeína	Metilxantina

De modo geral, o método de cultivo teve pouca influência em relação aos fitoquímicos (identificados) presentes nos extratos aquosos avaliados, contudo, apresentou

variação expressiva na absorvidade, dada pela intensidade do pico base (IPB, do inglês *base peak intensity*), sendo maior para o extrato obtido via método orgânico (B1). As classes encontradas utilizando as técnicas de UHPLC-ESI(+)-MS-PDA, para ambos os extratos, corroboram com fitoquímicos (compostos bioativos e metabólitos secundários) identificados na literatura para a *I. paraguariensis*.

A cafeína (3,7-diidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona) é um alcaloide do grupo das metilxantinas. Assim como seus derivados teobromina, teofilina e paraxantina [144], a cafeína é um composto nitrogenado (constituído por nitrogênio, hidrogênio, carbono e oxigênio). Tanto seus derivados quanto a cafeína foram identificados na literatura com razões m/z 181 Da e m/z 195, respectivamente [140][145][146].

O ácido clorogênico ((1S,3R,4R,5R)-3-[[2E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoyl]oxy}-1,4,5-trihydroxycyclohexanecarboxylic acid) é um polifenol que faz parte de uma família de ésteres formados por alguns ácidos hidroxicinâmicos (3-fenilpropanoico) – entre eles os ácidos ferúlico, p-cumárico, cafeico e sinapínico – e pelo ácido quínico ((1S,3R,4S,5R)-1,3,4,5-tetrahydroxycyclohexanecarboxylic acid). Estes ácidos (clorogênico e quínico) apresentam alguns isômeros e taninos derivados como os ácidos 3-cafeoilquínico (3-CQA), 4-cafeoilquínico (4-CQA), 5-cafeoilquínico (5-CQA), 3,4-dicafeoilquínico (3,4-diCQA), 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQA) e 4,5-dicafeoilquínico (4,5-diCQA) [147]: os quais também foram relatados na literatura com a razão m/z 193 e m/z 355 [146].

O flavonol (3-hidroxiavona) é uma classe de flavonoides e varia de acordo com a posição dos grupos hidroxila. Entre os flavonols, encontram-se a quercetina, o kaempferol, a mirecetina e a rutina, também relatados como presentes em *I. paraguariensis* [148]; identificados, no presente estudo, somente pela técnica de UHPLC-PDA.

Por fim, os compostos relacionados à cafeína e seus derivados, assim como ao ácido hidroxicinâmico e seus derivados apresentaram-se em maior intensidade relativa para o extrato B1, cultivado organicamente, sendo que uma explicação possível para este fato precisa ser investigada futuramente.

É importante mencionar que alguns fitoquímicos relativos a esta planta e já mencionados na literatura não podem ser identificados por quaisquer técnicas utilizadas no presente estudo, dado que são insolúveis em água e a extração dos compostos e síntese de AgNPs são realizadas em meio aquoso; contudo a ênfase foi dada justamente naqueles fitoquímicos que foram extraídos pelo material (extrato aquoso) utilizado na síntese de AgNPs.

5.2.1.2. Quantificação de antioxidantes e fenóis totais

Os extratos A1 e B1 foram avaliados quanto aos antioxidantes e fenóis totais, objetivando investigar se o modo de cultivo influencia no teor total destas classes químicas. Além da fitorregião distinta, as plantas provenientes de A e B foram cultivadas sob utilização de insumos químicos (tradicional A1) e sem o uso destes insumos (orgânico B1). A aplicação destes insumos químicos é realizada com a finalidade de proteger a planta, controlando e/ou combatendo os possíveis efeitos provocados por agentes estressores bióticos e abióticos já mencionados; os quais podem desencadear danos às plantações. Com o uso adequado e respeitando regras específicas (Lei N° 7.802), o uso dos mesmos não deve oferecer riscos a saúde humana e nem à saúde animal. Quando o uso destes insumos é dispensado, a planta necessita de um esforço maior para combater os estímulos agressores. Ainda que as plantas já apresentem um mecanismo de defesa constitutivo (pré existente), o mecanismo de defesa induzido (pós ataque) pode levar ao aumento da produção e/ou acúmulo de elicitadores como compostos bioativos e metabólitos secundários, que podem variar de acordo com o agente estressor e a espécie vegetal [149][150][151][152][153].

Entre as classes químicas, compostos e seus derivados/isômeros identificados pelas técnicas de UHPLC-PDA e UHPLC-ESI(+)-MS, sabe-se que vários destes apresentam atuação direta na defesa das plantas em relação a agentes bióticos e abióticos [154]. As metilxantinas, flavonóis e os compostos/ácidos fenólicos podem atuar como anti-herbívoros, antipatógenos e alelopáticos. Derivados de cafeína foram relatados por atuarem como antioxidantes, promovendo a detoxificação celular [155]. Entre os flavonóis, o kaempferol, a quercetina e a miricetina foram relatados por apresentarem ação nematicida. E entre os ácidos fenólicos, os hidroxicinâmicos e clorogênicos podem agir na inibição da oxidação como sequestradores de espécies reativas de oxigênio (EROs), e o ácido cafeico pode atuar como antimicrobiano e antifúngico [156].

Estes últimos (fenólicos) são sintetizados a partir da enzima fenilalanina-amônia-liase (via metabólica do ácido chiquínico) [157], a qual tem sua atividade aumentada em vegetais que sofrem estresses hídricos, baixas temperaturas climáticas, alta incidência de raios solares, ataques de patógenos e rupturas; assim como na defesa contra o crescimento de plantas próximas (daninhas), também reportados por estimular a produção das metilxantinas.

Os resultados referentes aos antioxidantes totais presentes nos extratos de *I. paraguariensis* A1 e B1 são apresentados na Figura 25, onde as curvas das cinéticas das reações referentes aos extratos foram plotadas comparativamente às curvas cinéticas dos

controles positivo (antioxidante padrão BHT (hidroxitolueno butilado)), negativo (contendo DPPH+metanol; dado que o BHT foi diluído em metanol) e negativo interno (contendo somente o radical DPPH e água; dado que as amostras foram diluídas em água), a fim de detectar possíveis interferências no método.

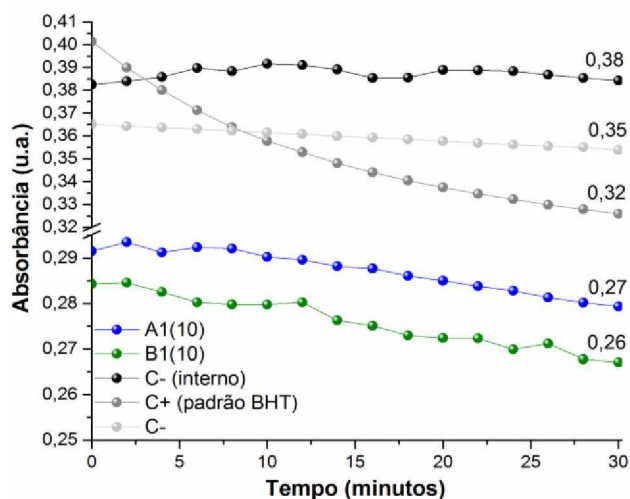


Figura 25: Curvas cinéticas de absorção dos extratos de plantas de *I. paraguariensis* cultivadas tradicionalmente [A1(10)] (linha azul) e organicamente [B1(10)] (linha verde), do controle interno (DPPH+água) (linha preta), do controle negativo (DPPH+metanol) (linha cinza claro) e do antioxidante padrão de BHT (linha cinza escuro), com leitura espectrofotométrica a 517 nm.

As curvas cinéticas indicaram que o controle negativo interno não promoveu o decréscimo na absorção – fenômeno característico de compostos sequestradores de radicais livres – e, portanto, sugere que a diluição em água não influenciou no resultado referente ao potencial antioxidante dos extratos aquosos. Já o controle negativo indicou um ligeiro decréscimo na absorbância, no entanto, pouco expressivo quando comparado ao perfil da cinética do BHT. O percentual de inibição de radicais livres (o qual corresponde a quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante) dos extratos e do padrão foi calculado a partir da equação,

$$A. A. (\%) = \frac{(\text{Abs. controle negativo interno} - \text{Abs. amostra}) \times 100}{\text{Abs. controle negativo interno}}$$

e segundo os resultados (Tabela 10), tanto o extrato A1 quanto o extrato B1 mostraram-se potenciais fontes de antioxidantes naturais, indicando a habilidade destes extratos de doar elétrons e reduzir os íons Ag^+ ; além de ambos terem apresentado maior percentual de inibição em relação ao padrão sintético utilizado (com inibição de 15,15%). Resultado similar foi reportado na literatura em um estudo que avaliou a atividade antioxidante de seis espécies de plantas, onde também foi observado maior percentual em relação ao antioxidante padrão [158].

Tabela 10: Comparação entre os métodos de cultivo tradicional e orgânico de *I. paraguariensis*: Quantificação de antioxidantes e fenóis totais. Os valores estão representados como a média \pm desvio padrão da média das medidas realizadas em triplicata.

Método de Cultivo	Amostra	Antioxidantes (% inibição)	Fenóis totais (mg/L)
Tradicional	A1	27,28 \pm 0,00	169,9
Orgânico	B1	30,46 \pm 0,01	219,0

Os fenóis totais para A1 e B1 foram calculados a partir da curva padrão de ácido gálico (Figura 26), considerando a absorbância análoga a concentração de 25 mg/mL; assim, os valores são dados, em equivalentes de ácido gálico. Os resultados obtidos nesta seção a respeito da comparação entre os métodos de cultivo da planta (Tabela 10) corroboram com estudos desenvolvidos por alguns autores com outros materiais, os quais também fizeram tal comparação; entre eles, laranja vermelha [150], algumas hortaliças [159], couve manteiga [160], amora preta, morango e milho [161]; onde o método de cultivo orgânico superou o método de cultivo tradicional, no que tange ao teor total de antioxidantes e fenóis. Sugere-se que a maior expressão destes compostos em alimentos advindos do cultivo orgânico seja decorrente do mecanismo de defesa induzido, conforme mencionado anteriormente.

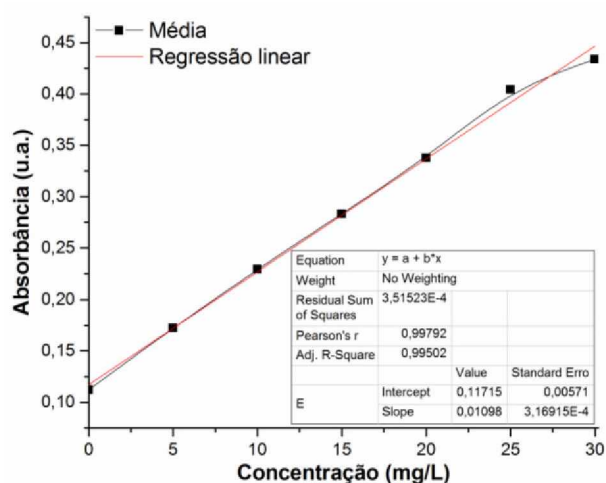


Figura 26: Curva padrão do ácido gálico com leitura espectrofotométrica a 750 nm, utilizada para quantificação de fenóis totais.

5.2.2. Análise Espectrofotométrica, Espectroscopia por correlação de fótons, Mobilidade eletroforética, Difração de Raios X e Espectroscopia FT-IR das AgNPs

O extrato proveniente da fitorregião B (B1) foi utilizado para síntese de AgNPs, visando investigar a possível influência do método de cultivo em relação às características físico-químicas das AgNPs, em comparação entre os métodos tradicional e orgânico. As AgNPs B1(10) foram sintetizadas e caracterizadas seguindo as mesmas condições da A1(10). Como a concentração final de 10 mg/mL de *I. paraguariensis* promoveu maior formação de

AgNPs quando comparadas àquelas produzidas a 1 mg/mL, esta concentração foi escolhida para dar continuidade ao estudo; assim como a temperatura de 50°C, pelo indicativo de apresentar maior taxa de formação de AgNPs (seção 5.1.1.3) e, de acordo com a literatura, nesta temperatura os extratos possivelmente sofram menor degradação térmica quando comparado a 60, 70 e 80°C.

A comparação entre as características físico-químicas considerou a cinética de formação, a curva de distribuição das absorbâncias indicativas de RPS, o diâmetro hidrodinâmico (dado pela intensidade), o PdI, o potencial Zeta de superfície, os grupamentos funcionais constituintes das suspensões e a estrutura cristalina. Os resultados sugerem características similares entre A1(10) e B1(10); no entanto com tendência a maior potencial de síntese para a amostra advinda do cultivo orgânico B1(10), dadas maiores absorbâncias relativas tanto para a cinética de formação (Figura 27a) quanto para a curva de RPS, salientando que os controles não exibem este pico ressonante (Figura 27b). Estes resultados estão em consonância com aqueles obtidos por UHPLC-ESI(+)-MS-PDA, onde há indícios da presença de fitoquímicos em maior abundância, dada pela intensidade relativa nos cromatogramas e espectros de massa.

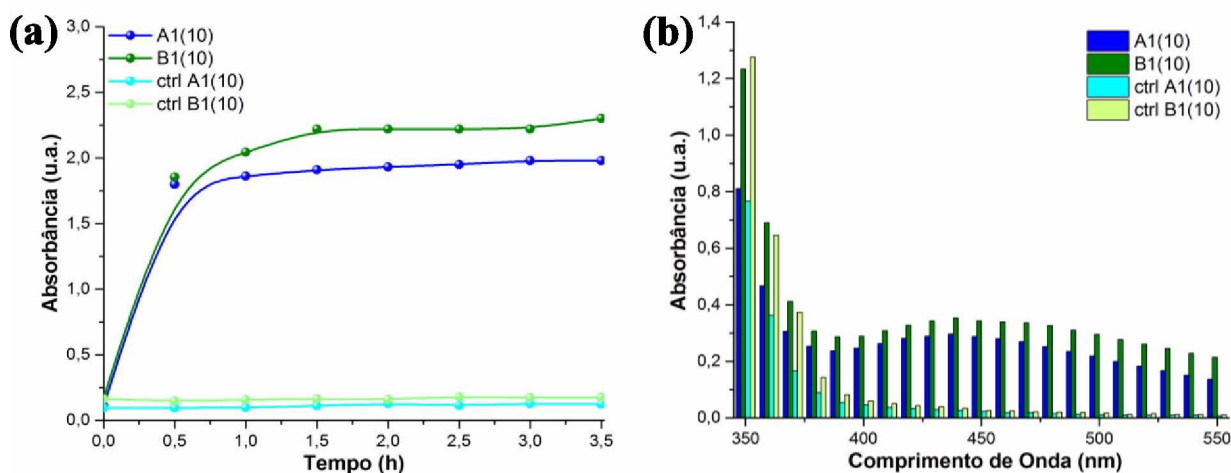


Figura 27: (a) Cinética das reações e (b) curvas de absorção indicativas de RPS para A1(10) e B1(10), com seus respectivos controles contendo somente extrato aquoso de *I. paraguariensis*.

Adicionalmente, as AgNPs para B1(10) apresentaram maior DH (Figura 28a), menor PdI e também menor potencial Zeta (Tabela 11), sugerindo menor estabilidade coloidal. Já os grupos funcionais (identificados por FT-IR) (Figura 28b) não sofreram alteração entre um método de cultivo e o outro, ainda que apresentem intensidades relativas e máximos variados, possivelmente afetados pela classe e quantidade de metabólitos constituintes identificados. Quanto à cristalinidade, os difratogramas de raios X apresentaram reflexões similares e com diâmetros médios dos cristalitos de AgNPs e AgCl-NPs

(apresentados na seção 5.1.4) também coincidentes, no entanto, com maior intensidade relativa e também ausência de alguns picos em B1(10), sugerindo um cristal com menos impurezas detectadas (Figura 29).

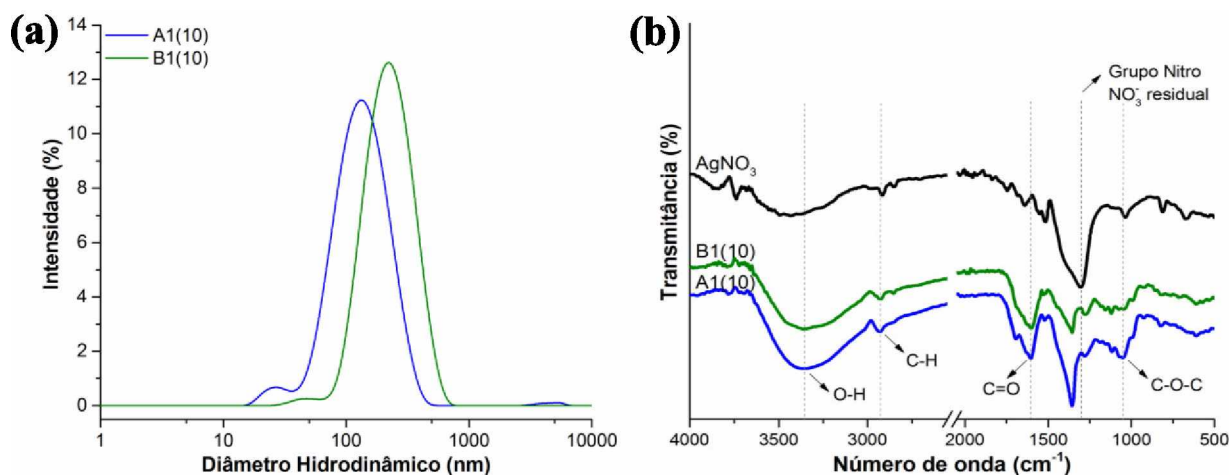


Figura 28: (a) Curvas de distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos (dados em intensidade (%)) e (b) espectros FT-IR para A1(10) e B1(10) de *I. paraguariensis*.

Tabela 11: Comparação entre os métodos de cultivo tradicional e orgânico: Z-average, PDI e potencial Zeta de superfície das amostras A1(10) e B1(10) de *I. paraguariensis*, obtidos no dia da síntese a 50°C, sob as mesmas condições. Os valores estão representados como a média \pm erro padrão da média das medidas obtidas a partir de três leituras individuais.

Método de Cultivo	Amostra	Z-average (d.nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
Tradicional	A1(10)	108,8 \pm 1,7	0,249 \pm 0,009	-22,3 \pm 0,9
Orgânico	B1(10)	190,6 \pm 0,2	0,217 \pm 0,004	-18,2 \pm 0,3

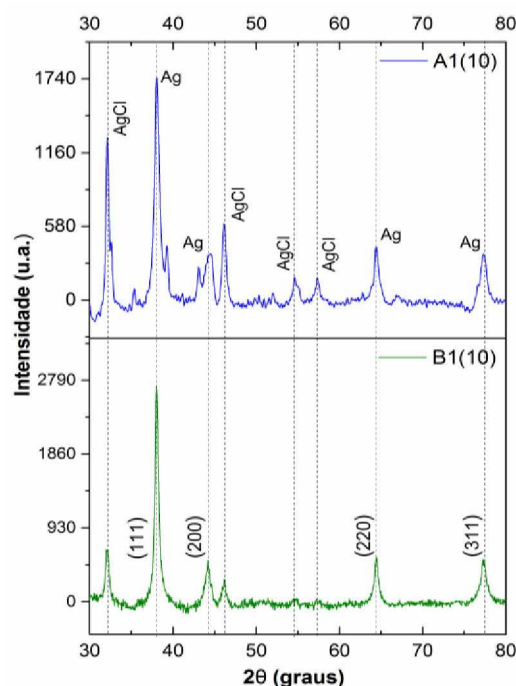


Figura 29: Difractogramas de raios X das AgNPs e possíveis AgCl-NPs sintetizadas a 50°C utilizando extratos aquosos de *I. paraguariensis* cultivadas a partir dos métodos tradicional [A1(10)] e orgânico [B1(10)].

Fitorregião C

5.3. Influência do aspecto do material e parte da planta utilizada na reação

Esta terceira etapa do estudo avaliou os materiais de *I. paraguariensis* coletados a partir da fitorregião C (Figura 30), objetivando investigar a possível influência do aspecto do material (fragmentado vs. pulverizado) e das partes da planta (folhas, pecíolos e ramos) utilizadas na reação, representados pelo esquema exibido na Figura 31. A investigação ocorreu em função da composição fitoquímica dos extratos aquosos e das características físico-químicas das possíveis AgNPs formadas.

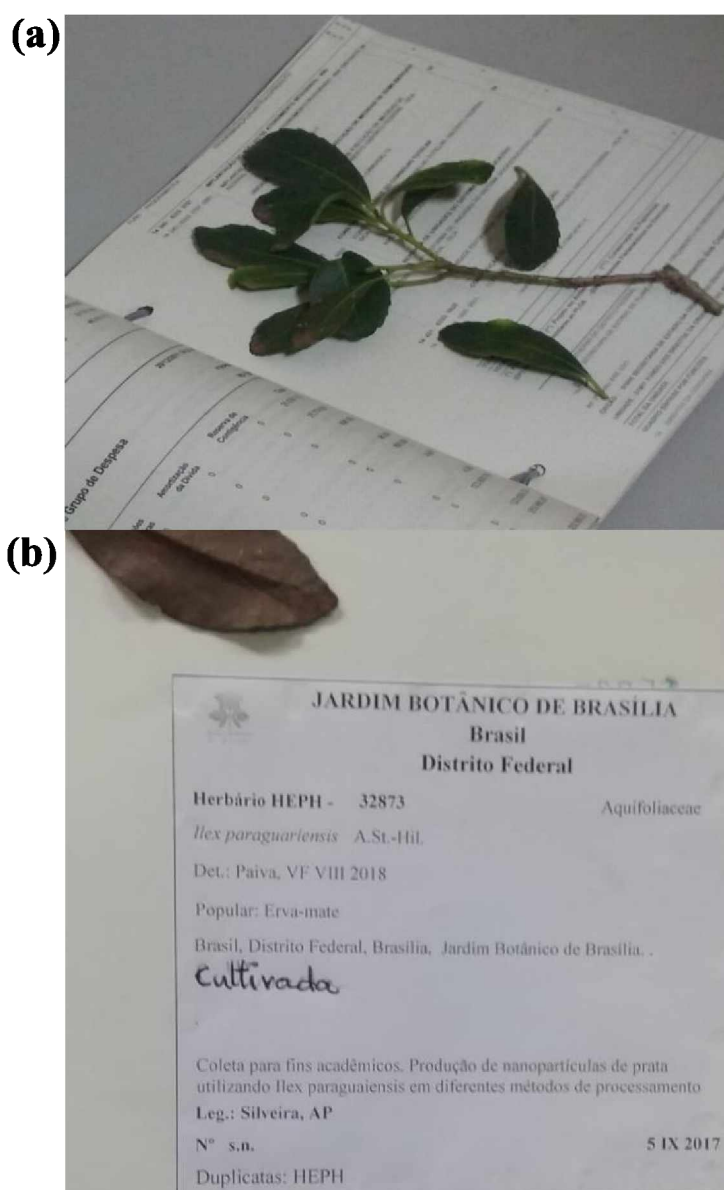


Figura 30: *I. paraguariensis* proveniente do Jardim Botânico de Brasília: a) *in natura*, antes do processo de confecção de exsicata e b) depois da confecção de exsicata, contendo as informações oficiais de número de tombo, espécie, família, nome popular, finalidade com a qual a planta foi coletada (fins acadêmicos) e identificação da responsável pelo estudo (Silveira, AP).

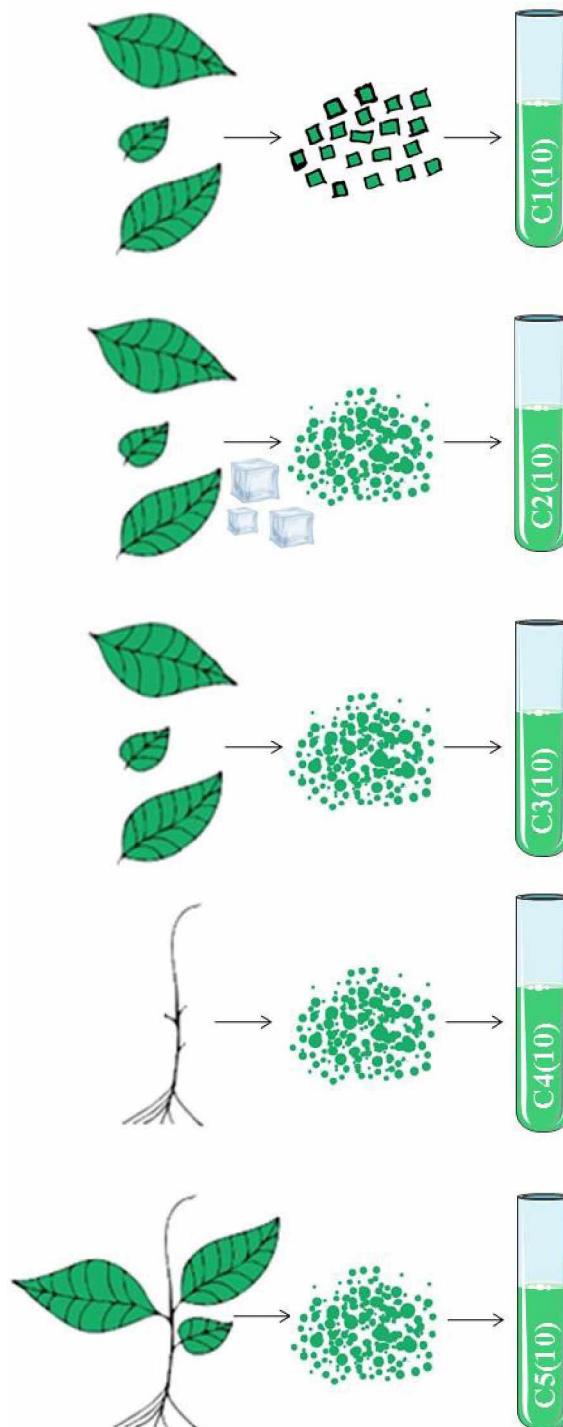


Figura 31: Esquema representativo dos Extratos C1, C2, C3, C4 e C5, provenientes da Região C (Jardim Botânico de Brasília). A planta, constituída por folhas, pecíolos e ramos, foi coletada, assepsiada e separada por partes, em suas formas fragmentadas e pulverizadas.

5.3.1. Caracterização dos extratos aquosos C1, C2, C3, C4 e C5

5.3.1.1. UHPLC-ESI(+)-MS-PDA, quantificação de antioxidantes e fenóis totais

Os materiais de *I. paraguariensis* advindos da fitoregião C foram investigados pelas técnicas de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a espectrometria de massas

com ionização por *electrospray* e ao detector de arranjo de fotodiodos (UHPLC-ESI(+)-MS-PDA), e pelos ensaios bioquímicos quanto ao teor de antioxidantes e fenóis totais presentes nos extratos aquosos destes materiais.

O extrato bruto de C1 (folhas e pecíolos) foi utilizado em sua forma fragmentada, a partir da planta *in natura* fresca. O extrato bruto de C2 (folhas e pecíolos) foi utilizado em sua forma pulverizada, a partir da planta *in natura* fresca seguido de congelamento. Já os extratos brutos de C3 (folhas e pecíolos), C4 (ramos) e C5 (folhas, pecíolos e ramos) foram utilizados em suas formas pulverizadas, a partir da planta *in natura*, sem passar por qualquer etapa de fragmentação ou congelamento. Todos os materiais pulverizados passaram por um processo de secagem em estufa. Os resultados relacionados ao teor total de antioxidantes e fenóis encontram-se na Tabela 12. Os resultados obtidos por UHPLC-PDA e UHPLC-ESI(+)-MS para todos os extratos foram compilados nas Tabelas 13 e 14, respectivamente; as quais encontram-se ao final da apresentação e discussão de todos os cromatogramas e espectros UV.

Os resultados referentes aos extratos C1 e C2, apresentados nos cromatogramas e espectros UV (Figuras 32 e 33, respectivamente), indicaram tempos de retenção (T_R) e frações eluídas similares entre si, sugerindo espécies moleculares também similares. Para ambos os extratos foram eluídos duas frações referentes a algum derivado de cafeína – possivelmente teobromina, teofilina ou paraxantina – e cafeína, respectivamente, $T_R=4,531$ e $T_R=5,526$ (para C1); e $T_R=4,607$ e $T_R=5,580$ (para C2). No entanto, diferenças expressivas foram observadas nos espectros de massa referentes a estes extratos (Figura 34); onde ocorre uma gama com total de 27 picos no cromatograma, referentes ao material fragmentado (C1); em oposição ao material pulverizado submetido a congelamento prévio (C2), com total de 4 picos eluídos. Os compostos identificados em C2 (Figura 34b) envolvem o ácido quínico (m/z 193,00 Da), algum derivado de cafeína (m/z 181,00), a cafeína (m/z 195,00 Da) e possivelmente o ácido gálico (m/z 169,00) [142], sendo este último não identificado a partir dos padrões comerciais utilizados na análise, como mencionado na seção 5.2.1.1. Por outro lado, para o extrato C1 (Figura 34a) – devido a largura dos picos, ruidosidade e absortividade baixa (dada pela IPB) quando comparada aos demais cromatogramas – é possível inferir somente a presença da cafeína, ainda que as demais classes/ compostos (incluindo aqueles em m/z 113,00 e m/z 153,00) tenham sido indicados no cromatograma.

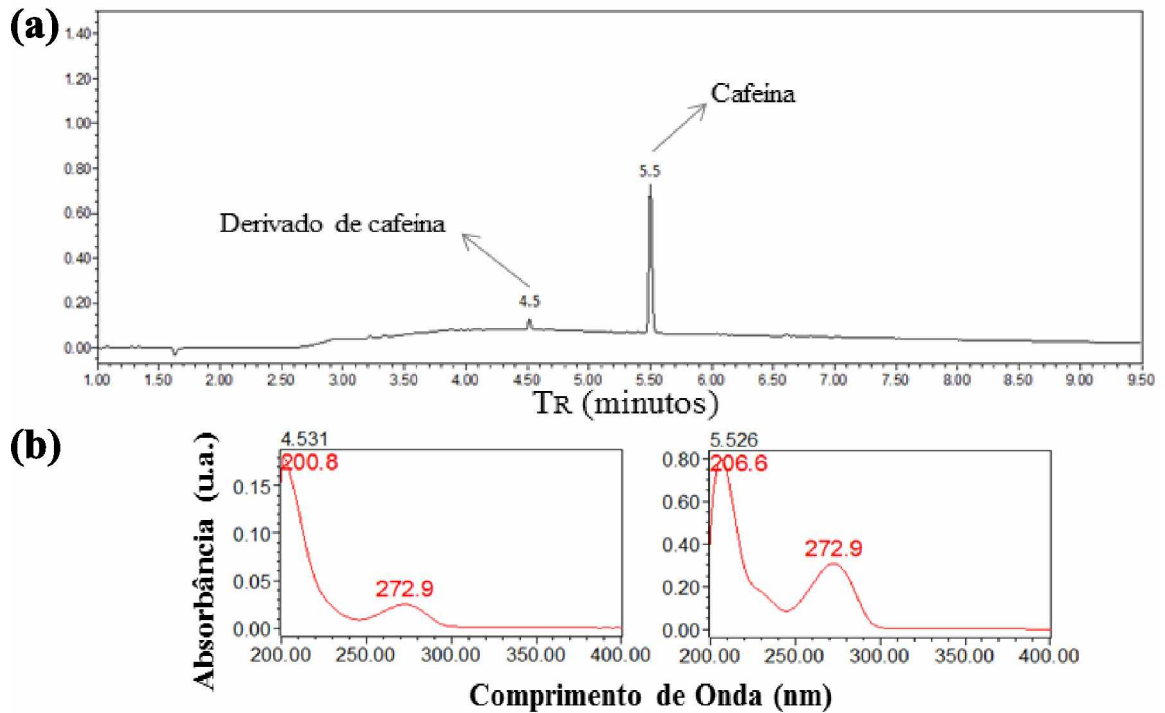


Figura 32: UHPLC-PDA do extrato aquoso de *I. paraguariensis* C1 (folhas e pecíolos *in natura* fragmentados): (a) frações eluídas por UHPLC e (b) os respectivos espectros UV.

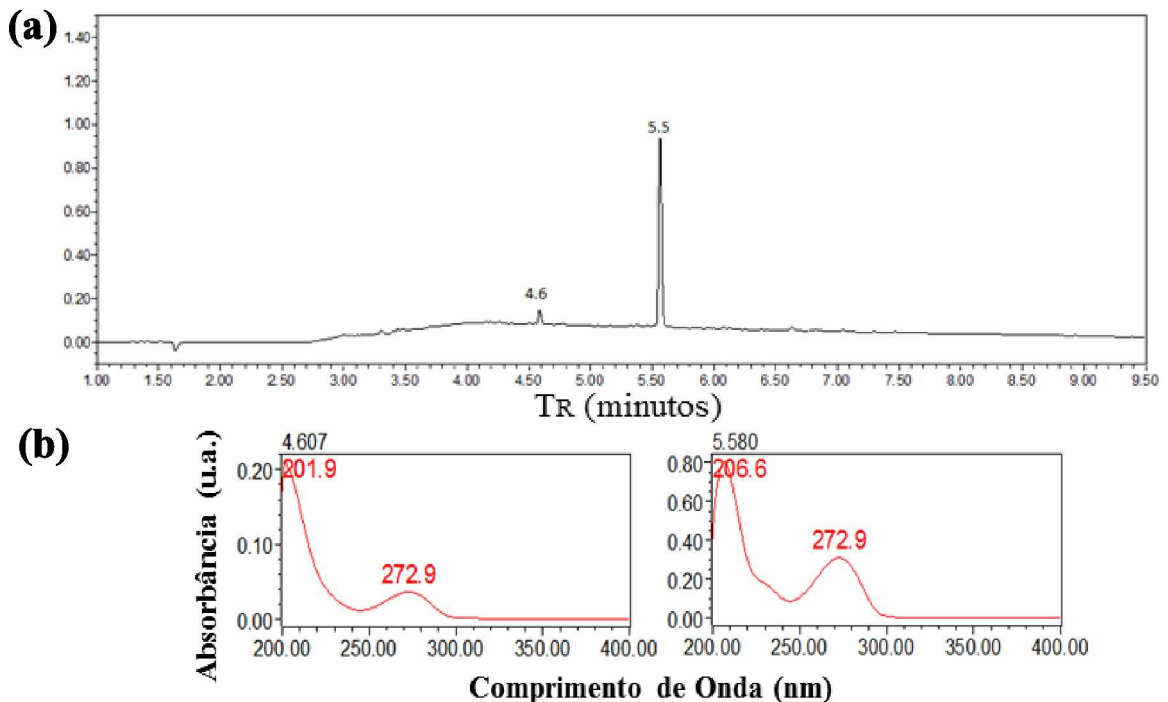


Figura 33: UHPLC-PDA do extrato aquoso de *I. paraguariensis* C2 (folhas e pecíolos *in natura*, mantido sob congelamento e posteriormente pulverizado): (a) frações eluídas por UHPLC e (b) os respectivos espectros UV.

Diferenças expressivas entre C1 e C2 também foram constatadas ao avaliar o teor de fenóis totais (Tabela 12), crescendo de 8,16 mg/L (C1) para 61,09 mg/L (C2), dados em equivalente de ácido gálico. Esta variação entre os extratos aquosos obtidos a partir do aspecto da planta fragmentada vs. pulverizada pode ocorrer devido a ruptura na parede celular

da matriz vegetal, provocada pela secagem do material bruto, pois além de ajudar a prevenir a oxidação precoce, esse processo induz a quebra dos tecidos vegetais; os quais tendem a maior homogeneização ao terem seus tamanhos diminuídos após passarem pelo processo de pulverização, aumentando a área de superfície/contato entre o solvente e a matriz, e facilitando a liberação dos compostos [162][163].

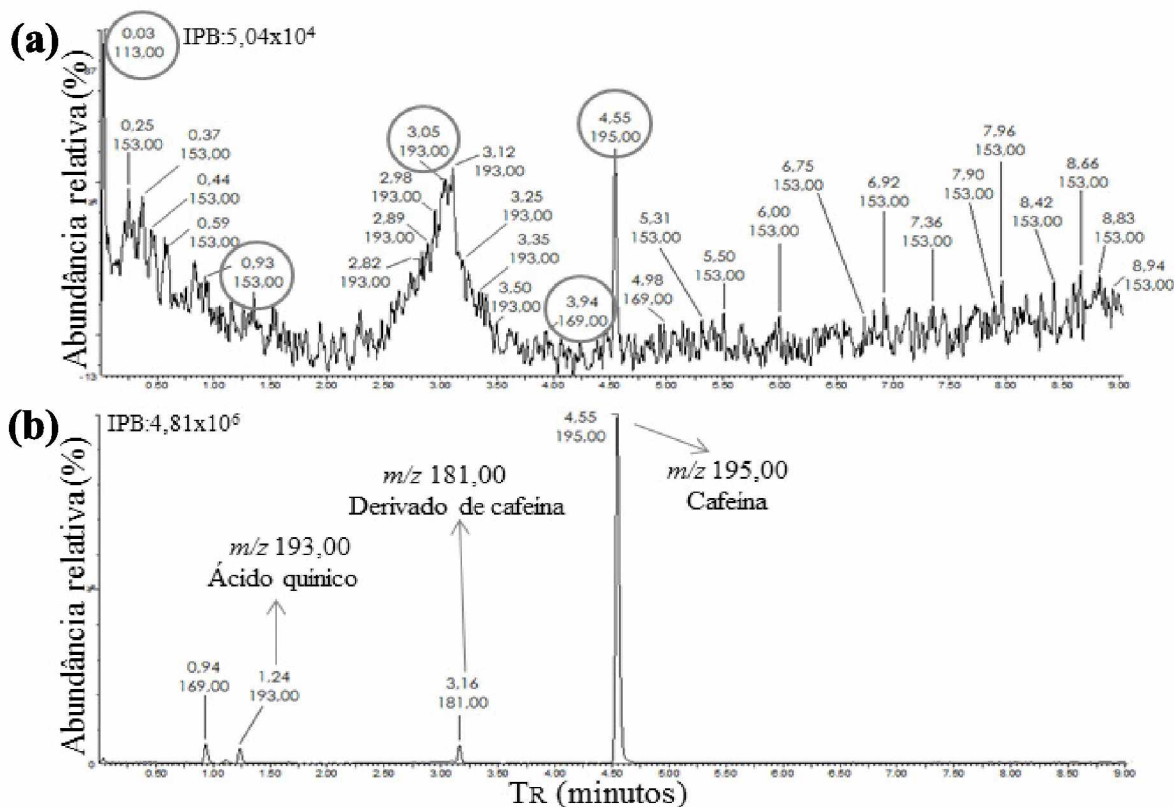


Figura 34: Cromatogramas obtidos por UHPLC-ESI(+)-MS a partir dos extratos aquosos de *I. paraguariensis*. a) extrato C1 e b) extrato C2.

Este efeito pode ser melhor elucidado para o extrato C3 (Figuras 36 e 37), o qual não passou por processo de congelamento prévio; e teve sua quantidade de fenóis totais (Tabela 12) praticamente dobrada (112,28 mg/L) em relação a C2; e quadruplicada (19,34%) em relação ao total de antioxidantes (Tabela 12; Figura 35), quando comparada a C1 (5,44 %) e C2 (5,72 %); sendo também mais expressiva que o padrão de BHT.

Além disso, foram eluídas 4 frações adicionais para C3, observadas no cromatograma e nos espectros UV (Figura 36), relativos a presença de derivados do ácido hidroxicinâmico (possivelmente ácidos ferúlico, p-cumárico, cafeico ou sinapínico) com $T_R=4,914$; $T_R=5,392$; $T_R=7,017$ e derivados de flavonóis (possivelmente quercetina, kaempferol, mirecetina ou rutina) com $T_R=6,294$. Ademais, em relação aos íons identificados nos espectros de massa referentes a C3 (Figura 37), estes permaneceram similares a C2 (Figura 34b).

Tabela 12: Comparação entre os aspectos e partes de *I. paraguariensis* quanto à quantificação de antioxidantes e fenóis totais. Os valores estão representados como a média \pm desvio padrão da média das medidas realizadas em triplicata.

Partes da planta	Amostra	Antioxidantes (% inibição)	Fenóis totais (mg/L)
Folhas e pecíolos (frescos fragmentados)	C1	5,44 \pm 0,00	8,16
Folhas e pecíolos (frescos, congelados e pulverizados)	C2	5,72 \pm 0,00	61,09
Folhas e pecíolos (frescos e pulverizados)	C3	19,34 \pm 0,00	112,28
Ramos (frescos e pulverizados)	C4	24,23 \pm 0,00	98,53
Folhas, pecíolos e ramos (frescos e pulverizados)	C5	13,22 \pm 0,00	111,40

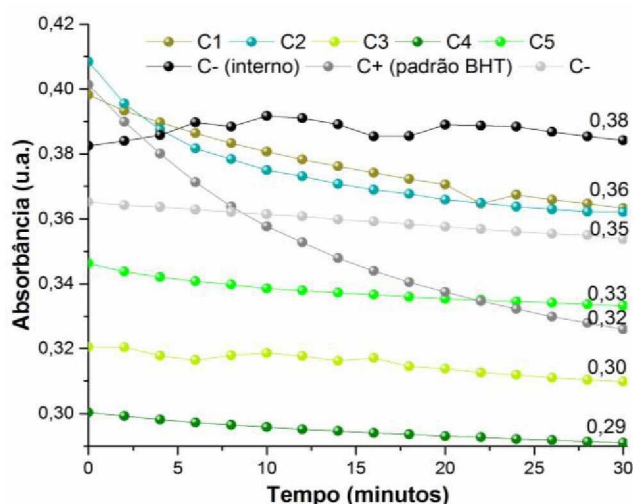


Figura 35: Cinéticas das reações antioxidantes para as amostras de *I. paraguariensis* provenientes da fitorregião C. O ensaio foi monitorado por 30 min com leitura espectrofotométrica a 517 nm.

Ao comparar os extratos aquosos C3, C4 (Figuras 38 e 39) e C5 (Figuras 40 e 41), nota-se, compostos em comum identificados, entre eles a cafeína, algum de seus derivados e derivados de ácido hidroxicinâmico; entretanto a presença do flavonol ocorre somente em C3; e algum derivado de ácido hidroxicinâmico com $T_R=5,475$ foi identificado somente para C4. Adicionalmente, o pico da cafeína ($T_R=5,5$) mostrou-se bastante diminuto em C4 (menor IPB), comparado às demais amostras de extratos, no entanto, outros picos (referentes a compostos com propriedades antioxidantes [164]) aparecem mais intensos em relação a C5 ($T_R=4,5$; $T_R=4,9$) e a C3 ($T_R=5,3$). De modo geral, foi possível eluir um número maior de frações a partir da amostra C4, verificados pelo cromatograma e pelos espectros UV, quando comparados a C3 e C5, sendo necessária investigação posterior para tal efeito.

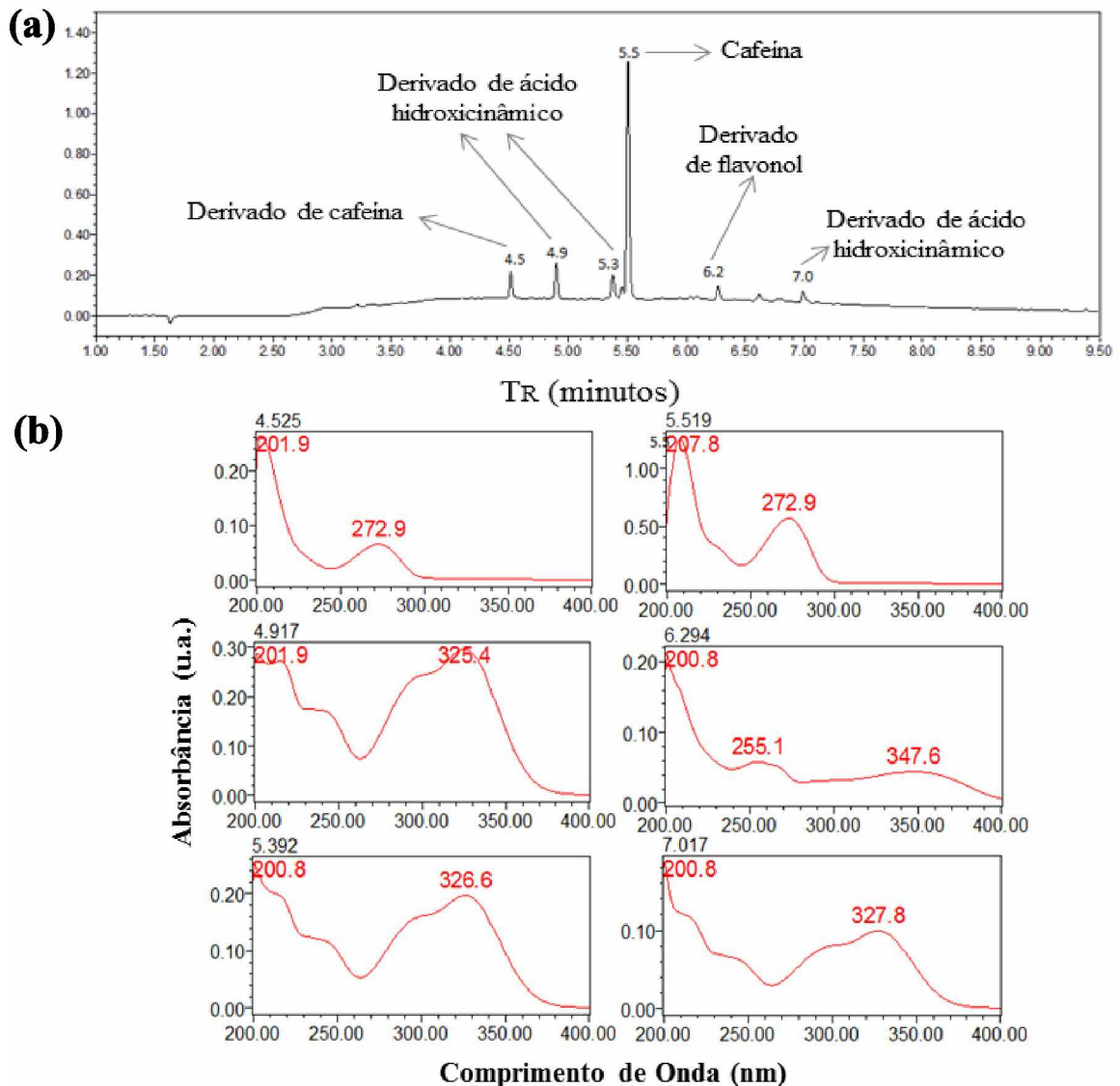


Figura 36: UHPLC-PDA do extrato aquoso de *I. paraguariensis* C3 (folhas e pecíolos *in natura* pulverizados): (a) frações eluídas por UHPLC e (b) os respectivos espectros UV.

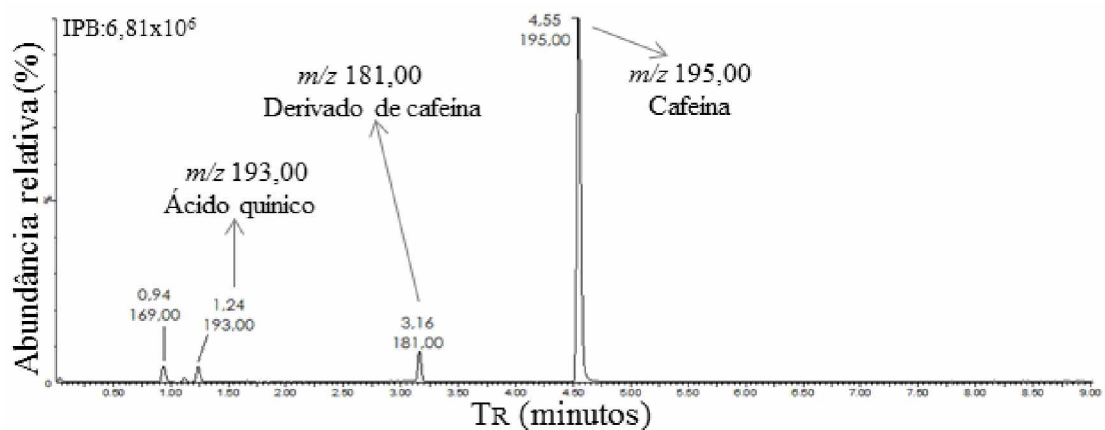


Figura 37: Cromatograma obtido por UHPLC-ESI(+)-MS do extrato aquoso de *I. paraguariensis* C3.

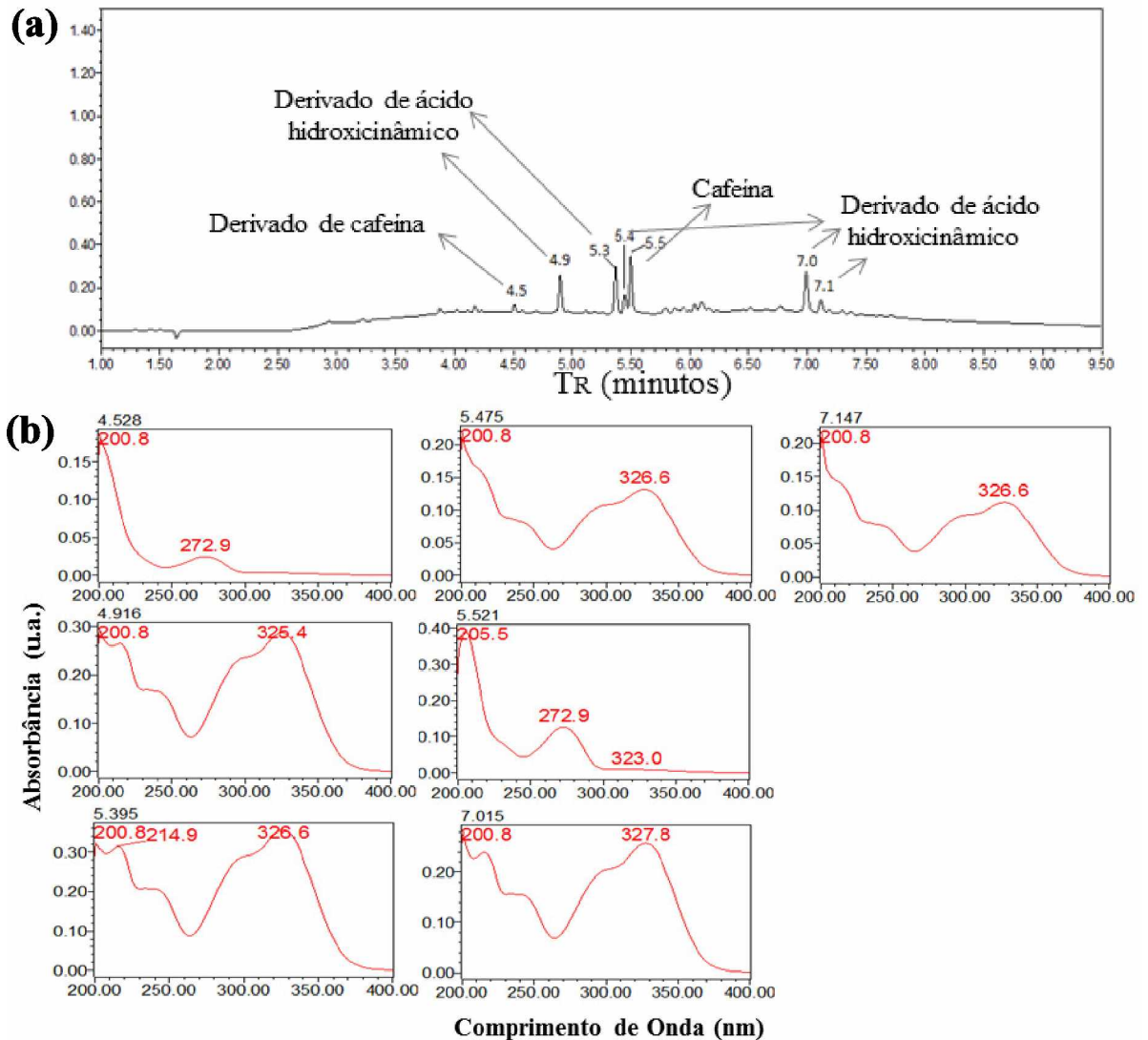


Figura 38: UHPLC-PDA do extrato aquoso de *I. paraguariensis* C4 (ramos *in natura* pulverizados): (a) frações eluídas por UHPLC e (b) os respectivos espectros UV.

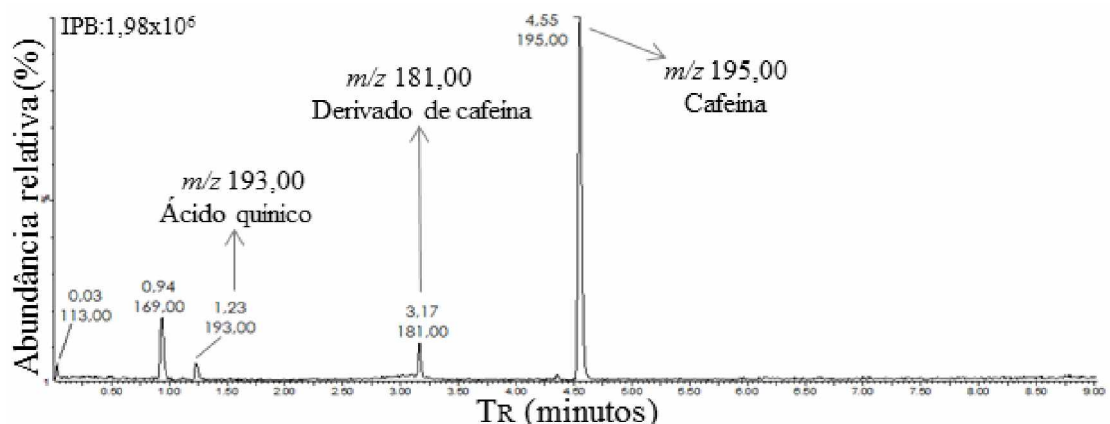


Figura 39: Cromatograma obtido por UHPLC-ESI(+)-MS do extrato aquoso de *I. paraguariensis* C4.

Em relação aos ensaios bioquímicos, a maior quantidade de fenóis totais (Tabela 12) refere-se ao extrato C3 (112,28 mg/L), seguido de C5 (111,40 mg/mL) e C4 (98,53 mg/L). Em oposição, em relação ao teor total de antioxidantes (Tabela 12; Figura 35), C4 obteve o

maior percentual sequestrador de radicais livres (23,24%), seguido de C3 (19,34%) e C5 (13,22%). Este resultado (antioxidantes e fenóis totais) é compatível e também contrário a outros estudos realizados utilizando folhas e ramos de acácia-branca [165] e de hibisco [166], onde foram detectados maior teor de compostos fenólicos e antioxidantes para as folhas quando comparadas aos ramos.

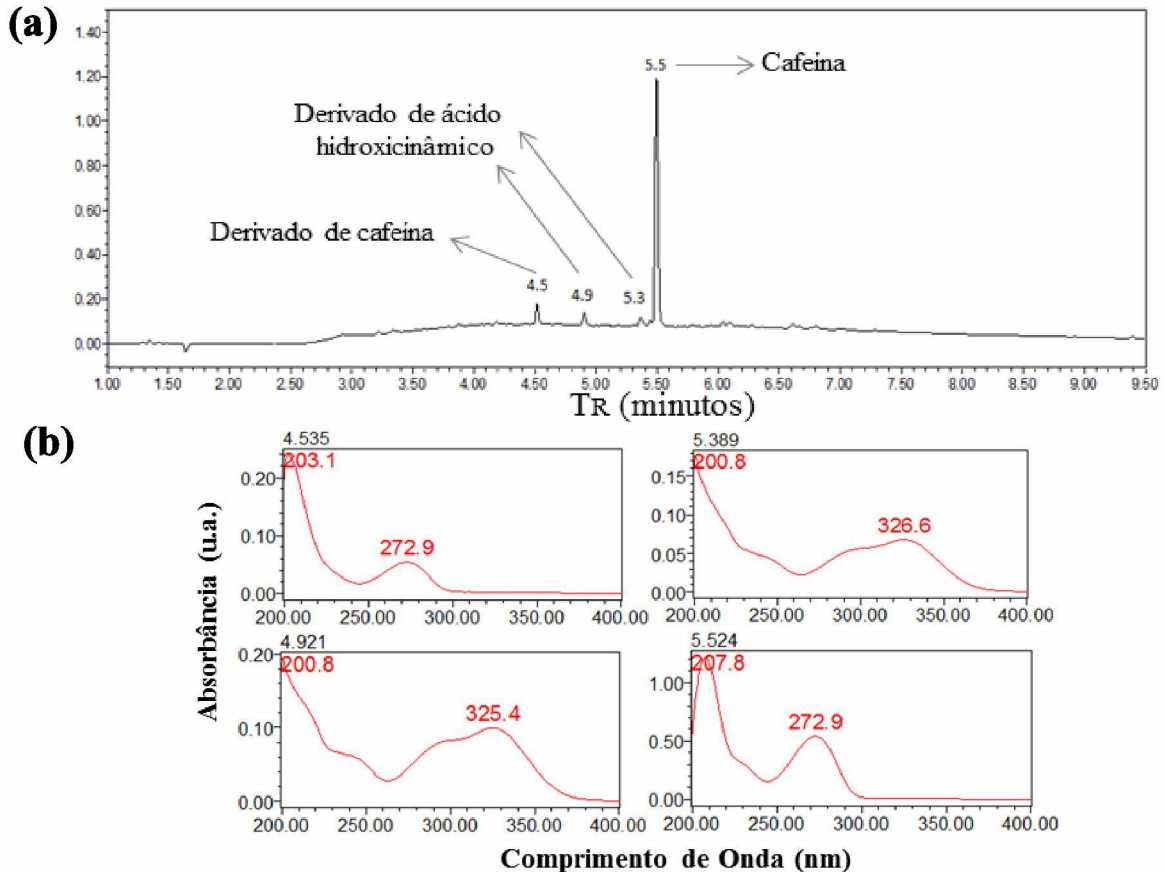


Figura 40: UHPLC-PDA do extrato aquoso de *I. paraguariensis* C5 (folhas, pecíolos e ramos *in natura* pulverizados): (a) frações eluídas por UHPLC e (b) os respectivos espectros UV.

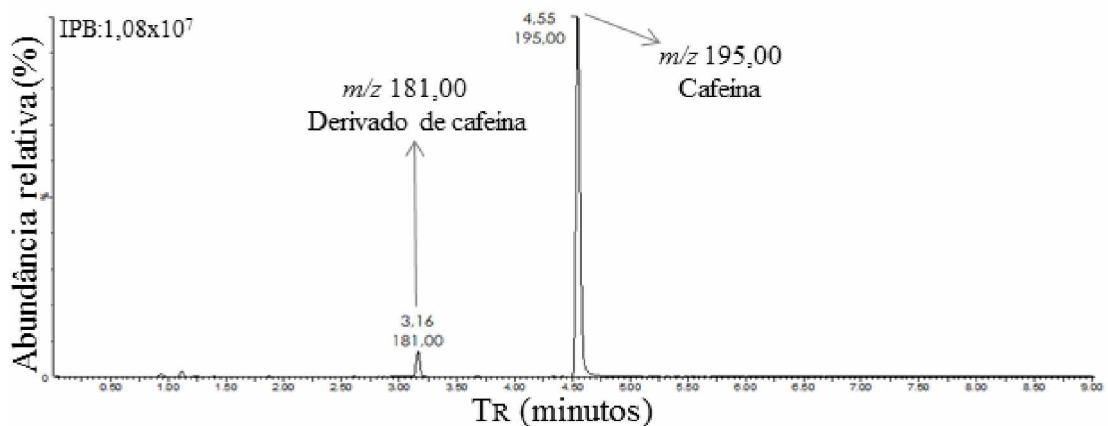


Figura 41: Cromatograma obtido por UHPLC-ESI(+)-MS do extrato aquoso de *I. paraguariensis* C5.

Tabela 13: Compilação dos tempos de retenção (T_R) referentes às frações eluídas por UHPLC-PDA dos extratos aquosos de *I. paraguariensis* C1, C2, C3, C4 e C5. Cada T_R corresponde a uma classe de fitoquímicos identificados a partir dos padrões experimentais.

C1		C2		C3		C4		C5	
UHPLC T_R (min)	UV $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	UHPLC T_R (min)	UV $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	UHPLC T_R (min)	UV $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	UHPLC T_R (min)	UV $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	UHPLC T_R (min)	UV $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)
4,531	200,8 272,9	-	-	4,525	201,9 272,9	4,528	200,8 272,9	4,535	203,1 272,9
-	-	4,607	201,9 272,9	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	4,917	201,9 325,4	4,916	200,8 325,4	4,921	200,8 325,4
-	-	-	-	5,392	200,8 326,6	5,395	200,8 214,9 326,6	5,384	200,8 326,6
-	-	-	-	-	-	5,475	200,8 326,6	-	-
5,526	206,6 272,9	5,580	206,6 272,9	5,519	207,8 272,2	5,521	200,5 272,9 323,0	5,524	207,8 272,9
-	-	-	-	6,294	200,8 255,1 347,6	-	-	-	-
-	-	-	-	7,017	200,8 327,8	7,015	200,8 327,8	-	-
-	-	-	-	-	-	7,147	200,8 326,6	-	-

Tabela 14: Compilação dos tempos de retenção (T_R) referentes às frações eluídas por UHPLC-ESI(+)-MS dos extratos aquosos de *I. paraguariensis* C1, C2, C3, C4 e C5. Cada T_R corresponde a uma classe de fitoquímicos identificados a partir dos padrões experimentais.

C1		C2		C3		C4		C5	
T_R (min)	ESI-MS m/z (Da)	T_R (min)	ESI-MS m/z (Da)	T_R (min)	ESI-MS m/z (Da)	T_R (min)	ESI-MS m/z (Da)	T_R (min)	ESI-MS m/z (Da)
0,03	113,00	-	-	-	-	0,03	113,00	-	-
0,25/0,37/0,44/0,59/0,93 5,31/6,00/6,75/6,92/7,36 7,90/7,96/8,66/8,83/8,94	153,00	-	-	-	-	-	-	-	-
3,94/ 4,98	169,00	0,94	169,00	0,94	169,00	0,94	169,00	-	-
-	-	3,16	181,00	3,16	181,00	3,17	181,00	3,16	181,00
2,82/2,89/2,98/3,05/3,12 3,25/3,35/3,50	193,00	1,24	193,00	1,24	193,00	1,23	193,00	-	-
4,55	195,00	4,55	195,00	4,55	195,00	4,55	195,00	4,55	195,00

5.3.2. Análise Espectrofotométrica, Espectroscopia por correlação de fótons, Mobilidade eletroforética, Difração de Raios X e Espectroscopia FT-IR das AgNPs

Os extratos de *I. paraguariensis* provenientes da fitorregião C (C1, C2, C3, C4 e C5) foram investigados quanto ao potencial para síntese de AgNPs, na concentração final de extrato aquoso de 10 mg/mL.

As curvas de distribuição das absorbâncias e indicativas de RPS adquiridas para cada uma das reações entre os extratos aquosos e o AgNO_3 são apresentados na Figura 42a. Nota-se ausência de pico ressonante para C1(10) (utilizando extrato aquoso obtido a partir de folhas e pecíolos fragmentados) e C2(10) (utilizando extrato aquoso obtido a partir de folhas e pecíolos pulverizados pós congelamento). Enquanto C1(10) segue comportamento similar ao seu respectivo controle [ctrl C1(10)] (Figura 42b), para C2(10) a absorbância aumenta ligeiramente, porém, também sem sucesso na formação de AgNPs. No entanto, como reportado nos resultados de UHPLC-ESI(+)-MS-PDA e quantificação de fenóis totais, as variações entre C1 e C2 foram expressivas. E ainda foi possível constatar que embora o congelamento possa ter inviabilizado a atividade redutora e/ou estabilizante das biomoléculas em relação aos íons Ag^+ para C2(10), o processo de secagem e pulverização propiciou maior extração de compostos da planta.

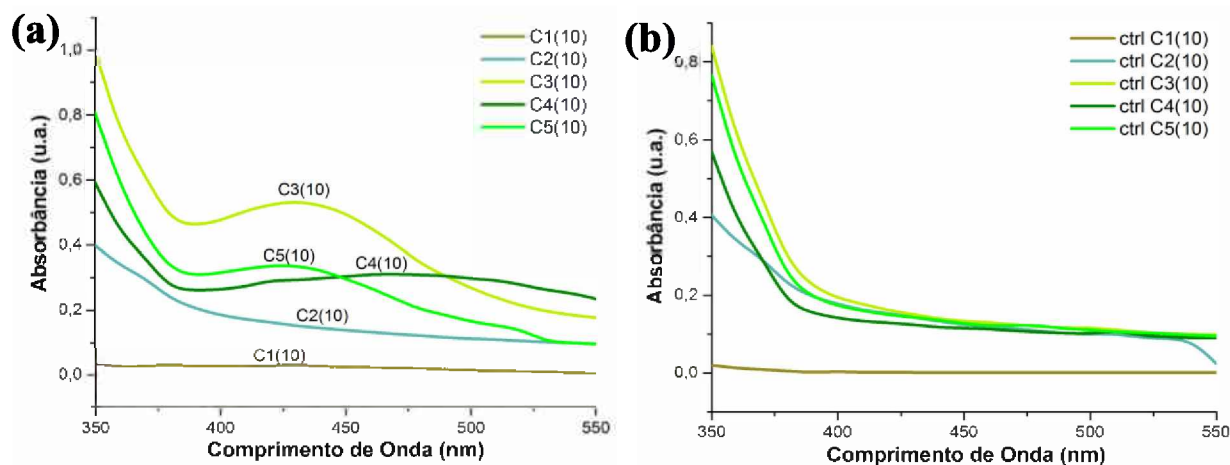


Figura 42: (a) Curvas de absorção indicativas de RPS e (b) seus respectivos controles contendo somente extrato aquoso de *I. paraguariensis*, para as amostras C1(10), C2(10), C3(10), C4(10) e C5(10).

Dado isto, e considerando os resultados apresentados na seção anterior (5.3.1.1), é possível afirmar que o aspecto da planta (fragmentada vs pulverizada) exerceu influência na eficiência não somente para extração dos fitoquímicos, como também no processo de síntese de AgNPs, dados os resultados obtidos para as AgNPs C3(10) (utilizando o extrato aquoso obtido a partir de folhas e pecíolos pulverizados sem passar por etapa de congelamento); onde há evidência do pico ressonante indicativo de RPS, com curva de distribuição de absorbâncias

com máximo bastante definido (em torno de 430 nm), e também com maior intensidade relativa, quando comparada aos demais aspectos e/ou partes da planta.

Ao comparar as partes de *I. paraguariensis* utilizadas nas reações, folhas+pecíolos; ramos; e folhas+pecíolos+ramos, respectivamente C3(10), C4(10) e C5(10), nota-se em C4(10), uma curva alargada, com máximo pouco definido, sugerindo menor formação de AgNPs. Ainda que C4 apresente o maior percentual antioxidante (24,23%), as diferenças entre o potencial de formação das AgNPs podem estar relacionadas ao conteúdo de fenóis totais, sendo ligeiramente menor para C4 (98,53 mg/L) quando comparado a C3 (112,28 mg/L) e C5 (111,40 mg/L). A amostra C5(10) também promoveu a formação de AgNPs, com absorvância de intensidade relativa intermediária entre C3(10) e C4(10). Possivelmente a união e interação dos ramos com folhas e pecíolos de *I. paraguariensis* exerceram interferência no potencial formador das biomoléculas envolvidas na síntese de AgNPs, ainda que a quantidade de fenóis totais entre C5 e C3 tenha sido similar e a IPB (Figura 41) tenha sido mais expressiva para C5. Contudo, deve ser ressaltado que o extrato C5 não apresentou ácido quínico em sua composição (de acordo com as frações eluídas por UHPLC-PDA); e assim como o extrato C4, também não dispõe de flavonol em sua composição.

Adicionalmente, as amostras C3(10), C4(10) e C5(10) também apresentaram variações nos DH, PDI e potencial Zeta de superfície (Tabela 15). Em relação ao DH (Figura 43a), verificou-se uma população bimodal para C5(10) com máximos em torno de 8,80 e 65,01 nm; unimodal e com ombro pronunciado com máximos em torno de 93,36 e 11,71 nm para a amostra C3(10); e unimodal com ombro pouco pronunciado com máximos em torno de 111,30 e 16,15 nm para C4(10). Por serem distribuições de tamanho dadas em função da intensidade do espalhamento, deve-se considerar que partículas maiores espalham mais luz do que as menores, podendo superestimar o DH dado em relação à média (Z-average).

Tabela 15: Comparação entre as partes de *I. paraguariensis* utilizadas na síntese de AgNPs, proveniente da fitorregião C: Z-average, PDI e potencial Zeta de superfície das amostras C3(10), C4(10) e C5(10), obtidos no dia da síntese a 50°C, sob as mesmas condições. Os valores estão representados como a média \pm erro padrão da média das medidas obtidas a partir de três leituras individuais.

Parte da planta	Amostra	Z-average (d.nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
Folhas e pecíolos	C3(10)	52,1 \pm 1,3	0,477 \pm 0,023	-22,1 \pm 0,3
Ramos	C4(10)	96,0 \pm 0,8	0,236 \pm 0,005	-19,3 \pm 0,3
Folhas, pecíolos e ramos	C5(10)	33,6 \pm 0,2	0,553 \pm 0,012	-24,6 \pm 1,1

Entre as amostras avaliadas, o menor potencial Zeta correspondeu a C4(10) (-19,3 \pm 0,3 mV), assim como o maior DH (96,0 \pm 0,8 nm), porém com o menor PDI (0,236 \pm 0,005),

sugerindo menor estabilidade coloidal, mas com distribuições de tamanho indicando AgNPs mais homogêneas. As variações observadas entre esses parâmetros para folhas e pecíolos; ramos; e folhas, pecíolos e ramos, podem corroborar com a presença/ausência e abundância de diferentes biomoléculas constituintes de cada parte da planta utilizada na síntese, variando também em relação à intensidade e deslocamentos das bandas de FT-IR (Figura 43b).

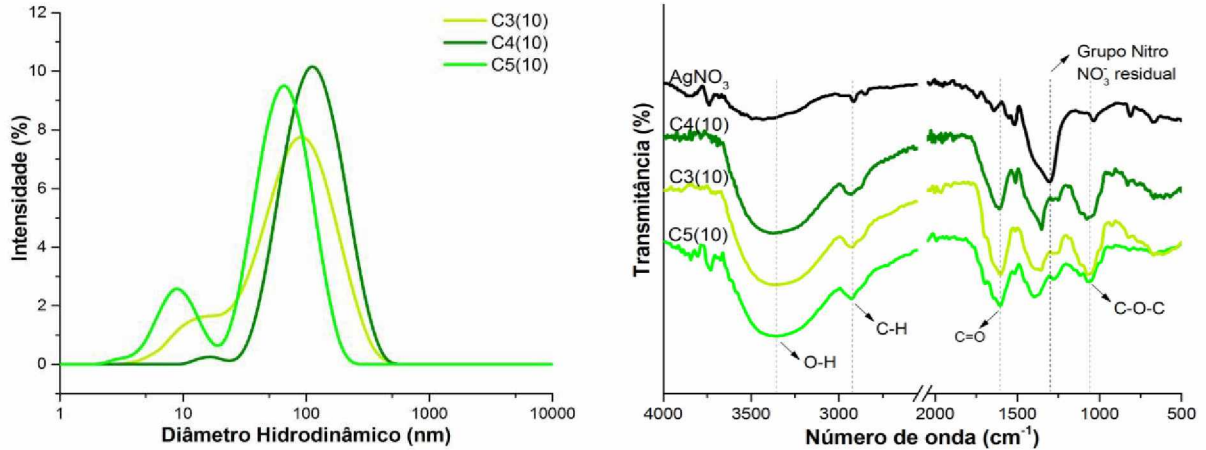


Figura 43: (a) Curvas de distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos (dados em intensidade (%)) e (b) espectros FT-IR para C3(10), C4(10) e C5(10).

Os difratogramas de raios X (Figura 44) indicaram estruturas cristalinas com padrões característicos de nanoestruturas de Ag e AgCl para todas as amostras, e com variações nas intensidades relativas em relação ao maior pico (111), decrescendo nessa ordem: C3(10), C5(10) e C4(10), respectivamente, 5100, 1440 e 720.

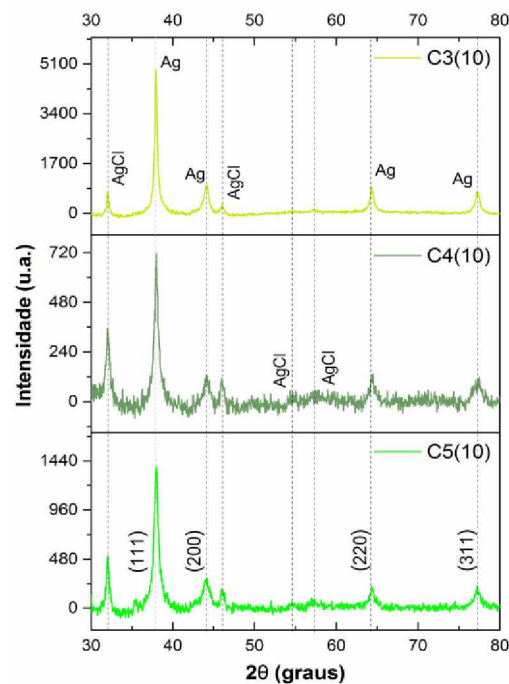


Figura 44: Difratogramas de raios X das AgNPs e possíveis AgCl-NPs sintetizadas a 50°C utilizando extrato aquoso de *I. paraguariensis* obtidos a partir de partes distintas da planta C3(10), C4(10), C5(10).

Fitorregiões A, B e C

5.4. Bioatividades das AgNPs em modelos procariontes e eucariontes

Esta quarta e última etapa deste estudo investigou as possíveis influências nas bioatividades das AgNPs sintetizadas a partir dos extratos aquosos dos materiais de *I. paraguariensis* advindos das fitorregiões A, B e C, representados pelo esquema exibido na Figura 45. Para isto, foram consideradas as variações (i) na concentração do extrato aquoso e características físico-químicas (quando avaliadas em relação às células procariontes, utilizando o extrato A1) e (ii) da fitorregião, método de cultivo, constituição da planta e características físico-químicas (quando avaliadas em relação às células eucariontes, utilizando os extratos A1, B1 e C5).

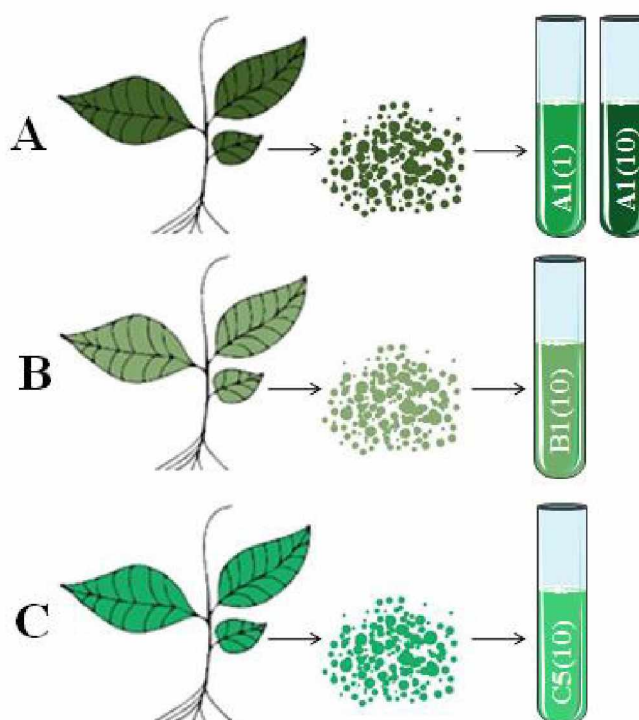


Figura 45: Esquema representativo dos Extratos A1, B1, C5, provenientes das Regiões A (Rio Grande do Sul), B (Santa Catarina) e C (Jardim Botânico de Brasília). As plantas, constituídas por folhas, pecíolos e ramos, foram adquiridas comercialmente (A e B) e processada manualmente (C), em suas formas pulverizadas.

5.4.1. Avaliação antibacteriana das AgNPs sintetizadas com *I. paraguariensis* proveniente da fitorregião A contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Agentes antibacterianos atuam na inibição do crescimento de bactérias ou para causar sua morte [167]. A busca por tratamentos alternativos para doenças infecciosas tem sido realizada considerando que várias bactérias já apresentam resistência aos antibióticos comumente utilizados [168]. Metabólitos secundários de baixa massa molecular pertencentes

a espécies vegetais, como os identificados no presente estudo (seções 5.2.1.1 e 5.3.1.1), podem atuar de diferentes maneiras conferindo propriedades biológicas às NPMs. Assim, a investigação e produção de AgNPs fitossintetizadas com potencial atividade antibacteriana foram relatadas na literatura, a partir de ensaios *in vivo*, como uma forma de terapia potencialmente segura [169][170][171][172][172][76][173]. Sabe-se que a prata, por si só, é um excelente agente contra bactérias e o mecanismo de ação de íons de prata (Ag^+) está suficientemente elucidado [173][174]; contudo, não há consenso sobre os mecanismos relacionados ao efeito antibacteriano de AgNPs (Ag^0).

De acordo com a literatura, tanto para os íons Ag^+ quanto para as AgNPs, é relatado que a concentração da amostra (de íons livres ou reduzidos/estabilizados) e o potencial Zeta de superfície da mesma influenciam diretamente no crescimento ou inibição de células bacterianas [175]. Diversos estudos afirmam que a ação antibacteriana das AgNPs ocorre devido à atração eletrostática entre estas nanopartículas (positivamente carregadas) e a membrana celular bacteriana e/ou grupos funcionais de lipopolissacarídeos (carregados negativamente), indicando que a carga positiva exibida por algumas AgNPs é essencial para atuar na inibição ou morte de bactérias [176][177]. Entretanto, o sucesso ou mesmo um possível mecanismo de ação para AgNPs negativamente carregadas como aquelas do presente estudo, são pouco relatados.

Neste trabalho, os resultados de concentração inibitória mínima (CIM) (Tabela 16) indicaram que AgNPs negativamente carregadas e sintetizadas a partir das duas concentrações de extrato de *I. paraguariensis* [A1(1) e A1(10)] apresentaram bioatividade contra os organismos procariontes *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, na maior concentração avaliada (256 μM). O mesmo ocorreu para o controle de prata (AgNO_3). Os controles de extrato [Ctrl A1(1) e Ctrl A1(10)] não mostraram qualquer atividade contra ambas as bactérias em todas as concentrações testadas.

Apesar das cargas negativas da membrana celular bacteriana e das AgNPs obtidas, e consequentemente a possível repulsão eletrostática entre elas, sugere-se que esses nanomateriais possam ter um efeito contra bactérias (quando em concentrações mais elevadas) devido ao *crowding* molecular [178]. Esse efeito pode levar a célula a sofrer compressão osmótica, perda do controle homeostático, diminuição das taxas de difusão, redução das atividades bioquímicas, alterações estruturais do citoplasma, mudanças nas interações eletrostáticas e/ou consequentemente a inativação da atividade vital [179][180][181][182][183]. Este efeito (*crowding* molecular) foi demonstrado em um trabalho

utilizando imagens obtidas por MET, onde AgNPs carregadas negativamente aparecem incorporadas à membrana bacteriana [97].

Por se tratar de um ensaio qualitativo, não é possível inferir qual amostra (incluindo AgNO₃ ou AgNPs) foi mais eficiente contra as bactérias avaliadas. No entanto, estes resultados indicaram que as AgNPs sintetizadas utilizando extratos aquosos de *I. paraguariensis* são adequadas para, pelo menos, evitar a contaminação por estas bactérias.

Tabela 16: Ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) das amostras de AgNPs sintetizadas com extrato aquoso de *I. paraguariensis* [A1(1) e A1(10)], seus respectivos controles de extrato (Ctrl(1) e Ctrl(10)) e o controle do sal metálico AgNO₃, avaliados contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os sinais positivos indicam o efeito antibacteriano provocado pelas amostras. Os sinais negativos indicam que não houve qualquer atividade.

Amostras	Bactéria											
	<i>Escherichia coli</i>						<i>Staphylococcus aureus</i>					
	Concentrações (µM)											
	256	128	64	32	16	08	256	128	64	32	16	08
A1(1)	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Ctrl A1(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1(10)	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Ctrl A1(10)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AgNO ₃	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

5.4.2. Investigação da citotoxicidade das AgNPs sintetizadas com *I. paraguariensis* provenientes das fitorregiões A, B e C sobre linhagem celular de *Spodoptera frugiperda*

Como verificado anteriormente, agentes estressores característicos de cada fitorregião e método de cultivo de *I. paraguariensis* podem causar alteração qualitativa e/ou quantitativa de determinados compostos bioativos em plantas. No que tange à área nanotecnológica, especificamente à produção de AgNPs, estes compostos advindos de extratos vegetais podem conferir bioatividades às AgNPs produzidas; e estas bioatividades podem variar de acordo com a planta utilizada e em função do tamanho, forma, carga e cobertura destas AgNPs [184], provocando efeitos benéficos ou deletérios específicos para cada organismo; os quais podem ser avaliados por bioensaios de citotoxicidade *in vitro*.

Segundo a literatura, o tamanho da nanopartícula pode facilitar ou impedir sua absorção, internalização e distribuição nas células [185][186]. AgNPs de 20 nm foram encontradas no citoplasma, mitocôndrias e núcleo de linhagens celulares humanas avaliadas *in vitro* [187]. Diversos autores relatam que AgNPs menores adentram mais facilmente nas células, diferentemente de AgNPs com 100 nm ou mais de diâmetro [188][189][190]. Entretanto, a dependência do tamanho das AgNPs pode variar de acordo com o organismo avaliado, pois cada um apresenta seu próprio limiar de toxicidade [190] ou ainda não haver qualquer correlação [191].

O efeito da cobertura foi avaliado em células de mamíferos utilizando AgNPs revestidas com hidrocarbonetos e outras revestidas com polissacarídeos [185]. No primeiro caso, as AgNPs tenderam a aglomerar-se, enquanto para o segundo caso as AgNPs foram muito mais dispersas, sendo melhor distribuídas na célula; contudo, a viabilidade celular foi maior para o primeiro caso. Os autores sugerem que isso ocorra porque as AgNPs aglomeradas podem ser excluídas de algumas organelas, como o núcleo e as mitocôndrias.

Possivelmente o mesmo ocorra em relação a carga (potencial Zeta de superfície), onde para AgNPs carregadas negativamente (funcionalizadas com citrato) e positivamente (funcionalizadas com polietilenoimina), o primeiro caso apresentou maior aglomeração e o segundo maior estabilidade *in vitro*, no entanto, também menor viabilidade celular [192]. Além disso, também foi constatado que nanopartículas com menor potencial Zeta negativo mostraram-se menos estáveis e mais suscetíveis à aglomeração, possivelmente em decorrência da estabilidade coloidal baixa [193].

Por fim, em relação à forma, um estudo relatou que variações na morfologia das AgNPs influenciaram na toxicidade em células A549 (células epiteliais alveolares humanas). Enquanto as AgNPs esféricas não apresentam efeito danoso, AgNPs em formato de fios foram citotóxicas [194]. Dessa forma, é relatado que a forma da partícula pode influenciar no mecanismo de absorção celular, modulando a resposta biológica.

Posto isto, e considerando a relação “causa-efeito” entre as características das AgNPs e as respostas das células mencionados na literatura, este estudo teve como um de seus objetivos específicos investigar a possível citotoxicidade das AgNPs produzidas utilizando extratos aquosos de *I. paraguariensis*. Levando em conta que (1) cada extrato aquoso advém de um material proveniente de uma fitorregião específica (A, B, C); (2) estes materiais foram cultivados por métodos específicos (A- com uso de insumos químicos; B- sem uso de qualquer insumo químico; e C- com uso de compostos naturais para contenção de insetos); (3) são constituídos por fitoquímicos e/ou os compostos bioativos distintos (previamente apresentados); e que (4) as características físico-químicas das AgNPs sintetizadas são distintas entre si (Tabela 17), possivelmente em função de 1, 2 e/ou 3; tendo portanto, somente a forma como similar, de acordo com as topografias obtidas por MFA (Figura 46).

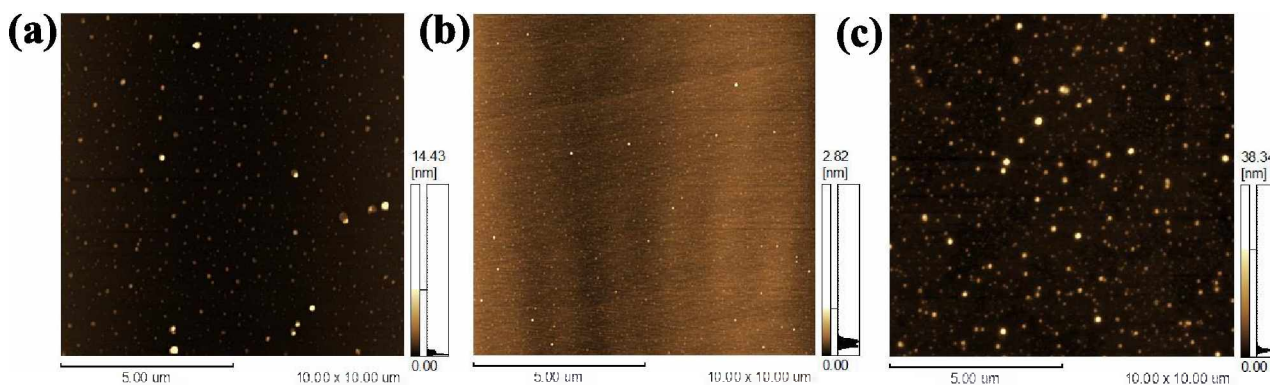


Figura 46: Topografias representativas obtidas por MFA das AgNPs produzidas utilizando extratos aquosos de *I. paraguariensis*: a) A1(10), b) B1(10) e c) C5(10), indicando morfologias esféricas ou quase-esféricas.

Tabela 17: Z-average, PDI e potencial Zeta de superfície dos materiais de *I. paraguariensis* provenientes das fitoregiões A (RS), B (SC) e C (DF): AgNPs A1(10), AgNPs B1(10), AgNPs C5(10) e seus respectivos controles contendo somente extrato aquoso Ctrl A1(10), Ctrl B1(10) e Ctrl C5(10), apresentados comparativamente. Os valores estão representados como a média \pm erro padrão da média das medidas obtidas a partir de três leituras individuais.

Fitorregião	Amostra	Z-average (d.nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
A	A1(10)	80,3 \pm 1,6	0,308 \pm 0,031	-24,5 \pm 1,2
	Ctrl A1(10)	456,7 \pm 44,9	0,387 \pm 0,075	-25,3 \pm 0,8
B	B1(10)	207,7 \pm 3,0	0,218 \pm 0,012	-21,1 \pm 1,2
	Ctrl B1(10)	1090 \pm 895	0,777 \pm 0,288	-25,9 \pm 1,3
C	C5(10)	33,6 \pm 0,2	0,553 \pm 0,012	-24,6 \pm 1,1
	Ctrl C5(10)	373,8 \pm 27,9	0,437 \pm 0,079	-25,5 \pm 1,1

O bioensaio foi realizado pelo método de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio), em linhagem celular de *Spodoptera frugiperda* (IPLB-Sf21), também conhecida como lagarta-do-cartucho. A linhagem Sf21, derivada do tecido ovariano do inseto, foi utilizada como modelo de célula de eucarionte para ser utilizada para a avaliação da citotoxicidade. Os resultados obtidos (Figura 47) apresentaram viabilidade celular similar entre as AgNPs, seus respectivos controles contendo somente extrato aquoso, e o controle positivo (C+), o qual continha mais de 95% de células viáveis. Também foi observada discreta diminuição da viabilidade para o controle contendo somente íons Ag^+ . Com isto, é possível indicar manutenção da viabilidade celular após as mesmas terem sido expostas às amostras testadas; sugerindo que (i) as AgNPs produzidas com *I. paraguariensis* não apresentaram atividade citotóxica para linhagem IPLB-Sf21; (ii) a fitoregião, (iii) o método de cultivo, (iv) a constituição da planta, e (v) as características físico-químicas das AgNPs não exerceram influência sobre a viabilidade da linhagem celular de inseto avaliada.

Ainda assim, é importante mencionar que caso o tempo de incubação fosse maior que o número horas testado (24h), é provável que as amostras de AgNPs poderiam sofrer decréscimo na viabilidade, devido à liberação contínua de Ag^+ [191]. Outros estudos são necessários para compreender o mecanismo pelo qual as AgNPs foram atóxicas em relação a esta linhagem celular, contudo, o resultado negativo de citotoxicidade *in vitro* das AgNPs pode ser um indício de biocompatibilidade e indica que estas concentrações de AgNPs utilizadas não foram capazes de causar efeitos deletérios.

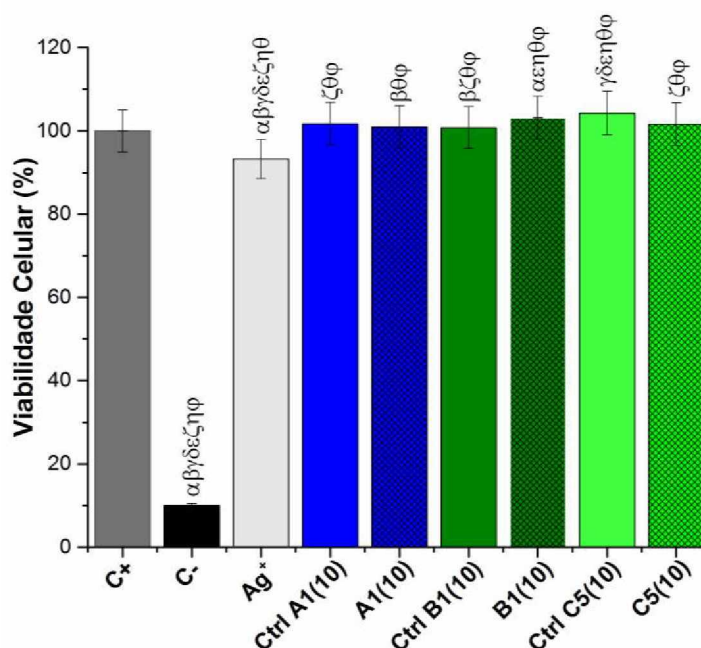


Figura 47: Ensaio de viabilidade celular (MTT) das AgNPs sintetizadas com os extratos aquosos de *I. paraguariensis* na concentração final de 10 mg/mL. Materiais provenientes das fitoregiões A, B e C: A1(10), B1(10) e C5(10), com seus respectivos controles Ctrl A1(10), Ctrl B1(10) e Ctrl C5(10). Para a análise estatística, foi aplicado o teste de Tukey ($p < 0,05$), com diferenças significativas descritas por símbolos correspondentes aos conjuntos de AgNPs [α =A1(10); β = B1(10); γ = C5(10)], dos respectivos controles contendo somente extratos aquosos [δ = Ctrl A1(10); ϵ = Ctrl B1(10); ζ = Ctrl C5(10)] e dos controles positivo [η = C+], negativo [θ = C-] e de sal metálico [ϕ = Ag^+].

Por fim, deve ser ressaltado que na literatura não há relatos de estudos sobre a citotoxicidade de AgNPs obtidas por qualquer método (físico, químico ou biológico) sobre a linhagem Sf21, e nem mesmo em relação a extratos de plantas. Com isso, a perspectiva é de que as informações obtidas com este bioensaio possam contribuir no que tange a interação entre as AgNPs fitossintetizadas com *I. paraguariensis* e a linhagem Sf21, ou ainda incentivar o estudo com outros extratos de plantas e esta ou outras células como modelos.

Por fim, o Quadro 1 apresenta um breve compilado contendo alguns dos resultados encontrados ao longo das seções abordadas e variáveis consideradas para esta Tese.

Quadro 1: Compilação das seções indicando os materiais brutos, parâmetros reacionais, teor total de antioxidantes (dado em função do percentual de inibição) e compostos fenólicos presentes em cada extrato aquoso avaliado; além do potencial formador de AgNPs e bioatividades conferidas às mesmas. Todos os bioensaios foram conduzidos a partir das AgNPs sintetizadas na temperatura de 50°C.

Fitorregião de origem	Parte da planta utilizada na reação	Aspecto do material	Referência do extrato	Antioxidantes (% inibição)	Fenóis totais [mg/L]	Temperatura de reação (°C)	Concentração de extrato aquoso [mg/mL]	Formação/referências das AgNPs	Bioatividade avaliada/ resultado	
A	Folhas, pecíolos e ramos	Processado (Pulverizado fresco)	A1	27,28 ± 0,00	169,9	50	50	Sem formação	-	-
						10	10	A1(10)	Antibacteriana	Sim
						20			Citotoxicidade	Não
						30				
						40				
						50	1	A1(1)	Antibacteriana	Sim
						60				
70										
80										
					50	0,1	Sem formação	-	-	
B	Folhas, pecíolos e ramos		B1	30,46 ± 0,01	219,0	50	10	B1(10)	Citotoxicidade	Não
C	Folhas e pecíolos		C3	19,34 ± 0,00	112,28	50	10	C3(10)	-	-
	Ramos		C4	24,23 ± 0,00	98,53	50	10	C4(10)	-	-
	Folhas, pecíolos e ramos		C5	13,22 ± 0,00	111,40	50	10	C5(10)	Citotoxicidade	Não
	Folhas e pecíolos	<i>In Natura</i> (Fragmentado fresco)	C1	5,44 ± 0,00	8,16	50	10	Sem formação	-	-
		Processado (Pulverizado congelado)	C2	5,72 ± 0,00	61,09	50	10	Sem formação	-	-

6. CONCLUSÕES

Os extratos de *I. paraguariensis* advindos das fitorregiões A, B e C, A1(1) e A1(10), B1(10), C3(10), C4(10) e C5(10) mostraram-se eficientes em relação à redução dos íons Ag^+ e estabilização das AgNPs formadas. A concentração e a temperatura de reação promoveram variações nas propriedades ópticas, dimensionais, composicionais, elétricas e estruturais das AgNPs produzidas. O ambiente de armazenamento interferiu no potencial dos extratos em relação a formação de AgNPs. O método de cultivo influenciou ligeiramente as características dos extratos, bem como as propriedades das AgNPs. O aspecto e partes da planta utilizadas nas reações interferiram expressivamente na extração de fitoquímicos dos materiais; proporcionando propriedades variadas às AgNPs obtidas. As AgNPs A1(1) e A1(10) apresentaram atividade, no mínimo bacteriostática contra as bactérias avaliadas; enquanto A1(10), B1(10) e C5(10) não apresentaram citotoxicidade em relação a linhagem eucariótica investigada.

7. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigo publicado

Physicochemical characteristics and antibacterial effects of silver nanoparticles produced using the aqueous extract of *Ilex paraguariensis*.

Autores: **Ariane Pandolfo Silveira**, Cínthia Caetano Bonatto, Cláudio Afonso Pinho Lopes, Luis Miguel Ramirez Rivera e Luciano Paulino Silva.

Revista "Materials Chemistry and Physics". Editora Elsevier. Ano: 2018.

Capítulo de livro publicado

Silver Nanoparticles as Antimicrobial Agents: Past, Present, and Future.

Autores: Luciano Paulino da Silva, **Ariane Pandolfo Silveira**, Cínthia Caetano Bonatto, Ivy Garcez Reis e Paulo Vieira Milreu.

Livro: Nanostructures for Antimicrobial Therapy. Editora Elsevier. Ano: 2017.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A.P. Reverberi, N.T. Kuznetsov, V.P. Meshalkin, M. Salerno, B. Fabiano, Systematical analysis of chemical methods in metal nanoparticles synthesis, *Theor. Found. Chem. Eng.* 50 (2016) 59-66. DOI:10.1134/S0040579516010127.
- [2] D.D. Majumder, R. Banerjee, C.H. Ulrichs, I. Mewis, A. Goswami, Nano-materials: Science of bottom-up and top-down, *IETE Tech. Rev.* 24 (2007) 9–25.

- DOI:10.4103/02564602.10876577.
- [3] D.C. Mendoza-Ruiz, I. Estrada-Guel, W. Antúnez-Flores, R. Martínez-Sánchez, Microstructural characterization of aluminum - Silver nanoparticles composites produced by mechanical milling, *Microsc. Microanal.* 14 (2008) 368–369. DOI:10.1017/S143192760808608X.
- [4] M. Scuderi, M. Esposito, F. Todisco, D. Simeone, I. Tarantini, L. De Marco, M. De Giorgi, G. Nicotra, L. Carbone, D. Sanvitto, A. Passaseo, G. Gigli, M. Cuscunà, Nanoscale study of the tarnishing process in electron beam lithography-fabricated silver nanoparticles for plasmonic applications, *J. Phys. Chem. C.* 120 (2016) 24314–24323. DOI:10.1021/acs.jpcc.6b03963.
- [5] M. Boutinguiza, R. Comesana, F. Lusquinos, A. Riveiro, J. Del Val, J. Pou, Production of silver nanoparticles by laser ablation in open air, *Appl. Surf. Sci.* 336 (2015) 108–111. DOI:10.1016/j.apsusc.2014.09.193.
- [6] J.H. Byeon, Y.W. Kim, A novel polyol method to synthesize colloidal silver nanoparticles by ultrasonic irradiation, *Ultrason. Sonochem.* 19 (2012) 209–215. DOI:10.1016/j.ultsonch.2011.06.004.
- [7] Y.F. Li, W.P. Gan, J. Zhou, Z.Q. Lu, C. Yang, T.T. Ge, Hydrothermal synthesis of silver nanoparticles in Arabic gum aqueous solutions, *Trans. Nonferrous Met. Soc. China.* 25 (2015) 2081–2086. DOI:10.1016/S1003-6326(15)63818-3.
- [8] C.T.G. Petit, M.S.A. Alsulaiman, R. Lan, G. Mann, S. Tao, Preparation of silver nanoparticles by a non-aqueous sol-gel process., *J. Nanosci. Nanotechnol.* 13 (2013) 5445–5451. DOI:10.1166/jnn.2013.7446.
- [9] F. Cataldo, O. Ursini, G. Angelini, Synthesis of silver nanoparticles by radiolysis, photolysis and chemical reduction of AgNO₃ in *Hibiscus sabdariffa* infusion (karkadé), *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 307 (2016) 447–455. DOI:10.1007/s10967-015-4141-2.
- [10] K. Sen Chou, Y.C. Lu, H.H. Lee, Effect of alkaline ion on the mechanism and kinetics of chemical reduction of silver, *Mater. Chem. Phys.* 94 (2005) 429–433. DOI:10.1016/j.matchemphys.2005.05.029.
- [11] R. Al-Bahrani, J. Raman, H. Lakshmanan, A.A. Hassan, V. Sabaratnam, Green synthesis of silver nanoparticles using tree oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* and its inhibitory activity against pathogenic bacteria, *Mater. Lett.* 186 (2017) 21–25. DOI:10.1016/j.matlet.2016.09.069.
- [12] K.C. Bhainsa, S.F. D'Souza, Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the

- fungus *Aspergillus fumigatus*, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 47 (2006) 160–164. DOI:10.1016/j.colsurfb.2005.11.026.
- [13] A.R. Shahverdi, S. Minaeian, H.R. Shahverdi, H. Jamalifar, A.A. Nohi, Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of enterobacteria: A novel biological approach, *Process Biochem.* 42 (2007) 919–923. DOI:10.1016/j.procbio.2007.02.005.
- [14] I.-M. Chung, I. Park, K. Seung-Hyun, M. Thiruvengadam, G. Rajakumar, Plant-mediated synthesis of silver nanoparticles: Their characteristic properties and therapeutic applications, *Nanoscale Res. Lett.* 11 (2016) 40. DOI:10.1186/s11671-016-1257-4.
- [15] L.P. Silva, A.P. Silveira, C. Bonatto, I.G. Reis, P. V Milreu, Silver nanoparticles as antimicrobial agents: Past, present, and future, 10 (2017) 577–596. DOI:10.1016/B978-0-323-46152-8.00026-3.
- [16] X. Li, H. Xu, Z.S. Chen, G. Chen, Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications, *J. Nanomater.* 2011 (2011) 16. DOI:10.1155/2011/270974.
- [17] B. He, J.J. Tan, K.Y. Liew, H. Liu, Synthesis of size controlled Ag nanoparticles, *J. Mol. Catal. A Chem.* 221 (2004) 121–126. DOI:10.1016/j.molcata.2004.06.025.
- [18] J. Natsuki, T. Natsuki, Y. Hashimoto, A review of silver nanoparticles: Synthesis methods, properties and applications, *Int. J. Mater. Sci. Appl.* 4 (2015) 325–332. DOI:10.11648/j.ijmsa.20150405.17.
- [19] S. Kagithoju, V. Godishala, R.S. Nanna, Eco-friendly and green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Strychnos potatorum* Linn.F. and their bactericidal activities, 3 *Biotech.* 5 (2015) 709–714. DOI:10.1007/s13205-014-0272-3.
- [20] E.S. Abdel-Halim, M.H. El-Rafie, S.S. Al-Deyab, Polyacrylamide/guar gum graft copolymer for preparation of silver nanoparticles, *Carbohydr. Polym.* 85 (2011) 692–697. DOI:10.1016/j.carbpol.2011.03.039.
- [21] E.E. Elemike, D.C. Onwudiwe, O. Arijeh, H.U. Nwankwo, Plant-mediated biosynthesis of silver nanoparticles by leaf extracts of *Lasienthra africanum* and a study of the influence of kinetic parameters, *Bull. Mater. Sci.* 40 (2017) 129–137. DOI:10.1007/s12034-017-1362-8.
- [22] S. Irvani, Green synthesis of metal nanoparticles using plants, *Green Chem.* 13 (2011) 2638–2650. DOI:10.1039/c1gc15386b.
- [23] A.P. Silveira, C.C. Bonatto, C.A.P. Lopes, L.M.R. Rivera, L.P. Silva, Physicochemical

- characteristics and antibacterial effects of silver nanoparticles produced using the aqueous extract of *Ilex paraguariensis*, *Mater. Chem. Phys.* 216 (2018) 476–484. DOI:10.1016/j.matchemphys.2018.05.068.
- [24] I. Ahuja, R.C.H. de Vos, A.M. Bones, R.D. Hall, Plant molecular stress responses face climate change, *Trends Plant Sci.* 15 (2010) 664–674. DOI:10.1016/j.tplants.2010.08.002.
- [25] A. Ramakrishna, G.A. Ravishankar, Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants, *Plant Signal. Behav.* 6 (2011) 1720–1731. DOI:10.4161/psb.6.11.17613.
- [26] D.S. Seigler, *Plant secondary metabolism*, Springer. 1 (1998) 1-759. DOI:10.1007/978-1-4615-4913-0.
- [27] E. Papoulias, A.S. Siomos, A. Koukounaras, D. Gerasopoulos, E. Kazakis, Effects of genetic, pre- and post-harvest factors on phenolic content and antioxidant capacity of white asparagus spears, *Int. J. Mol. Sci.* 10 (2009) 5370–5380. DOI:10.3390/ijms10125370.
- [28] D.N. Nair, S. Padmavathy, Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans, *Sci. World J.* 2014 (2014) 11. DOI:10.1155/2014/250693.
- [29] K.L. Korth, Profiling the response of plants to herbivorous insects, *Genome Biol.* 4 (2003) 221. DOI:10.1186/gb-2003-4-7-221.
- [30] L. Jelínek, M. Dolečková, M. Karabín, T. Hudcová, B. Kotlíková, P. Dostálek, Influence of growing area, plant age, and virus infection on the contents of hop secondary metabolites, *Czech J. Food Sci.* 30 (2012) 541–547. DOI: 10.17221/50/2012-CJFS.
- [31] I. Rejeb, V. Pastor, B. Mauch-Mani, Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: Molecular mechanisms, *Plants.* 3 (2014) 458–475. DOI:10.3390/plants3040458.
- [32] R. Kumar, G. Ghoshal, A. Jain, M. Goyal, Rapid green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using (*Prunus persica*) plants extract: Exploring its antimicrobial and catalytic activities, *J. Nanomed. Nanotechnol.* 8 (2017) 58. DOI:10.4172/2157-7439.1000452.
- [33] A.R. Vilchis-Nestor, V. Sánchez-Mendieta, M.A. Camacho-López, R.M. Gómez-Espinosa, M.A. Camacho-López, J.A. Arenas-Alatorre, Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camellia sinensis* extract, *Mater. Lett.* 62 (2008) 3103-3105. DOI:10.1016/j.matlet.2008.01.138.

- [34] A.A. Moosa, A.M. Ridha, M. Al-kaser, Process parameters for green synthesis of silver nanoparticles using leaves extract of *Aloe vera* plant, *Int. J. Multidiscip. Curr. Res.* 3 (2015) 966-975. DOI:10.1104/pp.15.00268.
- [35] S. Jain, M.S. Mehata, Medicinal plant leaf extract and pure flavonoid mediated green synthesis of silver nanoparticles and their Enhanced antibacterial property, *Sci. Rep.* 7 (2017) 15867. DOI:10.1038/s41598-017-15724-8.
- [36] D. Kalpana, J.H. Han, W.S. Park, S.M. Lee, R. Wahab, Y.S. Lee, Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Torreya nucifera* and their antibacterial activity, *Arab. J. Chem.* 26 (2014) 1878-5352. DOI:10.1016/j.arabjc.2014.08.016.
- [37] N. Bala, S. Saha, M. Chakraborty, M. Maiti, S. Das, R. Basu, P. Nandy, Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using Hibiscus subdariffa leaf extract: Effect of temperature on synthesis, anti-bacterial activity and anti-diabetic activity, *RSC Adv.* 5 (2015) 4993-5003. DOI:10.1039/c4ra12784f.
- [38] A. Mutahir, H. Chandra, M. Baunthiyal, Green synthesis of silver nanoparticles from different parts of the plant *Macrotyloma uniflorum*, *Octa J. Biosci.* 3 (2015) 58–61. ISSN: 2321-3663
- [39] L.P. Silva, I.G. Reis, C.C. Bonatto, Green synthesis of metal nanoparticles by plants: Current trends and challenges, *Springer, Cham.* 1 (2015) 259-275. DOI:10.1007/978-3-319-15461-9_9.
- [40] T. Mohide, *The international silver trade*, Woodhead Publishing, 1 (1992) 192. ISBN: 978-1-85573-067-0.
- [41] K. Heiberg, Electrolytic silver recovery from fixing baths in use, *Acta Radiol.* 34 (1950) 215–224. DOI:10.3109/00016925009135265.
- [42] S. Ju, Y. Zhang, Y. Zhang, P. Xue, Y. Wang, Clean hydrometallurgical route to recover zinc, silver, lead, copper, cadmium and iron from hazardous jarosite residues produced during zinc hydrometallurgy, *J. Hazard. Mater.* 192 (2011) 554-558. DOI:10.1016/j.jhazmat.2011.05.049.
- [43] K.G. Adani, R.W. Barley, R.D. Pascoe, Silver recovery from synthetic photographic and medical X-ray process effluents using activated carbon, in: *Miner. Eng.* 18 (2005) 1269–1276. DOI:10.1016/j.mineng.2005.05.021.
- [44] S. Ayata, H. Yildiran, A novel technique for silver extraction from silver sulphide ore, *Turkish J. Chem.* 25 (2001) 187–191. ISSN: 1300-0527.
- [45] G. Duarte de Souza, M. Aparecida Rodrigues, P. Pereira Silva, W. Guerra, Prata: Breve

- histórico, propriedades e aplicações, Educ. Química. 24 (2013) 14–16. DOI:10.1016/S0187-893X(13)73189-6.
- [46] L. A., Distribution of precious metals during the reducing pyrometallurgical processes of complex copper materials, Noble Met. (2012) 47–70. DOI:10.5772/33579.
- [47] H. Kang, S.J. Song, Y.E. Sul, B.S. An, Z. Yin, Y. Choi, L. Pu, C.W. Yang, Y.S. Kim, S.M. Cho, J.G. Kim, J.H. Cho, Epitaxial-growth-induced junction welding of silver nanowire network electrodes, ACS Nano. 12 (2018) 4894–4902. DOI:10.1021/acsnano.8b01900.
- [48] Z. Wang, J. Liu, X. Chen, J. Wan, Y. Qian, A simple hydrothermal route to large-scale synthesis of uniform silver nanowires, Chem. A Eur. J. 11 (2005) 160-163. DOI:10.1002/chem.200400705.
- [49] B.A. Milaneze, Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro com resina de *Virola oleifera* e avaliação do seu efeito antibacteriano, Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo. (2015) 93.
- [50] W.M. Haynes, CRC Handbook of Chemistry and Physics, CRC press. 93rd Edition (2015) 2677. ISBN: 1482260972.
- [51] H. Bar, D.K. Bhui, G.P. Sahoo, P. Sarkar, S. Pyne, A. Misra, Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Jatropha curcas*, Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 348 (2009) 212–216. DOI:10.1016/j.colsurfa.2009.07.021.
- [52] A. M. Awwad, N. M. Salem, A. O. Abdeen, Biosynthesis of silver nanoparticles using *Olea europaea* leaves extract and its antibacterial activity, Nanosci. Nanotechnol. 2 (2012) 164-170. DOI:10.5923/j.nn.20120206.03.
- [53] B. Ajitha, Y.A.K. Reddy, P.S. Reddy, Synthesis of silver nanoparticles : Green route, antimicrobial efficacy, Int. J. Curr. Eng. Technol. 2 (2014) 306-313. DOI: 10.14741/ijcet/spl.2.2014.56
- [54] L.D. da Silva, Síntese verde, caracterização e atividade biológica de nanopartículas de prata obtidas utilizando extratos de *Hancornia speciosa* Gomes - Apocynaceae (mangabeira), Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília. (2014) 101.
- [55] V.L. Albernaz, Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico, Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília. (2014) 121.
- [56] S. Ahmed, Saifullah, M. Ahmad, B.L. Swami, S. Ikram, Green synthesis of silver

- nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract, *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 9 (2016) 1-7. DOI:10.1016/j.jrras.2015.06.006.
- [57] F. Cataldo, Green synthesis of silver nanoparticles by the action of black or green tea infusions on silver ions, *Eur. Chem. Bull.* 3 (2014) 280–289. DOI:10.17628/ECB.2014.3.280-289.
- [58] N. Bracesco, A.G. Sanchez, V. Contreras, T. Menini, A. Gugliucci, Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview, *J. Ethnopharmacol.* 136 (2011) 378–384. DOI:10.1016/j.jep.2010.06.032.
- [59] D. Hao, X. Gu, P. Xiao, Z. Liang, L. Xu, Y. Peng, Research progress in the phytochemistry and biology of *Ilex* pharmaceutical resources, *Acta Pharm. Sin. B.* 3 (2013) 8-19. DOI:10.1016/j.apsb.2012.12.008.
- [60] R. Pasinato, Aspectos etnoentomológicos, socioeconômicos e ecológicos relacionados à cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no município de Salto do Lontra, Paraná, Brasil, Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. (2003) 112.
- [61] D.H.M. Bastos, D.M. Oliveira, R.L.T. Matsumoto, P.O. Carvalho, M.L. Ribeiro, Yerba maté: Pharmacological properties, research and biotechnology, *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.* 1 (2007) 37–46. DOI: 10.15468/c3kkgh.
- [62] C.I. Heck, E.G. De Mejia, Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations, *J. Food Sci.* 72 (2007) 138–151. DOI:10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x.
- [63] M.T.G. Aben-athar, Yerba mate tea extract: A green approach for the synthesis of silica supported iron nanoparticles for dye degradation, *J. Braz. Chem. Soc.* 27 (2016) 2093–2104. DOI: 10.5935/0103-5053.20160100
- [64] R.A. Arreche, G. Montes de Oca-Vásquez, J.R. Vega-Baudrit, P.G. Vázquez, Synthesis of silver nanoparticles using extracts from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) wastes, *Waste and Bio. Valor.* (2018) 1-9. DOI:10.1007/s12649-018-0394-7.
- [65] B.B. Strassmann, A.R. Vieira, E.L. Pedrotti, H.N.F. Morais, P.F. Dias, M. Maraschin, Quantitation of methylxanthinic alkaloids and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) and their effects on blood vessel formation in chick embryos, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 8348-8353. DOI:10.1021/jf801041f.
- [66] D.M. de Oliveira, G.R. Sampaio, C.B. Pinto, R.R. Catharino, D.H.M. Bastos, Bioavailability of chlorogenic acids in rats after acute ingestion of maté tea (*Ilex paraguariensis*) or 5-caffeoylquinic acid, *Eur. J. Nutr.* 56 (2017) 2541-2556.

- DOI:10.1007/s00394-016-1290-1.
- [67] T. Menini, C. Heck, J. Schulze, E. De Mejia, A. Gugliucci, Protective action of *Ilex paraguariensis* extract against free radical inactivation of paraoxonase-1 in high-density lipoprotein, *Planta Med.* 73 (2007) 1141–1147. DOI:10.1055/s-2007-981585.
- [68] E.C. De Moraes, A. Stefanuto, G.A. Klein, B.C.B. Boaventura, F. De Andrade, E. Wazlawik, P.F. Di Pietro, M. Maraschino, E.L. Da Silva, Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 8316–8324. DOI:10.1021/jf901660g.
- [69] R. Filip, R. Davicino, C. Anesini, Antifungal activity of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* against *Malassezia furfur.*, *Phytother. Res.* 24 (2010) 715–9. DOI:10.1002/ptr.3004.
- [70] O. Daniel, Erva-mate Sistema de produção e processamento industrial, UFGD. (2009) 288. DOI:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [71] M.C. Esmelindro, G. Toniazzo, A. Waczuk, C. Dariva, D. de Oliveira, Caracterização físico-química da erva mate: influência das etapas do processamento industrial, *Ciência e Tecnol. Aliment.* 22 (2002) 199–204. DOI:10.1590/S0101-20612002000200016.
- [72] P. Singh, Y.J. Kim, D. Zhang, D.C. Yang, Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms, *Trends Biotechnol.* 34 (2016) 588–599. DOI:10.1016/j.tibtech.2016.02.006.
- [73] K. Punjabi, P. Choudhary, L. Samant, S. Mukherjee, S. Vaidya, A. Chowdhary, Biosynthesis of nanoparticles : A review, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 30 (2015) 219–226. ISSN: 0976-044X.
- [74] P. Logeswari, S. Silambarasan, J. Abraham, Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property, *J. Saudi Chem. Soc.* 9 (2015) 311–317. DOI:10.1016/j.jscs.2012.04.007.
- [75] P. Kouvaris, A. Delimitis, V. Zaspalis, D. Papadopoulos, S.A. Tsipas, N. Michailidis, Green synthesis and characterization of silver nanoparticles produced using *Arbutus Unedo* leaf extract, *Mater. Lett.* 76 (2012) 18–20. DOI:10.1016/j.matlet.2012.02.025.
- [76] S. Ahmed, M. Ahmad, B.L. Swami, S. Ikram, A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise, *J. Adv. Res.* 7 (2016) 17–28. DOI:10.1016/j.jare.2015.02.007.
- [77] B. Ajitha, Y. Ashok Kumar Reddy, P. Sreedhara Reddy, Green synthesis and

- characterization of silver nanoparticles using *Lantana camara* leaf extract, Mater. Sci. Eng. C. 49 (2015) 373-381. DOI:10.1016/j.msec.2015.01.035.
- [78] C.K. Sathiya, S. Akilandeswari, Fabrication and characterization of silver nanoparticles using *Delonix elata* leaf broth, Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 128 (2014) 337-341. DOI:10.1016/j.saa.2014.02.172.
- [79] P. Anastas, N. Eghbali, Green chemistry: Principles and practice, Chem. Soc. Rev. 39 (2010) 301-312. DOI:10.1039/b918763b.
- [80] D.F. Mercado, P. Caregnato, L.S. Villata, M.C. Gonzalez, *Ilex paraguariensis* extract-coated magnetite nanoparticles: A sustainable nano-adsorbent and antioxidant, J. Inorg. Organomet. Polym. Mater. 28 (2018) 519–527. DOI:10.1007/s10904-017-0757-8.
- [81] D.F. Mercado, M. Cipollone, M.C. González, F.H. Sánchez, Yerba Mate applications: Magnetic response of powders and colloids of iron oxide nanoparticles coated with *Ilex paraguariensis* derivatives, J. Magn. Magn. Mater. 462 (2018) 13–21. DOI:10.1016/j.jmmm.2018.04.048.
- [82] M.P. Arrieta, L. Peponi, D. López, M. Fernández-García, Recovery of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) residue for the development of PLA-based bionanocomposite films, Ind. Crops Prod. 111 (2018) 317–328. DOI:10.1016/j.indcrop.2017.10.042.
- [83] L.P. dos Santos, T. Caon, M.A. Battisti, C.H.B. da Silva, C.M.O. Simões, F.H. Reginatto, A.M. de Campos, Antioxidant polymeric nanoparticles containing standardized extract of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. for topical use, Ind. Crops Prod. 108 (2017) 738–747. DOI:10.1016/j.indcrop.2017.07.035.
- [84] L. Barberia-Roque, E. Gámez-Espinosa, M. Viera, N. Bellotti, Assessment of three plant extracts to obtain silver nanoparticles as alternative additives to control biodeterioration of coatings, Int. Biodeterior. Biodegrad. (2018) 31. DOI:10.1016/j.ibiod.2018.06.011.
- [85] M.S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, Nature. 26 (1958) 1199-1200. DOI:10.1038/1811199a0.
- [86] Ø. Hammer, D.A.T. a. T. Harper, P.D. Ryan, PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis, Palaeontol. Electron. 4 (2001) 1–9. DOI:10.1016/j.bcp.2008.05.025.
- [87] J. Hardesty, B. Attili, Spectrophotometry and the beer-lambert Law: An important analytical technique in Chemistry, Collin College. (2010) 6.
- [88] Z. Dai, G. Flatberg, H. A. Preisig, L. Deng, Kinetic studies of fenton oxidation reaction

- by UV-VIS spectroscopy, *J. Lab. Chem. Educ.* 6 (2018) 141–147. DOI:10.5923/j.jlce.20180605.01.
- [89] A.S. Karkach, Trajectories and models of individual growth, *Demogr. Res.* 15 (2006) 347-400. DOI:10.4054/DemRes.2006.15.12.
- [90] J.M. Herrmann, Isokinetic consecutive reactions in heterogeneous catalysis, *Appl. Catal. A Gen.* 156 (1997) 285-297. DOI:10.1016/S0926-860X(97)00005-7.
- [91] Z. Wang, U. Wille, E. Juaristi, *Encyclopedia of physical organic chemistry*, 6 volume Set, Wiley. 1 (2017) 4464. ISBN: 1118470451.
- [92] L. Bentea, M.A. Watzky, R.G. Finke, Sigmoidal nucleation and growth curves across nature fit by the finke-watzky model of slow continuous nucleation and autocatalytic growth: Explicit formulas for the lag and growth times plus other key insights, *J. Phys. Chem. C.* 121 (2017) 5302-5312. DOI:10.1021/acs.jpcc.6b12021.
- [93] K.A. Willets, R.P. Van Duyne, Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 58 (2007) 267-297. DOI:10.1146/annurev.physchem.58.032806.104607.
- [94] D. Cruz, *Biosíntese e caracterização de nanopartículas metálicas*, Dissertação de mestrado. Universidade de Lisboa. (2010) 102.
- [95] Nano CEMMS, *Learning activity series - Gold and silver nanoparticles*, University of Illinois. (2012) 22.
- [96] D. Cruz, P.L. Falé, A. Mourato, P.D. Vaz, M. Luisa Serralheiro, A.R.L. Lino, Preparation and physicochemical characterization of Ag nanoparticles biosynthesized by *Lippia citriodora* (Lemon Verbena), *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 81 (2010) 67–73. DOI:10.1016/j.colsurfb.2010.06.025.
- [97] T.F.F. da Silveira, A.D. Meinhart, C.A. Ballus, H.T. Godoy, The effect of the duration of infusion, temperature, and water volume on the rutin content in the preparation of mate tea beverages: An optimization study, *Food Res. Int.* 60 (2014) 241-245. DOI:10.1016/j.foodres.2013.09.024.
- [98] M. Kopjar, V. Piližota, D. Šubari, J. Babic, Prevention of thermal degradation of red currant juice anthocyanins by phenolic compounds addition, *J. Food Sci.* 1 (2009) 24-30.
- [99] S. qian Cao, L. Liu, S. yi Pan, Thermal degradation kinetics of anthocyanins and visual color of blood orange juice, *Agric. Sci. China.* 10 (2011) 1992-1997. DOI:10.1016/S1671-2927(11)60201-0.

- [100] D. De Paepe, D. Valkenburg, K. Coudijzer, B. Noten, K. Servaes, M. De Loose, S. Voorspoels, L. Diels, B. Van Droogenbroeck, Thermal degradation of cloudy apple juice phenolic constituents, *Food Chem.* 162 (2014) 176-185. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.04.005.
- [101] A. Kirca, B. Cemeroğlu, Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate, *Food Chem.* 81 (2003) 583-587. DOI:10.1016/S0308-8146(02)00500-9.
- [102] A. Kucner, A. Papiewska, R. Klewicki, M. Sójka, E. Klewicka, Influence of thermal treatment on the stability of phenolic compounds and the microbiological quality of sucrose solution following osmotic dehydration of highbush blueberry fruits, *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 13 (2014) 79–88. DOI:10.17306/J.AFS.2014.1.7.
- [103] Y.T. Chen, W.T. Kao, K.W. Lin, Effects of pH on the total phenolic compound, antioxidative ability and the stability of dioscorin of various yam cultivars, *Food Chem.* 107 (2008) 250–257. DOI:10.1016/j.foodchem.2007.08.017.
- [104] S. Hamedi, S.M. Ghaseminezhad, S.A. Shojaosadati, S. Shokrollahzadeh, Comparative study on silver nanoparticles properties produced by green methods, *Iran. J. Biotechnol.* 10 (2012) 1–7. DOI:10.1016/j.carbpol.2012.03.030.
- [105] A. Chaicouski, J. Estina da Silva, J. Luiz Ferreira da Trindade, M. Helene Giovanetti Canteri, Análise de cor, atividade de água e sólidos solúveis totais em extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*), *Rev. Bras. Prod. Agro.* 16 (2014) 33-41. ISSN: 1517-8595.
- [106] A.C.D.S. Medeiros, M.T.S. Da Eira, Comportamento fisiológico, secagem e armazenamento de sementes florestais nativas, *Circ. Técnica.* 127. (2006) 1–13.
- [107] F.K.J. Yatsu, G.S. Borghetti, V.L. Bassani, Technological characterization and stability of *Ilex paraguariensis* st. hil. Aquifoliaceae (*Maté*) spray-dried powder, *J. Med. Food.* 14 (2011) 413-419. DOI:10.1089/jmf.2010.0044.
- [108] C.C. Bonatto, L.P. Silva, Higher temperatures speed up the growth and control the size and optoelectrical properties of silver nanoparticles greenly synthesized by cashew nutshells, *Ind. Crops Prod.* 58 (2014) 46–54. DOI:10.1016/j.indcrop.2014.04.007.
- [109] G.B. de Melo, Síntese verde e caracterização de nanopartículas de prata usando extrato aquoso de erva mate (*Ilex paraguariensis*), Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. (2015) 38.
- [110] Wallis, High resolution Zeta Potential Analyzer, I. For, Cordouan Tec. (n.d.).
- [111] K. Yamamoto, Standardization on particle size distribution measurement of

- nanomaterials, *Microsc. Microanal.* 21 (2015) 2399–2400. DOI: 10.1017/S1431927615012775.
- [112] D.J. Müller, A. Engel, The height of biomolecules measured with the atomic force microscope depends on electrostatic interactions, *Biophys. J.* 73 (1997) 1633–1644. DOI:10.1016/S0006-3495(97)78195-5.
- [113] S.Y. Lin, K.C. Yang, L.J. Chen, Effect of surface hydrophobicity on critical pinning concentration of nanoparticles to trigger the coffee ring formation during the evaporation process of sessile drops of nanofluids, *J. Phys. Chem. C.* 119 (2015) 3050–3059. DOI:10.1021/jp509547n.
- [114] P. Eaton, P. Quaresma, C. Soares, C. Neves, M.P. de Almeida, E. Pereira, P. West, A direct comparison of experimental methods to measure dimensions of synthetic nanoparticles, *Ultramicroscopy.* 182 (2017) 179–190. DOI:10.1016/j.ultramic.2017.07.001.
- [115] F.C. Frank, On Miller–Bravais indices and four-dimensional vectors, *Acta Crystallogr.* 18 (1965) 862–866. DOI:10.1107/S0365110X65002116.
- [116] W. Callister, D. Rethwisch, *Atomic Structure and Interatomic Bonding, Mater. Sci. Eng. An Introd.* (2007) 16–35. ISBN-13: 978-0-471-73696-7.
- [117] K. Anandalakshmi, J. Venugobal, V. Ramasamy, Characterization of silver nanoparticles by green synthesis method using *Pedaliium murex* leaf extract and their antibacterial activity, *Appl. Nanosci.* 6 (2016) 399–408. DOI:10.1007/s13204-015-0449-z.
- [118] V.S. Suvith, D. Philip, Catalytic degradation of methylene blue using biosynthesized gold and silver nanoparticles, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 118 (2014) 526–532. DOI:10.1016/j.saa.2013.09.016.
- [119] B. Li, M. Tester, M. Gilliam, Chloride on the move, *Trends Plant Sci.* 22 (2017) 236–248. DOI:10.1016/j.tplants.2016.12.004.
- [120] M. Esna-Ashari, M. Gholami, The effect of increased chloride (Cl⁻) content in nutrient solution on yield and quality of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) fruits, *J. Fruit Ornam. Plant Res.* 18 (2010) 37–44.
- [121] G. Bagherzade, M.M. Tavakoli, M.H. Namaei, Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of saffron (*Crocus sativus* L.) wastages and its antibacterial activity against six bacteria, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 7 (2017) 227–233. DOI:10.1016/j.apjtb.2016.12.014.

- [122] A.M. Awwad, N.M. Salem, Q.M. Ibrahim, A.O. Abdeen, Phytochemical fabrication and characterization of silver/silver chloride nanoparticles using *Albizia julibrissin* flowers extract, *Adv. Mater. Lett.* 6 (2015) 726-730. DOI:10.5185/amlett.2015.5816.
- [123] T. Theivasanthi, M. Alagar, Electrolytic synthesis and characterization of silver nanopowder, *Nano Biomed. Eng.* (2012) 12. DOI:10.5101/nbe.v4i2.p58-65.
- [124] C.J. Humphreys, The significance of bragg's law in electron diffraction and microscopy, and bragg's second law, *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* 69 (2013) 45-50. DOI:10.1107/S0108767312047587.
- [125] L. Bleicher, J.M. Sasaki, Introdução à difração de raio X em cristais, UFC. (2000) 20. DOI:10.1109/TMTT.1960.1124749.
- [126] D.L. Pavia, G.M. Lampman, G.S. Kriz, J.A. Vyvyan, Introduction to spectroscopy, 5th ed., Brooks Cole. (2014) 752. ISBN: 0495114782.
- [127] C. Jayaseelan, A.A. Rahuman, Acaricidal efficacy of synthesized silver nanoparticles using aqueous leaf extract of *Ocimum canum* against *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Hyalomma marginatum isaaci* (Acari: Ixodidae), *Parasitol. Res.* 111 (2012) 1369–1378. DOI:10.1007/s00436-011-2559-1.
- [128] S.P. Chandran, M. Chaudhary, R. Pasricha, A. Ahmad, M. Sastry, Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using *Aloe vera* plant extract, *Biotechnol. Prog.* 22 (2006) 577–583. DOI:10.1021/bp0501423.
- [129] S. Vaz, Analytical techniques and methods for biomass, Springer. (2016) 286. DOI:10.1007/978-3-319-41414-0.
- [130] A.S. Oliveira, R. Ribeiro-Santos, F. Ramos, M.C. Castilho, A. Sanches-Silva, UHPLC-DAD multi-method for determination of phenolics in aromatic plants, *Food Anal. Methods.* 11 (2018) 440-450. DOI:10.1007/s12161-017-1015-y.
- [131] H. Choi, Advances of photo diode array, Man. SCINCO Co.Ltd. (1950) 1–9.
- [132] R. López-Serna, M. Petrović, D. Barceló, Direct analysis of pharmaceuticals, their metabolites and transformation products in environmental waters using on-line TurboFlow™ chromatography-liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1252 (2012) 115-129. DOI:10.1016/j.chroma.2012.06.078.
- [133] L. Chromatography, Analysis of organic acids in food with the perkinElmer flexar FX-15 system equipped with a PDA detector, (n.d.) 1–4.
- [134] S.M. Chesnut, J.J. Salisbury, The role of UHPLC in pharmaceutical development, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1183-1190. DOI:10.1002/jssc.200600505.

- [135] R. Monošík, L.O. Dragsted, A versatile UHPLC-MSMS method for simultaneous quantification of various alcohol intake related compounds in human urine and blood, *Anal. Methods*. 8 (2016) 6865-6871. DOI:10.1039/c6ay01908k.
- [136] E. Dziurkowska, M. Wesolowski, Simultaneous quantitation of venlafaxine and its main metabolite, O-desmethylvenlafaxine, in human saliva by HPLC, *J. Sep. Sci.* 36 (2013)1726-1733. DOI:10.1002/jssc.201300087.
- [137] C. Echiburu-Chau, L. Pastén, C. Parra, J. Bórquez, A. Mocan, M.J. Simirgiotis, High resolution UHPLC-MS characterization and isolation of main compounds from the antioxidant medicinal plant *Parastrephia lucida* (Meyen), *Saudi Pharm. J.* 25 (2017) 1032-1039. DOI:10.1016/j.jsps.2017.03.001.
- [138] G.U. Balcke, V. Handrick, N. Bergau, M. Fichtner, A. Henning, H. Stellmach, A. Tissier, B. Hause, A. Frolov, An UPLC-MS/MS method for highly sensitive high-throughput analysis of phytohormones in plant tissues, *Plant Methods*. 8 (2012) 47. DOI:10.1186/1746-4811-8-47.
- [139] V. Spínola, B. Mendes, J.S. Câmara, P.C. Castilho, An improved and fast UHPLC-PDA methodology for determination of L-ascorbic and dehydroascorbic acids in fruits and vegetables. Evaluation of degradation rate during storage, in: *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 1049-1058. DOI:10.1007/s00216-011-5668-x.
- [140] M. Sakairi, H. Kambara, Characteristics of a Liquid Chromatograph/Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometer, *Anal. Chem.* 60 (1988) 774–780. DOI:10.1021/ac00159a009.
- [141] F. Wilson, Walker, Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology, Camb. Univ. Press. (2018) 352-357. ISBN: 9781316677056
- [142] P. Pereira, M.C. Oliveira, M.G.B. Gil, M.J. Cebola, HPLC/MS identification of the polyphenols present in an extract of *Myrtus communis* L. obtained by supercritical fluid extraction, *Biomed. Biopharm. Res.* 14 (2017) 195–203. DOI:10.19277/bbr.14.2.162.
- [143] S.C. Moldoveanu, V. David, Parameters that characterize HPLC analysis, in: *Essentials mod. HPLC Sep.* (2013) 53-84. DOI:10.1016/B978-0-12-385013-3.00002-1.
- [144] C.A.B. De Maria, R.F.A. Moreira, Cafeína: Revisão sobre métodos de análise, *Quim. Nova.* 30 (2007) 99. DOI:10.1590/S0100-40422007000100021.
- [145] H. Fontela, Maria, Drogues en el medi aquàtic de les aigües residuals a l'aigua potable, Tese de doctorado. Universidade de Barcelona. (2016) 370.
- [146] R.G. Peres, F.G. Tonin, M.F.M. Tavares, D.B. Rodriguez-Amaya, HPLC-DAD-

- ESI/MS identification and quantification of phenolic compounds in *Ilex paraguariensis* beverages and on-line evaluation of individual antioxidant activity, *Molecules*. 18 (2013) 3859-3871. DOI:10.3390/molecules18043859.
- [147] A. Farah, M. Monteiro, C.M. Donangelo, S. Lafay, Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans, *J. Nutr.* 138 (2008) 2309-2315. DOI:10.3945/jn.108.095554.
- [148] M. Bojić, V. Simon Haas, D. Šarić, Ž. Maleš, Determination of flavonoids, phenolic acids, and xanthines in mate tea (*Ilex paraguariensis* St.-Hil.), *J. Anal. Methods Chem.* (2013) 6. DOI:10.1155/2013/658596.
- [149] C.H. Rinnert, Análise estrutural de folha de *senna multijuga* subsp. *lindleyana* (gardner) hs irwin & barneby (leguminosae, caesalpinoideae) e localização *in situ* de compostos com ação biológica de interesse farmacológico. Tese de doutorado. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. (2010) 102.
- [150] A. Tarozzi, S. Hrelia, C. Angeloni, F. Morroni, P. Biagi, M. Guardigli, G. Cantelli-Forti, P. Hrelia, Antioxidant effectiveness of organically and non-organically grown red oranges in cell culture systems, *Eur. J. Nutr.* 45 (2006) 152–158. DOI:10.1007/s00394-005-0575-6.
- [151] E. Hallmann, E. Rembial kowska, Characterisation of antioxidant compounds in sweet bell pepper (*Capsicum annuum* L.) under organic and conventional growing systems, *J. Sci. Food Agric.* 92 (2012) 2409-2415. DOI:10.1002/jsfa.5624.
- [152] O. Legislation, O. Practices, C.K. Winter, S.F. Davis, Organic foods, *J. Food Sci.* 71 (2006) 117-124. DOI:10.1111/j.1750-3841.2006.00196.x.
- [153] P.V.L. Sousa. Conteúdo de compostos fenólicos, atividade antioxidante e minerais em hortaliças convencionais e orgânicas. Dissertação de mestrado. Universidade federal do Piauí. (2017) 91.
- [154] Freeman, An overview of plant defenses against pathogens and herbivores, *Plant Heal. Instr.* (2008) 22. DOI:10.1094/PHI-I-2008-0226-01.
- [155] R.G. Hollingsworth, J.W. Armstrong, E. Campbell, Pest control: caffeine as a repellent for slugs and snails, *Nature*. 417 (2002) 915. DOI:10.1038/417915a.
- [156] M. Siddiq, M.A. Uebersax, Handbook of vegetables and vegetable processing: Second Edition. (2018). DOI:10.1002/9781119098935.
- [157] R.A. Dixon, N.L. Paiva, Stress-Induced phenylpropanoid metabolism, *Plant Cell*. 7 (1995) 1085. DOI:10.2307/3870059.

- [158] M. Rico, I. Sánchez, C. Trujillo, N. Pérez, Screening of the antioxidant properties of crude extracts of six selected plant species from the Canary Islands (Spain), 220 (2013) 217–220. DOI:10.5073/JABFQ.2013.086.030.
- [159] K.A. Arbos, R.J.S. de Freitas, S.C. Stertz, L.A. Carvalho, Segurança alimentar de hortaliças orgânicas: aspectos sanitários e nutricionais, *Ciência e Tecnol. Aliment.* 30 (2010) 215-220. DOI:10.1590/S0101-20612010000500033.
- [160] G.D.J. Rigueira, A.V.M. Bandeira, C.G.O. Chagas, R.C.R. de M. Milagres, Atividade antioxidante e teor de fenólicos em couve-manteiga (*brassica oleracea* L. var. acephala) submetida a diferentes sistemas de cultivo e métodos de preparo, *Semin. Ciências Biológicas e Da Saúde.* 37 (2016) 3-12. DOI:10.5433/1679-0367.2016v37n2p3.
- [161] D.K. Asami, Y.J. Hong, D.M. Barrett, A.E. Mitchell, Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1237-1241. DOI:10.1021/jf020635c.
- [162] K. Ghafoor, Y.H. Choi, J.Y. Jeon, I.H. Jo, Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 4988-4994. DOI:10.1021/jf9001439.
- [163] F.J. Barba, Z. Zhu, M. Koubaa, A.S. Sant'Ana, V. Orlie, Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review, *Trends Food Sci. Technol.* 49 (2016) 96-109. DOI:10.1016/j.tifs.2016.01.006.
- [164] J. Teixeira, A. Gaspar, E.M. Garrido, J. Garrido, F. Borges, Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview, *Biomed Res. Int.* (2013) 11. DOI: 10.1155/2013/251754.
- [165] M.C. Shih, C.M. Chang, S.M. Kang, M.L. Tsai, Effect of different parts (leaf, stem and stalk) and seasons (summer and winter) on the chemical compositions and antioxidant activity of *Moringa oleifera*, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 6077-6088. DOI:10.3390/ijms12096077.
- [166] M.L. De Carvalho, B. Ribeiro, M. Marques, K.A. Vale, Estudo comparativo entre a quantidade de fenólicos totais presentes em folhas e cálices de *Hibiscus sabdariffa* L, In: VII CONNEPI-Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação. (2012) 7.
- [167] T. Musumeci, G. Puglisi, Antimicrobial agents. (2013) 305-333.

- DOI:10.1533/9781908818348.305.
- [168] M.M. Cowan, Plant products as antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (1999) 564–582.
- [169] R.W. Bussmann, G. Malca-García, A. Glenn, D. Sharon, G. Chait, D. Díaz, K. Pourmand, B. Jonat, S. Somogy, G. Guardado, C. Aguirre, R. Chan, K. Meyer, A. Kuhlman, A. Townesmith, J. Effio-Carbajal, F. Frías-Fernandez, M. Benito, Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies, *J. Ethnopharmacol.* 132 (2010) 101–108. DOI:10.1016/j.jep.2010.07.048.
- [170] F. Nakhjiri, M. Mirhosseini, M. Alsatat Mozaheb, Green synthesis of silver nanoparticle using echinops extract and its antibacterial activity, *Nanomedicine J.* 4 (2017) 98–106. DOI:10.22038/nmj.2017.8411.
- [171] T.A. Abalkhil, S.A. Alharbi, S.H. Salmen, M. Wainwright, Bactericidal activity of biosynthesized silver nanoparticles against human pathogenic bacteria, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 31 (2017) 411–417. DOI:10.1080/13102818.2016.1267594.
- [172] A. Miri, N. Dorani, M. Darroudi, M. Sarani, Green synthesis of silver nanoparticles using *Salvadora persica* L. and its antibacterial activity, *Cell. Mol. Biol.* 62 (2016) 46–50. DOI:10.14715/cmb/2016.62.9.8.
- [173] H.A. Hemeg, Nanomaterials for alternative antibacterial therapy, *Int. J. Nanomedicine.* 12 (2017) 8211–8225. DOI:10.2147/IJN.S132163.
- [174] W.K. Jung, H.C. Koo, K.W. Kim, S. Shin, S.H. Kim, Y.H. Park, Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 2171–2178. DOI:10.1128/AEM.02001-07.
- [175] S.R.K. Pandian, V. Deepak, K. Kalishwaralal, P. Viswanathan, G. Sangiliyandi, Mechanism of bactericidal activity of silver nitrate - A concentration dependent bi-functional molecule, *Brazilian J. Microbiol.* 41 (2010) 805–809. DOI:10.1590/S1517-83822010000300033.
- [176] A. Abbaszadegan, Y. Ghahramani, A. Gholami, B. Hemmateenejad, S. Dorostkar, M. Nabavizadeh, H. Sharghi, The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: A preliminary study, *J. Nanomater.* 2015 (2015) 661. DOI:10.1155/2015/720654.
- [177] N.D. Jasuja, D.K. Gupta, M. Reza, S.C. Joshi, Green synthesis of AgNPs stabilized with biowaste and their antimicrobial activities, *Brazilian J. Microbiol.* 45 (2014) 1325–1332. DOI:10.1590/S1517-83822014000400024.

- [178] A.M. Fayaz, K. Balaji, M. Girilal, R. Yadav, P.T. Kalaichelvan, R. Venketesan, Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 6 (2010) 103–109. DOI:10.1016/j.nano.2009.04.006.
- [179] J.T. Mika, G. Van Den Bogaart, L. Veenhoff, V. Krasnikov, B. Poolman, Molecular sieving properties of the cytoplasm of *Escherichia coli* and consequences of osmotic stress, *Mol. Microbiol.* 77 (2010) 200–207. DOI:10.1111/j.1365-2958.2010.07201.x.
- [180] A. Miermont, F. Waharte, S. Hu, M.N. McClean, S. Bottani, S. Leon, P. Hersen, Severe osmotic compression triggers a slowdown of intracellular signaling, which can be explained by molecular crowding, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (2013) 5725–5730. DOI:10.1073/pnas.1215367110.
- [181] M.A. Mourão, J.B. Hakim, S. Schnell, Connecting the dots: The effects of macromolecular crowding on cell physiology, *Biophys. J.* 107 (2014) 2761–2766. DOI:10.1016/j.bpj.2014.10.051.
- [182] B.R. Parry, I. V. Surovtsev, M.T. Cabeen, C.S. O’Hern, E.R. Dufresne, C. Jacobs-Wagner, The bacterial cytoplasm has glass-like properties and is fluidized by metabolic activity, *Cell.* 156 (2014) 183–194. DOI:10.1016/j.cell.2013.11.028.
- [183] I. Sondi, B. Salopek-Sondi, Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria, *J. Colloid Interface Sci.* 275 (2004) 177–182. DOI:10.1016/j.jcis.2004.02.012.
- [184] M.A. Malik, M.Y. Wani, M.A. Hashim, F. Nabi, Nanotoxicity: Dimensional and morphological concerns, *Adv. Phys. Chem.* 2011 (2011) 15. DOI:10.1155/2011/450912.
- [185] M. Ahamed, M. Karns, M. Goodson, J. Rowe, S.M. Hussain, J.J. Schlager, Y. Hong, DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 233 (2008) 404–410. DOI:10.1016/j.taap.2008.09.015.
- [186] L. Shang, K. Nienhaus, G.U. Nienhaus, Engineered nanoparticles interacting with cells: Size matters, *J. Nanobiotechnology.* 12 (2014) 5. DOI:10.1186/1477-3155-12-5.
- [187] M. Kruszewski, K. Brzoska, G. Brunborg, N. Asare, M. Dobrzyńska, M. Dušinská, L.M. Fjellsbø, A. Georgantzopoulou, J. Gromadzka-Ostrowska, A.C. Gutleb, A. Lankoff, Z. Magdolenová, E.R. Pran, A. Rinna, C. Instanes, W. J. Sandberg, P. Schwarze, T. Stępkowski, M. Wojewódzka, M. Refsnes, Toxicity of Silver

- Nanomaterials in higher eukaryotes, *Adv. Mol. Toxicol.* 5 (2011) 179-218. DOI:10.1016/B978-0-444-53864-2.00005-0.
- [188] Y.M. Cho, Y. Mizuta, J.I. Akagi, T. Toyoda, M. Sone, K. Ogawa, Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice, *J. Toxic. Pathol.* (2017) 73-80. DOI: 10.1293/tox.2017-0043.
- [189] L. Zapór, Effects of silver nanoparticles of different sizes on cytotoxicity and oxygen metabolism disorders in both reproductive and respiratory system cells, *Arch. Environ. Prot.* 42 (2016) 32-47. DOI:10.1515/aep-2016-0038.
- [190] M. Akter, M.T. Sikder, M.M. Rahman, A.K.M.A. Ullah, K.F.B. Hossain, S. Banik, T. Hosokawa, T. Saito, M. Kurasaki, A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives, *J. Adv. Res.* 9 (2018) 1-16. DOI:10.1016/j.jare.2017.10.008.
- [191] T. Bartłomiejczyk, A. Lankoff, M. Kruszewski, I. Szumiel, Silver nanoparticles - Allies or adversaries?, *Ann. Agric. Environ. Med.* 20 (2013) 48-54.
- [192] E.C. Frey, Influence of silver nanoparticle surface charge on cytotoxic efficacy against Cancer Cells, (2017) 31.
- [193] J. Kaur, K. Tikoo, Evaluating cell specific cytotoxicity of differentially charged silver nanoparticles, *Food Chem. Toxicol.* 51 (2013) 1-14. DOI:10.1016/j.fct.2012.08.044.
- [194] M. Akter, M.T. Sikder, M.M. Rahman, A.K.M.A. Ullah, K.F.B. Hossain, S. Banik, T. Hosokawa, T. Saito, M. Kurasaki, A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives, *J. Adv. Res.* 9 (2018) 1–16. DOI:10.1016/j.jare.2017.10.008.