

CARLA REGINA BORGES LOPES

**SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E
OURO E SUA APLICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE
MERCÚRIO**

Dissertação apresentada, como exigência parcial, para obtenção do título de Mestre em Ciências, ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu Ciência e Tecnologia da Sustentabilidade do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lilia Coronato Courrol

DIADEMA

2018

Lopes, Carla Regina Borges

Síntese verde de nanopartículas de prata e ouro e sua aplicação na determinação de mercúrio / Carla Regina Borges Lopes --

Diadema, 2018.

120f.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia da Sustentabilidade) - Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, 2018

Orientadora: Lilia Coronato Courrol

1. Nanopartículas metálicas. 2. Síntese verde. 3. Sensor de mercúrio.
4. Fotorredução. 5. *Mimusops coriacea*. I. Título.

CDD 620.5

Dedico este trabalho ao meu marido Felipe.
Dedico a todos que de alguma forma
contribuíram para sua realização.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus, que me abençoou com coragem e força para chegar até aqui.

Ao meu marido Felipe, por todo apoio e paciência ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À minha família, em especial à minha Tia Margarete, por disponibilizar acomodação e apoio durante este período.

À Universidade Federal de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia da Sustentabilidade, pela estrutura e ensino de qualidade.

À Capes pelo apoio financeiro.

À Central Experimental Multiusuário da Universidade Federal do ABC, por disponibilizar treinamento e permitir o uso do equipamento para análises de espalhamento de luz dinâmico.

Ao Prof. Dr. Dário Santos Jr., pela ajuda com os experimentos e por contribuir de forma primordial com o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Suzan P. de Vasconcelos, pelas análises de potencial de inibição de crescimento microbiano.

À Prof.^a Dr.^a Cristina S. F. Nordi pela disponibilização de amostras para análise.

À Dr.^a Flávia Rodrigues, pesquisadora da Universidade de São Paulo pelas análises de microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Dr. Thiago da Silva Cordeiro, pesquisador da Universidade de São Paulo pelos experimentos com irradiação à laser.

Ao meu grande amigo Douglas, que desde o dia em que nos conhecemos demonstrou imensa generosidade ao compartilhar seus conhecimentos e sua companhia, tão importantes nos momentos de maior dificuldade.

Aos técnicos do Núcleo de Instrumentação para Pesquisa e Ensino – NIPE, Cátia, Rafael e Robson, pelas análises de infravermelho e pela contribuição com seus conhecimentos.

A todos os colegas, professores e amigos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

Finalmente, meu agradecimento especial à Prof.^a Lilia, que mais do que orientadora, foi amiga e companheira, acreditando em meu potencial desde o primeiro momento. Muito obrigada pela oportunidade, carinho e dedicação que ficarão guardados eternamente em minha memória.

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”.

(Albert Einstein)

RESUMO

Nanopartículas metálicas (NPM) tem despertado grande interesse da comunidade científica nos últimos anos, devido ao seu grande número de aplicações em diversas áreas da ciência. Na área ambiental, se destacam como uma alternativa aos métodos tradicionais de quantificação de poluentes, entre eles metais potencialmente tóxicos, como o mercúrio (Hg), que em altas concentrações pode causar danos ao cérebro, coração, rins, pulmões e o sistema imune dos seres humanos. As técnicas tradicionalmente utilizadas para a síntese de nanopartículas metálicas, envolvem o uso de reagentes químicos tóxicos, ascendendo à busca por métodos mais seguros, entre eles, o processo de síntese verde tem se mostrado uma alternativa sustentável, pois visa a utilização de organismos biológicos em substituição aos reagentes químicos. No presente projeto foram sintetizadas nanopartículas esféricas de prata (AgNP) e ouro (AuNP) com diâmetros médios entre 10 e 50nm aproximadamente. Como agentes redutores dos íons metálicos e para evitar a agregação das partículas, foram utilizados o aminoácido L-Triptofano (TrpAgNP/TrpAuNP) combinado com exposição à lâmpada de xenônio em um processo de fotorredução, ou o extrato aquoso obtido de folhas de *Mimusops coriacea* (McAgNP/McAuNP), planta de origem africana com presença abundante no litoral de São Paulo, conhecida como Abriçó-de-Praia. As nanopartículas sintetizadas foram caracterizadas por diferentes técnicas, como absorção óptica UV-vis; emissão (fluorescência); infravermelho (FTIR); microscopia eletrônica de transmissão (MET); espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta. Foram aplicadas variações no pH do meio, concentração dos reagentes e tempo de exposição à lâmpada, com o objetivo de otimizar os processos de síntese, considerando ideais os que resultaram em nanopartículas esféricas com boa estabilidade, levando em conta diversos parâmetros, tais como: economia de reagentes e energia; menor custo; rapidez e rendimento. As nanopartículas sintetizadas, foram testadas quanto ao seu potencial para a detecção e quantificação de mercúrio em solução aquosa, através de alterações na propriedade de Plasmon Superficial de Ressonância (SPR), com consequente alteração na banda de absorção óptica UV-vis na presença de diferentes concentrações do metal. As McAgNP apresentaram o melhor resultado, com limite de detecção (LOD) a partir de $6,5 \text{ ng.mL}^{-1}$, e de quantificação (LOQ) de $21,7 \text{ ng.mL}^{-1}$, demonstrando alto potencial para o desenvolvimento de um método simples e de fácil operação para a quantificação de mercúrio. Todas as etapas deste trabalho foram realizadas para que as AgNPs/AuNPs obtidas por estas rotas consistissem em um material de interesse no desenvolvimento de novos produtos nanotecnológicos com bases sustentáveis. Os processos de síntese utilizados apresentaram alta reprodutibilidade, e estão de acordo com os princípios da química verde e da sustentabilidade, apresentando-se como uma alternativa de baixo custo e biocompatível na síntese de AgNPs/AuNPs.

Palavras-chave: Nanopartículas metálicas. Síntese verde. Sensor de mercúrio. Fotorredução. *Mimusops coriacea*.

ABSTRACT

Metal nanoparticles (MNP) has attracted great interest from the scientific community in recent years due to its large number of applications in various areas of science. In the environmental area, they stand out as an alternative to the traditional methods of quantification of pollutants, among them potentially toxic metals, such as mercury (Hg), which at high concentrations can cause damage to the brain, heart, kidneys, lungs and the immune system from human beings. The techniques traditionally used for the synthesis of metallic nanoparticles, involve the use of toxic chemical reagents, increasing the search for safer methods, among them, the green synthesis process has shown a sustainable alternative, it aims to use biological organisms to replace chemical reagents. In this project were synthesized spherical nanoparticles of silver (AgNP) and gold (AuNP) with average diameters between 10 and 50nm approximately. As reducing agents of the metallic ions and to avoid the aggregation of particles, the amino acid L-tryptophan (TrpAgNP/TrpAuNP) combined with exposure to the xenon lamp in a photoreduction process, or the aqueous extract obtained from leaves of *Mimusops coriacea* (McAgNP/McAuNP), plant of African origin with abundant presence on the coast of São Paulo, known as Abriçó-de-Praia. Synthesized nanoparticles were characterized by different techniques, such as UV-vis optical absorption; emission (fluorescence); infrared (FTIR); transmission electron microscopy (TEM); dynamic light scattering (DLS) and zeta potential. Variations in the pH of the medium, concentration of the reagents and time of exposure to the lamp, were applied, aiming to optimize the synthesis processes, considering ideals that resulted in spherical nanoparticles with good stability, considering various parameters, such as: reagents and energy savings; lower cost; speed and yield. The synthesized nanoparticles have been tested for their potential for the detection and quantification of mercury in aqueous solution, through changes in the Superficial Plasmon of Resonance (SPR), with consequent alteration in the band of UV-vis optical absorption in the presence of different metal concentrations. The McAgNP presented the best result, with detection limit (LOD) from 6,5ng. mL⁻¹, and quantification (LOQ) of 21,7ng. mL⁻¹, showing high potential for the development of a simple and easy-to-operate method for the quantification of mercury. All the stages of this work were carried out so that the AgNPs/AuNPs obtained by these routes consisted of a material of interest in the development of new nanotechnological products with sustainable bases. The synthesis processes presented high reproducibility and are in accordance with the principles of green chemistry and sustainability, presenting as a low-cost alternative and biocompatible in the synthesis of AgNPs/AuNPs.

Keywords: Metal nanoparticles. Green synthesis. Mercury sensor. Photoreduction. *Mimusops coriacea*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Ciclo do Hg no ambiente..... | 17 |
| Figura 2 - Número de publicações com o termo "nano" entre 2007 e 2017..... | 22 |
| Figura 3 - Oscilação conjunta dos elétrons da superfície de uma NPM..... | 23 |
| Figura 4 - Linhas de campo sobre uma nanoesfera de alumínio. A) Frequência ressonante com o SPR da partícula; B) Frequência não ressonante com o SPR da partícula. | 23 |
| Figura 5 - Bandas plasmônicas de NPM..... | 25 |
| Figura 6 - Bandas plasmônicas de AuNP em razão do diâmetro da partícula..... | 25 |
| Figura 7 - Artigos publicados entre 2007 e 2017 contendo os termos silver nanoparticles ou gold nanoparticles. | 26 |
| Figura 8 - Estrutura molecular do Triptofano..... | 29 |
| Figura 9 - Distribuição de comprimentos de onda da lâmpada de Xenônio de 300W entre 300nm e 1000nm. | 31 |
| Figura 10 - <i>Mimusops coriacea</i> . a) Árvore jovem; b) árvore adulta; c) frutos; d) folhas..... | 34 |
| Figura 11 - Representação esquemática da síntese das TrpAgNP. | 40 |
| Figura 12 - Imagem de satélite do local da coleta do material vegetal para preparo do extrato..... | 41 |
| Figura 13 - Preparo do extrato de folhas de <i>Mimusops coriacea</i> . a) folhas lavadas e escorridas; b) pesagem das folhas picadas; c) infusão; d) extrato filtrado. | 42 |
| Figura 14 - a) L Triptofano em água; b) AgNO ₃ em água; c) HAuCl ₄ em água..... | 49 |
| Figura 15 - a)TrpAuNP; b)TrpAg (antes da exposição ao Xe); c) TrpAgNP (Xe 5 minutos)..... | 49 |
| Figura 16 - Espectros UV-vis das soluções de L-Triptofano e AgNO ₃ antes da exposição à lâmpada de Xenônio..... | 50 |
| Figura 17 - Alterações ópticas nas TrpAuNP em razão da concentração de HAuCl ₄ ⁻ (Diluídas à 20%). a) Espectros UV-vis; b) Intensidade de absorbância, c) Largura da banda à meia altura; d) posição do λ máximo. | 51 |
| Figura 18 - Imagens de MET e respectivos histogramas de distribuição de tamanho das TrpAuNP. a) HAuCl ₄ 2mmol/L; b) HAuCl ₄ 3mmol/L. | 52 |
| Figura 19 - Redução na intensidade de absorbância das TrpAuNP após 90 dias. a) e b) espectros Uv-vis das TrpAuNP; c) curva de redução da intensidade absorbância. (Diluídas à 20%). | 53 |
| Figura 20 - Estudo de espécies reativas de ouro (III) sob condições experimentais. | 55 |
| Figura 21 - Espectros UV-vis das TrpAuNP em razão do pH. (Diluídas à 20%). | 56 |
| Figura 22 - Espectro UV-vis das TrpAuNP com razão L-Trp:HAuCl ₄ 4,5:1 (Diluídas à 20%)..... | 58 |
| Figura 23 - Imagens MET e histograma de distribuição de tamanho das TrpAuNP com razão molar L-Trp:HAuCl ₄ 4,5:1 após ajuste de pH. | 58 |
| Figura 24 - Análise de reprodutibilidade das TrpAuNP. a) variação na posição da banda plasmônica; b) variação na intensidade de absorbância..... | 59 |
| Figura 25 - Estruturas moleculares do a) L-Triptofano e da b) Quinurenina. | 60 |
| Figura 26 - Região UV do espectro do Triptofano e das TrpAuNP. (Diluídas à 20%). | 60 |
| Figura 27 - Supressão da fluorescência do triptofano na presença de TrpAuNP. | 61 |
| Figura 28 - Espectros FTIR do L-Triptofano e TrpAuNP. | 62 |
| Figura 29 - a) Espectros UV-vis das TrpAgNP; b) Variações nas características das bandas plasmônicas. Concentrações de AgNO ₃ conforme tabela 10 (Diluídas à 20%). | 63 |
| Figura 30 – MET das TrpAgNP iluminadas 10 minutos com diferentes concentrações de AgNO ₃ (mmol/L). a)0,3; b)0,5; c) 1,0; d)2,0 | 65 |

| | |
|--|----|
| Figura 31 - Distribuição de tamanho das TrpAg 2 (Xe 10'). | 66 |
| Figura 32 - Variações nas TrpAgNP (Xe 10') em razão do pH. (Diluídas à 20%). a) Intensidade de absorbância; b) posição do $\lambda_{\text{máx}}$; c) largura à meia altura. | 67 |
| Figura 33 - Intensidade de absorbância das TrpAg 2 (Xe 10'). 30 e 90 dias após a síntese. | 69 |
| Figura 34 - Análise de reprodutibilidade das TrpAg2 Xe 10'. a) variação na posição da banda plasmônica; b) variação na intensidade de absorbância. | 70 |
| Figura 35 - Espectros FTIR de a) L-Triptofano; b) TrpAg 2 Xe 10'. | 71 |
| Figura 36 - Espectros de emissão das TrpAgNP. | 71 |
| Figura 37 - Coloração das soluções em razão da concentração de AgNO_3 . a) Extrato (5,0g) antes da reação. B) Após 60 minutos de reação. Da esquerda para a direita, maior concentração de AgNO_3 . | 74 |
| Figura 38 - Espectros UV-vis das McAgNP em razão da concentração de AgNO_3 (mmol/L). (Diluídas a 5%). | 75 |
| Figura 39 - Curva de intensidade de absorbância em razão do tempo de reação da suspensão preparada com 2mmol/L de AgNO_3 (Diluída a 5%). | 75 |
| Figura 40 - Espectros UV-vis das McAgNP (Diluídas a 5%). a) pH inicial 5 a 6; b) pH 6,5 a 7,5; c) pH 9 a 11. | 76 |
| Figura 41 - Espectros UV-Vis e curva de intensidade de absorbância das McAg 2 (diluídas a 5%). a) e b) em razão do pH; c) e d) em razão do tempo de reação. | 78 |
| Figura 42 - Espectros UV-vis das McAg 2 ph $\sim 7,5$ - após 90 e 180 dias. (Diluídas 5%). | 79 |
| Figura 43 - Imagens MET e histograma de distribuição de tamanho das McAgNP 2 pH $\sim 7,5$. | 79 |
| Figura 44 - Análise de Reprodutibilidade da McAg 2 pH $\sim 7,5$ a) intensidade de absorbância; b) posição $\lambda_{\text{máx}}$. | 80 |
| Figura 45 - Espectro UV-vis de a) extrato aquoso de <i>Mimusops coriacea</i> 25mg/mL b) extrato e McAgNP (Diluídos 5%). | 81 |
| Figura 46 - Espectros de fluorescência da clorofila e McAgNP. | 81 |
| Figura 47 - Espectros FTIR do extrato de <i>Mimusops coriacea</i> e McAgNP. | 82 |
| Figura 48 - Esquema representativo do mecanismo de redução dos íons Ag^+ e formação de nanopartículas de prata por compostos fenólicos. | 83 |
| Figura 49 - Esquema representativo do efeito de encapsulamento das nanopartículas de prata por compostos fenólicos. | 83 |
| Figura 50 - Mudança de coloração do extrato de <i>Mimusops coriacea</i> após na presença das McAuNP. a) Extrato M.c (2,5g./100mL água destilada); b) após 1 minuto; c) após 15 minutos. | 84 |
| Figura 51 - Intensidade de absorbância das McAuNP em razão do tempo de reação, a) espectros Uv-vis; b) curva do aumento de intensidade de absorbância. (diluídas a 50%). | 84 |
| Figura 52 - Espectros UV-vis das McAuNP em razão da concentração de HAuCl_4 . | 85 |
| Figura 53 - Imagens de MET das McAuNP, a) McAu 1; b) McAu 4. | 86 |
| Figura 54 - Espectros UV-vis McAu 1; 1 e 30 dias após a síntese. (Diluídas a 50%). | 87 |
| Figura 55 - Espectros UV-vis das McAuNP em razão do pH. a) McAu1; b) McAu 2; c) McAu 3; d) McAu 4. | 88 |
| Figura 56 - Espectros UV-vis. Extrato de <i>Mimusops coriacea</i> e McAuNP (Diluídos à 50%). | 88 |
| Figura 57 - Espectros de Fluorescência da clorofila e McAuNP. | 89 |
| Figura 58 - Espectros FTIR do extrato de <i>Mimusops coriacea</i> e McAu 1. | 89 |
| Figura 59 - Espectros UV-Vis das NPs após adição de Hg^{2+} (Médias das triplicatas). a) TrpAgNP; b) TrpAuNP; c) McAgNP; d) alteração na coloração das McAgNP em concentrações crescentes de Hg^{2+} (da esquerda para a direita). | 92 |
| Figura 60 - Variação na intensidade de absorbância das McAgNP na presença de contaminantes. | 94 |

| | |
|--|-----|
| Figura 61 - Espectros UV-vis das McAgNP diluídas a 10% na presença de soluções aquosas de Hg com concentrações entre 50 e 500ng/mL. | 95 |
| Figura 62 - Curva analítica para quantificação de Hg ²⁺ em razão da intensidade de absorbância. Linhas verdes representam a banda de confiança e a inserção representa a banda de previsão (95%). | 96 |
| Figura 63 - Curva analítica para quantificação de Hg ²⁺ em razão da área de banda entre 320 e 600nm. Linhas verdes representam a banda de confiança e a inserção representa a banda de previsão (95%). .. | 96 |
| Figura 64 - Curva analítica para quantificação de Hg ²⁺ em razão do deslocamento do λ _{máx} . Linhas verdes representam a banda de confiança e a inserção representa a banda de previsão (95%). | 97 |
| Figura 65 - Análise da estabilidade da reação durante 30 minutos, obtida por análises do branco e na adição de Hg na concentração 200ng/mL. a) área de banda entre 320 e 600nm; b) intensidade de absorbância; c) posição do λ _{máx} | 97 |
| Figura 66 - Imagens MET das McAgNP na presença de diferentes concentrações de Hg ²⁺ . a) 1 µg/mL; b) 5 µg/mL; c) 20 µg/mL | 98 |
| Figura 67 - Representação esquemática do mecanismo de detecção de Hg ²⁺ pelas McAgNP | 99 |
| Figura 68 - L-Triptofano em água | 113 |
| Figura 69 - AgNO ₃ em água | 113 |
| Figura 70 - HAuCl ₄ em água | 114 |
| Figura 71 - Extrato de <i>Mimusops coriacea</i> (A. de Candolle) Miq. | 114 |
| Figura 72 – Resultado da análise de MIC das McAgNP para <i>Staphylococcus aureus</i> | 116 |
| Figura 73 - Resultado da análise de MIC das TrpAgNP para <i>Staphylococcus aureus</i> | 116 |
| Figura 74 - Resultado da análise de MIC das McAuNP para <i>Staphylococcus aureus</i> | 116 |
| Figura 75 – Resultado da análise de MIC das TrpAuNP para <i>Staphylococcus aureus</i> | 116 |
| Figura 76 - Resultado da análise de MIC das McAgNP para <i>Escherichia coli</i> | 117 |
| Figura 77 - Resultado da análise de MIC das TrpAgNP para <i>Escherichia coli</i> | 117 |
| Figura 78 - Resultado da análise de MIC das McAuNP para <i>Escherichia coli</i> | 117 |
| Figura 79 - Resultado da análise de MIC das TrpAuNP para <i>Escherichia coli</i> | 117 |
| Figura 80 - Resultado da análise de MIC das McAgNP para <i>Candida albicans</i> | 118 |
| Figura 81 - Resultado da análise de MIC das TrpAgNP para <i>Candida albicans</i> | 118 |
| Figura 82 - Resultado da análise de MIC das McAuNP para <i>Candida albicans</i> | 118 |
| Figura 83 - Resultado da análise de MIC das TrpAuNP para <i>Candida albicans</i> | 118 |
| Figura 84 - Espectros UV-vis das TrpAgNP em razão do pH. a) TrpAg1; b) TrpAg2; c) TrpAg3; d) TrpAg4..... | 119 |
| Figura 85 - Espectros UV-vis das TrpAg 2 (Xe 10') na presença de íons Hg ²⁺ com concentrações entre 100 e 500ng/mL. | 120 |
| Figura 86 - Curva de redução da intensidade de absorbância das TrpAg 2 (Xe 10')) na presença de íons Hg ²⁺ com concentrações entre 100 e 500ng/mL | 120 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Limites legais para concentração de Hg no Brasil em água, solo e produtos da pesca. | 19 |
| Tabela 2 -Principais técnicas analíticas utilizadas na detecção de mercúrio e seus respectivos limites de detecção. | 20 |
| Tabela 3 - Principais técnicas utilizadas para a obtenção de materiais em nanoescala. | 26 |
| Tabela 4 - Variações nas condições de síntese das McAgNP. | 42 |
| Tabela 5 - Variações nas condições de síntese das McAuNP. | 43 |
| Tabela 6 - Relação de reagentes utilizados na análise de seletividade do método. | 46 |
| Tabela 7 – Resultados das análises DLS das TrpAuNP em razão da concentração de HAuCl ₄ | 51 |
| Tabela 8 - Resultados das análises DLS das TrpAuNP em razão da acidez do meio..... | 56 |
| Tabela 9 - Bandas nos espectros FTIR do L-Triptofano e TrpAuNP..... | 62 |
| Tabela 10 - Concentrações de AgNO ₃ utilizadas no preparo das TrpAgNP..... | 63 |
| Tabela 11 - Variação do pH das TrpAgNP após irradiação. | 66 |
| Tabela 12 - Resultados de DLS e Potencial Zeta das TrpAg 2 Xe 10'. | 68 |
| Tabela 13 - Condições ideais para síntese de TrpAuNP e TrpAgNP e suas principais características.. | 73 |
| Tabela 14 - Variações no preparo das McAgNP. | 76 |
| Tabela 15 - Resultado das análises de DLS da McAg 2 (pH ~7,5). | 78 |
| Tabela 16 - Variações nas condições aplicadas no preparo das McAuNP. | 85 |
| Tabela 17 – Resultados das análises de DLS das McAuNP. | 86 |
| Tabela 18 - Condições ideais para síntese de McAgNP e suas principais características. | 91 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNO₃ – Nitrato de Prata
AgNP – Nanopartículas de Prata
APA – Área de Preservação Ambiental
AuNP – Nanopartículas de Ouro
CCTM – Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais
CEM – Central Experimental Multiusuário
CID – Código Internacional de Doenças
CNNPA – Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
CuNP – Nanopartículas de cobre
DH – Diâmetro Hidrodinâmico
DLS – Espalhamento de Luz Dinâmico
FTIR – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
HAuCl₄ – Ácido Cloroaurico
Hg – Mercúrio
Hg²⁺ - Cátion de Mercúrio
IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
IR – Infravermelho
KBr – Brometo de Potássio
LABMSMA – Laboratório Multidisciplinar em saúde e Meio Ambiente
L-Trp – L-Triptofano
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
McAgNP – Nanopartículas de Prata e Extrato Aquoso de *Mimusops coriacea*
McAuNP – Nanopartículas de Ouro e Extrato Aquoso de *Mimusops coriacea*
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
MIC – Concentração Mínima Inibitória
NaOH – Hidróxido de Sódio
nm – Nanômetro
NP – Nanopartículas
NPM – Nanopartículas Metálicas
ONU – Organização das Nações Unidas
PdI - Polidispersividade
SPR – Ressonância Plasmônica de Superfície
TrpAgNP – Nanopartículas de Prata e Triptofano
TrpAuNP – Nanopartículas de Ouro e Triptofano
UFABC – Universidade Federal do ABC
UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo
USP – Universidade de São Paulo
UV – Ultravioleta
UV-vis – Ultravioleta-visível
Xe – Xenônio

SUMÁRIO

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 | MERCÚRIO..... | 16 |
| 1.1.2 | Efeitos do Mercúrio na Saúde Humana | 17 |
| 1.1.2 | Referências Legais no Brasil para Mercúrio..... | 18 |
| 1.1.3 | Métodos de Quantificação | 20 |
| 1.2 | NANOCIÊNCIA/NANOTECNOLOGIA | 21 |
| 1.2.1 | Nanopartículas Metálicas (NPM) | 22 |
| 1.2.1.1 | Nanopartículas de prata (AgNP) e ouro (AuNP) e aplicações | 24 |
| 1.2.1.2 | Síntese de nanopartículas | 26 |
| 1.2.1.3 | Síntese verde de nanopartículas..... | 27 |
| 1.3 | TRIPTOFANO | 28 |
| 1.3.1 | Triptofano na Síntese de Nanopartículas | 29 |
| 1.4 | LÂMPADA DE XENÔNIO | 31 |
| 1.4.1 | Luz na Síntese de Nanopartículas..... | 32 |
| 1.4.2 | Lâmpada de Xenônio na Síntese de Nanopartículas | 32 |
| 1.5 | <i>Mimusops coriacea</i> (A. de Candolle) Miq. | 33 |
| 1.5.1 | Extratos Vegetais na Síntese de Nanopartículas | 34 |
| 1.6 | NANOPARTÍCULAS METÁLICAS NA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO | 36 |
| 2 | OBJETIVOS | 38 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 39 |
| 3.1 | PREPARO DAS SUSPENSÕES DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E OURO | 39 |
| 3.1.1 | Materiais..... | 39 |
| 3.1.1.1 | Reagentes | 39 |
| 3.1.1.2 | Equipamentos | 39 |
| 3.1.2 | Síntese de Nanopartículas de Ouro e Triptofano (TrpAuNP) | 39 |
| 3.1.3 | Síntese de Nanopartículas de Prata e Triptofano (TrpAgNP) | 40 |
| 3.1.4 | Síntese de Nanopartículas de Prata e Extrato Aquoso de <i>Mimusops Coriacea</i> (A. de Candolle) Miq. (McAgNP) | 40 |
| 3.1.5 | Síntese de Nanopartículas de Ouro e Extrato Aquoso de <i>Mimusops Coriacea</i> (A. de Candolle) Miq. (McAuNP) | 43 |
| 3.2 | TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO | 43 |
| 3.2.1 | Espectrofotometria de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível – (UV-vis) | 43 |
| 3.2.2 | Espalhamento de Luz Dinâmico – (DLS)..... | 44 |
| 3.2.3 | Microscopia Eletrônica de Transmissão – (MET) | 44 |
| 3.2.4 | Espectrofotometria de Emissão – Fluorescência..... | 44 |
| 3.2.5 | Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – (FTIR) | 45 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 3.2.6 | Reprodutibilidade | 45 |
| 3.3 | APLICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE MERCURIO EM SOLUÇÃO AQUOSA | 45 |
| 3.3.1 | Materiais..... | 45 |
| 3.3.1.1 | Reagentes | 45 |
| 3.3.2 | Análise de Sensibilidade e Seletividade | 46 |
| 3.3.3 | Curva Analítica | 47 |
| 3.3.4 | Determinação dos Limites de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ)..... | 47 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 48 |
| 4.1 | SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS | 48 |
| 4.1.1 | Síntese de Nanopartículas de Ouro (TrpAuNP) e Prata (TrpAgNP) Através do Aminoácido L-Triptofano e Exposição à Lâmpada de Xenônio..... | 49 |
| 4.1.1.1 | Nanopartículas de ouro e L-Triptofano – TrpAuNP | 50 |
| 4.1.1.2 | Nanopartículas de prata e L-Triptofano – TrpAgNP | 62 |
| 4.1.1.3 | Discussão | 72 |
| 4.1.2 | Síntese de Nanopartículas de Prata (McAgNP) e Ouro (McAuNP) Através do Extrato Aquoso de Folhas de <i>Mimusops coriacea</i> (A. de Candolle) Miq. | 74 |
| 4.1.2.1 | Nanopartículas de prata e extrato de <i>Mimusops coriacea</i> – McAgNP..... | 74 |
| 4.1.2.2 | Nanopartículas de ouro e extrato de <i>Mimusops coriacea</i> – McAuNP..... | 83 |
| 4.1.2.3 | Discussão | 89 |
| 4.2 | APLICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM SOLUÇÃO AQUOSA | 91 |
| 4.2.1 | Discussão | 98 |
| 5 | CONCLUSÃO | 101 |
| 6 | ATIVIDADES REALIZADAS NO PERÍODO | 103 |
| | ANEXO A - Comportamento Espectral do L-Triptofano, AgNO ₃ , HAuCl ₄ e extrato de folhas de <i>Mimusops coriacea</i> em água..... | 113 |
| | APÊNDICE A – Análise de Concentração Mínima Inibitória das Nanopartículas | 115 |
| | APÊNDICE B - Espectros UV-Vis das TrpAgNP antes e após o ajuste de pH. | 119 |
| | APÊNDICE C – Análise de sensibilidade das TrpAgNP ao Hg em concentrações entre 100 e 500ng/mL. | 120 |

1 INTRODUÇÃO

O mercúrio (Hg) é conhecido como uma substância que causa preocupação mundial, devido ao seu longo tempo de permanência no meio ambiente, seu acúmulo nos ecossistemas, propagação atmosférica e efeitos negativos à saúde humana, sendo sua ação tóxica reconhecida pelo Código Internacional de Doenças (CID). O Brasil não é um produtor de Hg, importando toda a quantidade consumida, entretanto, exporta alguns produtos contendo o metal, como lâmpadas, computadores e televisores (BRASIL, 2013; PNUMA, 2013).

Devido à alta toxicidade do Hg mesmo em baixas concentrações, diversas técnicas analíticas para sua determinação tem sido desenvolvidas nos últimos anos (JÚNIOR, 2010). Embora altamente sensíveis e seletivos, os métodos tradicionalmente utilizados para sua detecção e quantificação em amostras ambientais dependem de equipamentos de alto custo e procedimentos complexos para o preparo das amostras, assim, o desenvolvimento de métodos práticos, rápidos e de baixo custo para determinação de Hg continua sendo um desafio.

Recentemente, nanopartículas metálicas (NPM) como as de prata (AgNP) e ouro (AuNP), têm sido reportadas com excelentes resultados no o desenvolvimento de métodos colorimétricos para detecção de cátions de mercúrio (Hg^{2+}). Estes métodos são baseados em suas propriedades ópticas extremamente sensíveis às condições do meio e características como forma, tamanho e agregação, entretanto, dependem de sua funcionalização pela da adição de outras moléculas. Além disso, na maioria dos relatos, as NPM foram obtidas através de reagentes químicos tóxicos para a redução do íon metálico e estabilização do seu crescimento (CHAI et al., 2010; DUAN et al., 2014; LI et al., 2009; SENER; UZUN; DENIZLI, 2014; SHARMA et al., 2018).

Com base nestas informações, o presente estudo propôs a síntese de AgNP e AuNP a partir dos precursores metálicos nitrato de prata (AgNO_3) e ácido cloroáurico (HAuCl_4), utilizando o aminoácido L- Triptofano (L-Trp) combinado com radiação eletromagnética por lâmpada de Xenônio (Xe) ou o extrato aquoso de folhas de *Mimusops coriacea* como redutores dos íons metálicos e responsáveis por evitar a aglomeração das nanopartículas (NP) em suspensão, além da sua caracterização por diferentes técnicas instrumentais. As NP obtidas foram analisadas quanto ao seu potencial para determinação de Hg^{2+} em solução.

Este estudo apresenta, em seu primeiro capítulo, uma revisão sobre os temas abordados. No capítulo seguinte, são apresentados os objetivos gerais e específicos, sucedidos pela metodologia utilizada para obtenção das NP em cada método proposto; sua caracterização e aplicação proposta, apresentados no capítulo 3. Os resultados encontram-se no capítulo 4,

abordando inicialmente a síntese e caracterização das NP em cada método, com suas respectivas conclusões parciais; no mesmo capítulo, são descritos os resultados obtidos com a aplicação proposta, também seguidos da conclusão parcial. O capítulo 5 trata das conclusões e considerações finais.

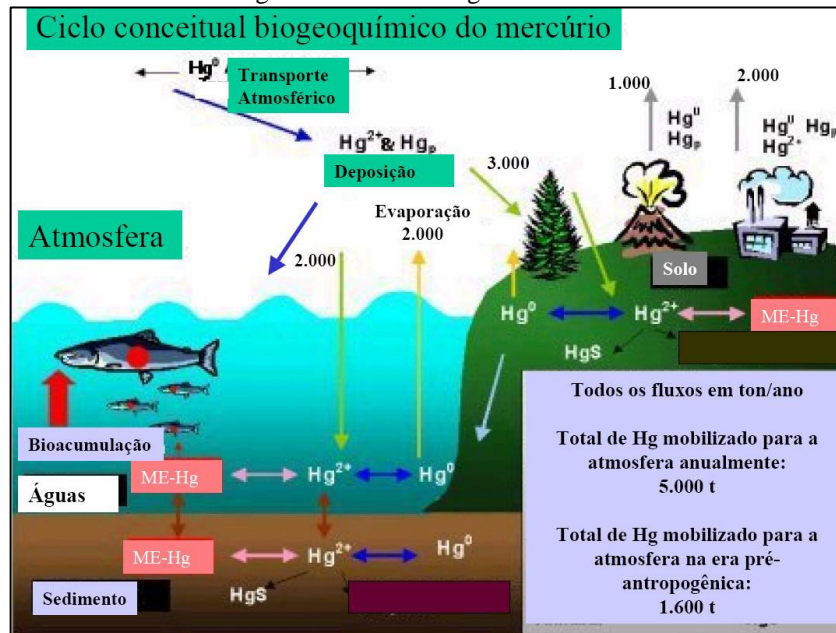
1.1 MERCÚRIO

O Hg é um metal de transição, de número atômico 80 e peso molecular 200,59g/mol. É encontrado naturalmente na crosta terrestre, ocorrendo no ar, no solo e na água. Se apresenta em diversas formas químicas, divididas nas categorias: mercúrio metálico ou elementar, mercúrio inorgânico (principalmente na forma de sais mercúricos), e mercúrio orgânico, ligado a radicais de carbono, por exemplo metilmercúrio e etilmercúrio (BRASIL, 2013).

Ocorre em estado líquido em temperatura ambiente. Com o aumento da temperatura volatiliza para a atmosfera, formando vapores tóxicos incoloros e inodoros. Uma vez liberado, permanece no meio ambiente, e circula entre o ar, a água, o sedimento, o solo, e a biota. A maioria das emissões para o ar ocorre na forma do mercúrio elementar, que é muito estável podendo permanecer na atmosfera por longos períodos e ser transportado por longas distâncias. O vapor de mercúrio presente na atmosfera pode se depositar ou ser convertido na forma solúvel, retornando à superfície terrestre nas águas da chuva, onde duas alterações químicas podem ocorrer: pode ser convertido novamente em vapor de mercúrio e retornar à atmosfera, ou pode ser “metilado” pelos microorganismos presentes nos sedimentos, se transformando em metilmercúrio (BRASIL, 2013). A metilação bacteriana do Hg ocorre através da atuação enzimática sobre a espécie Hg^{2+} . Esta espécie (Hg^{2+}) é a forma dominante de Hg presente na deposição atmosférica úmida e seca, resultante da oxidação do Hg^0 presente na atmosfera pela ação do oxigênio e ozônio. Portanto, a emissão de Hg^0 por fontes antrópicas pode resultar indiretamente em um incremento da deposição de Hg^{2+} aumentando sua disponibilidade para metilação bacteriana (BRASIL, 2013).

No ambiente aquático, o Hg^{2+} é adsorvido na superfície dos sedimentos e material particulado, podendo formar grande quantidade de complexos e quelantes com o material orgânico. As camadas superiores do sedimento são biologicamente ativas, onde o Hg^{2+} é, em parte, metilado pelas bactérias, incluindo as sulfato redutoras, transformando-se em metilmercúrio e etilmercúrio. O ciclo do mercúrio no meio ambiente está apresentado na figura 1.

Figura 1 – Ciclo do Hg no ambiente.



Fonte: (BRASIL, 2013, p. 14).

1.1.2 Efeitos do Mercúrio na Saúde Humana

A exposição ao Hg pode trazer riscos à saúde humana, resultante da contaminação ambiental pelo metal e por seus compostos orgânicos e inorgânicos. A intoxicação pelo Hg é denominada Hidrargismo ou Mercurialismo, sendo as alterações neuropsiquiátricas, digestivas e renais seus efeitos mais comuns. Entretanto, são descritos efeitos sobre o sistema cardiovascular, respiratório, sanguíneo, endócrino, imunológico e reprodutor, além de ser reconhecidamente um agente teratogênico, ou seja, quando presente na vida embrionária ou fetal pode resultar em alterações no desenvolvimento (FARIAS, 2006).

O metilmercúrio, uma das formas mais tóxicas do metal, é rapidamente absorvido pelos organismos aquáticos e assim é bioacumulado e biomagnificado ao longo da cadeia trófica. Deste modo, os seres vivos situados nos níveis tróficos mais altos, apresentarão as maiores concentrações do metal. Peixes predadores, como cação e tucunaré, por exemplo, costumam apresentar maiores concentrações de Hg, podendo levar a contaminação da população que se alimenta destas espécies (BRASIL, 2013; FARIAS, 2006).

Um caso emblemático de contaminação em massa por mercúrio foi o desastre ambiental ocorrido em Minamata, Japão, após a contaminação de peixes por efluentes descartados na baía que servia de fonte de renda e alimento à população local. No início da década de 1950, a população felina das aldeias de pescadores passou a apresentar sintomas como tremores e dificuldade para caminhar; nos anos seguintes, passaram a surgir relatos de nascimentos de

filhos de pescadores com graves problemas neurológicos. Ao final do ano de 1956 já eram 52 pacientes apresentando sintomas de problemas neurológicos e motores, com 17 óbitos. Em 1959, um grupo de pesquisas da Universidade de Kumanoto, criado para estudar as causas da doença, sugeriu que a mesma fosse causada por um derivado orgânico do mercúrio, porém, somente após o segundo surto em 1965, o governo acatou a conclusão dos estudos, considerando as emissões de efluentes da Chisso responsáveis pela contaminação, porém, esta somente reconheceu sua responsabilidade em 1973, após longa batalha judicial.

Em 1972 foi criada em Minamata, uma unidade hospitalar de apoio às vítimas. De 1972 a 2001, 2.955 pessoas tinham sido certificadas como portadoras da “doença de Minamata” e 1.048 óbitos foram reconhecidos como tendo sido causados pela doença. É impossível, no entanto, saber o número exato de vítimas, uma vez que muitas morreram antes mesmo do reconhecimento da doença e outras tantas nunca reclamaram compensação governamental (BRASIL, 2013; KAWANAMI, 2014).

Deste modo, em janeiro de 2013 no seu quinto período de sessões, o Comitê Intergovernamental de Negociação acordou o texto da Convenção de Minamata sobre o Mercúrio. O texto foi aprovado na Conferência de Plenipotenciários, reunida em 10 de outubro de 2013 no Japão. Esta convenção tem o objetivo de proteger a saúde humana e o meio ambiente das emissões e liberações antropogênicas de mercúrio e compostos de mercúrio, e nele se recorrem diversas medidas para cumprir este objetivo. Dentre elas, destaque para o controle da exploração e comércio de mercúrio e a fiscalização da extração e de ouro artesanal e de pequena escala. As emissões de mercúrio para a atmosfera se dão pela queima de combustíveis fósseis, nesta convenção há um artigo específico tratando da redução destas emissões, porém, de maneira flexível, levando em conta os planos de desenvolvimento de cada país (PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O MEIO AMBIENTE, 2013)

1.1.2 Referências Legais no Brasil para Mercúrio

No Brasil, desde o início da década de 1970 existe a preocupação com as questões relacionadas ao mercúrio. Em 1971, a Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu, por meio de resolução, um limite residual para organo-mercuriais em frutas, hortaliças e legumes, e em 1975 foi proibido o uso de agrotóxicos contendo metilmercúrio, etilmercúrio e outros compostos de aquilmercúrio (BRASIL, 2013).

O Diagnóstico Preliminar sobre o Mercúrio, publicado pelo Ministério do Meio Ambiente em 2013 (BRASIL, 2013), apresenta um levantamento da Legislação Federal, indicando cerca de 80 documentos entre leis, decretos, portarias, instruções normativas e resoluções que abordam o tema mercúrio, sendo que, em alguns deles, o mercúrio é abordado em conjunto com outros metais.

Uma vez que a maioria dos casos de contaminação humana por mercúrio está ligada à sistemas aquáticos, principalmente pela ingestão de pescados contaminados, estão sumarizados na tabela 1 os limites legais estabelecidos para sua concentração na água, solo e produtos da pesca.

Tabela 1 – Limites legais para concentração de Hg no Brasil em água, solo e produtos da pesca.

| Portaria do Ministério da Saúde nº2914/2011 – Qualidade da água para consumo humano (SAÚDE, 2011) | |
|--|--------------------|
| Padrão de potabilidade | 1µg/L (ppb) |
| Resolução CONAMA nº 357/05 – Qualidade das águas superficiais (CONAMA, 2005) | |
| Águas doces – classe I e II | 0,2 µg/L |
| Águas doces – classe III | 2 µg/L |
| Águas salinas – classe I | 0,2 µg/L |
| Águas salinas – classe II | 1,8 µg/L |
| Águas salobras – classe I | 0,2 µg/L |
| Águas salobras – classe II | 1,8 µg/L |
| Lançamento de efluentes | 10 µg/L |
| Resolução CONAMA nº 396/08 – Qualidade das águas subterrâneas (CONAMA, 2008) | |
| Consumo humano | 1 µg/L |
| Dessedentação de animais | 10 µg/L |
| Irrigação | 2 µg/L |
| Recreação | 1 µg/L |
| Resolução CONAMA nº 420/09 – critérios e valores orientadores de qualidade do solo Valor de Referência de Qualidade (VRQ) – Cada UF deverá apresentar o seu (CONAMA, 2009) | |
| Valor de prevenção | 0,5 mg/kg |
| Valor de Investigação – solo agrícola | 12 mg/kg |
| Valor de Investigação – solo residencial | 36 mg/kg |
| Valor de Investigação – solo industrial | 70 mg/kg |
| ANVISA – RDC nº 42/2013 | |
| Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos (ANVISA, 2013) | |
| Peixes, exceto predadores | 0,50 mg/kg |
| Peixes predadores | 1,0 mg/kg |
| Moluscos cefalópodos | 0,50 mg/kg |
| Moluscos bivalvos | 0,50 mg/kg |
| Crustáceos | 0,50 mg/kg |

Fonte: (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013; CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE, 2005, 2008, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011)

1.1.3 Métodos de Quantificação

A alta toxicidade do Hg, mesmo em baixas concentrações, levou ao desenvolvimento de técnicas analíticas altamente sensíveis e seletivas para sua determinação em amostras ambientais. A tabela 2 apresenta uma relação dos métodos tradicionalmente utilizados para a detecção de Hg e seus respectivos limites de detecção.

Tabela 2 -Principais técnicas analíticas utilizadas na detecção de mercúrio e seus respectivos limites de detecção.

| Técnica | Limite de detecção |
|--|---------------------------|
| Método Colorimétrico | 0,01-0,1 µg/g |
| Espectrometria de Absorção Atômica Modo forno de Grafite (GF AAS) | 1 ng/g |
| Espectrometria de Absorção Atômica Modo Vapor Frio (CV AAS) | 0,01-1 ng/g |
| Espectrometria de Fluorescência atômica Vapor Frio (CV AFS) | 0,001-0,01/ng g |
| Análise por Ativação com Nêutrons Instrumental (INAA) | 1-10 ng/g |
| Análise por Ativação com Nêutrons Radioquímica (RNAA) | 0,01-1 ng/g |
| Cromatografia gasosa Detector por Captura Eletrônica | 0,01-0,05 ng/g |
| Cromatografia gasosa Detector por Emissão Atômica | ~ 0,05 ng/g |
| Cromatografia gasosa Espectrometria de Massa | 0,1 ng/g |
| Cromatografia gasosa CV-AAS / CV – AFS | 0,01-0,05 ng/g |
| Cromatografia líquida de alta eficiência Detector de Ultra-Violeta | 1 ng/mL |
| Cromatografia líquida de alta eficiência CVAAS | 0,5 ng/mL |
| Cromatografia líquida de alta eficiência CVAFS | 0,08 ng/mL |
| Cromatografia líquida de alta eficiência Eletroquímica | 0,1-1 ng/mL |
| Plasma Acooplado Indutivamente Espectrometria de Massa (ICP/MS) | 0,1 ng/mL |
| Espectrometria de Emissão Atômica (ICP/AES) | 2 ng/mL |
| Espectrometria Foto-Acústica | 0,05 ng/g |
| Fluorescência de Raios-X | 0,005 - 1 µg/g |
| Métodos Eletroquímicos | 0,1-1 µg/g |
| Analizador de Filme de Ouro | 0,05 µg/g |

Fonte: (JÚNIOR, 2010).

1.2 NANOCIÊNCIA/NANOTECNOLOGIA

A nanociência pode ser definida como “a área do conhecimento que estuda os princípios fundamentais de moléculas e estruturas, nas quais pelo menos uma de suas dimensões está compreendida entre 1 e 100nm” enquanto a nanotecnologia seria a “a aplicação destas estruturas em dispositivos nanoescalares utilizáveis” (ALVES, 2004).

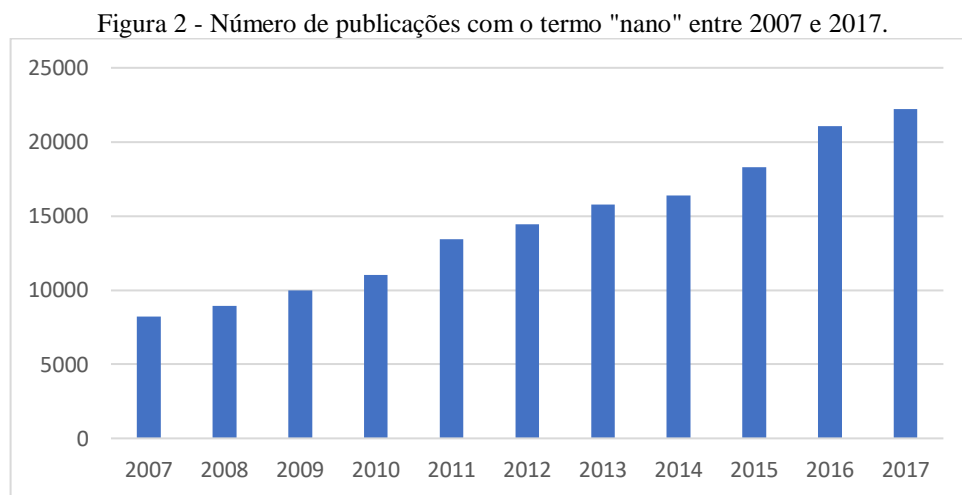
Existem controvérsias quanto a definição de nanotecnologia, mas é consenso que ao menos uma das dimensões das partículas deve estar no intervalo de 1 – 100nm. Outra conformidade, é de que as propriedades das nanopartículas diferem do material em escalas maiores, diferenças estas que se baseiam no fato de que as superfícies envolvidas são muito maiores em comparação aos volumes, propiciando maiores áreas de contato, ou seja, quando uma partícula decresce em tamanho, uma grande proporção de seus átomos encontra-se na superfície, e uma vez que reações químicas ocorrem nas superfícies, nanopartículas são mais reativas do que uma massa de material feito de partículas maiores. Apenas com a redução do tamanho, materiais podem apresentar diferentes características e novas propriedades, tais como: elasticidade, tenacidade, resistência, condutividade elétrica, propriedades magnéticas, acumulação de carga elétrica, diferentes cores, entre outras, todas resultado da maior área de contato (CAO, 2004; MEWS, 2007).

Em 1959, um artigo sobre nanotecnologia publicado pelo físico Richard Feynman sob o título — "*Atomic assembly*" cuja precursora foi a palestra "*There's Plenty of Room at the Bottom*", também de 1959. Neste artigo, Feynman defende que a nanotecnologia, proporcionaria materiais com propriedades superiores e menor quantidade de defeitos (FEYNMAN, 1960). A sucessão de acontecimentos importantes como a criação do microscópio eletrônico de tunelamento, que permitiu o imageamento de átomos individuais em 1981 e a descoberta dos fulerenos em 1985, permitiram a percepção da relevância da nanotecnologia (ALVES, 2004).

Embora seja notável a intensa evolução da nanotecnologia nos últimos anos, trata-se de uma área de estudo relativamente nova e muitas são as incertezas que assolam os cientistas, o poder público e a população, principalmente no que tange a saúde humana e os possíveis impactos nocivos ao meio ambiente, devido a imprevisibilidade de seus efeitos. Na maioria dos países, mesmo com uma grande variedade de produtos contendo nanotecnologia já disponíveis ao consumidor, não há legislação específica para os nanomateriais, a qual são enquadrados na legislação que se refere ao material em escalas maiores (NOLASCO, 2016).

Diante deste quadro, tem se observado o crescimento de políticas públicas que visam a regulamentação da nanotecnologia, através da criação de comitês específicos para a discussão e criação de diretrizes para sua produção e comercialização, e de investimentos em pesquisas que abordem a segurança de materiais e tecnologias ativados pelo uso de nanopartículas e da busca por uma padronização dos processos de síntese.

As lacunas existentes para o total domínio e compreensão da nanotecnologia, além de sua interdisciplinaridade, trazem um notório aumento no número de publicações a respeito do tema. A figura 2 ilustra o crescimento de artigos publicados com o termo “nano” nos últimos 10 anos. A pesquisa foi efetuada na Coleção Principal da base de dados Web of Science.



Pesquisa feita em 10/06/2018 com a palavra-chave nano*, utilizando a Base de dados Web of Science – Principal Coleção, campo de busca Tópico; considerando as publicações entre 2007 e 2017.

Na área ambiental, a nanotecnologia traz a perspectiva de grandes avanços que permitam melhorar a qualidade de vida e ajudar na preservação do meio ambiente. Entre eles estão a aplicação de nanomateriais na prevenção, tratamento, remediação, detecção e monitoramento de poluição (QUINA, 2004).

1.2.1 Nanopartículas Metálicas (NPM)

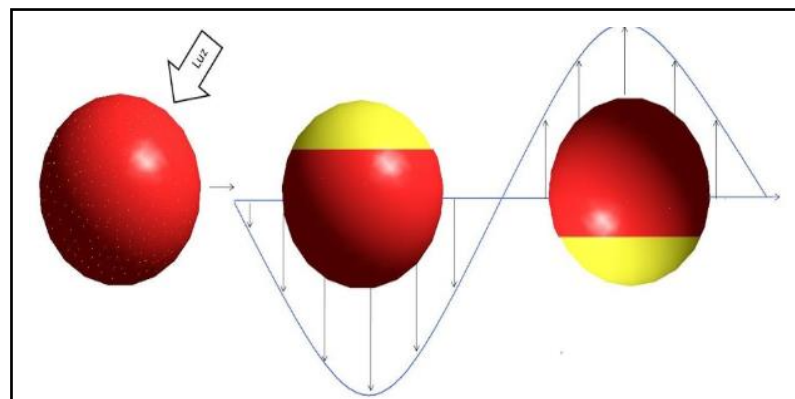
Nanopartículas metálicas (NPM), são partículas da ordem de nanômetros, formadas por elementos metálicos, por exemplo: ferro; níquel; prata; ouro; entre outros. Se destacam por apresentar características físico-químicas diferentes das observadas macroscopicamente, como modificações na reatividade química e em propriedades mecânicas, ópticas, elétricas e magnéticas. Podem existir em diferentes formas e tamanhos, sendo que cada combinação

resulta em propriedades físico químicas diferenciadas (OTUBO, 2005). As diferenças nas propriedades observadas nas NPM são decorrentes principalmente do efeito de área superficial.

As NPM possuem uma característica físico-química em especial, a Ressonância de Plasmônica de Superfície, em inglês *Surface Plasmon Resonance* (SPR), que consiste na oscilação conjunta de elétrons livres na superfície metálica. Ao incidir uma radiação eletromagnética sobre uma nanopartícula metálica, se esta radiação apresentar frequência igual à frequência da oscilação conjunta de elétrons da superfície do metal, há a absorção desta radiação por ressonância. (EUSTIS; EL-SAYED, 2006; KELLY et al., 2003; ZHANG et al., 2011)

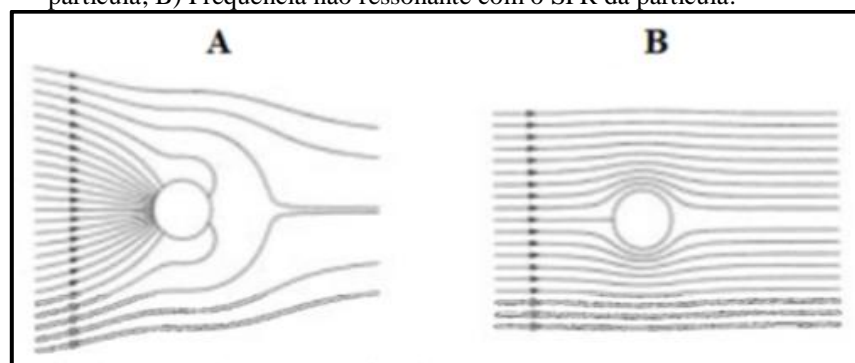
A frequência (comprimento de onda) e intensidade desta característica são extremamente relacionadas com o tipo de material, forma e tamanho das nanopartículas, como com o meio em que se encontram (HUTTER; FENDLER, 2004). As figuras 3 e 4 demonstram esquematicamente a oscilação conjunta dos elétrons e a ocorrência da ressonância da superfície metálica de uma NPM com um campo elétrico.

Figura 3 - Oscilação conjunta dos elétrons da superfície de uma NPM.



Adaptado de: (OLHAR NANO)

Figura 4 - Linhas de campo sobre uma nanoesfera de alumínio. A) Frequência ressonante com o SPR da partícula; B) Frequência não ressonante com o SPR da partícula.



Fonte: (MOCK et al., 2002).

A absorvância decorrente do fenômeno SPR, é largamente utilizada para caracterizar as NPM. É extremamente sensível às condições do meio, como índice de refração por exemplo, logo, mantendo as condições do meio, quanto maior o tamanho de uma NPM esférica, maior será o comprimento de onda de máxima absorvância (MOCK et al., 2002; ZHU; FU, 2009), deste modo, a presença de determinados analitos podem alterar as propriedades SPR das nanopartículas, o que pode ser usado para o desenvolvimento de um sensor colorimétrico.

1.2.1.1 Nanopartículas de prata (AgNP) e ouro (AuNP) e aplicações

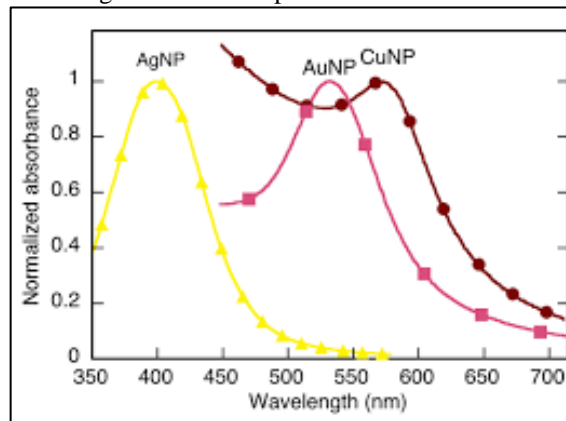
Nanopartículas de prata e nanopartículas de ouro são nomes dados respectivamente à prata (Ag) e ao ouro (Au) em escala nanométrica. Também podem ser chamados de prata ou ouro coloidal. Quando em meio líquido, encontram-se em suspensão, pois se tratam de pequenos sólidos insolúveis em um meio dispersante.

A prata é um metal de transição, com número atômico 47 e massa molar 107,86g/mol. (SOUZA; RODRIGUES; PEREIRA, 2013). O ouro também é um metal de transição, com número atômico 79 e massa molar 196,96g/mol.

Quando em escala nanométrica, apresentam maior área superficial em relação ao volume e apresentam SPR, que lhes conferem propriedades ópticas únicas possibilitando aplicações como biosensores e biomarcadores (DE LA ESCOSURA-MUÑIZ; MERKOÇI, 2011; SZUNERITS et al., 2012).

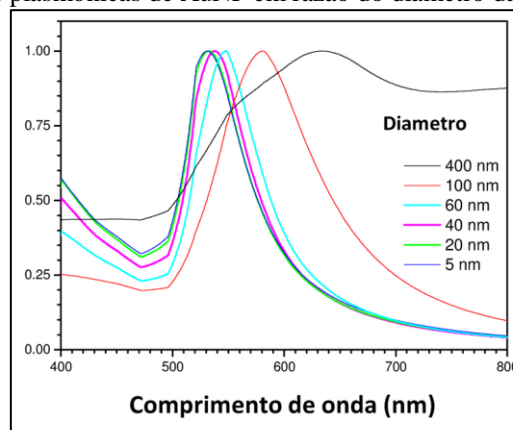
A propriedade de SPR confere cor característica e absorvância por ressonância em comprimentos de onda específicos, sendo que nanopartículas esféricas de 10nm de diâmetro aproximadamente apresentam banda plasmônica $\lambda \cong 420\text{nm}$ para AgNP, e $\lambda \cong 500\text{nm}$ para AuNP, porém, características como tamanho e forma influenciam no comprimento de onda, intensidade de absorvância máxima e coloração da solução, sendo a adição de determinados analitos capazes de alterar estas características. A figura 5 apresenta bandas plasmônicas de NPM de prata, ouro e cobre (CuNP), enquanto a figura 6 mostra a mudança no comprimento de onda da absorvância máxima na banda SPR em razão do diâmetro de AuNP.

Figura 5 - Bandas plasmônicas de NPM.



Fonte: (NETTO-FERREIRA, 2015).

Figura 6 - Bandas plasmônicas de AuNP em razão do diâmetro da partícula.

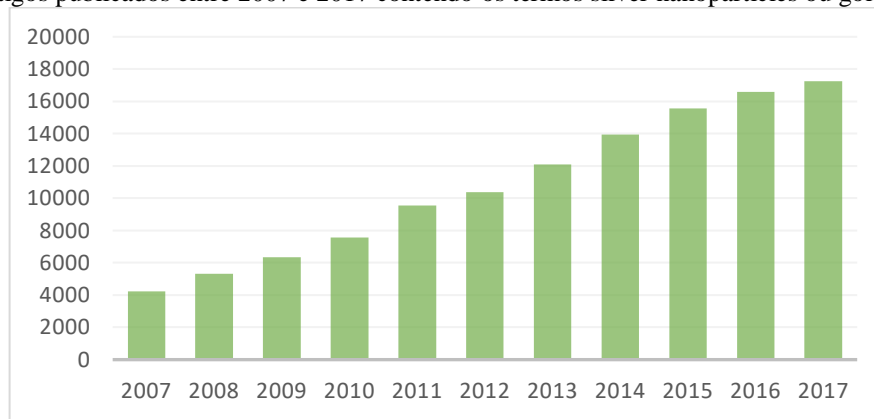


Fonte: (MARTINS; TRINDADE, 2012).

Recentemente, estudos tem reportado o uso de nanopartículas de prata e ouro nas mais diferentes aplicações: AgNP tem sido estudadas principalmente quanto ao seu potencial antimicrobiano no tratamento de água e na inibição do crescimento de bactérias super-resistentes, além da quantificação de poluentes e uso na medicina terapêutica e diagnóstica (LIN et al., 2013; MONGE, 2009; SHARMA; YNGARD; LIN, 2009; ZHANG et al., 2016). AuNP têm suas principais aplicações na medicina, com crescente número de estudos sobre o transporte de drogas (drug delivery) e biomarcadores para diagnóstico de tumores (CAI, 2008; DREADEN et al., 2012; VIGDERMAN; ZUBAREV, 2013).

O potencial de nanopartículas de prata e ouro em aplicações nos mais diversos campos da ciência têm resultado no aumento de publicações sobre o tema nos últimos anos. A figura 7 apresenta o número de artigos publicados com os termos “silver nanoparticles” ou “gold nanoparticles” nos últimos 10 anos, considerando a Coleção Principal da base de dados Web of Science.

Figura 7 - Artigos publicados entre 2007 e 2017 contendo os termos silver nanoparticles ou gold nanoparticles.



Pesquisa feita em 18/06/2018 com as palavras-chave “silver nanoparticle* or gold nanoparticle*”, utilizando o banco de dados Web of Science – Principal Coleção, campo de busca: Tópico, considerando as publicações entre 2007 e 2017.

1.2.1.2 Síntese de nanopartículas

A obtenção de nanopartículas, processo chamado de síntese, ocorre por meio de dois métodos: o primeiro denominado Top-down (de cima para baixo), utiliza técnicas de fabricação para cortar, moer e moldar materiais até atingir a nanoescala. O segundo, chamado de Bottom-up (de baixo para cima), baseia-se nas propriedades químicas de moléculas/átomos, fazendo com que se organizem formando estruturas em escala nanométrica (MEWS, 2007).

Alguns dos principais métodos utilizados para a síntese de nanomateriais estão sumarizados na tabela 3.

Tabela 3 - Principais técnicas utilizadas para a obtenção de materiais em nanoescala.

| Top-down | Botton-up |
|-------------------------|----------------------------------|
| Nanolitografia | Redução química |
| Ablação a laser/térmica | Processo Sol-gel |
| Abrasão | Deposição química em fase vapor |
| Pulverização catódica | Pirólise por spray ou laser |
| Cauterização química | Condensação atômica ou molecular |
| | Fotorredução |

Adaptado de (ALBERNAZ, 2014).

Em relação às NPM, existem diferentes técnicas e reagentes empregados nos processos de síntese, resultando em produtos com características diferentes.

Para a obtenção de uma NPM, é necessária a redução do íon metálico, seguido da nucleação e crescimento do cristal. Também é necessário garantir sua estabilidade (não aglomeração), podendo ser pela repulsão das nanopartículas com carga de mesmo sinal (eletrostática), ou pela adição de um agente capeante, geralmente uma molécula grande/polímero que envolve as nanopartículas impedindo seu contato (MATOS, 2014).

1.2.1.3 Síntese verde de nanopartículas

A maioria das técnicas tradicionalmente utilizadas para a obtenção de NPM, envolve a utilização de redutores químicos fortes (ex. borohidreto de sódio, citrato de sódio) e a utilização de moléculas tóxicas como agente capeante (ex. polivinil álcool – PVA, polietetrólito cloreto de polialilamina - PAH), limitando sua utilização principalmente no campo clínico e farmacêutico, além da possibilidade da geração de resíduos potencialmente nocivos ao meio ambiente e à saúde humana (ALBERNAZ, 2014).

Diante deste quadro, cresce a busca por rotas de síntese mais seguras e com menor impacto ao meio ambiente. Existem na literatura estudos sobre a síntese de nanopartículas metálicas empregando microrganismos (BAI et al., 2011; MISHRA et al., 2011), polissacarídeos (SHARMA; YNGARD; LIN, 2009), líquido-iônico (ITOH; NAKA; CHUJO, 2004; SINGH et al., 2009) irradiação (fotólise a laser) (BAE; NAM; PARK, 2002; SHARMA; YNGARD; LIN, 2009), polímeros naturais, clara de ovo (LU et al., 2012) e até saliva humana (DE MATOS; COURROL, 2014) para a síntese de nanopartículas metálicas.

A síntese verde de NPs propõe a utilização de organismos biológicos, ou partes deles, em substituição aos reagentes químicos tóxicos para obtenção de nanomateriais, apresentando-se como uma alternativa sustentável (IRAVANI, 2011). Este método de síntese geralmente utiliza solventes com baixa toxicidade (ex. água), reduzindo os impactos ambientais relacionados a estes processos. Adicionalmente, nanopartículas obtidas através destas rotas apresentam biocompatibilidade e biodegradabilidade, custo de produção baixo e alto rendimento do produto.

Além de ser caracterizada pela substituição de reagentes químicos tóxicos, a síntese verde deve seguir os princípios da sustentabilidade e da química verde.

A sustentabilidade se baseia em três pilares: ambiental, econômico e social, isto é, pode ser considerado sustentável um processo que seja ambientalmente seguro (ecologicamente correto), economicamente viável e socialmente justo. Já a definição de desenvolvimento sustentável é estabelecida pela Organização das Nações Unidas (ONU) como:

“Desenvolvimento sustentável é aquele que atende às necessidades das gerações atuais sem comprometer a capacidade das gerações futuras de atenderem às suas necessidades e aspirações” (BRUNDTLAND, 1987).

Quanto à química verde, seu conceito surgiu nos Estados Unidos na década de 1990, e consiste no desenho, desenvolvimento e implementação de produtos e processos químicos a fim de reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente. Para tal objetivo foram definidos 12 princípios elementares (ANASTAS; KIRCHHOFF, 2002; POLIAKOFF et al., 2002):

- 1) Prevenção da formação de dejetos;**
- 2) Economia de átomos;**
- 3) Sínteses com compostos de menor toxicidade;**
- 4) Desenvolvimento de compostos seguros;**
- 5) Diminuição no uso de solventes e auxiliares;**
- 6) Eficiência energética;**
- 7) Uso de fontes renováveis de matéria-prima;**
- 8) Redução de derivativos;**
- 9) Catálise;**
- 10) Desenvolvimento de compostos para degradação;**
- 11) Análise em tempo real para a prevenção da poluição;**
- 12) Química segura para a prevenção de acidentes.**

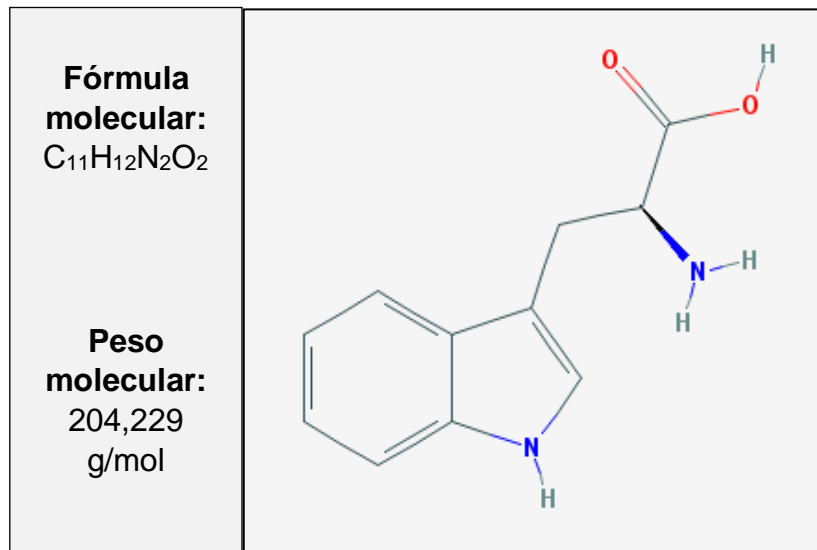
1.3 TRIPTOFANO

O triptofano é um aminoácido essencial, que atua na síntese proteica. É necessário para o crescimento normal de bebês e no equilíbrio de nitrogênio em adultos. É precursor da serotonina, um neurotransmissor essencial na regulação do apetite, sono, humor e dor. O triptofano não é sintetizado pelo organismo, devendo ser ingerido. É encontrado naturalmente em alimentos ricos em proteínas como ovos, carne, leite, peixes, entre outros (PUBCHEM).

Possui um grupo amino (básico), um grupo carboxílico (ácido) e sua cadeia lateral consiste em um indol, que faz dele um aminoácido aromático e apolar. Sua capacidade de doar elétrons e parte do anel N-heterocíclico, faz com que o triptofano seja considerado um ligante químico bastante versátil (CARVALHO et al., 2013).

No pH fisiológico, o triptofano é um zwitterion, ou seja, um composto químico eletricamente neutro, mas com cargas opostas em diferentes átomos, podendo se comportar como ácido ou base. O grupo amino ($pK_a = 9.39$) encontra-se protonado ($-NH^3+$) e o grupo carboxila ($pK_a = 2.38$) encontra-se desprotonado ($-COO^-$). (PUBCHEM; RODRIGUES, 2013). Sua estrutura, fórmula e peso molecular são apresentados na figura 8.

Figura 8 - Estrutura molecular do Triptofano.



Fonte: (PUBCHEM).

1.3.1 Triptofano na Síntese de Nanopartículas

No que se refere a sua utilização na síntese de NPM, as primeiras publicações datam do final da década de 1990, por Kazachenko e colaboradores (KAZACHENKO et al., 1999), onde o autor utiliza o aminoácido na síntese de nanopartículas de ouro. No ano seguinte, o mesmo autor relata pela primeira vez o uso do triptofano na síntese de nanopartículas de prata (KAZACHENKO et al., 2000), neste artigo a estrutura do complexo foi proposta considerando as medidas de infravermelho, com a qual o autor propõe que a coordenação do triptofano foi através do nitrogênio do grupo amino e do átomo de oxigênio do grupo carboxila.

Em 2003, Mandal e colaboradores (SELVAKANNAN et al., 2004a), relataram a redução espontânea de íons de cloroaurato aquoso pelo aminoácido triptofano, a uma temperatura de $50^{\circ}C$, indicando o grupo indol do triptofano como responsável pela redução. Esta conclusão foi baseada em alterações na região UV dos espectros de absorção do triptofano e em análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), que indicaram mudanças na sua composição química ao reduzir o ouro iônico. Neste mesmo artigo, o autor faz uso do triptofano

como agente capeante de AuNP já reduzidas com boro-hidreto. Neste caso, o autor conclui que a ligação do triptofano com a superfície do ouro ocorre através do grupo amina primário e esta reação leva apenas a uma mudança estrutural e não há alteração química no aminoácido.

Assim como a temperatura e tempo de reação, a acidez do meio também pode influenciar na síntese de NPM mediada pela oxidação do triptofano, uma vez que o aminoácido tem sua molécula modificada em razão do pH, podendo existir nas formas catiônica, neutra e aniônica, em pH 2, 6 e 10 respectivamente (HARRIMAN, 1987). Seu potencial de redução aumenta em meio ácido, porém, na síntese de NPM ele age como redutor, ou seja, sofre oxidação na presença do íon metálico reduzindo-o e, uma vez que o potencial de oxidação está inversamente relacionado ao potencial de redução, isto é, quanto menor o potencial de redução, maior a tendência da espécie química em doar elétrons (oxidar), este apresenta maior potencial de oxidação em sua forma aniônica.

Em 2014, Matos (MATOS, 2014) propôs a síntese de nanopartículas de prata e ouro através da oxidação de 21 aminoácidos, pela redução dos íons metálicos com exposição à luz branca de xenônio como catalizadora da reação. O autor analisou diferentes variáveis como razão amino/metálico e tempo de exposição à luz, e observou que o triptofano foi o único aminoácido capaz de reduzir o ouro iônico sem necessidade de exposição à lâmpada, devido à sua alta polarizabilidade, propriedade relacionada com a capacidade de uma espécie química em doar elétrons. As AuNP neste caso foram preparadas com o Triptofano em sua forma neutra e o HAuCl_4 em solução com pH ácido. Para a redução da prata iônica, o autor empregou o triptofano e o AgNO_3 em sua forma neutra, porém, devido ao baixo potencial de redução da Ag^+ , neste caso a exposição à luz foi necessária. Nos dois casos o autor propôs um ajuste do pH da suspensão após a redução das NP para valores mais elevados para garantir maior estabilidade às suspensões.

Mais recentemente, Mukha e colaboradores (MUKHA et al., 2016), obtiveram nanopartículas de prata e ouro utilizando o aminoácido triptofano como responsável pela redução do íon metálico e estabilização, analisando os efeitos da acidez do meio, onde o pH das soluções foi ajustado com a adição de NaOH ou HCl antes da reação. O autor relata uma rápida redução do ouro iônico em meio ácido, por outro lado, em meio básico os complexos hidróxido quase não foram reduzidos e ouro coloidal quase não foi formado, acompanhado por significativas mudanças no espectro de absorção. Já quando a espécie metálica a ser reduzida era a Ag^+ , o autor relata que sua redução só foi possível com o triptofano em sua forma aniônica e com a necessidade de aquecimento contínuo.

Diferentes métodos para síntese de NPM utilizando o aminoácido triptofano foram relatados, porém, em sua maioria através de processos lentos e complicados ou necessitando da adição de outros reagentes químicos para catalisar a reação, sendo que, em alguns casos, o triptofano é utilizado apenas na funcionalização ou na anti-agregação de nanopartículas já sintetizadas através de outros redutores químicos. (BIAN et al., 2013, 2014; SRIVASTAVA et al., 2013).

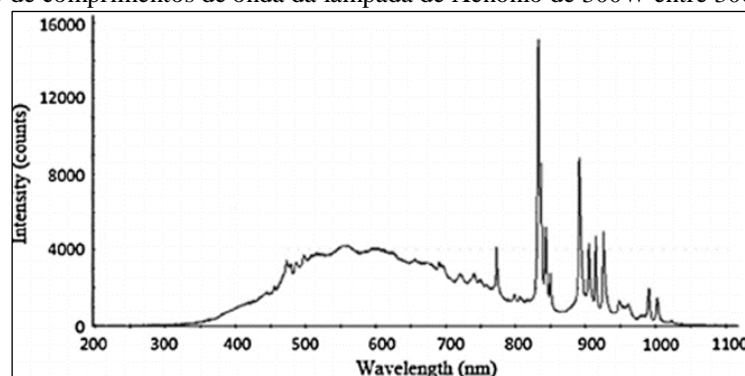
Neste estudo, o triptofano foi o responsável pela redução e estabilização de nanopartículas de prata e ouro através de uma reação redox, por um processo simples e rápido adaptado de Matos (MATOS, 2014), sendo a iluminação por luz branca (lâmpada de xenônio) a única catalizadora desta reação.

1.4 LÂMPADA DE XENÔNIO

Lâmpadas de Xenônio (Xe) são lâmpadas acionadas por eletricidade, do tipo descarga, de alta pressão. Consistem em um bulbo preenchido com gás xenônio (muitas vezes acrescido de mercúrio), onde são montados dois eletrodos separados por poucos milímetros na qual se forma um pequeno arco voltaico que emite luz intensa. A emissão ocorre em uma ampla faixa de comprimento de onda que vai de 300 a 1000nm (figura 9), abrangendo as regiões do ultravioleta (UV), visível e infravermelho (IR) próximo (LEE et al., 2014).

A radiação eletromagnética emitida por este tipo de lâmpada é do tipo não polarizada, ou seja, é formada por muitas irradiações independentes, caracterizando-se por apresentar campo elétrico em diversas direções, de forma aleatória. Lâmpadas incandescentes são exemplo de fonte de luz de não polarizada.

Figura 9 - Distribuição de comprimentos de onda da lâmpada de Xenônio de 300W entre 300nm e 1000nm.



Fonte: (LEE et al., 2014).

1.4.1 Luz na Síntese de Nanopartículas

Na síntese de NPM, a radiação eletromagnética se mostra como uma alternativa interessante, pois se caracteriza por ser livre de efeitos ambientalmente negativos como utilização de solventes tóxicos ou redutores agressivos.

Trabalhos sobre a utilização de radiação eletromagnética na síntese de NP começaram a ser publicados no final da década de 1990: em 1999 Yong Zhou (ZHOU et al., 1999), sintetizaram NPM com o uso de radiação UV, em conjunto com polímeros como PVA e PAM, com tempo médio de irradiação de 48 horas. Dois anos depois, foi relatada a preparação de nanocompósitos solúveis de poliamida e prata, utilizando uma lâmpada de mercúrio de alta pressão como fonte de radiação UV. O tempo de irradiação foi de 12 horas e foram obtidas nanopartículas de prata entre 6 e 20nm de diâmetro (HUANG et al., 2001).

Em 2003 Calegari (CALLEGARI; TONTI; CHERGUI, 2003) relatou a utilização de luz visível, onde com a aplicação de filtros de vidros coloridos o autor modificou o tamanho e forma de nanopartículas de prata, porém, neste caso a irradiação não foi empregada na redução dos íons metálicos, este se deu pela adição de boro-hidrato à uma solução de AgNO_3 .

Mais recentemente, foram publicados estudos que relatam a formação de nanopartículas de prata em microestruturas de 1, 2 ou 3 dimensões através de irradiação UV seguida de tratamento térmico adicional (PARK et al., 2010); outros artigos também relatam a formação de nanopartículas de prata através de irradiação por lâmpada de LED UV, xenônio e excitação por lâmpada de sódio utilizando resina autopolimerizável e AgNO_3 em solução de etanol (COURROL; SILVA; GOMES, 2007); irradiação com laser de pulsos de fentossegundos, utilizando solução de agar-agar (MATOS et al., 2013) entre outros.

1.4.2 Lâmpada de Xenônio na Síntese de Nanopartículas

A Lâmpada de Xenônio possui uma luz branca e muito brilhante, semelhante a luz natural. A ampla faixa de emissão da lâmpada de xenônio, que se estende para a região do infravermelho da radiação eletromagnética, leva a geração de calor.

O campo elétrico proveniente da lâmpada de Xenônio orienta os elétrons de uma molécula neutra (que apresenta o mesmo número de prótons e elétrons), no sentido contrário ao da corrente elétrica. Assim os elétrons concentram-se em um lado da molécula, que se torna negativo e conseqüentemente, o outro lado torna-se positivo. Este processo gera um momento dipolo que ocorre mais facilmente para moléculas mais polarizáveis. Ao ser irradiada por um

comprimento de onda ressonante, uma molécula absorve energia havendo a população de estados (níveis) excitados. Nesta configuração os elétrons estão mais distantes do núcleo, havendo uma menor força de atração, como consequência a polarizabilidade da molécula aumenta.

O aumento da polarizabilidade da molécula faz com que esta oxide mais facilmente, ou seja, tenha uma maior tendência a doar elétrons. Uma vez que a síntese das NPM ocorre por uma reação de oxidação e redução, onde a espécie oxidada doa elétrons ao íon metálico reduzindo-o a um átomo neutro, a radiação eletromagnética pela lâmpada de xenônio atua como catalisadora desta reação (MATOS, 2014).

Em 2007, Courrol e colaboradores relataram a exposição do AgNO_3 , diluído em etanol e resina autopolimerizável à lâmpada de xenônio, induzindo a suspensão coloidal de partículas de prata, sendo posteriormente submetidos a pulsos de laser para redução de tamanho (COURROL; SILVA; GOMES, 2007). Matos também relatou a exposição à lâmpada de xenônio seguida por irradiação à laser para a formação de nanopartículas de prata, porém, foi utilizado o AgNO_3 em solução preparada a partir de um polímero natural, extraído da planta *Euphorbia milli* (DE MATOS et al., 2011).

No presente estudo, a irradiação pela lâmpada de xenônio foi utilizada na síntese de nanopartículas de prata, atuando na redução de íons Ag^+ , através da oxidação do L-Triptofano em solução aquosa. Este procedimento foi adaptado do apresentado por Matos em 2014 (MATOS, 2014).

1.5 *Mimusops coriacea* (A. de Candolle) Miq.

A *Mimusops coriacea* (A de Candolle) Miq. (figura 10), é uma espécie vegetal original de Madagascar (GAUTIER et al., 2012), porém, comumente encontrada no litoral brasileiro. Existem vários nomes comuns para denominá-la: Abricó, Abricó-de-praia, Abricó-do-Pará, Abricó de São Domingos, Abricó Selvagem, Abricó-do-Mato.

A espécie encontrada em vários estados do Brasil, é empregada em picadas de insetos, para expelir vermes intestinais e no tratamento de feridas comuns e úlceras. Possui frutos amarelos de polpa doce e farinhosa, e folhas ovaladas com bordas lisas e tamanhos médios de 15x8cm, verde-escuro na face superior e verde-claro na inferior (LAZARINI, 1998).

Quanto sua classificação botânica temos (LAZARINI, 1998):

- **Divisão:** *Magnoliophyta (Angiospermae)*
- **Classe:** *Magnoliopsida (Dicotyledonae)*
- **Subclasse:** *Dilleniidae*
- **Ordem:** *Ebenales*
- **Família:** *Sapotaceae*
- **Gênero:** *Mimosops*
- **Espécie:** *Mimosops coriacea (A. de Candolle) Miquel*

Figura 10 - *Mimosops coriacea*. a) Árvore jovem; b) árvore adulta; c) frutos; d) folhas.



Imagens: a própria autora.

1.5.1 Extratos Vegetais na Síntese de Nanopartículas

Plantas são materiais facilmente acessíveis, que se apresentam como excelente alternativa para a síntese de NPM. A obtenção de AgNP por esta rota foi inicialmente reportada por Gardea-Torresdey *et al.* (GARDEA-TORRESDEY *et al.*, 2003), através do uso de broto de alfafa. Neste estudo os autores reportam a redução do Ag^+ para Ag^0 e posterior organização do Ag^0 em nanopartículas de prata. A planta era utilizada na íntegra e o processo lento e bastante trabalhoso. Estas dificuldades foram superadas com o uso de extratos vegetais, que minimizou

o tempo de redução do Ag^+ para minutos, dependendo de condições como temperatura, concentração do metal na solução e pH (MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013).

A síntese de nanopartículas a partir de extratos vegetais, pode ser atribuída a abundância de biomoléculas como proteínas, carboidratos, ácidos graxos e vitaminas presentes nas plantas (RAUWEL et al., 2015). Muitos estudos indicam os metabólitos secundários encontrados nos óleos essenciais presentes nos extratos vegetais como principais agentes responsáveis pela redução do íon metálico e formação das nanopartículas (PARK et al., 2016; SONG; KIM, 2009; VILAS; PHILIP; MATHEW, 2014). Estes fitoquímicos são responsáveis não somente pela síntese das nanopartículas, mas também pelo seu encapsulamento evitando posterior agregação das partículas.

Para escolha da espécie vegetal a ser testada, foi efetuado um levantamento bibliográfico sobre síntese de nanopartículas metálicas através de extratos vegetais (MASHWANI et al., 2015b). Os principais fatores considerados para a escolha foram a rapidez, simplicidade e baixo custo do processo além da disponibilidade da espécie para coleta. Outros fatores determinantes para a escolha desta espécie foram sua alta resistência ao vento e solo arenoso, rápida germinação e crescimento.

O procedimento utilizado como referência para o apresentado neste trabalho foi o publicado por Prakash e colaboradores em 2013 (PRAKASH et al., 2013), onde o autor obteve nanopartículas de prata esféricas, com diâmetro entre 55 e 83nm, através do extrato aquoso das folhas de *Mimusops elengi* L. O extrato foi obtido pela infusão das folhas em água destilada, e a obtenção das nanopartículas ocorreu pela adição do sal metálico (AgNO_3) ao extrato em temperatura ambiente e sob pH neutro, após 2 horas de reação.

Neste artigo, o autor cita outros trabalhos já publicados com esta espécie (SAHA et al., 2008; SATISH et al., 2008), que apontam a presença de diversos compostos orgânicos como alcaloides, fenóis, flavonoides, taninos, terpenoides, esteroides, glicosídeos e benzenoides, que podem ser os responsáveis pela redução do íon metálico e estabilização das nanopartículas.

A *Mimusops elengi* é citada na obra Flora Brasiliensis (MIQUEL, 1863), como sinônimo da *Mimusops coriacea*, pertencentes ao subgênero *Imbricaria*, do gênero *Mimusops* L., da família *Sapotaceae*. Devido a vasta presença da espécie *Mimusops coriacea* no litoral paulista facilitando o procedimento de coleta, esta foi utilizada para o processo.

Há poucas informações sobre a *Mimusops coriacea* na literatura, porém, a *Mimusops elengi* é muito utilizada não apenas na síntese de nanopartículas, mas também por suas atividades antimicrobianas, antioxidantes, analgésicas, diuréticas, anti-inflamatórias, larvicida,

entre outras, presentes em todas as suas partes (casca da árvore, folhas, frutos e sementes) (KUMAR et al., 2014; RUIKAR et al., 2012; SAHA et al., 2008).

Além do trabalho publicado por Prakash, utilizando o extrato aquoso das folhas de *Mimusops elengi*, é possível encontrar trabalhos que relatam a síntese de NPM através do extrato obtido da casca da árvore e de suas sementes (KUMAR et al., 2014; MAJUMDAR; BAG; GHOSH, 2016), onde os autores apontam compostos polifenólicos, como o ácido gálico, presentes nestes extratos como os responsáveis pela redução do íon metálico e estabilização das partículas.

1.6 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS NA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO

Nanopartículas de metais nobres, como as de ouro e prata, tem apresentado excelentes resultados como sensores colorimétricos para a detecção dos íons Hg^{2+} em baixas concentrações. Estes métodos são baseados na agregação ou anti-agregação das nanopartículas, com consequente alteração de suas propriedades ópticas.

Estas reações geralmente ocorrem através da adição de moléculas capazes de se ligarem às nanopartículas em suspensão, levando à sua aglomeração ou evitando-a. Entretanto, estas moléculas apresentam maior tendência para ligação com o Hg^{2+} , ou seja, adicionando o metal à solução altera-se as características da suspensão coloidal, e consequentemente, suas propriedades ópticas, relacionando-as à concentração de Hg^{2+} na solução.

Li e colaboradores (LI et al., 2009) reportaram a detecção de Hg^{2+} pela agregação de AuNP esféricas de ~13nm de diâmetro sintetizadas a partir da redução por citrato de sódio. Neste método aptâmeros de DNA e Hg^{2+} em solução são misturados e adicionados às AuNP previamente sintetizadas. O procedimento leva à aglomeração das partículas, com alterações nas bandas plasmônicas observadas em ~ λ 520nm e na coloração das soluções. Em 2010, um método bastante semelhante foi publicado, desta vez através da adição da L-cisteína na funcionalização de AuNP esféricas de ~16nm de diâmetro (CHAI et al., 2010).

Em 2014, o uso da 6-Tioguanina foi reportado, induzindo inicialmente à aglomeração de AgNP, alterando a coloração da solução e deslocando o $\lambda_{\text{máx}}$ da banda plasmônica para comprimentos de onda maiores. A presença do Hg^{2+} na solução leva a desagregação das nanopartículas, com mudança na coloração da solução e deslocamento hipsocrômico da banda plasmônica (DUAN et al., 2014). Mais recentemente, foi reportada a detecção de Hg^{2+} através da aglomeração de AgNP encapsuladas por quitosana (SHARMA et al., 2018). Entretanto este método foi sensível também aos íons Fe^{3+} e Cu^{2+} .

Estes métodos têm apresentado excelente seletividade e sensibilidade, com limites de detecção da ordem de nanomol (nM) de Hg, porém, embora a preparação de alguns desses ligantes seja relativamente fácil, o desenvolvimento de métodos mais simples, eliminando etapas de síntese e reduzindo os custos do procedimento, sem prejuízo da seletividade e sensibilidade é bastante atraente.

No presente estudo, as nanopartículas obtidas através dos métodos de síntese propostos, foram analisadas quanto a sua sensibilidade e seletividade na detecção de íons Hg^{2+} em solução aquosa, em um procedimento adaptado do descrito por Ahmed e colaboradores (AHMED; HASAN; MOHIUDDIN, 2014), na qual, nanopartículas de prata são utilizadas na quantificação de mercúrio, sem qualquer funcionalização ou modificação prévia, através de alterações nas bandas plasmônicas na presença do analito, proporcionais ao aumento da sua concentração, permitindo assim sua detecção e quantificação. No estudo citado o limite de detecção encontrado é de $1\mu\text{g/mL}$, entretanto, no presente estudo buscamos otimizar o método aumentando sua sensibilidade, permitindo detectar concentrações da ordem ng/mL .

2 OBJETIVOS

Os objetivos gerais desta pesquisa são a síntese de nanopartículas de prata e ouro por métodos “verdes”, e sua aplicação na detecção e quantificação de mercúrio, através de alterações na banda plasmônica decorrente da propriedade de SPR das nanopartículas.

Como objetivos específicos temos:

- Síntese de nanopartículas de prata e ouro, utilizando o aminoácido L-Triptofano combinado com irradiação eletromagnética por lâmpada de Xenônio;
- Síntese de nanopartículas de prata e ouro a partir do extrato aquoso de folhas de *Mimusops coriacea* (A. de Candolle) Miq;
- Caracterização das nanopartículas através de diferentes técnicas instrumentais;
- Análise do potencial das nanopartículas sintetizadas na detecção e quantificação de mercúrio em soluções aquosas, através de alterações em suas bandas plasmônicas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PREPARO DAS SUSPENSÕES DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E OURO

3.1.1 Materiais

3.1.1.1 Reagentes

- Nitrato de Prata 99,99% Sigma-Aldrich (AgNO_3);
- Cloreto de Ouro a 0,2% em solução aquosa Sigma-Aldrich (HAuCl_4);
- L-Triptofano 98,5% Vetec ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$);
- Água destilada
- Hidróxido de Sódio em solução aquosa 0,1M (NaOH)

3.1.1.2 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados para o preparo e armazenamento das soluções foram: balança analítica de precisão Simadzu AVW 220D, lâmpada de xenônio Oriel 300W, pHmetro Prolab pH500 -2.0~16pH; vortex Biomixer, agitador magnético com aquecimento Fisatom753A, estufa ECB Linea – Olidef CZ (até 70°C); filtros de papel, pipetas e bequers de diversos volumes, tubos eppendorf e frascos de vidro.

As amostras foram armazenadas em refrigerador a ~7°C.

3.1.2 Síntese de Nanopartículas de Ouro e Triptofano (TrpAuNP)

Foi preparada uma solução de L-Triptofano na concentração de 3mmol/L em água destilada. Em seguida, o precursor metálico HAuCl_4 foi adicionado à solução até atingir as concentrações 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0mmol/L. As soluções foram agitadas em vortex por aproximadamente 2 minutos para homogeneização. O procedimento foi efetuado sem ajuste prévio de pH.

A reação levou a acidificação da solução e foi efetuado um estudo quanto ao ajuste do pH pela adição de NaOH tornando o meio neutro e básico, detalhados no item Resultados e Discussões.

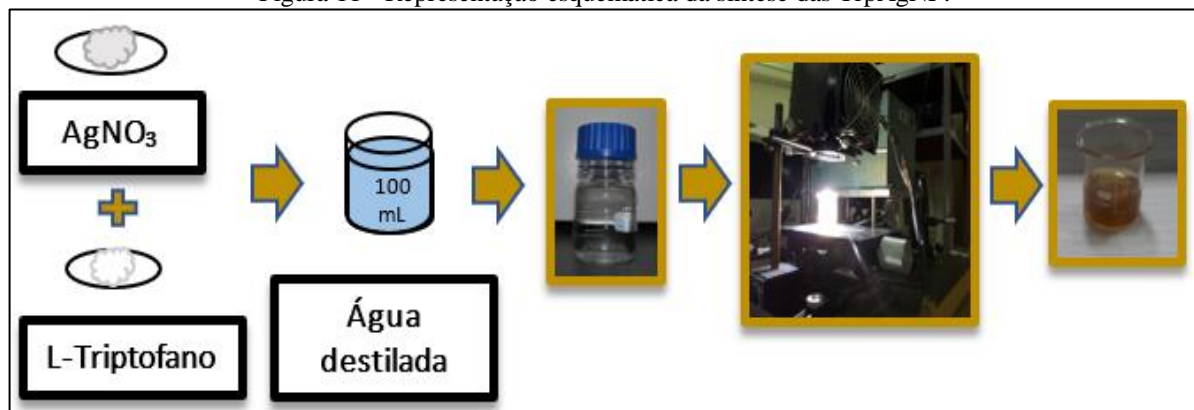
3.1.3 Síntese de Nanopartículas de Prata e Triptofano (TrpAgNP)

As soluções foram preparadas a partir da pesagem do L-Triptofano e AgNO_3 em balança analítica e diluídas em 100mL de água destilada. A concentração de L-Triptofano foi fixada em 3mmol/L, variando a concentração de AgNO_3 em 0,3; 0,5; 1,0 e 2,0 mmol/L. As soluções foram agitadas em vortex por cerca de 2 minutos para homogeneização.

As soluções foram expostas à lâmpada de Xenônio, 10mL ($\pm 0,1$) por vez, em um béquer de 15mL de capacidade, a 11 cm de distância da lâmpada, entregando uma energia de 3,6 J (0,86 cal) por segundo e por cm^2 à solução irradiada. Os períodos de exposição utilizados foram 5, 10 e 15 minutos, alterando a coloração da solução para um tom castanho avermelhado indicando a formação das TrpAgNP em suspensão. A figura 11 esquematiza este procedimento.

As soluções foram preparadas sem ajuste prévio de pH, porém, a exposição à lâmpada levou a uma variação na acidez. Uma análise do ajuste de pH pela adição de NaOH tornando o meio básico foi efetuada e está detalhada no item Resultados e Discussões.

Figura 11 - Representação esquemática da síntese das TrpAgNP.



Fonte: a própria autora.

3.1.4 Síntese de Nanopartículas de Prata e Extrato Aquoso de *Mimusops Coriacea* (*A. de Candolle*) Miq. (McAgNP)

Este método foi adaptado de Prakash (PRAKASH et al., 2013), porém, a planta utilizada neste estudo foi a *Mimusops coriacea* (*A. de Candolle*) Miq. A espécie difere da utilizada neste trabalho, porém, pertence ao mesmo gênero.

Para obtenção do extrato, folhas jovens de *Mimusops coriacea* foram coletadas na orla da Prainha Branca, localizada na Área de Preservação Ambiental (APA) Serra do Guararu, Guarujá-SP, a latitude -23,869296 e longitude -46,137139 (figura 12). Em média, o clima na

região apresenta temperaturas mais elevadas e maior precipitação entre setembro e abril; os demais meses compreendem o período de clima mais seco e temperaturas mais baixas.

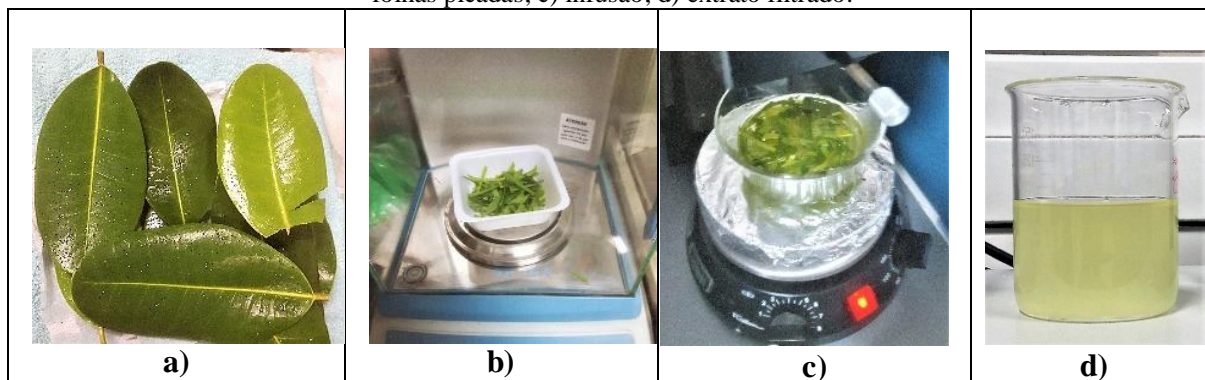
Figura 12 - Imagem de satélite do local da coleta do material vegetal para preparo do extrato.



Fonte: (GOOGLE).

As folhas foram lavadas com água corrente em abundância, enxaguadas com água destilada e após escorrerem à temperatura ambiente foram picadas em pequenos pedaços de cerca de 10x3mm. O material picado foi colocado em infusão durante 5 minutos em 100mL de água destilada, na concentração 50mg/mL(± 2 mg), a temperatura média de 82°C (± 2 °C) em um agitador magnético com aquecimento. Após um minuto de repouso o material foi filtrado em filtro de papel rendendo cerca de 80mL de extrato, que consistiu em um líquido verde claro. Os extratos foram preparados em até 24horas após a colheita do material. A figura 13 ilustra fotograficamente as etapas.

Figura 13 - Preparo do extrato de folhas de *Mimusops coriacea*. a) folhas lavadas e escorridas; b) pesagem das folhas picadas; c) infusão; d) extrato filtrado.



Imagens: a própria autora

O preparo da suspensão de McAgNP ocorreu a partir da diluição do precursor metálico AgNO_3 , em 40mL do extrato à temperatura ambiente, sem ajuste prévio de pH. A solução foi agitada manualmente durante alguns segundos para homogeneização e mantida em temperatura ambiente sem agitação. Após cerca de 10 minutos houve a mudança de cor da solução de verde-claro do extrato para um tom castanho intenso, característico das nanopartículas de prata. O preparo das suspensões foi efetuado no mesmo dia do preparo do extrato.

Um estudo quanto a concentração de AgNO_3 foi efetuado, pesando e diluindo-o diretamente no extrato, até atingir as concentrações: 0,5; 1,0; 2,0; e 3,0 mmol/L. Foram analisadas as variações na coloração das soluções e efetuadas análises de espectrofotometria UV-Vis (conforme descrito no item 3.2.1). Diante dos resultados obtidos, uma análise de variações no volume de folhas utilizado no preparo do extrato, combinadas com diferentes concentrações do sal metálico e acidez do meio, ajustada pela adição do NaOH foi efetuada. Estas variações estão sumarizadas na tabela 4, porém, estão melhor detalhadas no item Resultados e Discussões.

Tabela 4 - Variações nas condições de síntese das McAgNP.

| Fator avaliado | Valores |
|--|--|
| Concentração de folhas no preparo do extrato (mg/mL) | 25; 50; 100 (± 2) |
| Concentração de AgNO_3 (mmol/L) | 1,0 – 2,0 ($\pm 0,1$) |
| pH | Ácido (5-6) – Neutro (6,5-7,5) – Básico (9,5-11,5) |

3.1.5 Síntese de Nanopartículas de Ouro e Extrato Aquoso de *Mimusops Coriacea* (*A. de Candolle*) *Miq.* (McAuNP)

O método de obtenção do extrato de *Mimusops coriacea* e preparo das suspensões de McAuNP foi o mesmo empregado na síntese de McAgNP, descrito no item anterior, entretanto, o precursor metálico utilizado foi o H₂AuCl₄. Neste caso a mudança de cor da solução também iniciou após cerca de 10 minutos, desta vez para violeta, característico das nanopartículas de ouro.

Fatores como concentração do extrato e do sal metálico, assim como a acidez do meio foram analisados e estão sumarizados na tabela 5.

Tabela 5 - Variações nas condições de síntese das McAuNP.

| Fator avaliado | Valores |
|--|--|
| Concentração de folhas no preparo do extrato (mg/mL) | 25; 50; (± 2) |
| Concentração de AgNO ₃ (mmol/L) | 1,0 – 2,0 ($\pm 0,1$) |
| pH | Ácido (2-3) – Neutro (6,5-7,5) – Básico (9,5-11,5) |

3.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

3.2.1 Espectrofotometria de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível – (UV-vis)

Para esta técnica, o aparelho utilizado foi o espectrofotômetro UV/Vis Shimadzu – MultiSpec 1501, sendo as medidas efetuadas em cubeta de quartzo de 1cm de caminho ótico, com as amostras à temperatura ambiente. Foi analisado o espectro entre 200 e 800nm. Devido ao sinal muito intenso, foi necessária a diluição prévia das amostras em água destilada, indicada junto aos seus respectivos resultados.

Foram efetuadas medidas para todas as variações testadas, servindo para a comprovação da presença de nanopartículas em suspensão e caracterização inicial através da observação dos espectros. As medidas foram plotadas e tratadas através do software *Origin 8*.

3.2.2 Espalhamento de Luz Dinâmico – (DLS)

Para esta análise, utilizou-se o aparelho Zetasizer NanoZS da Malvern da Central Experimental Multiusuário (CEM) da Universidade Federal do ABC (UFABC).

O ângulo de espalhamento de luz foi fixado em 173° e a temperatura em 25°C. O tempo de estabilização da amostra foi fixado em 120 segundos. Uma cela de eletroforese foi utilizada para análise das amostras. Os resultados foram analisados pelo software do aparelho *Zetasizer Software*.

Este equipamento fornece informações sobre a distribuição de tamanho, considerando o diâmetro hidrodinâmico (DH) das partículas, sua polidispersividade (PDI), além de permitir o cálculo do potencial zeta, na qual valores mais próximos a 0mV indicam partículas com alta tendência a se agregar.

3.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão – (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão, foi utilizada para a determinação do tamanho (diâmetro), e da ultraestrutura das nanopartículas. As análises foram efetuadas no Centro de Ciência e Tecnologia dos Materiais (CCTM), do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) da Universidade de São Paulo (USP), pela pesquisadora Dr.^a Flávia Rodrigues.

As amostras foram gotejadas em uma grade de cobre e analisadas no microscópio eletrônico de transmissão JEM 2100 – JEOL. A análise de distribuição de tamanho das partículas foi efetuada através das imagens obtidas por esta técnica com o software *ImageJ*.

3.2.4 Espectrofotometria de Emissão – Fluorescência

O equipamento empregado nesta técnica foi o Fluorímetro Fluorolog 3 Horiba Jobin Yvon, sendo as medidas efetuadas em cubetas de quartzo de 1cm de caminho óptico em temperatura ambiente. As TrpAgNP/TrpAuNP foram excitadas em 280nm e o espectro medido entre 295 e 500nm; as McAgNP/McAuNP foram excitadas em 430nm e espectro medido entre 450 e 800nm.

As medidas efetuadas pelo equipamento são automaticamente plotadas no software Origin, na qual foi possível observar o pico de emissão do triptofano em comprimentos de onda de aproximadamente 350nm nas TrpAg/TrpAuNP; e da clorofila em aproximadamente 630nm no caso das McAg/McAuNP.

3.2.5 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – (FTIR)

Para esta técnica, foi utilizado o espectrofotômetro IR Prestige 21- Shimadzu.

O preparo das amostras foi efetuado pipetando 200 μ L da solução a ser analisada em uma lâmina para microscopia e colocadas em estufa. Após aproximadamente 60 minutos, o solvente já havia evaporado e o procedimento foi repetido por 2 vezes. O intervalo entre as repetições foi menor pois a temperatura de estufa aumentou gradativamente. A temperatura inicial era de 30°C e atingiu 68°C ao final do processo. Uma pequena quantidade da amostra seca foi misturada ao brometo de potássio (KBr) e prensada, obtendo-se uma pastilha fina e translúcida, utilizada para análise.

Para obtenção dos espectros foram acumuladas 100 varreduras.

3.2.6 Reprodutibilidade

A análise dos espectros UV-vis das suspensões de AgNP e AuNP preparadas ao longo do estudo foram utilizadas para determinar a reprodutibilidade do método. Foram analisadas as variações na posição do λ máximo e na intensidade de absorbância.

3.3 APLICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM SOLUÇÃO AQUOSA

3.3.1 Materiais

3.3.1.1 Reagentes

Todas as diluições foram efetuadas utilizando água MiliQ. Para análise de sensibilidade foi utilizada uma solução padrão de mercúrio para espectrofotometria de 1000mg/L (\pm 5mg/L) SpecSol.

Os reagentes empregados nas análises de seletividade estão sumarizados na tabela 6.

Tabela 6 - Relação de reagentes utilizados na análise de seletividade do método.

| Símbolo | Descrição | Fornecedor |
|------------------------|---|-------------------|
| Li⁺ | CLORETO DE LÍTIO P.A. LiCl | SYNTH |
| Na⁺ | CLORETO DE SÓDIO P.A. NaCl | DINÂMICA |
| K⁺ | CLORETO DE POTÁSSIO P.A. - KCl | - |
| Mg²⁺ | CLORETO DE MAGNÉSIO HEXAHIDRATADO P.A. – MgCl ₂ .6H ₂ O | VETEC |
| Ca²⁺ | NITRATO DE CÁLCIO P.A. TETRAHIDRATADO – Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O | VETEC |
| Sr²⁺ | CLORETO DE ESTRÔNCIO P.A. HEXAHIDRATADO – SrCl ₂ .6H ₂ O | ÊXODO |
| Ba²⁺ | CLORETO DE BÁRIO P.A DIHIDRATADO– BaCl ₂ .2H ₂ O | SYNTH |
| Ni²⁺ | NITRATO DE NÍQUEL P.A HEXAHIDRATADO – Ni(NO ₃) ₂ .6H ₂ O | VETEC |
| Cu²⁺ | CLORETO DE COBRE II DIHIDRATADO P.A. - CuCl ₂ .2H ₂ O | CAAL |
| Zn²⁺ | NITRATO DE ZINCO P.A. HEXAHIDRATADO – Zn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O | VETEC |
| Hg²⁺ | CLORETO DE MERCÚRIO - HgCl ₂ | DINÂMICA |
| Co²⁺ | NITRATO DE COBALTO P.A. HEXAHIDRATADO - Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O | VETEC |
| Cd²⁺ | CLORETO DE CÁDMIO MONOHIDRATADO PURÍSSIMO – CdCl ₂ .H ₂ O | VETEC |

3.3.2 Análise de Sensibilidade e Seletividade

Foi preparada uma solução estoque de 100µg/mL(±5µg/mL) de mercúrio, pipetando 10mL(±0,5mL) da solução padrão de Hg 1000µg/mL em um balão volumétrico de 100mL e completando com água MiliQ até a marca.

Na primeira etapa, foram efetuadas diluições progressivas da solução estoque previamente preparada, com menor concentração fixada em 5%(±1%) da concentração inicial. Após a caracterização das nanopartículas e determinação das melhores condições obtidas com cada método, estas foram diluídas na proporção 1:4 nas soluções preparadas em diferentes diluições da solução estoque de Hg, e aguardou-se 10 minutos, quando foram efetuadas análises de espectrofotometria UV-vis em triplicata. O preparo das soluções, assim como as medidas de espectrofotometria UV-vis foram efetuados em temperatura ambiente, sem diluição e qualquer outro tratamento prévio.

Para o preparo das amostras de branco, diluiu-se a suspensão em água MiliQ na mesma proporção utilizada nas amostras com o analito. Este procedimento foi adaptado do descrito por

Ahmed e colaboradores (AHMED; HASAN; MOHIUDDIN, 2014), onde o limite de detecção obtido foi de 1µg/mL.

Para análise de seletividade, os cátions relacionados na tabela 6, foram pesados em balança analítica e diluídos em água MiliQ na concentração de 100µg/mL ($\pm 3\mu\text{g/mL}$). Foram preparadas amostras nas mesmas condições aplicadas na análise de sensibilidade, utilizando as nanopartículas que apresentaram melhores resultados na etapa anterior e efetuadas análises dos espectros UV-vis também nas mesmas condições.

Comprovada a seletividade do método, foram efetuadas variações na diluição prévia da suspensão coloidal e na proporção de diluição com a solução aquosa de Hg, e analisados os espectros UV-vis, com o objetivo de aumentar a sensibilidade de método.

3.3.3 Curva Analítica

Após otimização dos parâmetros, construiu-se uma curva analítica, pela obtenção de espectros UV-vis das amostras preparadas com diferentes concentrações de Hg. O intervalo de concentração estudado foi de 50 a 500ng/mL e as medidas foram efetuadas em triplicata.

3.3.4 Determinação dos Limites de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ)

Por definição, limite de detecção (LOD), é a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser detectada; e limite de quantificação (LOQ), é a concentração mais baixa de um analito que pode ser determinada com precisão aceitável e exatidão, nas condições experimentais estabelecidas (CURRIE, 1999).

Para determinação baseada em parâmetros da curva analítica, o LOD e LOQ podem ser calculados pelas equações 1 e 2 (CURRIE, 1999):

$$LOD = \frac{3Sd}{b} \quad (1)$$

$$LOQ = \frac{10Sd}{b} \quad (2)$$

Onde Sd corresponde ao desvio padrão de 10 medidas do branco; e b ao coeficiente angular da curva analítica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

Conforme descrito no item anterior, foram efetuadas variações na concentração metal, no volume de folhas utilizado para preparação do extrato vegetal no caso das McNP, no tempo de iluminação por lâmpada de xenônio (quando necessário) e na acidez do meio no preparo das suspensões de nanopartículas de prata e ouro.

A presença de NPM em suspensão, foi determinada inicialmente pela coloração das soluções: amarelo/marrom para AgNPs e vinho/violeta para AuNP. Esta coloração característica é decorrente da ressonância plasmônica de superfície das NPM, onde a cor observada é complementar ao comprimento de onda de absorção do plasmon.

A análise dos espectros UV-vis, confirmou a presença das NPM em suspensão e possibilitou uma triagem inicial entre as melhores condições de síntese para cada procedimento. Os principais parâmetros avaliados foram: a presença de banda plasmônica decorrente da propriedade de SPR das nanopartículas, observadas em comprimentos de onda de $\cong 420\text{nm}$ para AgNP e $\cong 500\text{nm}$ para AuNP; intensidade de absorbância (quanto mais intensa, mais concentrada a suspensão), largura a meia altura (quanto mais estreita menos polidispersa, ou seja, mais homogênea); e posição do $\lambda_{\text{máx}}$ (comprimentos de onda menores indicam partículas menores)(VIOL et al., 2011; YU; WANG; PENG, 2003).

O comportamento espectral, em água, dos reagentes: L-Triptofano; AgNO_3 e HAuCl_4 , foram estudados anteriormente (MATOS, 2014), e estão apresentados no anexo A, assim como os espectros do extrato de *Mimusops coriacea*. Estes apresentam absorção na região do UV, não interferindo na análise das bandas das AgNP/AuNP, porém, auxiliaram na compreensão dos mecanismos de síntese.

Outras técnicas de caracterização como DLS e potencial zeta, que determinam o diâmetro hidrodinâmico, a polidispersividade e a estabilidade das suspensões, além de imagens obtidas por MET contribuíram para a triagem. Análises complementares de fluorescência e FTIR foram efetuadas para auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos de síntese.

4.1.1 Síntese de Nanopartículas de Ouro (TrpAuNP) e Prata (TrpAgNP) Através do Aminoácido L-Triptofano e Exposição à Lâmpada de Xenônio

O L-Triptofano em água, assim como o AgNO_3 em água, apresentam-se incolores, como demonstrado na figura 14 a e b e figura 68 e 69 do anexo A, já o HAuCl_4 em água possui coloração amarela translúcida (figura 14 c e figura 70 do anexo A).

Nas soluções preparadas com L-Triptofano e HAuCl_4 (TrpAu), a mudança de cor para violeta observada na figura 15 a, é imediata em todas as concentrações testadas, indicando a presença de nanopartículas de ouro (TrpAuNP) em suspensão coloidal, dispensando a exposição à lâmpada; enquanto nas soluções com AgNO_3 (TrpAg), a mudança de cor só é observada após iluminação (Figura 15 b e c). A ausência de banda em $\lambda \cong 420\text{nm}$ no espectro UV-vis (figura 16) indica que não houve formação de nanopartículas de prata (TrpAgNP) antes da iluminação.

Figura 14 - a) L Triptofano em água; b) AgNO_3 em água; c) HAuCl_4 em água.

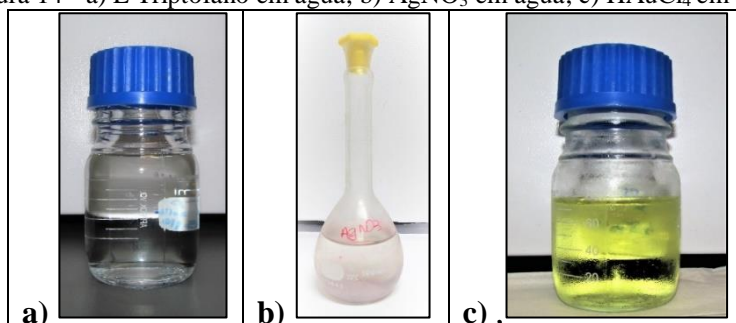


Figura 15 - a) TrpAuNP; b) TrpAg (antes da exposição ao Xe); c) TrpAgNP (Xe 5 minutos).

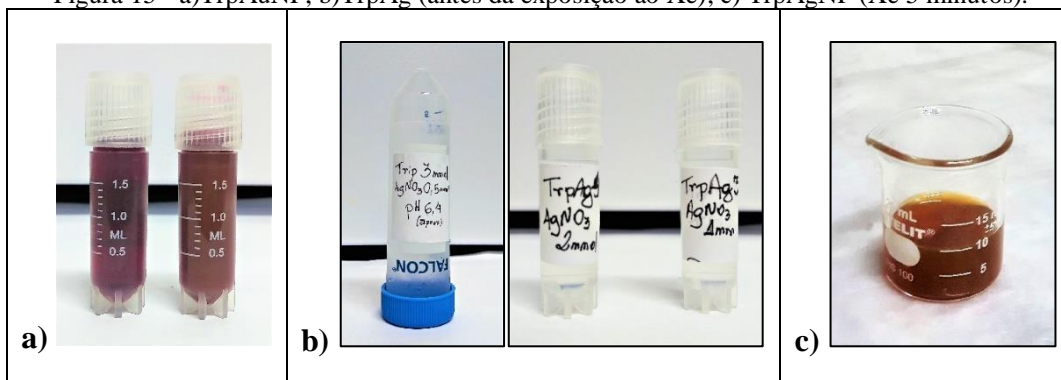
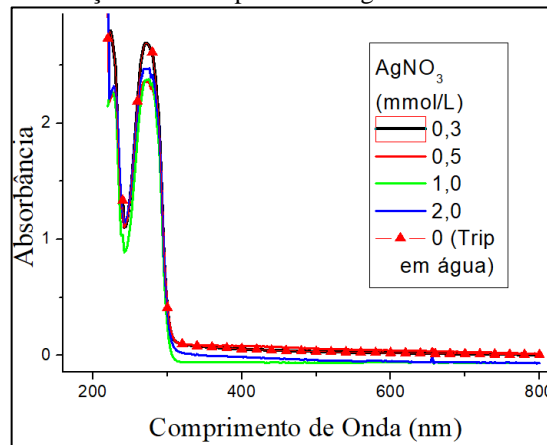


Figura 16 - Espectros UV-vis das soluções de L-Triptofano e AgNO₃ antes da exposição à lâmpada de Xenônio.



4.1.1.1 Nanopartículas de ouro e L-Triptofano – TrpAuNP

Ao diluir o H_{AuCl}₄ em água, os ligantes cloreto, são substituídos por hidroxilas, formando um complexo, cuja banda, tem máximo de absorbância em ~300 nm (figura 70 do anexo A), com o aumento da concentração, a banda sofre deslocamento para o vermelho, ~314 nm, decorrência da formação de complexo com cloretos (substituição de hidroxilas por cloretos).

Os espectros UV-vis das TrpAuNP, são apresentados na figura 17 a. Foi observado, que a medida que a concentração de H_{AuCl}₄, aumenta (menor razão L-Trp/H_{AuCl}₄), as bandas de absorção plasmônica sofrem um deslocamento hipsocrômico (para comprimentos de onda menores), indo de 565nm para a amostra de 0,5 mmol/L para 547nm para 3 mmol/L (fig 17 d), tornam-se, mais intensas (fig. 17 b) e mais estreitas (fig 17 c), indicando a presença de partículas menores, em suspensões mais concentradas e mais homogêneas. Entretanto, comparando as bandas das suspensões com concentrações de H_{AuCl}₄ de 2 e 3mmol/L, nota-se que apresentam pouca diferença entre si. Um levantamento da banda em comprimentos de onda acima de 750nm, nas amostras mais concentradas, é indicativo de ressonância longitudinal como no caso dos nanotubos (AFROOZ et al., 2013). Análises de DLS, potencial zeta e MET foram efetuadas fornecendo informações sobre tamanho, forma, polidispersividade e estabilidade das TrpAuNP. Estes resultados são apresentados na tabela 7 e figura 18.

Figura 17 - Alterações ópticas nas TrpAuNP em razão da concentração de HAuCl_4^- (Diluídas à 20%). a) Espectros UV-vis; b) Intensidade de absorbância, c) Largura da banda à meia altura; d) posição do λ máximo.

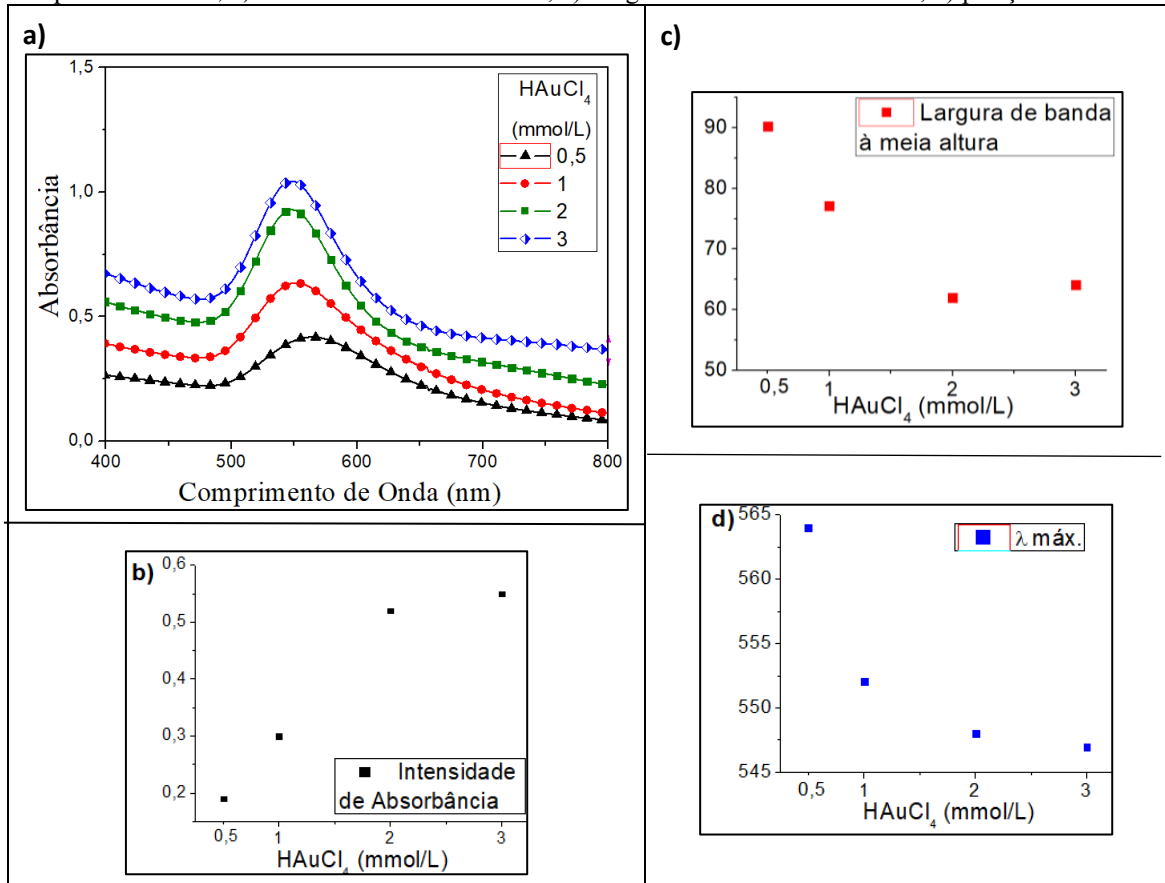
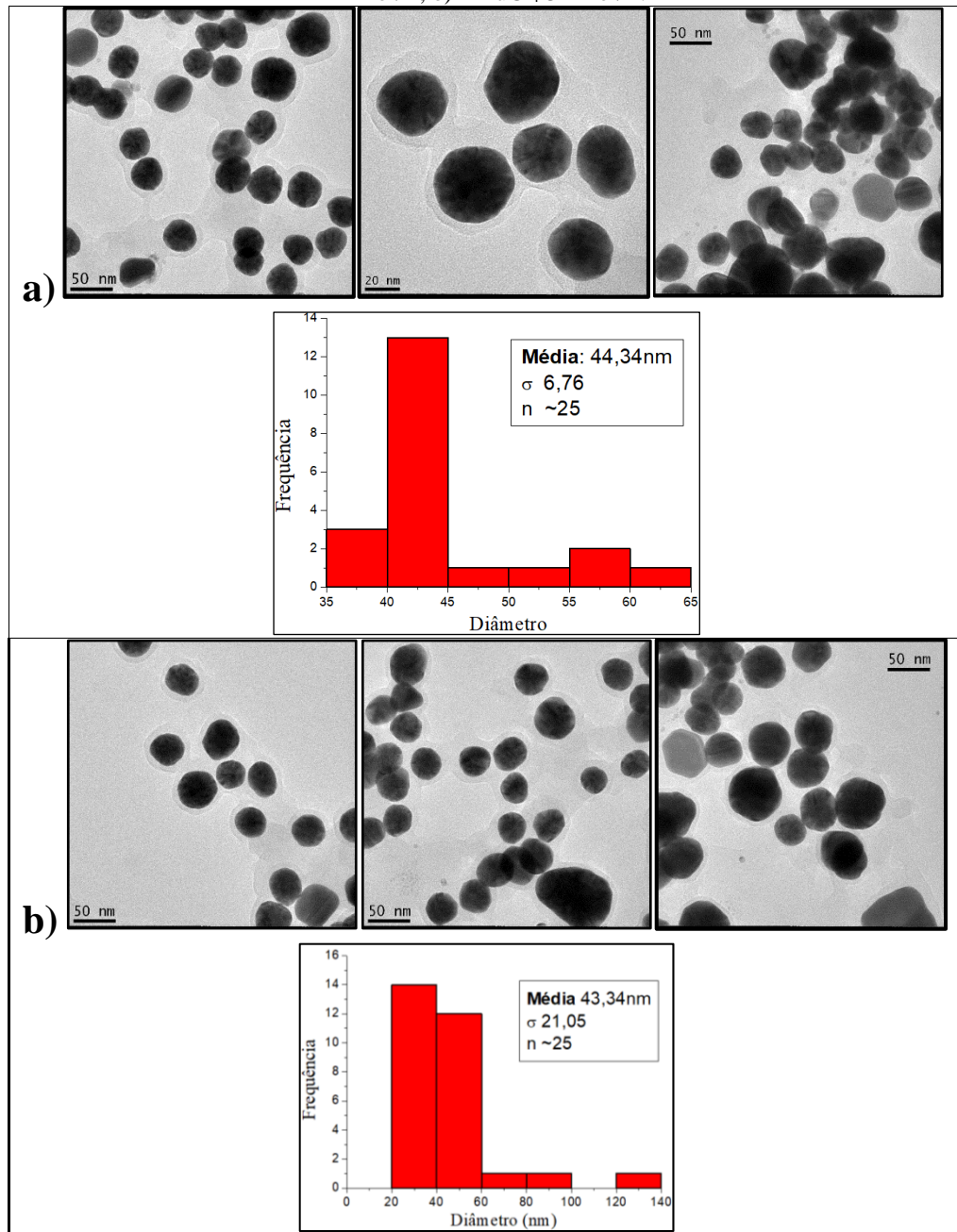


Tabela 7 – Resultados das análises DLS das TrpAuNP em razão da concentração de HAuCl_4^-

| HAuCl_4^- (mmol/L) | Diâmetro Hidrodinâmico (nm) | Vol. (%) | PdI | Potencial Zeta (mV) |
|--------------------------------|-----------------------------------|-------------|-------|------------------------|
| | 23,28 ($\pm 4,75$) | 17,1 | | |
| 2,0 | 71,94 ($\pm 32,42$) | 80,4 | 0,177 | +22,5 ($\pm 0,83$) |
| | 1460 ($\pm 417,4$) | 1,8 | | |
| 3,0 | 78,14 ($\pm 36,71$) | 58,4 | 0,192 | +22,9 ($\pm 1,93$) |
| | 24,69 ($\pm 6,11$) | 41,6 | | |

Figura 18 - Imagens de MET e respectivos histogramas de distribuição de tamanho das TrpAuNP. a) HAuCl_4 2mmol/L; b) HAuCl_4 3mmol/L.

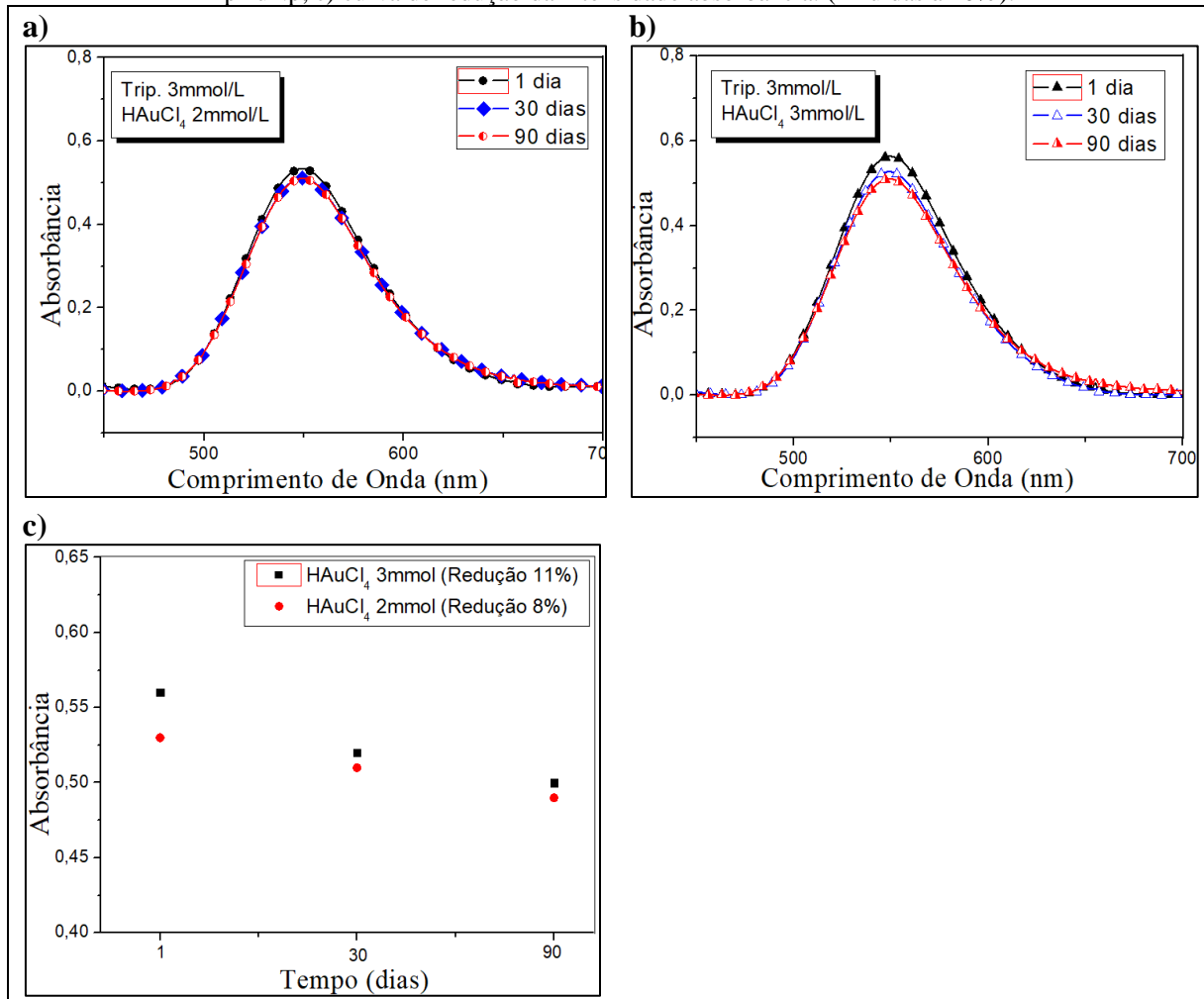


Assim como, indicado pelas características das bandas plasmônicas das TrpAuNP, as imagens de MET, indicam que as suspensões com concentração de HAuCl_4 2 e 3mmol/L apresentam NP esféricas em sua maioria, com diâmetros médios de 44,3 e 43,3nm respectivamente, contando ainda com algumas estruturas maiores.

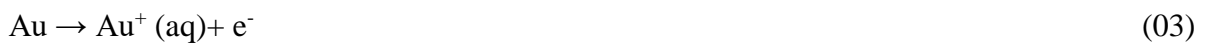
As análises de DLS (tabela 7), indicam monodispersividade alta, sendo que na suspensão com menor concentração os resultados indicam a presença de aglomerados, representados pelas partículas com diâmetro médio de 1460nm (1,8% do volume).

Os valores de potencial zeta (tabela 7), indicam suspensões com baixa estabilidade, entretanto, análises dos espectros UV-vis indicam que as TrpAuNP continuam estáveis após 90 dias, pois houve apenas uma pequena redução na absorbância máxima, apresentada na figura 19. As TrpAuNP nestas condições apresentam carga superficial positiva, proveniente da protonação do grupo amina do L-Triptofano em meio ácido (catiônico).

Figura 19 - Redução na intensidade de absorbância das TrpAuNP após 90 dias. a) e b) espectros Uv-vis das TrpAuNP; c) curva de redução da intensidade absorbância. (Diluídas à 20%).



O sal de ouro dissolve-se facilmente em água deionizada para resultar em um cátion, como descreve a equação 03 (WANG et al., 2009):



A ocorrência desta reação é dada pela equação de Nernst ou potencial de redução (equação 04):

$$E = E^{\circ} - 2.303 \frac{RT}{F} \log_{10} \frac{[Au]}{[Au^{+}]} \quad (04)$$

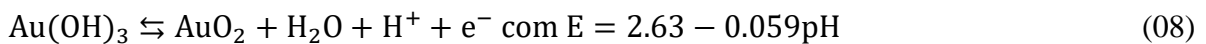
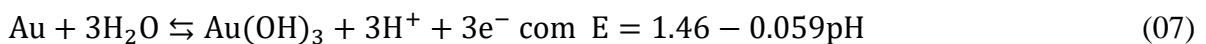
na qual R é a constante dos gases, F é a constante de Faraday, T é a temperatura absoluta (25 °C ou 298 K) e E° o potencial do eletrodo padrão para a reação (~1,7 V). Tomando o ouro [Au] como parâmetro, a equação 04 se reduz a:

$$E = 1.7 + 0.059 \log_{10}[Au^{+}] \quad (05)$$

Lembrando que a valência do ouro é 3+ e adotando-se $E^{\circ}_{Au^{3+}/Au}=1.50$, as equações anteriores podem ser reescritas na forma da equação 06:

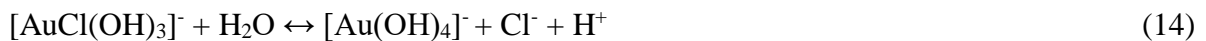
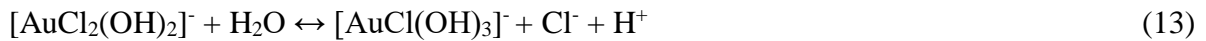
$$E = 1.5 + 0.0197 \log_{10}[Au^{3+}] \quad (06)$$

Assim, a oxidação do metal ao interagir com o ambiente aquoso é dada pelas reações adiante e seus respectivos potenciais de redução (equações 07 e 08)



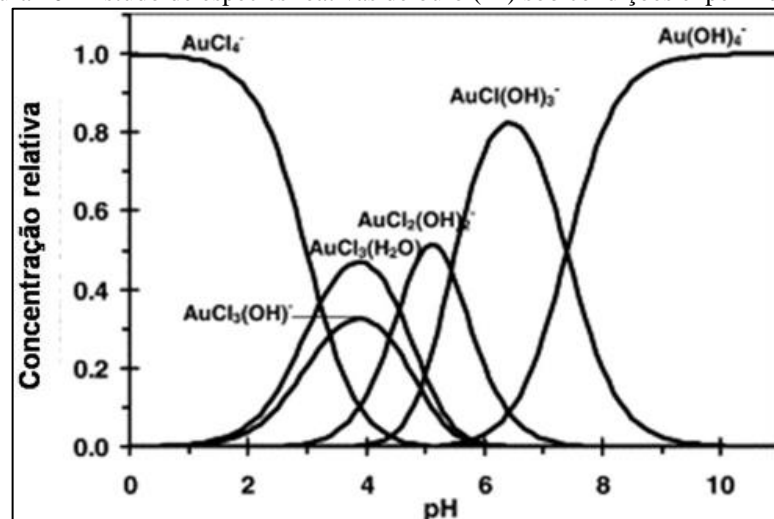
As espécies de ouro em solução aquosa são sempre uma mistura de vários complexos (figura 20). Diferentes espécies de ouro certamente vão apresentar diferentes reatividades químicas, portanto, quando se emprega a redução de $HAuCl_4$ para a síntese de AuNPs, o pH da solução tem influência sobre a nucleação e crescimento dos aglomerados de ouro. Durante a hidrólise de $[AuCl_4]^{-}$, espécies neutras são produzidas através do deslocamento dos íons Cl^{-} (equações 3 a 5), perda de prótons pelas espécies neutras (equações 4 e 6) e substituição dos íons Cl pelos íons OH^{-} (equações 4 e 6) (WANG et al., 2009).





$[\text{AuCl}(\text{OH})_3]^-$ e $[\text{Au}(\text{OH})_4]^-$ são mais difíceis de serem reduzidos do que as espécies de $[\text{AuCl}_4]^-$ e $[\text{AuCl}_3(\text{OH})]^-$. Portanto, quando $[\text{AuCl}_4]^-$ e $[\text{AuCl}_3(\text{OH})]^-$ dominam a especiação aquosa de HAuCl_4 , o processo de nucleação prossegue rapidamente, facilitando a formação de AuNPs pequenas e bem dispersas. No entanto, quando $[\text{AuCl}(\text{OH})_3]^-$ e $[\text{Au}(\text{OH})_4]^-$ dominam a especiação, o processo de nucleação prossegue lentamente e o crescimento das AuNPs ocorre adequadamente, o que conduz à formação de colóides maiores de ouro.

Figura 20 - Estudo de espécies reativas de ouro (III) sob condições experimentais.



Fonte: (WANG et al., 2009)

O L-Triptofano em água apresenta-se neutro ($\text{pH} \cong 7,5$); ao reagir com o ouro iônico formando TrpAuNP o pH final foi de $\cong 2,8$. A formação de nanopartículas ocorre por um processo redox, no qual o triptofano sofre oxidação na presença de ouro iônico, reduzindo Au^{3+} em Au^0 . A oxidação do aminoácido e a redução do ouro levam a presença de uma grande quantidade de H^+ no meio resultando em soluções ácidas (MATOS, 2014).

Embora já relatado que o pH ácido é mais favorável para a redução do ouro iônico (WANG et al., 2009), e esta afirmação tenha sido comprovada experimentalmente no presente estudo, resultando em TrpAuNP esféricas com alta estabilidade, suspensões com pH próximo ao fisiológico ampliam as possibilidades de aplicações das NPM, principalmente nos campos da medicina e farmácia (MATOS, 2014; MUKHA et al., 2016), portanto, julgou-se necessário um estudo de ajuste da acidez do meio.

Para esta análise, o pH das TrpAuNP já reduzidas foi ajustado com a adição de NaOH gota a gota, tornando o meio neutro ($6 \leq \text{pH} \leq 8$) e básico ($9 \leq \text{pH} \leq 12$). Após este ajuste, análises de espectrofotometria UV-vis, DLS e potencial zeta foram novamente efetuados e são apresentados na figura 21 e tabela 8.

Figura 21 - Espectros UV-vis das TrpAuNP em razão do pH. (Diluídas à 20%).

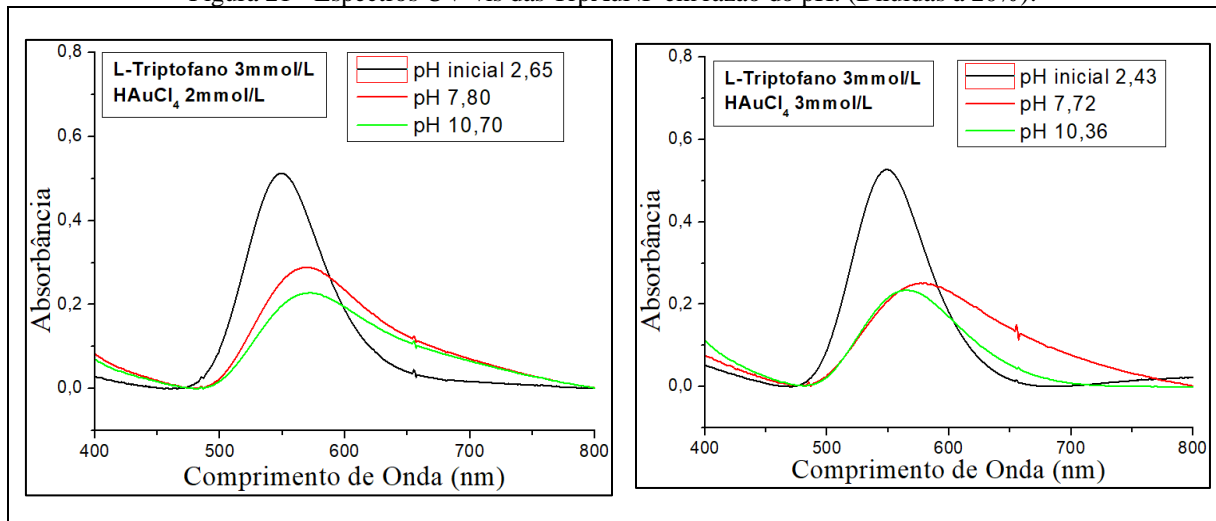


Tabela 8 - Resultados das análises DLS das TrpAuNP em razão da acidez do meio.

| HAuCl ₄ (mmol/L) | Meio | Diâmetro Hidrodinâmico (nm) | Vol. % | PdI | Potencial Zeta (mV) |
|--------------------------------|--------|-----------------------------------|-----------|-------|---------------------------|
| 2,0 | Neutro | 2058 (±811,4) | 62,5 | 0,790 | -31 (±0,55) |
| | | 5029 (±732,) | 11,9 | | |
| | | 205 (±43,39) | 2,2 | | |
| | Básico | 1832 (±796,9) | 89,2 | | |
| | | 5023 (±733,6) | 10,8 | | |
| | | | | | |
| 3,0 | Neutro | 1276 (±274,5) | 97,9 | 0,461 | -35,6 (±0,57) |
| | | 5577 (±586,8) | 1,0 | | |
| | | 68,11 (±11,85) | 1,1 | | |
| | Básico | 1785 (±860,5) | 100 | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

Observa-se significativa redução da intensidade de absorvância das TrpAuNP, além do deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$ para comprimentos de onda maiores, e alargamento da banda em pH elevado. Estas características também são indicadas nos resultados das análises de DLS: houve um intenso aumento do DH, com alto valor de desvio padrão, que pode ser proveniente da presença de partículas de formatos não-esféricos ou da sua agregação; o aumento da polidispersividade também foi observado em pH elevado. Os pHs neutro e básico aumentaram o valor de potencial zeta, conferindo carga negativa às partículas, resultante da desprotonação do grupo carboxila do triptofano em sua forma aniônica. Neste caso, após a alteração de pH $[\text{AuCl}(\text{OH})_3]^-$ e $[\text{Au}(\text{OH})_4]^-$ dominam a especiação, o que conduziu à formação de coloides maiores de ouro.

No estudo apresentado por Matos (MATOS, 2014), o autor relata a adição de NaOH após a redução das TrpAuNP, aumentando o valor de pH do meio, com o objetivo de melhorar a estabilidade das suspensões e evitar a reação com o polímero do tubo eppendorf, utilizado para seu armazenamento. Embora o autor não indique se houveram alterações nos espectros UV-vis após o ajuste, a razão molar L-Trp:HAuCl₄ utilizada foi de 5,48:1. Diante deste resultado, no presente estudo foi efetuada uma análise do comportamento dos espectros UV-vis de TrpAuNP preparadas com concentrações mais altas de L-triptofano, fixando a concentração de HAuCl₄ em 2mmol/L. Após a reação, o meio foi ajustado para neutro e básico com adição de NaOH. Observa-se que, quando se aumenta a concentração de L-triptofano para 9mmol/L e ajusta-se o pH para básico (pH = 10,05), obtém-se apenas uma pequena redução na intensidade de absorvância, em relação as TrpAuNP preparadas com a mesma concentração antes do ajuste, e não há alteração na posição do $\lambda_{\text{máx}}$ (figura 22). Análises de DLS indicam partículas com DH distribuídos em dois picos: 70,5% do volume com 72,4nm ($\pm 29,85$) e 29,5% com 415,5nm ($\pm 216,5$), sendo o segundo possivelmente atribuído a áreas com aglomerados de partículas ou partículas de formatos não esféricos. O PdI das TrpAuNP nestas condições foi de 0,358; e o potencial zeta -29,6mV ($\pm 1,67$). Imagens de MET (figura 23), apresentam partículas com diâmetros médios de 52nm, esféricas em maioria e com alguns aglomerados, justificando a assimetria da banda plasmônica. Após 24hs, o pH diminuiu e estabilizou-se em $\cong 7,63(\pm 1)$, portanto, o aumento da razão molar L-Trp/HAuCl₄ pode ser uma alternativa quando há a necessidade de soluções com pH próximo ao neutro.

Figura 22 - Espectro UV-vis das TrpAuNP com razão L-Trp:HAuCl₄ 4,5:1 (Diluídas à 20%).

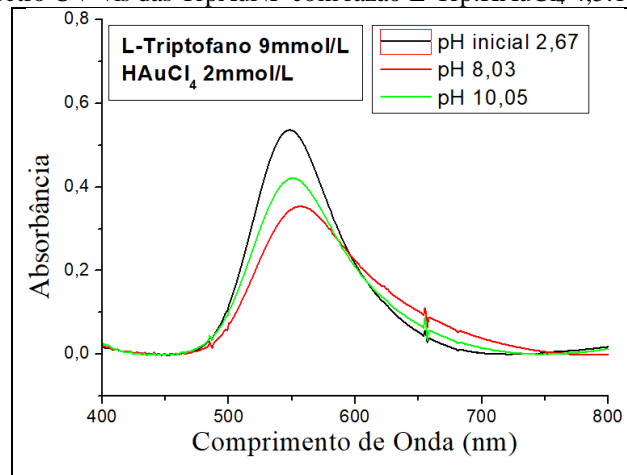
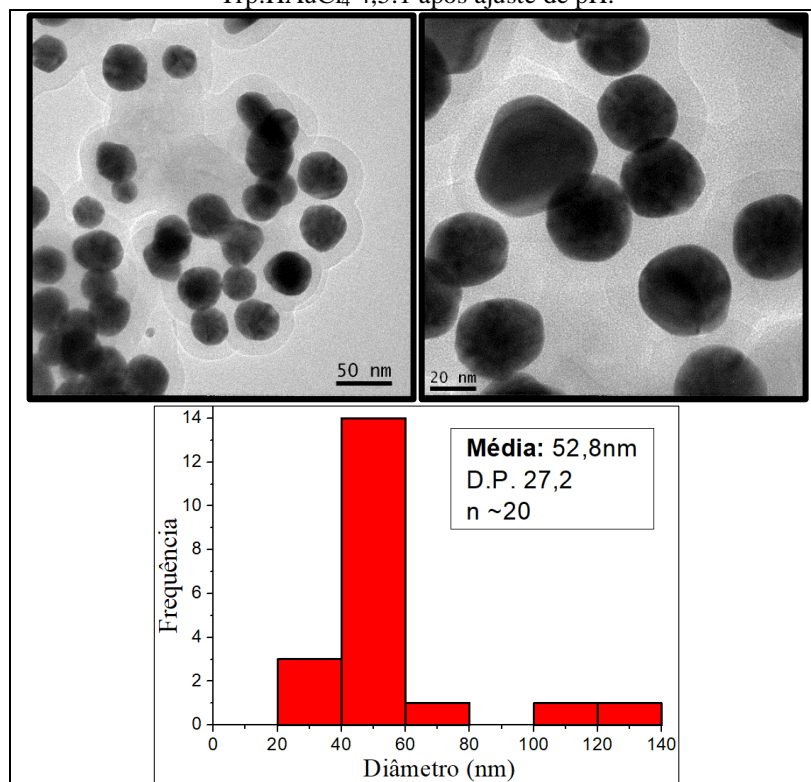
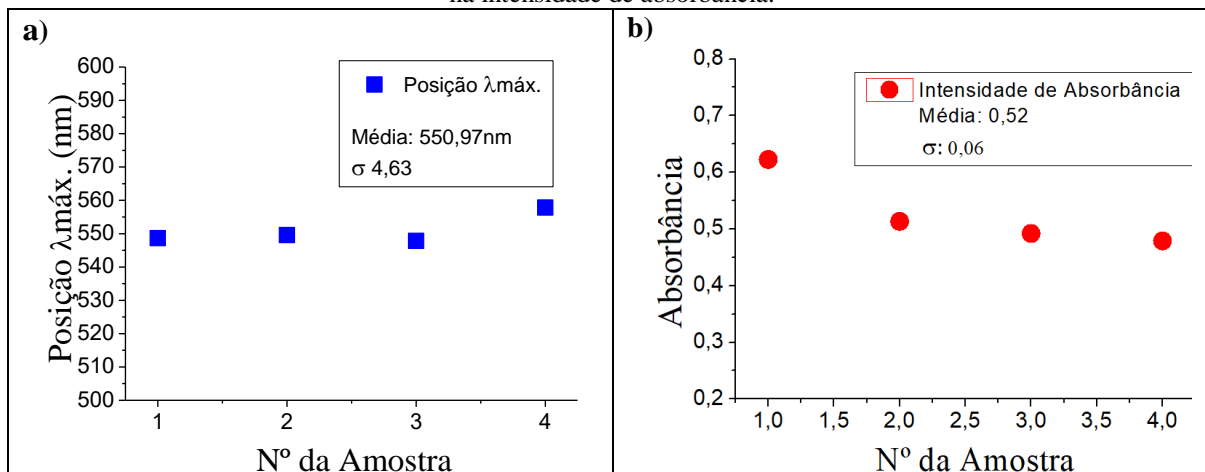


Figura 23 - Imagens MET e histograma de distribuição de tamanho das TrpAuNP com razão molar L-Trp:HAuCl₄ 4,5:1 após ajuste de pH.



A análise da reprodutibilidade do método ocorreu conforme descrito no item 3.2.6. Foram utilizadas 4 amostras de TrpAuNP, preparadas em diferentes momentos ao longo do desenvolvimento do projeto, utilizando as concentrações de L-Triptofano 3mmol/L e HAuCl₄ 2mmol/L. A variação de cerca de 1% na posição a banda (fig. 24 a) e 11% na intensidade de absorbância (fig 24 b) indicam que o método apresenta alta reprodutibilidade.

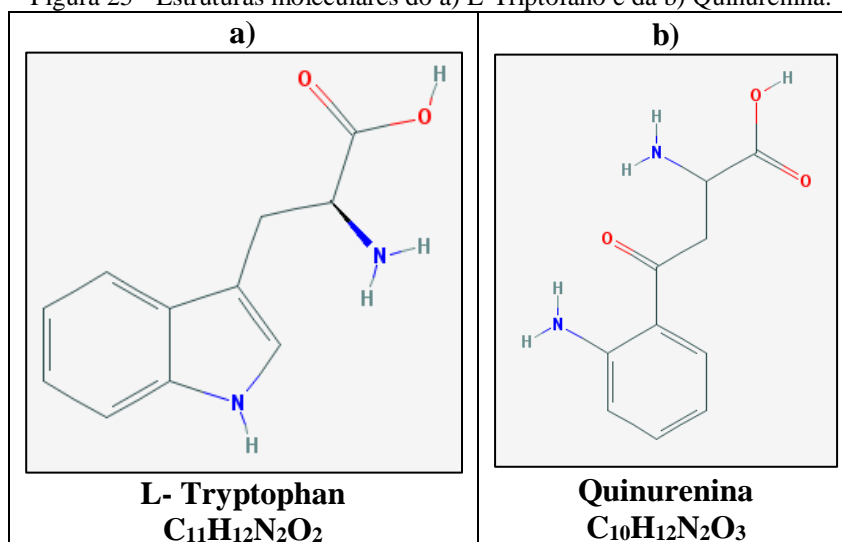
Figura 24 - Análise de reprodutibilidade das TrpAuNP. a) variação na posição da banda plasmônica; b) variação na intensidade de absorbância.



Quanto ao mecanismo de oxidação do triptofano para redução do ouro iônico, uma análise de estudos anteriores (MUKHA et al., 2016) onde foram utilizados procedimentos semelhantes foi necessária, na qual os autores relatam uma modificação na estrutura química do triptofano com a ligação da molécula à superfície do ouro pelo átomo de nitrogênio do grupo amina do radical indol.

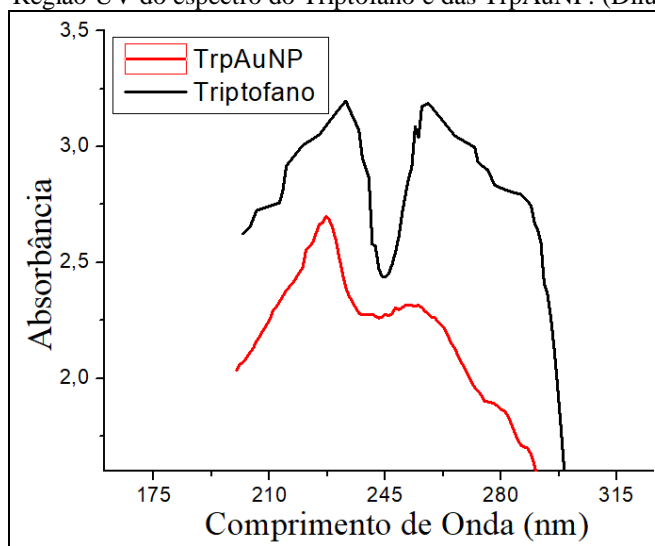
Foi proposto que a conversão do triptofano em um sistema TrpAu, passa pela via da quinurenina (figura 25), atribuindo esta conclusão, inicialmente, a alterações na banda de absorção do triptofano na região do UV após a reação: a absorção observada em comprimentos de onda de $\cong 270\text{nm}$, que surge devido à excitação de transição $\pi\text{-}\pi^*$ da parte indol da molécula, apresenta alterações, indicando a quebra de ligações no anel indol. O outro produto possível da oxidação do triptofano seria a serotonina, porém, esta mantém o anel indol na molécula, não havendo mudanças significativas no perfil de absorção. Através destes resultados e análises adicionais por outras técnicas de caracterização, o autor obteve espectros de massa dos sistemas TrpAu e de moléculas individuais de triptofano, na qual a análise dos dados permitiu confirmar que o mecanismo de conversão do triptofano ocorre pela via da quinurenina e que a oxidação mais completa se dá em meio ácido. Como já citado na introdução, Selvakannan e colaboradores (SELVAKANNAN et al., 2004b) observaram resultado semelhante na alteração da banda plasmônica do triptofano antes e após a formação de TrpAuNP e atribuíram a redução do ouro iônico por modificações no grupo indol.

Figura 25 - Estruturas moleculares do a) L-Triptofano e da b) Quinurenina.



Analisando a região entre 200 e 300nm do espectro de absorção das TrpAuNPs sintetizadas no presente estudo, e comparando-o com o espectro do triptofano, antes da reação, apresentados na figura 26, podemos observar comportamento semelhante ao relatado nos estudos citados, indicando que o mesmo mecanismo de oxidação do triptofano para redução do ouro iônico pode ser atribuído.

Figura 26 - Região UV do espectro do Triptofano e das TrpAuNP. (Diluídas à 20%).

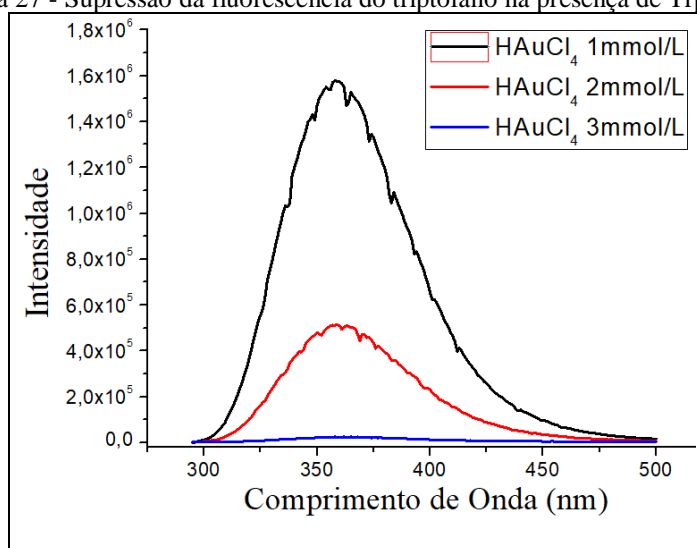


A análise de espectrofotometria de emissão, apresentada na figura 27, mostra a redução da fluorescência do triptofano (observada em comprimentos de onda ≈ 350 nm, excitando a amostra à 280nm), quando as TrpAuNP são formadas, indicando que neste processo há

alteração da estrutura do triptofano. Esta redução é mais pronunciada quando há aumento da concentração de HAuCl_4 .

Uma vez que a redução do Au^{3+} depende de três elétrons, e uma molécula de triptofano pode perder até quatro elétrons por oxidação direta pelo mecanismo proposto (MUKHA et al., 2016), há a necessidade de maiores concentrações do aminoácido em condições menos favoráveis para redução do ouro iônico.

Figura 27 - Supressão da fluorescência do triptofano na presença de TrpAuNP.



Na fig. 28 é apresentado o espectro no IR das TrpAuNP produzidas em comparação com o espectro do triptofano puro. São observadas as bandas típicas para os grupos carboxila (1664 cm^{-1} , 1413 cm^{-1}) e α -Amina (1592 cm^{-1} , 1450 cm^{-1}), bem como os modos atribuídos aos anéis de pirrol e benzeno (1461 cm^{-1} , $1357 - 700\text{ cm}^{-1}$) (PAJOVIĆ et al., 2015). Na presença das nanopartículas, há uma mudança nas bandas que pertencem a uma ampla faixa espectral entre 1150 e 800 cm^{-1} . Estas bandas originam-se principalmente dos modos de flexão C-H do grupo indol, mas também a partir das vibrações de alongamento do C-C e C-N no pirrol. A tabela 9 apresenta detalhes.

Figura 28 - Espectros FTIR do L-Triptofano e TrpAuNP.

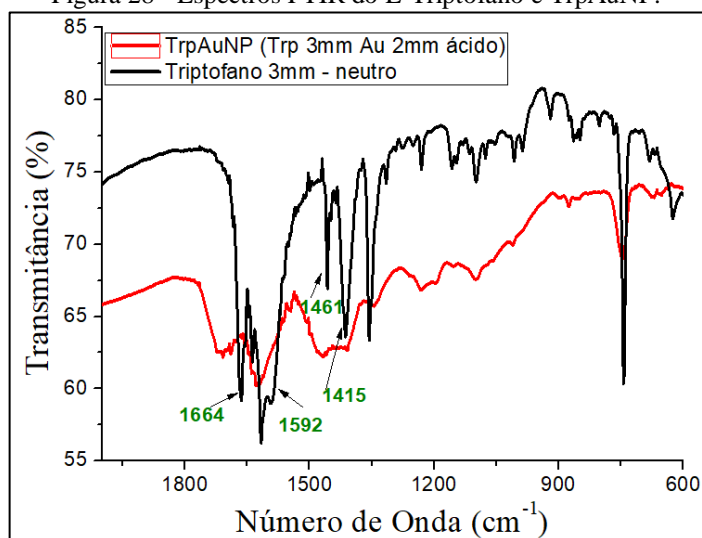


Tabela 9 - Bandas nos espectros FTIR do L-Triptofano e TrpAuNP.

| L-Triptofano | TrpAuNP | Modo |
|--------------|---------|--|
| 745 | 745 | $\beta\text{H}(\text{R})$ |
| 804 | * | βCOO^- , βCH_2 |
| 850 | * | $\beta\text{H}(\text{R})$ |
| 865 | 872 | βNH_3^+ , βNCC |
| 919 | * | βCH_2 |
| 987 | * | $\beta\text{H}(\text{R})$ |
| 1008 | 1006 | νCN , βNH_3^+ |
| 1099 | 1096 | $\beta\text{H}(\text{r})$ |
| 1159 | * | νCC |
| 1232 | 1232 | βCH , νR |
| 1317 | * | βCH_2 , νr |
| 1354 | 1350 | βCH |
| 1415 | 1413 | νsCOO^- |
| 1461 | 1461 | βsNH_3^+ |
| 1592 | 1592 | βasNH_3^+ |
| 1664 | 1664 | νasCOO^- |

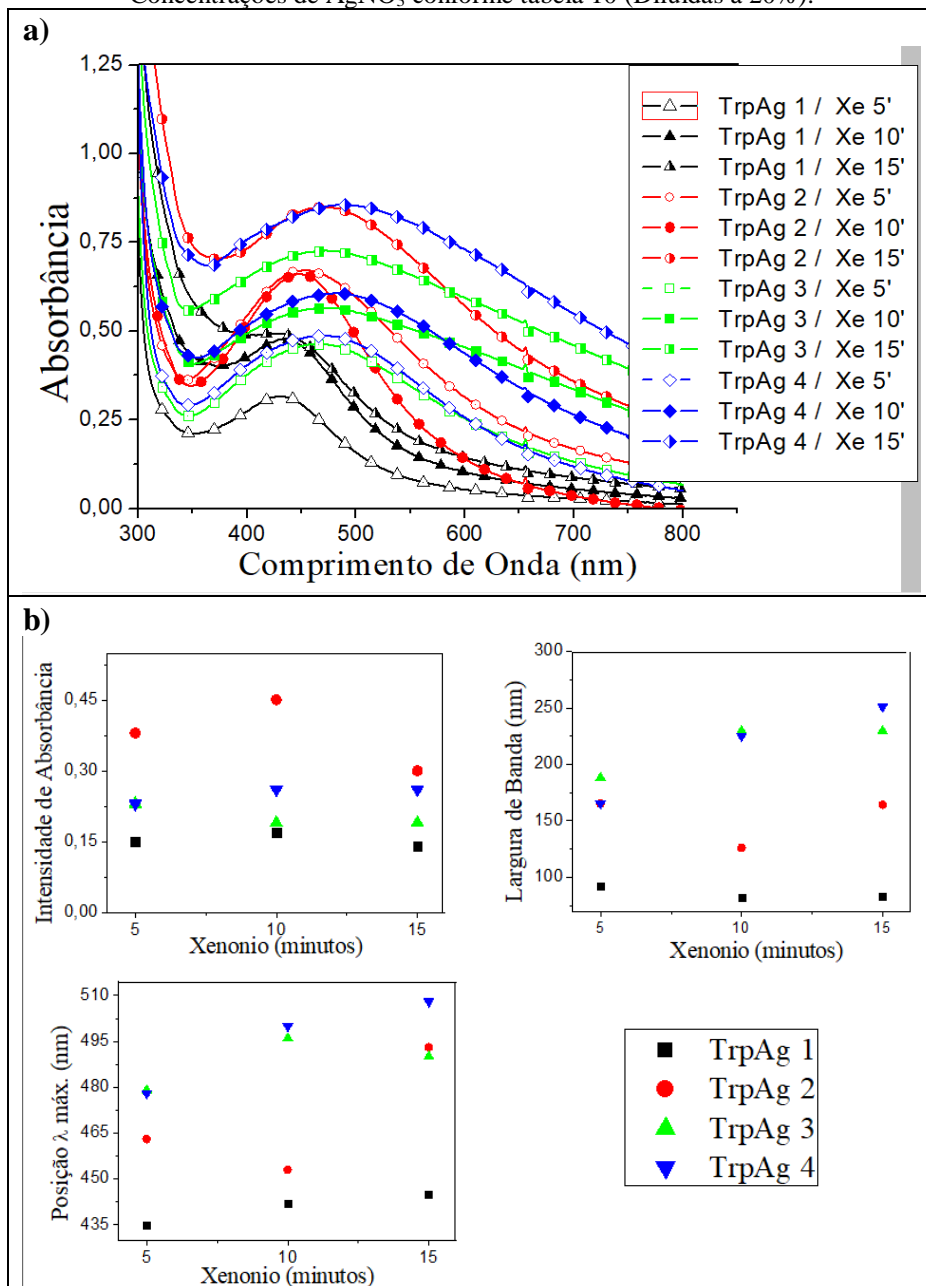
v: alongamento; β : flexão; s: deformação simétrica; as: deformação assimétrica; R: anel benzeno; r: anel pirrol; *, modo não observado. Adaptado de (PAJOVIĆ et al., 2015)

4.1.1.2 Nanopartículas de prata e L-Triptofano – TrpAgNP

Os espectros UV-vis das TrpAgNP são apresentados na figura 29 a. As soluções foram preparadas como descrito no item 3.1.3. Para facilitar a apresentação dos resultados, as amostras foram numeradas em ordem crescente, de acordo com a concentração de AgNO_3 utilizada, e estão sumarizadas na tabela 10.

Tabela 10 - Concentrações de AgNO_3 utilizadas no preparo das TrpAgNP.

| Nome | AgNO_3 (mmol/L) |
|---------|-----------------------------|
| TrpAg 1 | 0,3 ($\pm 0,01$) |
| TrpAg 2 | 0,5 ($\pm 0,01$) |
| TrpAg 3 | 1,0 ($\pm 0,01$) |
| TrpAg 4 | 2,0 ($\pm 0,01$) |

Figura 29 - a) Espectros UV-vis das TrpAgNP; b) Variações nas características das bandas plasmônicas. Concentrações de AgNO_3 conforme tabela 10 (Diluídas à 20%).

Pode ser observado nas figuras 29 a e b, que a suspensão nomeada TrpAgNP 2 (razão molar L-Trip:AgNO₃ 6:1), exposta à lâmpada de xenônio durante 10 minutos, apresenta maior intensidade de absorção; banda plasmônica mais simétrica; e com $\lambda_{\text{máx}}$ em menor comprimento de onda (com exceção da TrpAu 1), indicando que estas condições resultaram em uma suspensão mais homogênea, mais concentrada, e as partículas presentes estão entre as com menores diâmetros. Imagens de MET (figura 30 b), confirmaram que nestas condições, estão presentes nanopartículas de prata esféricas com diâmetros médios de $\cong 18,5\text{nm}$, com distribuição de tamanho apresentada no histograma na figura 31. Nas imagens das suspensões preparadas com as demais concentrações, também com tempo de iluminação de 10 minutos (figura 30 a, c e d), observa-se que as suspensões são mais polidispersas e com muitos aglomerados, principalmente nas com maiores concentrações do metal, assim como indicado pelas características de suas bandas plasmônicas. É possível observar também partículas de formatos não-esféricos, além de algumas estruturas formadas por aglomerados de partículas.

Figura 30 – MET das TrpAgNP iluminadas 10 minutos com diferentes concentrações de AgNO_3 (mmol/L). a)0,3; b)0,5; c) 1,0; d)2,0

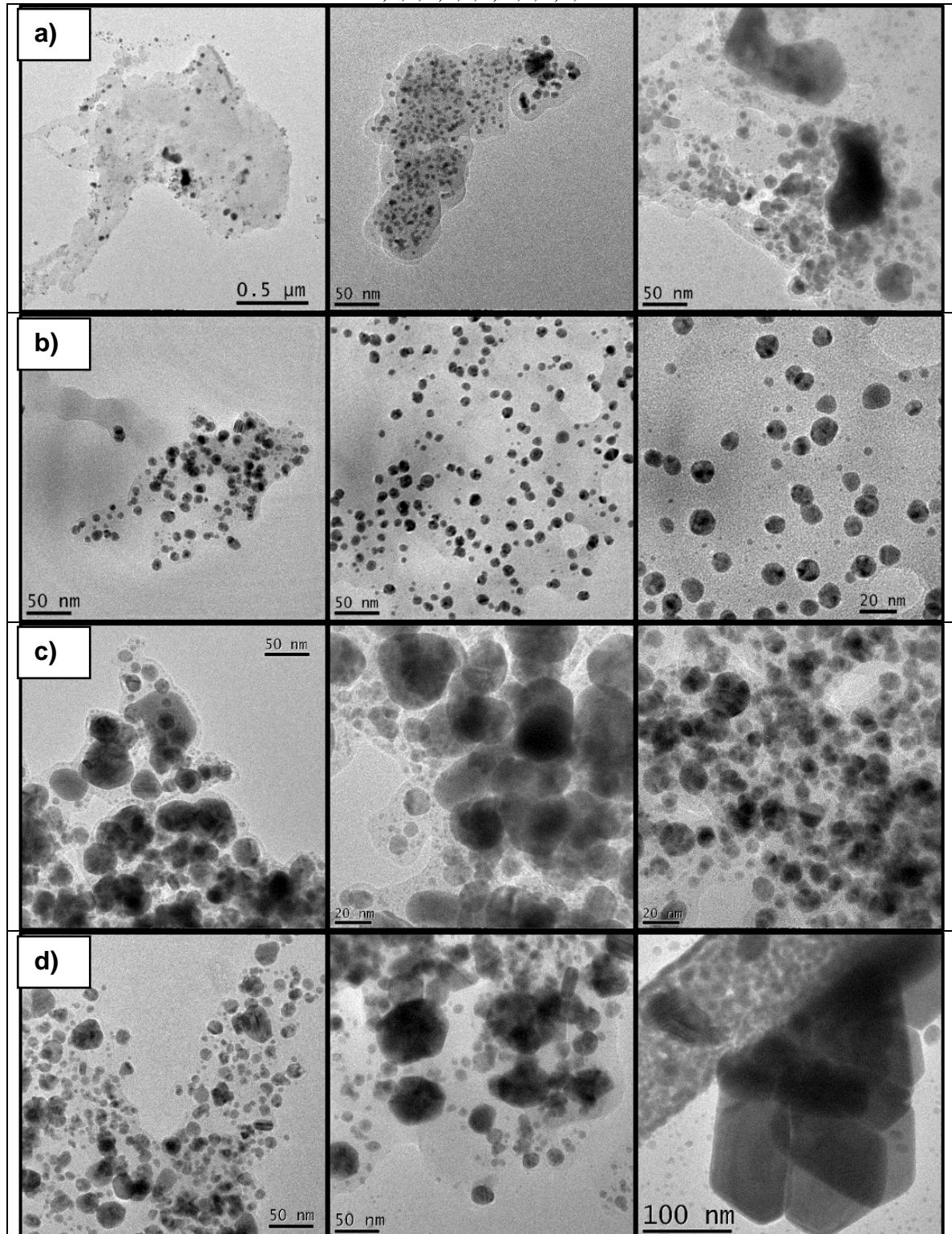
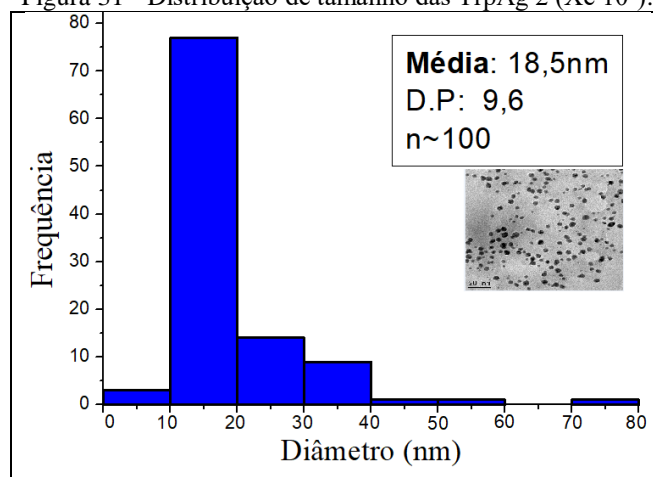


Figura 31 - Distribuição de tamanho das TrpAg 2 (Xe 10').



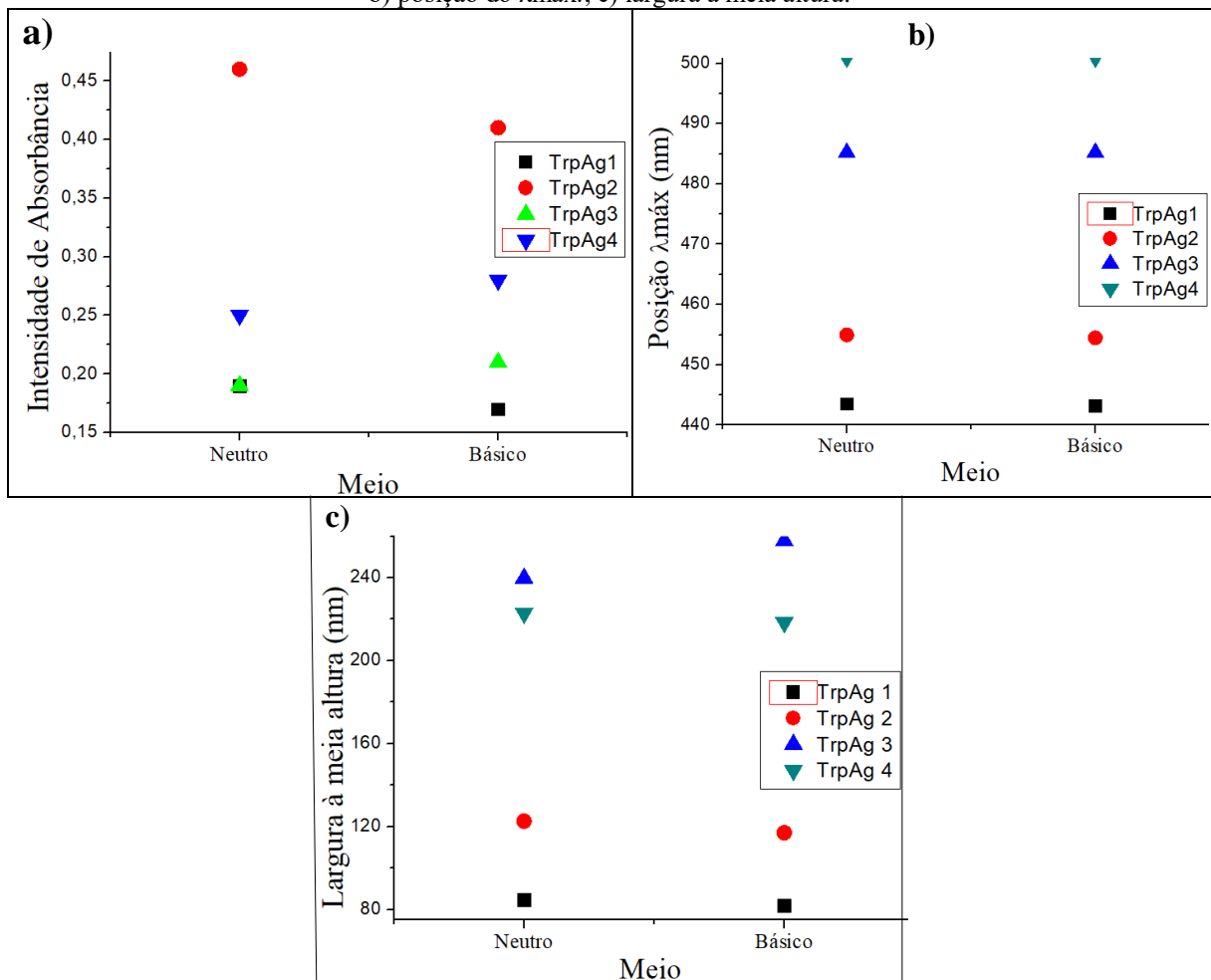
Assim como nas TrpAuNP, as soluções foram preparadas com o L-Triptofano em sua forma neutra ($\text{pH} \cong 7,5$). Ao adicionar o AgNO_3 e expor as soluções à luz, foram observadas pequenas alterações na acidez do meio, sendo que, o aumento na concentração de AgNO_3 levou a menores valores de pH, porém, com exceção da suspensão mais concentrada e com maior tempo de exposição, as demais mantiveram o valor de pH entre 6 e 7,5, ou seja, continuaram em sua forma neutra. A variação de pH observada após cada tempo de exposição à lâmpada está sumarizada na tabela 11.

Tabela 11 - Variação do pH das TrpAgNP após irradiação.

| Nome | Xenônio (minutos) | pH |
|--------|-------------------|------|
| TrpAg1 | 0 | 7,11 |
| | 5 | 7,46 |
| | 10 | 7,42 |
| | 15 | 7,53 |
| TrpAg2 | 0 | 6,77 |
| | 5 | 6,77 |
| | 10 | 7,37 |
| | 15 | 7,43 |
| TrpAg3 | 0 | 6,80 |
| | 5 | 5,98 |
| | 10 | 6,04 |
| | 15 | 6,32 |
| TrpAg4 | 0 | 6,25 |
| | 5 | 6,48 |
| | 10 | 5,20 |
| | 15 | 4,30 |

A possibilidade de sintetizar nanopartículas de prata com boa estabilidade em meio neutro favorece sua aplicação, entretanto, sabendo que a oxidação do triptofano é mais favorável em sua forma aniônica (HARRIMAN, 1987), um estudo do ajuste do pH, com adição de NaOH tornando o meio básico, antes e após a iluminação foi efetuado. Algumas alterações nos parâmetros das bandas plasmônicas foram observados, entretanto, estas não justificam a adição desta etapa ao processo, visto que em meio neutro já se observam resultados satisfatórios, e estas condições são favoráveis a uma maior variedade de aplicações. Já foi relatado que o número de coordenações do triptofano com a prata aumenta com o aumento do pH, partindo de uma solução ácida (pH=3,02) e estando saturado em pH 7,05 (YOU; ZHANG, 2008). Todos os espectros UV-vis obtidos nesta etapa encontram-se no apêndice B; a figura 32 apresenta as alterações observadas após o ajuste de pH, considerando diferentes parâmetros das bandas UV-vis das TrpAgNP, expostas a lâmpada de xenônio por 10 minutos.

Figura 32 -Variações nas TrpAgNP (Xe 10') em razão do pH. (Diluídas à 20%). a) Intensidade de absorbância; b) posição do $\lambda_{\text{máx}}$; c) largura à meia altura.



Não se observa a banda plasmônica característica das AgNP nas suspensões não expostas à lâmpada, mesmo após tornar o meio básico (apêndice B), indicando que para a formação de TrpAgNP nestas condições, é necessária a iluminação/aquecimento: a aplicação de um campo elétrico nas moléculas gera um momento dipolo, aumentando sua polarizabilidade que faz com que esta oxide mais facilmente, ou seja, tenha maior tendência a doar elétrons. Devido ao baixo potencial de redução de Ag^+ (0,8V), a luz é necessária para catalisar a reação redox entre o metal e o aminoácido aquecendo e fornecendo fótons à solução (MATOS, 2014).

Diante destes resultados, a suspensão coloidal nomeada TrpAg2, iluminada durante 10 minutos e em meio neutro (sem ajuste de pH), foi considerada ideal entre as condições testadas.

Análises de DLS foram efetuadas e quanto a distribuição de tamanho foram obtidos três picos que indicam diâmetros muito superiores aos observados na MET (figura 30 b). Estes valores estão apresentados na tabela 12.

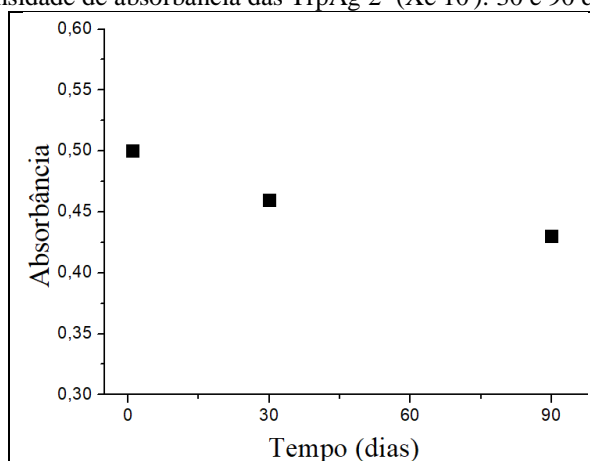
A discordância dos valores de tamanho obtidos com o DLS e com o TEM pode ser causada por dois fatores principais. O DLS é uma técnica que permite a determinação indireta do raio hidrodinâmico das partículas em suspensão. Portanto, caso haja agregados de nanopartículas se difundindo no fluido, eles serão detectados como sendo uma única partícula maior. Outra possível razão para essa diferença, é que a intensidade do espalhamento Rayleigh por uma partícula esférica é proporcional ao seu diâmetro na sexta potência. Assim, o DLS detectará a influência das partículas maiores com uma intensidade bem elevada, revelando uma distribuição na qual há uma maior frequência relativa de partículas grandes.

Tabela 12 - Resultados de DLS e Potencial Zeta das TrpAg 2 Xe 10¹.

| Diâmetro Hidrodinâmico (nm) | Vol. (%) | PdI | Potencial Zeta (mV) |
|-----------------------------|----------|-------|---------------------|
| 1288 ($\pm 437,4$) | 93,4 | | |
| 237,7 ($\pm 78,26$) | 5,2 | 0,504 | -27,6 ($\pm 0,5$) |
| 5201 ($\pm 724,2$) | 1,4 | | |

O potencial zeta próximo à 30mV (tabela 12) indica uma suspensão com boa estabilidade. Análises dos espectros UV-vis obtidos 90 dias após a síntese confirmam este resultado, visto a redução na intensidade de absorvância 90 dias após a síntese foi de apenas 14%, indicado na figura 33.

Figura 33 - Intensidade de absorbância das TrpAg 2 (Xe 10'). 30 e 90 dias após a síntese.



No estudo publicado por Matos (MATOS, 2014), são definidas como condições ótimas para a síntese de TrpAgNP, concentrações iguais de L-Triptofano e AgNO₃ (2mmol/L), com 2 minutos de exposição à lâmpada de xenônio, entretanto, relata que TrpAgNP são formadas a partir de 30 segundos.

Com base na distribuição de Boltzmann, que relaciona a energia média de moléculas em um meio com a temperatura, através da equação 15:

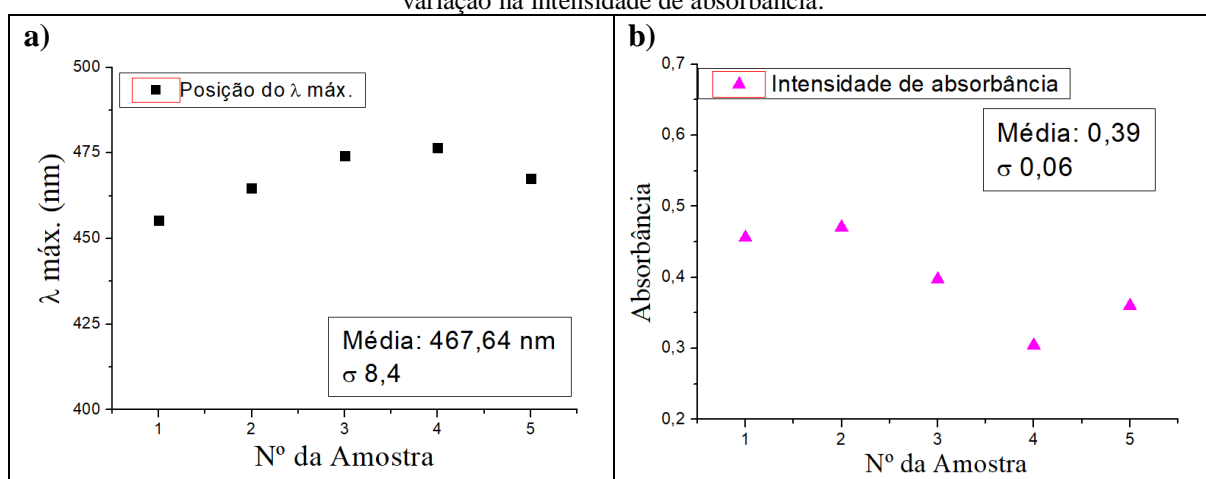
$$E = k \cdot T \quad (15)$$

em que E é a energia (J); k é a constante de Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K) e T é a temperatura (K), o autor concluiu que a energia das moléculas na temperatura do meio após 30 segundos de exposição à lâmpada é de $4,181 \cdot 10^{-21}$ J, ou seja, é a energia mínima necessária para facilitar a formação de dipolo e população dos níveis energéticos superiores do triptofano, levando a sua oxidação e formação das nanopartículas. Através de uma curva criada com a variação de temperatura e energia convertida para as moléculas, com aumento do tempo de iluminação, o autor conclui, também, que a iluminação aplicada não é linearmente convertida em energia para as moléculas, resultado da diminuição da concentração de aminoácido no meio (menor absorção de fótons). No tempo definido pelo autor como ideal (2 min.), esta energia é de $4,457 \cdot 10^{-21}$ J.

No presente estudo, a concentração de reagentes utilizada foi diferente, podendo influenciar na variação de temperatura, logo, o mesmo cálculo foi aplicado e a energia das moléculas após 10 minutos de exposição à lâmpada foi de $4,653 \cdot 10^{-21}$ J, próxima a encontrada pelo autor nas condições consideradas ideais.

A análise de reprodutibilidade (conforme item 3.2.6), indica que de acordo com as características das bandas plasmônicas de 5 amostras de TrpAg 2 Xe 10', partículas de tamanhos semelhantes foram obtidas, devido a variação de cerca de apenas 2% na posição do λ máximo (fig 34 a), entretanto, a variação na intensidade de absorbância mostra que a concentração de TrpAgNP obtida foi menor em algumas amostras (fig. 34 b).

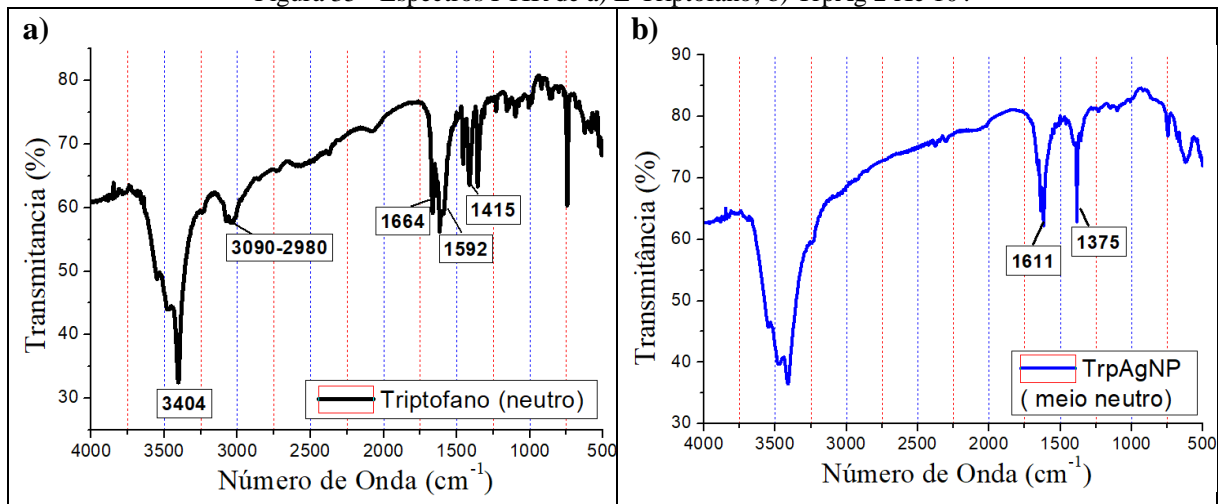
Figura 34 - Análise de reprodutibilidade das TrpAg2 Xe 10'. a) variação na posição da banda plasmônica; b) variação na intensidade de absorbância.



Espectros de infravermelho do L-Triptofano (figura 35 A), e das TrpAg 2 Xe 10' (figura 35 B), foram analisados para identificar grupos funcionais envolvidos nos processos de síntese.

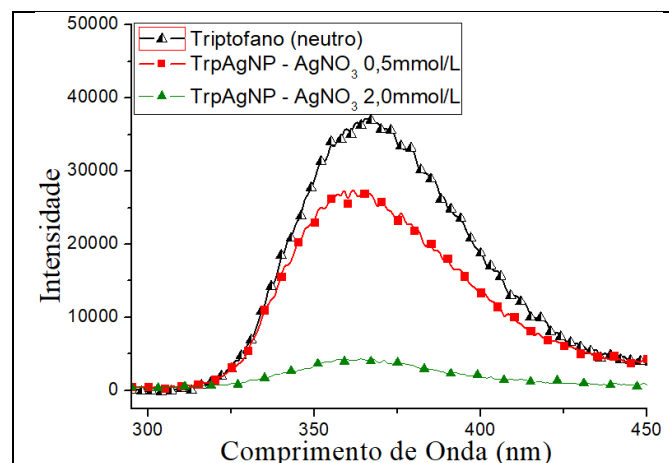
No L-Triptofano, observa-se a presença de uma banda forte em 3404cm^{-1} e duas bandas entre 3090 e 2980cm^{-1} , correspondentes respectivamente ao modo de vibração N-H do anel indol ao alongamento simétrico e assimétrico do grupo amina. A deformação angular do grupo NH_3^+ foi observada em 1592cm^{-1} e as bandas correspondentes ao alongamento simétrico e assimétrico do grupo COO^- livre em 1664 e 1415cm^{-1} . No espectro das TrpAgNP as bandas atribuídas ao alongamento simétrico e assimétrico do grupo amina não são observadas, assim como houve um deslocamento nos modos de alongamento do grupo COO^- , indicando que há uma coordenação destes grupos funcionais com a Ag^+ . Resultado semelhante já foi reportado (BIAN et al., 2013), onde com base nos resultados de FTIR e RMN o autor sugere a complexação do triptofano com a prata através de um dos átomos de oxigênio do grupo carboxila e o átomo de nitrogênio do grupo amina.

Figura 35 - Espectros FTIR de a) L-Triptofano; b) TrpAg 2 Xe 10'.



Os espectros de emissão (figura 36), mostram a redução da fluorescência do triptofano na presença das TrpAgNP (exc. 280nm), indicando que neste processo há consumo/modificação do aminoácido. A supressão da fluorescência é mais pronunciada nas suspensões com maiores concentrações de AgNO_3 , sendo possível observar também, um deslocamento da banda de emissão para comprimentos de onda menores. Zhang e colaboradores (YOU; ZHANG, 2008) também relataram o deslocamento para o azul e a supressão da fluorescência do triptofano ao formar um complexo com a prata, concluindo que a coordenação ocorre através do átomo de nitrogênio do anel indol do aminoácido, pois sua modificação resulta na redução da fluorescência, o que não ocorreria se a coordenação envolvesse apenas os grupos carboxila e amina. Outros estudos (MUKHA et al., 2016; SELVAKANNAN et al., 2004b) também reportaram a modificação do triptofano para formação de um sistema Trp-Ag onde a conversão do aminoácido em tal sistema passa pela via da quinurenina.

Figura 36 – Espectros de emissão das TrpAgNP.



4.1.1.3 Discussão

A formação de nanopartículas foi possível por um processo redox, na qual o triptofano oxida na presença do metal iônico e luz/aquecimento, reduzindo Au^{3+} em Au^0 e Ag^+ em Ag^0 , formando átomos neutros. Estes átomos colidem e formam um núcleo estável (processo de nucleação), seguido pelo crescimento, onde mais átomos colidem e formam partículas maiores, que se estabiliza com o esgotamento dos íons metálicos na solução, ou pelo recobrimento das partículas.

A redução do íon metálico, ocorre através da doação de elétrons pela espécie oxidada, sendo que cada espécie química apresenta um potencial de redução próprio, ou seja, uma tendência maior ou menor de receber estes elétrons. Quanto maior o potencial de redução, maior é a tendência da espécie em ganhar elétrons (reduzir). No caso do ouro e prata, o Au^{3+} tem um alto potencial de redução (1,5V), enquanto na Ag^+ este potencial não é muito alto (0,8V), o que justifica a necessidade de exposição à lâmpada de Xenônio para a formação das TrpAgNP, por um processo de redução fotoinduzida. A ampla faixa de emissão da lâmpada de xenônio aquece a solução, e possibilita alterações nos níveis energéticos do triptofano, levando a uma maior polarizabilidade, mesmo que momentânea. Uma maior polarizabilidade está diretamente relacionada com a tendência da espécie em doar elétrons, ou seja, oxidar. Entretanto, como já relatado em estudos anteriores, o prolongamento do tempo de exposição das suspensões à lâmpada com consequente aumento de temperatura e de energia das moléculas, pode levar à sua agregação ou a formação de partículas maiores (MATOS, 2014).

Quanto a concentração do precursor metálico, resultados inversos são observados de acordo com a espécie metálica utilizada: concentrações mais altas melhoram as características das nanopartículas de ouro, enquanto nas de prata, embora mais nanopartículas sejam formadas, o aumento da concentração do sal metálico resulta em sua aglomeração.

Como já relatado, o triptofano pode ionizar em meio ácido ou básico, entretanto, o ouro iônico tem maior tendência a reduzir em pH baixo, e a presença de íons Na^+ pode levar a aglomeração das partículas, quando se utiliza um redutor fraco como o triptofano (WANG et al., 2009; YOU; ZHANG, 2008). Os íons H^+ liberados no meio pela hidrólise do HAuCl_4 e pela oxidação do triptofano na presença do íon metálico, resultam na acidificação da solução e na redução quase imediata dos íons Au^{3+} em Au^0 , com formação das TrpAuNP. Este resultado é bastante satisfatório, uma vez que é possível obter nanopartículas de ouro esféricas, estáveis por mais de 90 dias, por um processo que envolve apenas uma etapa e em tempo muito reduzido. Por outro lado, soluções ácidas restringem as aplicações do nanomaterial. Como alternativa,

aumentou-se a razão molar L-Trp:HAuCl₄ para 4,5:1 (L-Trp.9,0/HAuCl₄ 2 mmol/L), permitindo elevar o pH para valores próximos ao neutro, sem prejuízo da estabilidade da suspensão.

Quando a espécie metálica utilizada é a prata, estudos anteriores indicam que a redução é mais favorável com o triptofano em sua forma aniônica, entretanto, os processos relatados dependem de longos períodos de aquecimento, adição de outros redutores químicos, ou envolvem várias etapas (CARVALHO et al., 2013; MUKHA et al., 2016). Diferentemente do observado com as TrpAuNP, a oxidação do triptofano, neste caso, não resulta na acidificação da solução, apenas quando se aumenta a concentração do metal, porém menos pronunciada. A adição de NaOH tornando o meio básico, resultou em poucas alterações nas bandas plasmônicas, e os resultados satisfatórios obtidos em meio neutro, com formação de nanopartículas esféricas com estabilidade de cerca de 90 dias e alta monodispersividade, indicam que o ajuste de pH neste caso é dispensável.

As alterações nas bandas de absorção na região do UV do triptofano, além da supressão da fluorescência do aminoácido após a formação das TrpAgNP e TrpAuNP, indicam que nos dois casos há modificação na sua estrutura química, mais especificamente no anel indol, região portadora de elétrons. A supressão da fluorescência é mais pronunciada na formação de TrpAuNP, uma vez que este depende de três elétrons para ser reduzido enquanto a Ag⁺, apenas um.

De modo geral, considera-se que este objetivo foi atingido de forma bastante satisfatória, visto que foi possível sintetizar nanopartículas esféricas em maioria, com alta estabilidade e monodispersividade, através de processos rápidos, simples, de baixo custo e com bom rendimento.

O L-Triptofano foi mais eficiente na síntese de nanopartículas de ouro, uma vez que a reação foi imediata sem necessidade de exposição à lâmpada de xenônio.

A tabela 13 sumariza as condições de síntese consideradas ideais entre as testadas neste processo e as principais características das TrpAuNP e TrpAgNP obtidas.

Tabela 13 - Condições ideais para síntese de TrpAuNP e TrpAgNP e suas principais características.

| | Sal metá. (mmol/L) | L-Trip. (mmol/L) | Meio | Xe. (min) | Diâmetro Médio (nm) | PdI | Potencial Zeta (mV) |
|---------|-----------------------|---------------------|--------|--------------|------------------------|-------|------------------------|
| TrpAuNP | 2,0 | 3,0 | Ácido | 0 | 44,3(±6,7) | 0,177 | +22,5 |
| TrpAgNP | 0,5 | 3,0 | Neutro | 10 | 18,5(±9,6) | 0,504 | -27,6 |

4.1.2 Síntese de Nanopartículas de Prata (McAgNP) e Ouro (McAuNP) Através do Extrato Aquoso de Folhas de *Mimusops coriacea* (A. de Candolle) Miq.

4.1.2.1 Nanopartículas de prata e extrato de *Mimusops coriacea*– McAgNP

A primeira etapa do estudo nas variações das condições de síntese através do extrato de *Mimusops coriacea*, se trata da análise da concentração do AgNO_3 . O preparo foi efetuado como descrito no item 3.1.4.

Observou-se o início da mudança de cor das soluções após aproximadamente 10 minutos, passando de amarelo-esverdeado claro do extrato (figura 37 a) para colorações entre amarelo translúcido a marrom escuro (figura 37 b), sendo mais intensa em maiores concentrações de AgNO_3 . As análises de espectrofotometria UV-vis comprovaram a presença de nanopartículas prata a partir da concentração de AgNO_3 1mmol/L (figura 38), devido a presença de banda plasmônica em $\lambda \approx 420\text{nm}$. A absorvância tornou-se mais intensa com o aumento da concentração do metal na solução, saturando em 2mmol/L, uma vez que pouca alteração foi observada com o aumento da concentração. A variação da intensidade de absorvância em razão do tempo de reação foi analisada: a reação se inicia imediatamente com expressivo crescimento até 30 minutos, continuando em crescimento mais lento até 60 minutos quando parece estabilizar-se (figura 39).

Figura 37 - Coloração das soluções em razão da concentração de AgNO_3 . a) Extrato (5,0g) antes da reação. B) Após 60 minutos de reação. Da esquerda para a direita, maior concentração de AgNO_3 .

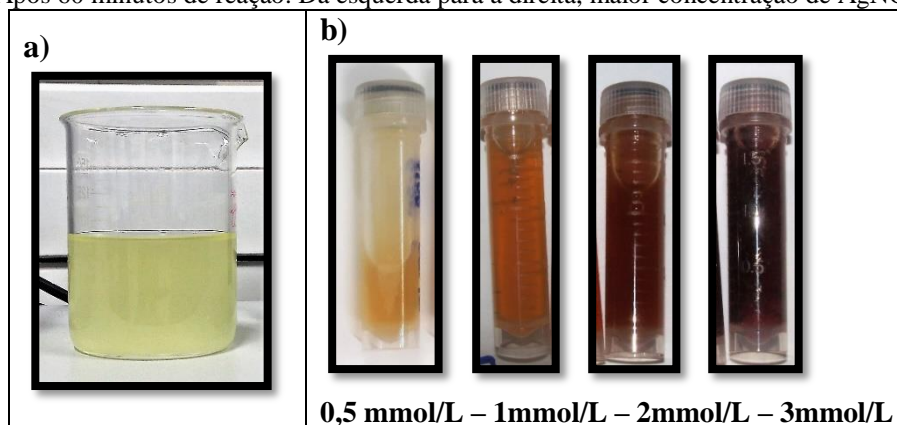


Figura 38 - Espectros UV-vis das McAgNP em razão da concentração de AgNO_3 (mmol/L). (Diluídas a 5%).

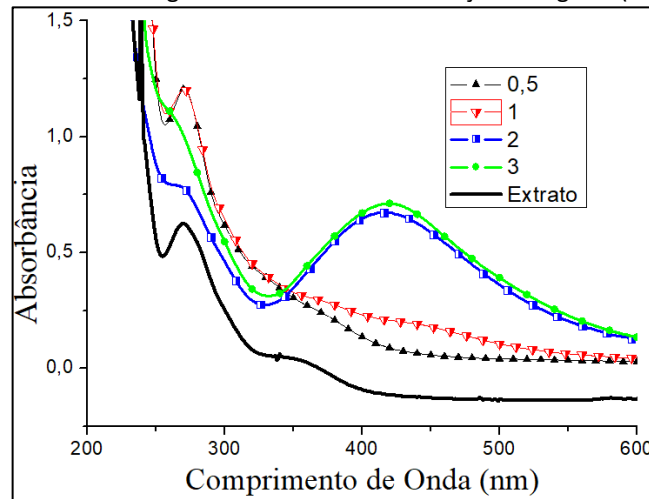
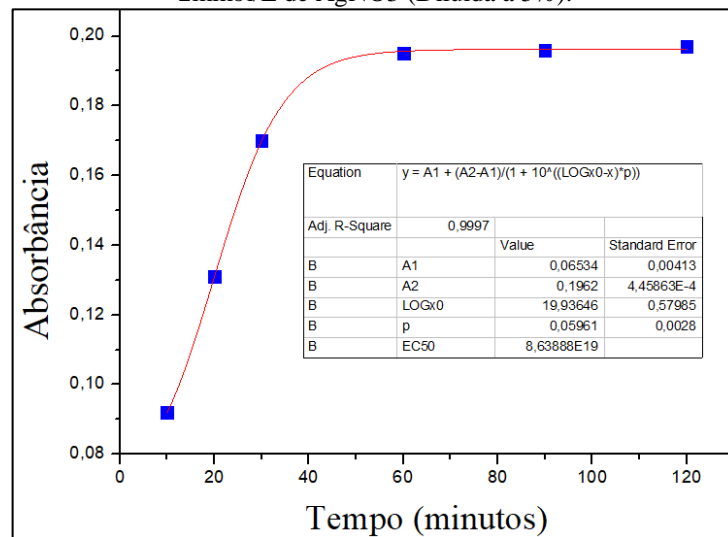


Figura 39 - Curva de intensidade de absorbância em razão do tempo de reação da suspensão preparada com 2mmol/L de AgNO_3 (Diluída a 5%).



Os dados foram ajustados através de uma curva de crescimento pela equação 16:

$$y = A1 + (A2 - A1) / (1 + 10^{((\text{LOG}x0 - x) * p)}) \quad (16)$$

Onde $\text{LOG}x0$ é o valor de concentração quando a resposta está a meio caminho entre parte inferior e superior.

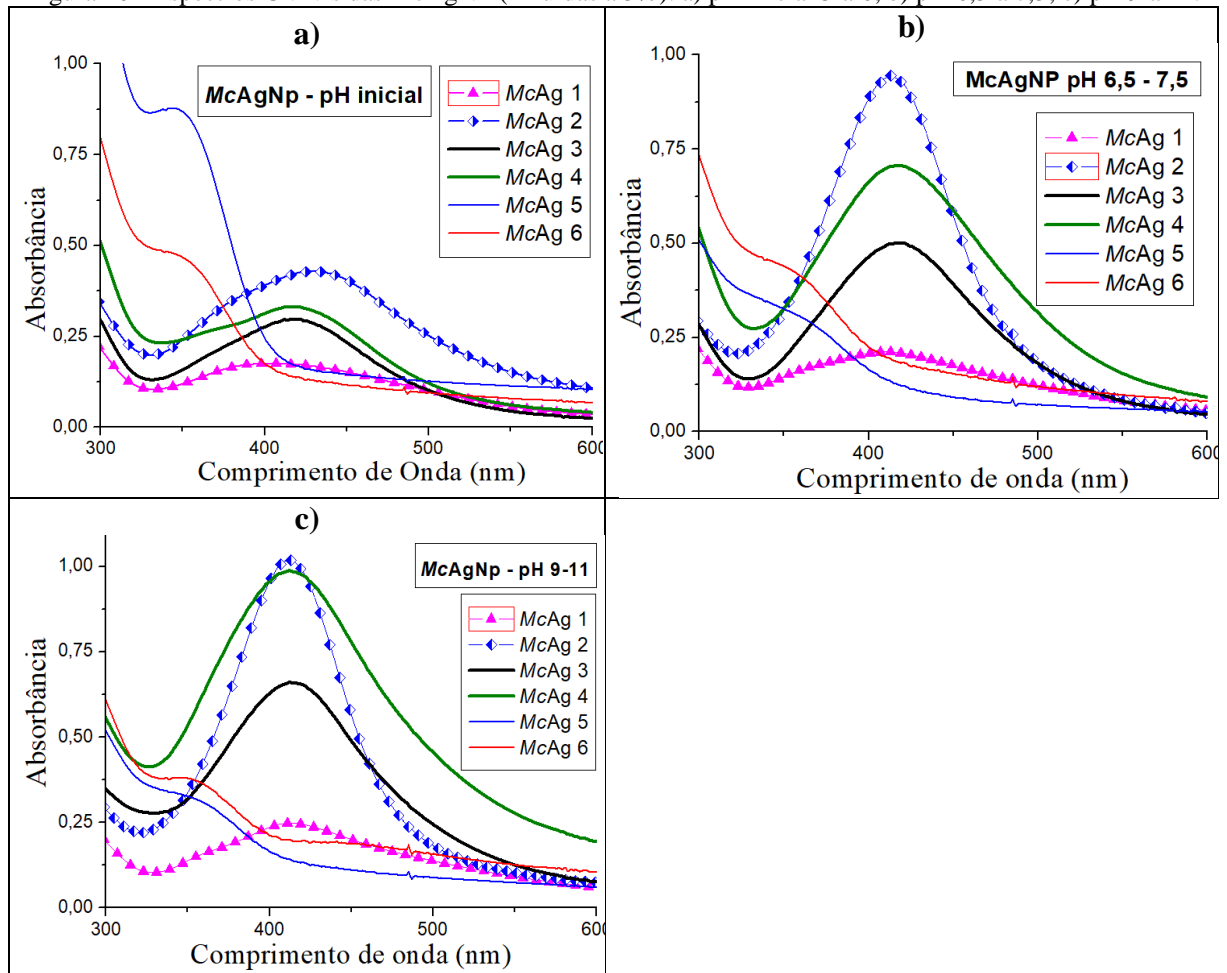
O extrato apresenta $\text{pH} \cong 6,5$, após a reação com o AgNO_3 a solução torna-se levemente ácida. Antes de cada medida de espectrofotometria UV-vis da etapa seguinte, o pH das suspensões foi ajustado pela adição de NaOH, para valores próximos ao neutro ($6,5 \leq \text{pH} \leq 7,5$), e básico ($9,5 \leq \text{pH} \leq 11$). Para melhor visualizar os resultados, as suspensões foram numeradas de

acordo com volume do material vegetal e concentração do AgNO_3 , e estão sumarizadas na tabela 14, com seus respectivos valores de pH antes e após cada ajuste. As figuras 40 a, b e c apresentam os espectros UV-vis antes e após cada ajuste de pH respectivamente.

Tabela 14 - Variações no preparo das McAgNP.

| Nome | Folhas de <i>M.c.</i> (mg/mL) ($\pm 2\text{mg}$) | AgNO_3 (mmol/L) | pH inicial ($\pm 0,1$) | pH ajuste 1 ($\pm 0,1$) | pH ajuste 2 ($\pm 0,1$) |
|--------|--|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| McAg 1 | 25 | 1 | 5,83 | 6,92 | 10,10 |
| McAg 2 | 25 | 2 | 5,90 | 7,45 | 10,21 |
| McAg 3 | 50 | 1 | 5,40 | 7,39 | 9,80 |
| McAg 4 | 50 | 2 | 5,05 | 6,78 | 10,76 |
| McAg 5 | 100 | 1 | 5,30 | 7,16 | 9,87 |
| McAg 6 | 100 | 2 | 5,32 | 6,99 | 10,54 |

Figura 40 - Espectros UV-vis das McAgNP (Diluídas a 5%). a) pH inicial 5 a 6; b) pH 6,5 a 7,5; c) pH 9 a 11.



No geral, observa-se aumento significativo na intensidade de absorvância das TrpAgNP após o ajuste de pH, além de um pequeno deslocamento para o azul do $\lambda_{\text{máx}}$ e estreitamento da banda. Pouca diferença foi observada entre as suspensões em pH neutro e básico, entretanto, 24hs após o ajuste, houve uma redução no pH das suspensões ajustadas para $\text{pH} \geq 9,5$, possivelmente pela liberação de íons H^+ no meio durante o processo de oxidação de compostos presentes no extrato. O pH final destas soluções em média foi de 7,6 ($\pm 0,3$). Esta redução de pH não foi observada nas suspensões com pH ajustado entre 6,5 e 7,5.

Observa-se que extratos preparados com menor volume de material vegetal são favoráveis, visto que os melhores resultados foram obtidos desta forma e, ao aumentar a concentração do extrato para 100mg/mL, não se observa a banda plasmônica característica das nanopartículas de prata. Em contrapartida, o aumento da concentração de AgNO_3 na solução leva a suspensões coloidais mais concentradas.

Em estudos anteriores, sobre a síntese de AgNPs com extratos vegetais, foi relatado que menores razões extrato/prata favorecem a reação, além de indicar o ajuste de pH como fator determinante para redução dos íons metálicos, para o controle de tamanho e estabilidade das nanopartículas, sendo que a maioria dos relatos indica o pH neutro ou levemente básico como ideal (MASHWANI et al., 2015b; RAJESHKUMAR; BHARATH, 2017). Diante destas afirmações e dos resultados observados experimentalmente, a suspensão nomeada como McAg2 foi selecionada para as etapas seguintes de caracterização.

Foram analisadas as variações na intensidade de absorvância em razão do aumento do pH (figura 41 a e b), na qual observou-se intenso aumento após o primeiro ajuste (51%), seguido por um aumento menos pronunciado nos pHs 9,1(15%) e 10,7 (9%), onde ocorre uma saturação.

Assim como relatado anteriormente, o pH das suspensões 24hs após o ajuste, apresenta valores menores, estabilizando-se em $\text{pH} \cong 7,5$. Efetuou-se então, uma nova análise, desta vez ajustando o pH da suspensão para $\cong 7,5$ logo após a adição do AgNO_3 ao extrato, observando as alterações na intensidade de absorvância em razão do tempo de reação (figura 41 c e d). A reação inicia-se tão logo o pH é ajustado, com um aumento de 21% após 30 minutos, onde estabiliza-se e apresenta um pequeno aumento após 24hs (8%), mantendo-se estável.

Análises de DLS apresentadas na tabela 15 indicam que a suspensão McAg 2 ($\text{pH} \cong 7,5$), tem monodispersividade alta, entretanto, conta com alguns aglomerados. Os valores de potencial zeta próximos a -30mV indicam boa estabilidade e carga superficial negativa, levando à repulsão eletrostática das partículas. A estabilidade das McAgNP pôde ser comprovada através de espectros UV-vis (figura 42), que apresentam apenas uma discreta redução na

intensidade de absorvância (8%) e leve alargamento na banda plasmônica (20%) mesmo 180 dias após o preparo. Imagens de MET (figura 43) confirmam a presença de nanopartículas esféricas em sua maioria, com diâmetros médios de 15nm.

Figura 41 - Espectros UV-Vis e curva de intensidade de absorvância das McAg 2 (diluídas a 5%). a) e b) em razão do pH; c) e d) em razão do tempo de reação.

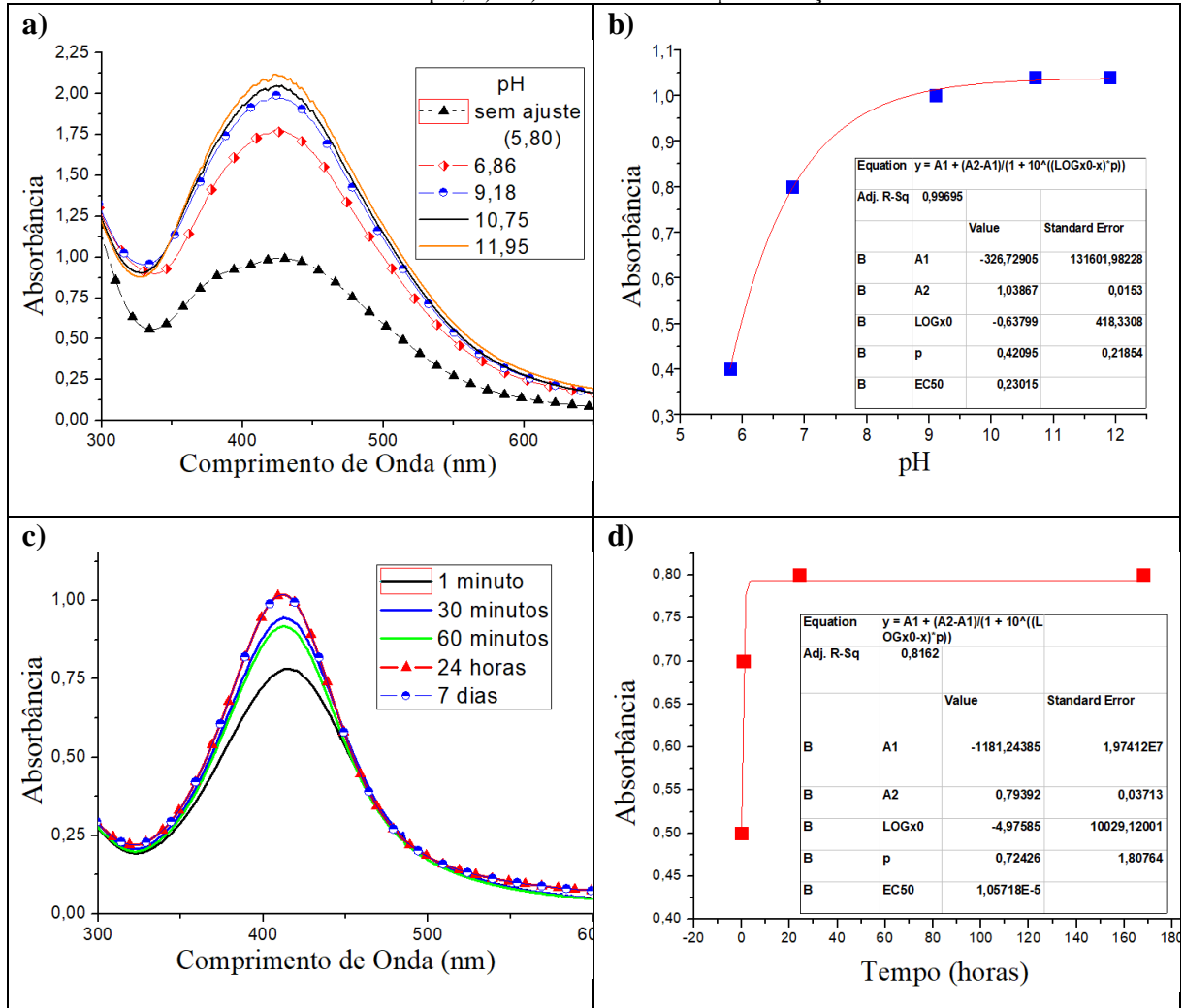


Tabela 15 - Resultado das análises de DLS da McAg 2 (pH ~7,5).

| Diâmetro Hidrodinâmico (nm) | Vol. (%) | PdI | Potencial Zeta (mV) |
|-----------------------------|----------|-------|---------------------|
| 95,89 (±59,42) | 59,7 | | |
| 1230 (±395,0) | 6,7 | 0,239 | -28,0 (±0,43) |
| 27,53 (±5,45) | 33,0 | | |

Figura 42 – Espectros UV-vis das McAg 2 pH ~7,5 – após 90 e 180 dias. (Diluídas 5%).

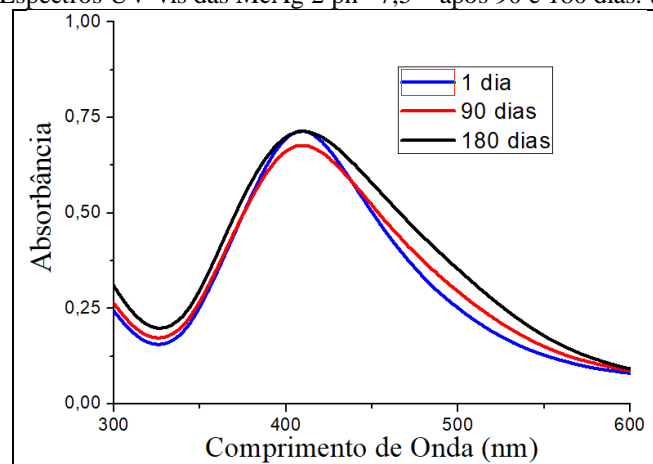
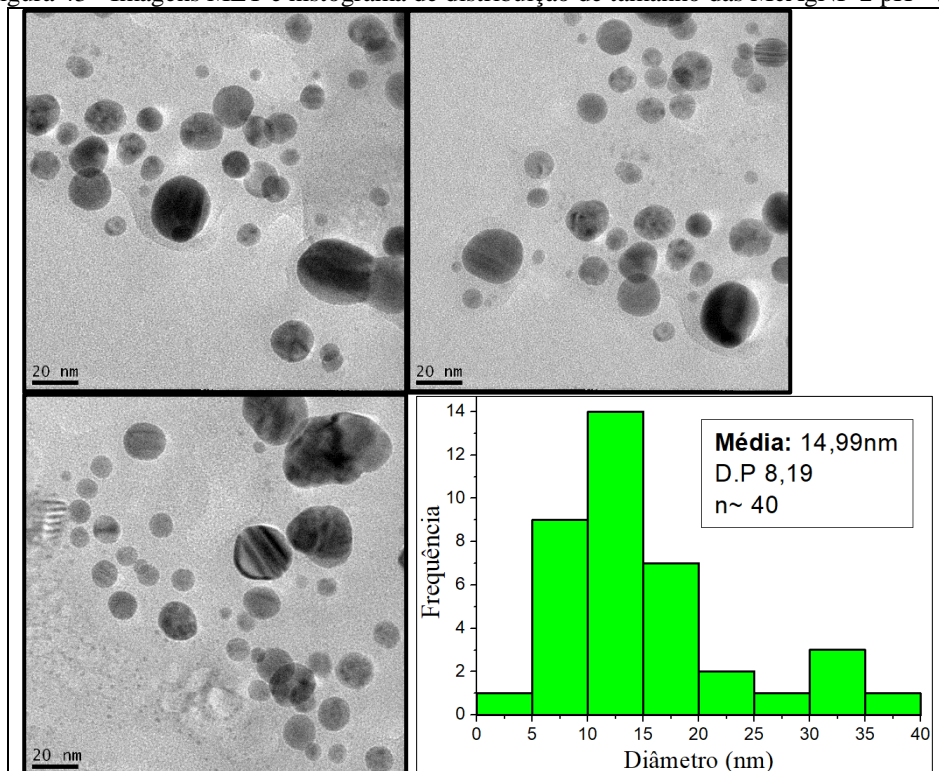
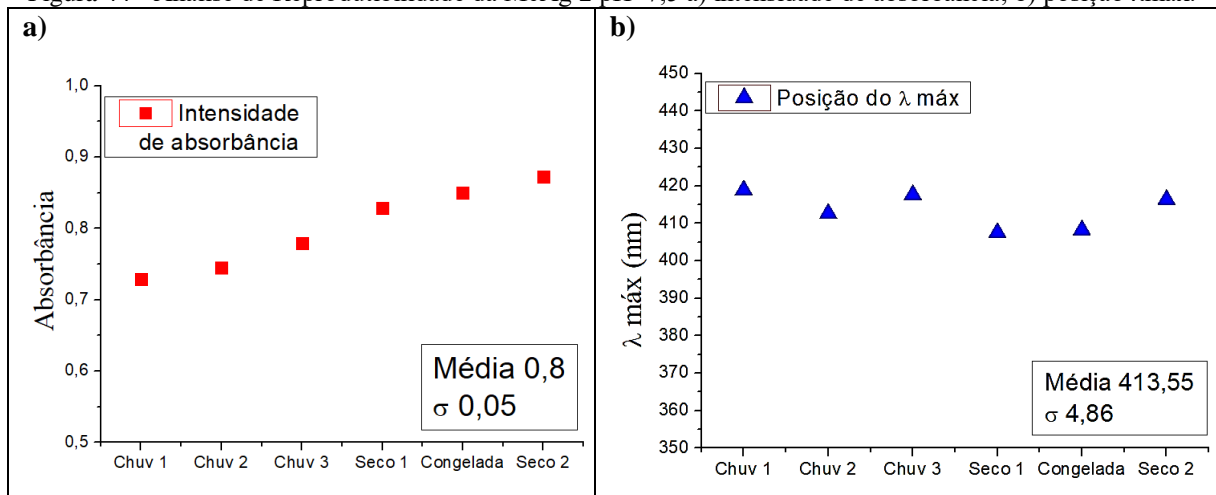


Figura 43 - Imagens MET e histograma de distribuição de tamanho das McAgNP 2 pH ~7,5.



Visto que o agente redutor dos íons metálicos neste processo, trata-se de um material natural, susceptível a variações de acordo com o clima e estágio de desenvolvimento, para análise de reprodutibilidade foram observados os espectros de 3 suspensões preparadas durante o período chuvoso e 2 durante o período de clima seco, de McAg 2 pH~7,5. Folhas colhidas no período seco foram lavadas, picadas e congeladas em tubo Falcon por 5 meses, quando foram preparados o extrato e uma nova amostra. A figura 44 indica características semelhantes em todas as condições.

Figura 44 - Análise de Reprodutibilidade da McAg 2 pH~7,5 a) intensidade de absorbância; b) posição λ máx.



Os resultados obtidos confirmam que a suspensão nomeada McAg 2 com ajuste do meio para neutro a levemente básico, são as condições ideais entre as testadas para a obtenção de nanopartículas de prata através do método proposto. Estes resultados são bastante satisfatórios, uma vez que suspensões com valores de pH próximos ao neutro, ampliam as possibilidades de aplicações do nanomaterial e o procedimento para sua obtenção é rápido, simples e com alto rendimento.

Para contribuir com a elucidação dos compostos presentes no extrato aquoso de *Mimusops coriacea*, e seu papel na síntese das nanopartículas de prata, resultados obtidos por espectroscopia de absorção UV-vis, fluorescência e FTIR foram analisados e comparados à estudos anteriores.

O espectro de absorção UV-vis do extrato de *Mimusops coriacea* (figura 45 a), apresenta bandas de absorção na região do UV, que indicam a presença de aminoácidos, carotenoides e clorofila, que podem estar ligados às McAgNP (figura 45 b). A banda em 218nm presente no extrato e nas McAgNP indica a presença de taninos (BULUT, 2009; RAO; PARIJA, 2013). A presença de alcaloides, taninos e outros compostos fenólicos em plantas do gênero *Mimusops* e outras da família *Sapotaceae* já foi relatada em estudos anteriores (MASHWANI et al., 2015b; PRAKASH et al., 2013; SATISH et al., 2008).

Foram obtidos os espectros de fluorescência das McAgNP e do extrato de *Mimusops coriacea* sem adição do metal, para observar mudanças na fluorescência da clorofila presente no extrato após a formação das nanopartículas. Na figura 46 observa-se que a presença de AgNP induz a supressão da fluorescência de clorofila em 676 nm (amostras excitadas em 430nm). A supressão de fluorescência indica modificação ou consumo da clorofila durante o processo de síntese das nanopartículas (BARAZZOUK; KAMAT; HOTCHANDANI, 2005). Além disso,

há novas bandas em 467, 503, 587 e 706 nm, devido a pigmentos carotenóides, que aumentam com a formação das nanopartículas. A xantofila, nesse caso, é o principal carotenóide que exibe um estado de transferência de carga intramolecular (KHOROSHYY et al., 2018). Os resultados mostraram que os estados tripletos da clorofila, foram eficazmente suprimidos a partir da excitação dos carotenóides por um processo de transferência de energia do estado singlete da clorofila (KHOROSHYY et al., 2018). Provavelmente os estados mais elevados da clorofila e carotenóides são efetivamente preenchidos por transferência de carga da banda SPR de nanopartículas de prata.

Figura 45 - Espectro UV-vis de a) extrato aquoso de *Mimusops coriacea* 25mg/mL b) extrato e McAgNP (Diluído 5%).

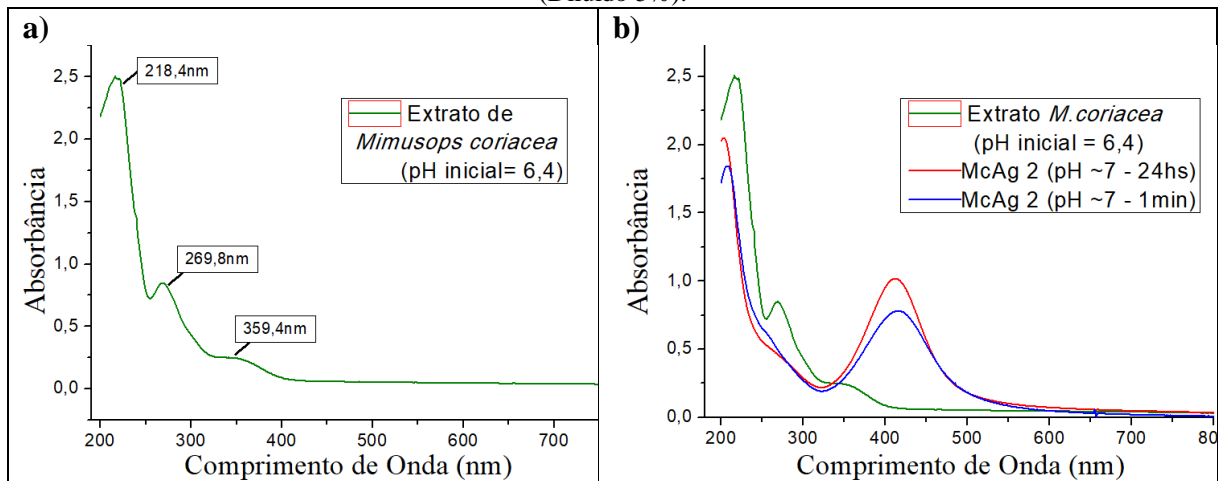
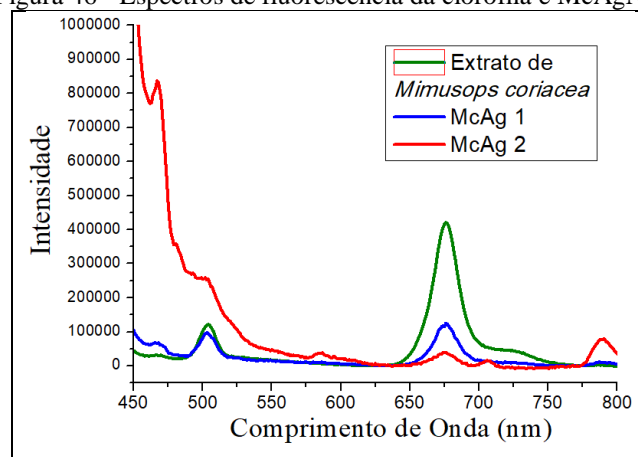
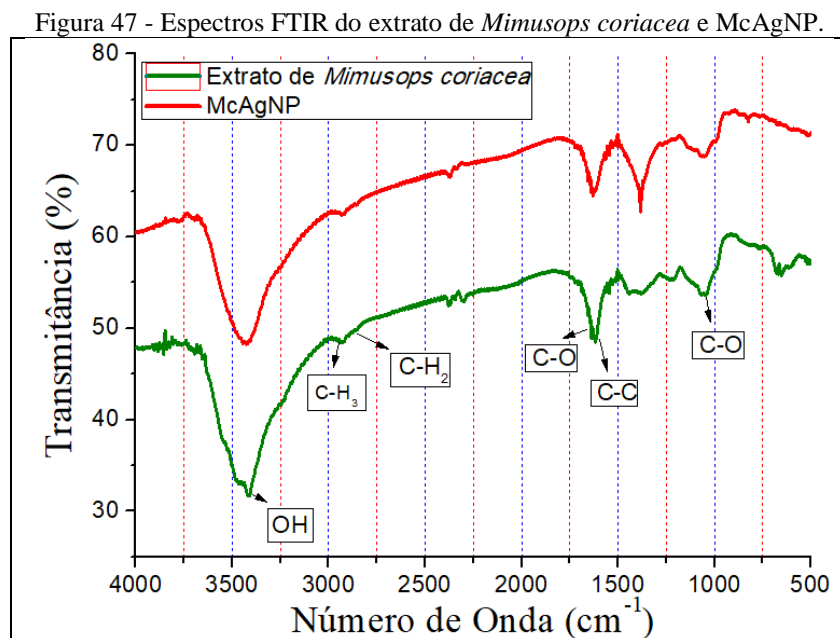


Figura 46 - Espectros de fluorescência da clorofila e McAgNP.



Os espectros de FTIR do extrato das folhas de *Mimusops coriacea* e da McAgNP são apresentados na fig. 47. O sinal FTIR do extrato apresenta picos em torno de em 3436cm^{-1} , 2935cm^{-1} , 1617cm^{-1} , 1444cm^{-1} e 1049cm^{-1} . A banda a 3436cm^{-1} ocorre devido ao estiramento OH. A banda 2935cm^{-1} ocorre devido à presença de aldeído CH e foi deslocado

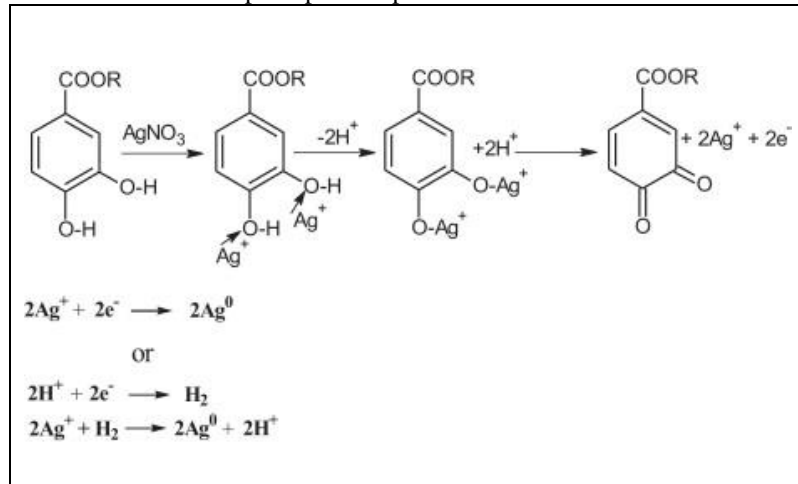
para frequência menor (2928 cm^{-1}) na McAgNP. A banda 1617 cm^{-1} no extrato da folha de *Mimusops coriacea*, devido à presença das vibrações da Amida I foi deslocada para 1627 cm^{-1} na McAgNP provavelmente devido a presença de proteínas que possivelmente se ligaram às nanopartículas de prata através dos grupos amina. A banda 1049 cm^{-1} devido ao estiramento C-O-C, poderia ser atribuída à redução da Ag^+ , uma vez que a banda foi deslocada para 1040 cm^{-1} nas McAgNPs (PRAKASH et al., 2013).



A ação de taninos e outros compostos polifenólicos (uma ou mais hidroxilas ligadas a um anel aromático) presentes em extratos vegetais aquosos na síntese de nanopartículas por uma reação redox é bem descrita na literatura, onde estes compostos são indicados como responsáveis pela redução dos íons metálicos e pelo recobrimento das nanopartículas evitando sua aglomeração (BULUT, 2009; RAJESHKUMAR; BHARATH, 2017; RAO; PARIJA, 2013)

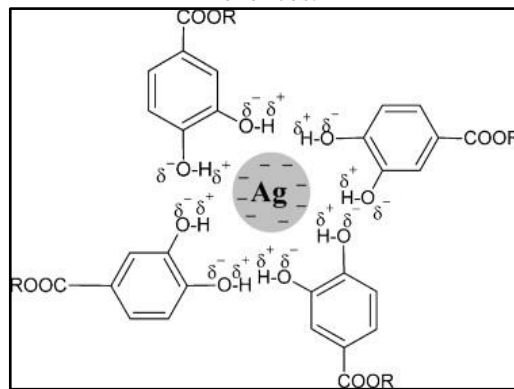
Neste modelo de reação, propõe-se que a redução ocorra pelos grupos hidroxila presentes no anel benzênico. O processo se inicia com a oxidação do tanino na presença de íons Ag^+ , formando um complexo intermediário. Os íons Ag^+ são então reduzidos a Ag^0 , que colidem formando aglomerados. A estabilização do crescimento das nanopartículas possivelmente ocorre por encapsulamento pelo composto polifenólico. Os processos de redução e encapsulamento descritos, estão esquematizados nas figuras 48 e 49 respectivamente (BULUT, 2009; RAO; PARIJA, 2013)

Figura 48 - Esquema representativo do mecanismo de redução dos íons Ag^+ e formação de nanopartículas de prata por compostos fenólicos.



Fonte: (RAO; PARIA, 2013).

Figura 49 - Esquema representativo do efeito de encapsulamento das nanopartículas de prata por compostos fenólicos.



Fonte: (RAO; PARIA, 2013).

4.1.2.2 Nanopartículas de ouro e extrato de *Mimusops coriacea* – McAuNP

As suspensões foram preparadas conforme descrito no item 3.1.5.

Como primeira etapa do estudo, foi preparada uma solução diluindo o HAuCl_4 até a concentração de 1mmol/L no extrato preparado com $2,5\text{g}$ de folhas em 100mL de água destilada (25mg/mL), resultando em uma solução amarela translúcida (Figura 50 b). Após 15 minutos a coloração da solução havia se alterado para violeta (figura 50 c), característico da presença de nanopartículas de ouro em solução. Espectros UV-vis foram obtidos, mostrando que a reação se inicia após 5 minutos, devido a presença de uma pequena banda em $\sim 550\text{nm}$, com aumento da intensidade até 60 minutos, quando estabiliza-se (figura 51).

Figura 50 - Mudança de coloração do extrato de *Mimusops coriacea* após na presença das McAuNP. a) Extrato M.c (2,5g./100mL água destilada); b) após 1 minuto; c) após 15 minutos.

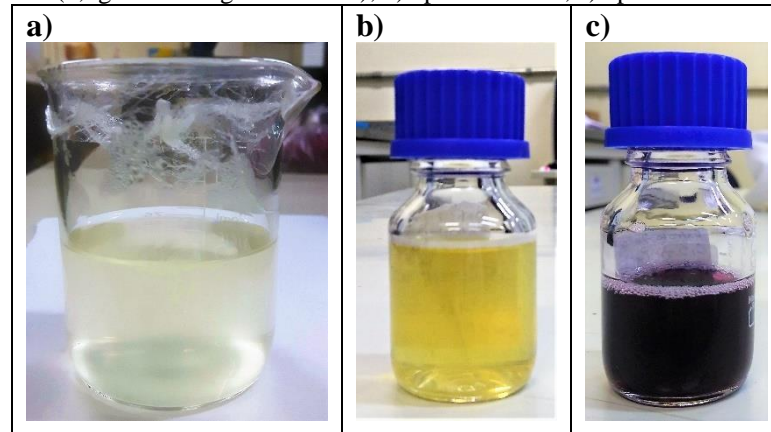
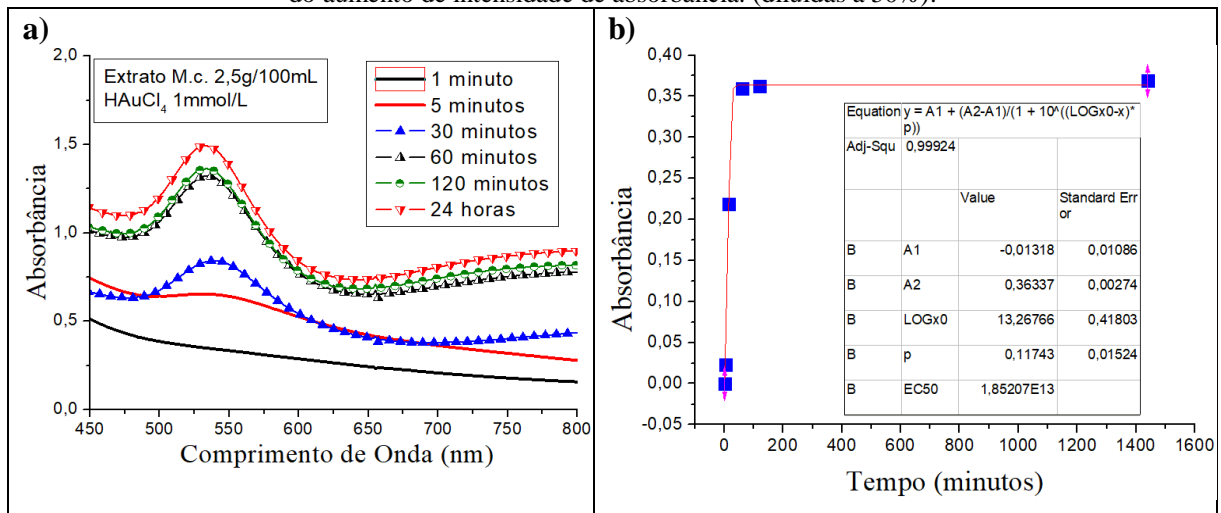


Figura 51 - Intensidade de absorvância das McAuNP em razão do tempo de reação, a) espectros Uv-vis; b) curva do aumento de intensidade de absorvância. (diluídas a 50%).

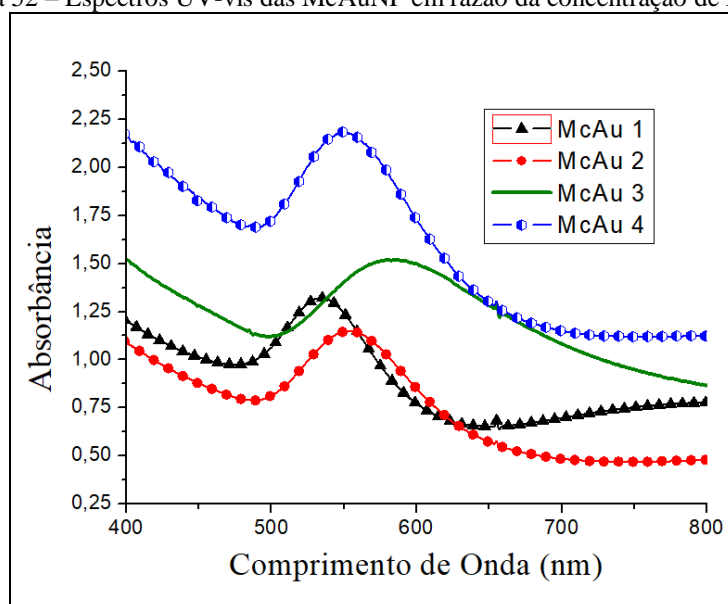


Em seguida, foram preparadas suspensões com maior concentração de HAuCl₄ na solução e maior volume de folhas no preparo do extrato. Para facilitar a apresentação dos resultados, as suspensões foram numeradas e estão sumarizadas na tabela 16. Uma análise em relação ao tempo de reação foi efetuada, e assim como observado anteriormente, estabilizou-se após 60 minutos.

Os espectros UV-vis das suspensões 60 minutos após o preparo, são apresentados na figura 52. Observa-se que embora a McAu 4 apresente maior intensidade de absorvância, a banda plasmônica obtida com a McAu 1 é mais simétrica, estreita e com $\lambda_{\text{máx}}$ em comprimentos de onda menores, indicando a presença de partículas menores. Entretanto, nos dois casos observa-se a formação de banda plasmônica em comprimentos de onda maiores, indicando a formação de estruturas maiores ou com formatos não esféricos.

Tabela 16 - Variações nas condições aplicadas no preparo das McAuNP.

| Nome | Folhas de M.c. (mg/mL) ± 2 mg | HAuCl ₄ (mmol/L) | pH ($\pm 0,1$) |
|--------|--|--------------------------------|---------------------|
| McAu 1 | 25 | 1 | 2,90 |
| McAu 2 | 25 | 2 | 2,50 |
| McAu 3 | 50 | 1 | 2,71 |
| McAu 4 | 50 | 2 | 2,53 |

Figura 52 – Espectros UV-vis das McAuNP em razão da concentração de HAuCl₄.

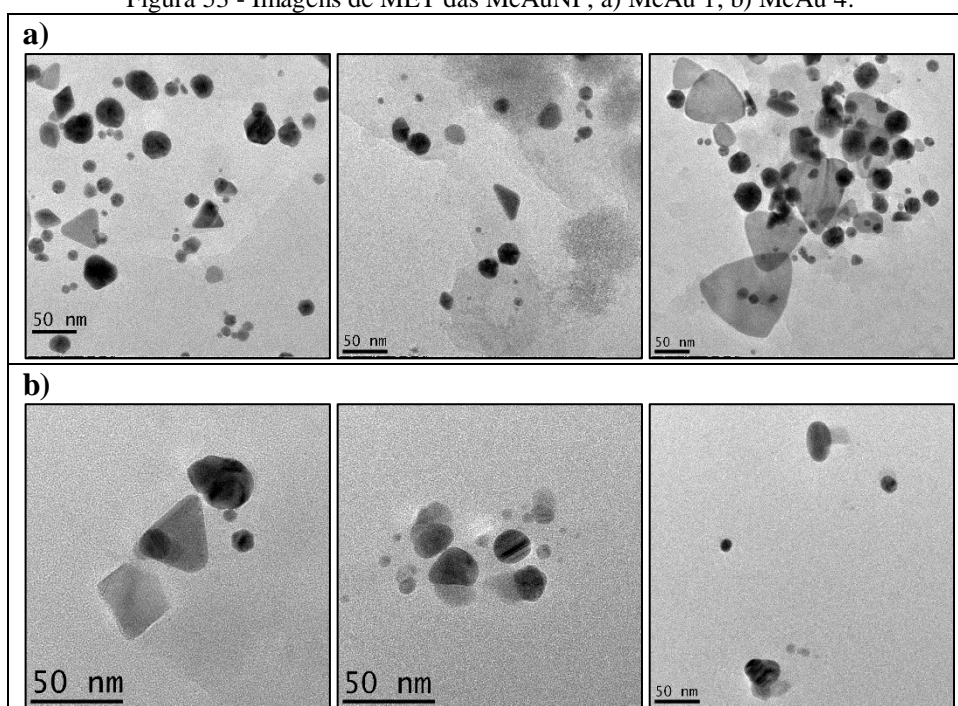
As análises de DLS, resumidas na tabela 17 indicam maior monodispersividade e presença de partículas menores quando utilizado extrato com menor volume de folhas (McAu 1 e 2), resultado compatível com o indicado nos espectros UV-vis, entretanto, uma comparação entre as suspensões McAu 1 e McAu 4 através de imagens MET (figura 53 a e b), indica que há maior concentração de nanopartículas na primeira, contradizendo o indicado pelas bandas plasmônicas. Esta discrepância ocorre devido a presença de partículas maiores e de formatos não-esféricos, que interferem nas propriedades ópticas das NPM. É possível observar nas imagens da McAu 1 (figura 53 a), estruturas com formatos majoritariamente triangulares e alguns hexagonais, além de nanopartículas esféricas e algumas estruturas tridimensionais com formatos de losangos ou algumas formas irregulares, justificando a banda em $\lambda \sim 750$ nm. A McAu 4 também apresenta estruturas semelhantes, porém em menor número. Chandran e colaboradores (CHANDRAN et al., 2006), acompanharam através de imagens de MET, as

alterações na forma e tamanho de nanopartículas de ouro preparadas com diferentes concentrações de extrato aquoso de *Aloe vera*, relatando que o aumento da concentração do extrato na solução levou à redução do tamanho médio de nanotriângulos e a formação de um maior volume de nanopartículas de formato esférico.

Tabela 17 – Resultados das análises de DLS das McAuNP.

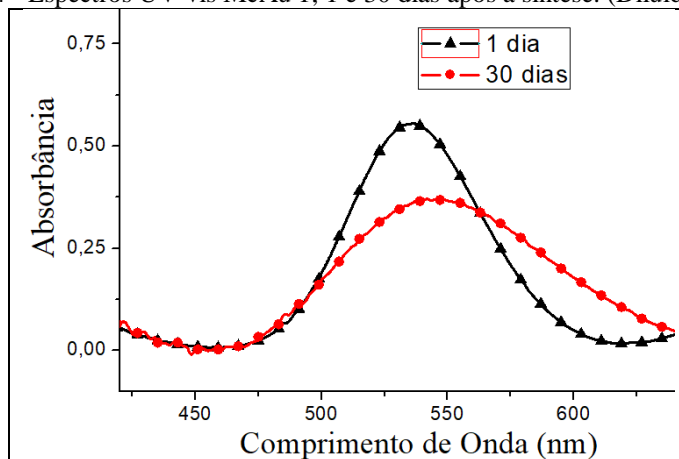
| Nome | Diâmetro Hidrodinâmico (nm) | Vol. % | PdI | Potencial Zeta (mV) |
|--------|-----------------------------|--------|-------|---------------------|
| McAu 1 | 50,83 ($\pm 7,92$) | 99,1 | 0,458 | -17,3 |
| | 1148 ($\pm 273,3$) | 0,8 | | |
| | 4871 ($\pm 972,0$) | 0,1 | | |
| McAu 2 | 53,06 ($\pm 11,89$) | 13,2 | 0,352 | -19,2 |
| | 412,1 ($\pm 169,7$) | 49,2 | | |
| | 1118 ($\pm 347,7$) | 32,8 | | |
| McAu3 | 218,7 ($\pm 32,73$) | 10,5 | 0,606 | -12,1 |
| | 3205 ($\pm 470,1$) | 33,3 | | |
| | 675,3 ($\pm 104,8$) | 22,9 | | |
| McAu 4 | 1006 ($\pm 358,2$) | 75,6 | 0,598 | -15,2 |
| | 106,3 ($\pm 24,88$) | 1,7 | | |
| | 44,26 ($\pm 10,68$) | 19,4 | | |

Figura 53 - Imagens de MET das McAuNP, a) McAu 1; b) McAu 4.



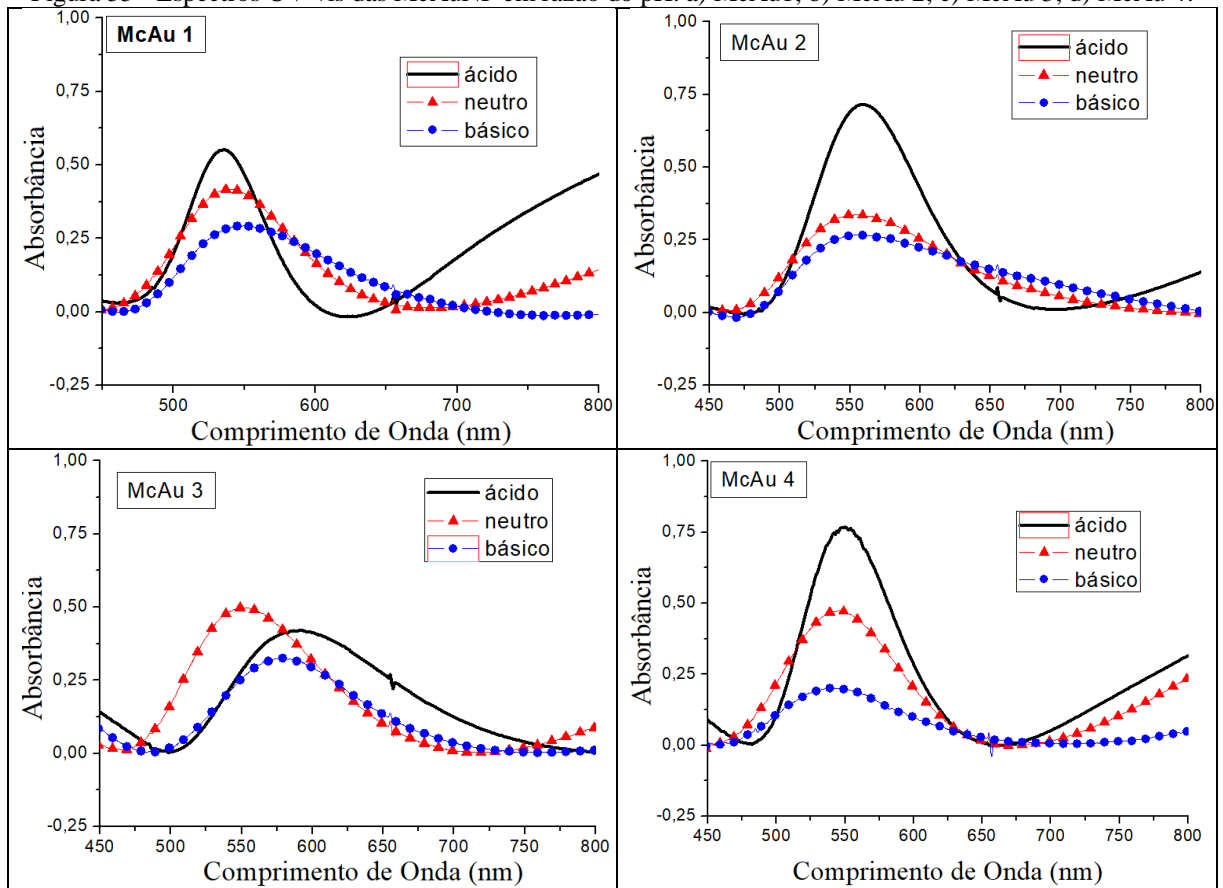
Quanto a estabilidade das suspensões, o valor de potencial zeta abaixo de 20mV (tabela 17) indica partículas com alta tendência a se agregar; o espectro UV-vis da McAu 1 obtido 30 dias após o preparo (figura 54) mostra uma queda de 34% na intensidade de absorbância e banda 33% mais larga, indicando que as nanopartículas começam a se agregar antes deste período, podendo ainda estar relacionado com alterações na forma das partículas presentes na suspensão.

Figura 54 - Espectros UV-vis McAu 1; 1 e 30 dias após a síntese. (Diluídas a 50%).



Conforme sumarizado na tabela 16, após a reação as suspensões tornam-se ácidas ($\text{pH} \cong 2,5 \pm 0,3$). Uma análise do ajuste de pH para valores entre 7-8 e 9,5-12 foi efetuada com a adição de NaOH às suspensões, seguida de medidas espectrofotometria UV-vis, apresentados na figura 55. Com exceção da McAu 3 (fig 55 c), no geral nota-se principalmente o alargamento da banda e redução da intensidade de absorbância em $\lambda \sim 550\text{nm}$. Além disso há redução da banda presente em comprimentos de onda maiores. Estas alterações nas propriedades ópticas podem estar relacionadas a menor tendência dos íons Au^{3+} a reduzir em pHs elevados, como relatado anteriormente; à tendência a agregação das nanopartículas de ouro na presença de íons Na^+ quando redutores fortes não são utilizados (WANG et al., 2009); ou ainda a alterações nos formatos das partículas.

Figura 55 - Espectros UV-vis das McAuNP em razão do pH. a) McAu1; b) McAu 2; c) McAu 3; d) McAu 4.



Quanto aos mecanismos de redução do íon metálico e estabilização do crescimento, observa-se nos espectros UV-vis (figura 56), de fluorescência (figura 57) e FTIR (figura 58) resultados bastante semelhantes aos obtidos com as McAgNP: extinção das bandas de absorção em ~ 270 e ~ 360 nm; supressão da fluorescência da clorofila em $\lambda \sim 680$ nm (exc. 430 nm) e alterações nas bandas dos espectros FTIR na região entre 1000 e 1600, levando a conclusão que o mesmo mecanismo de coordenação ocorre na formação das McAuNP.

Figura 56 - Espectros UV-vis. Extrato de *Mimusops coriacea* e McAuNP (Diluídos à 50%).

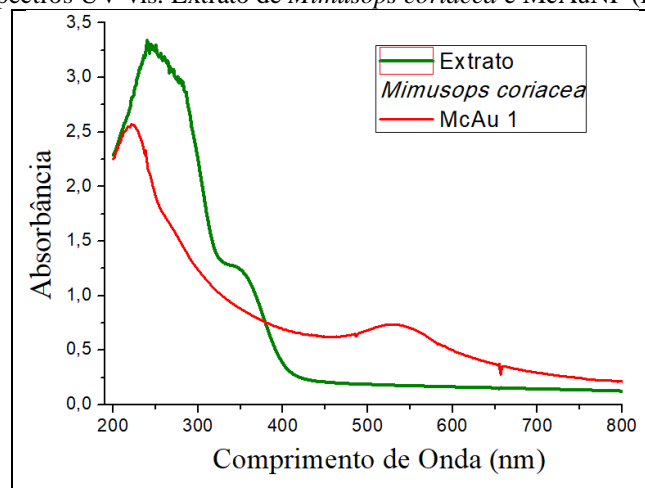
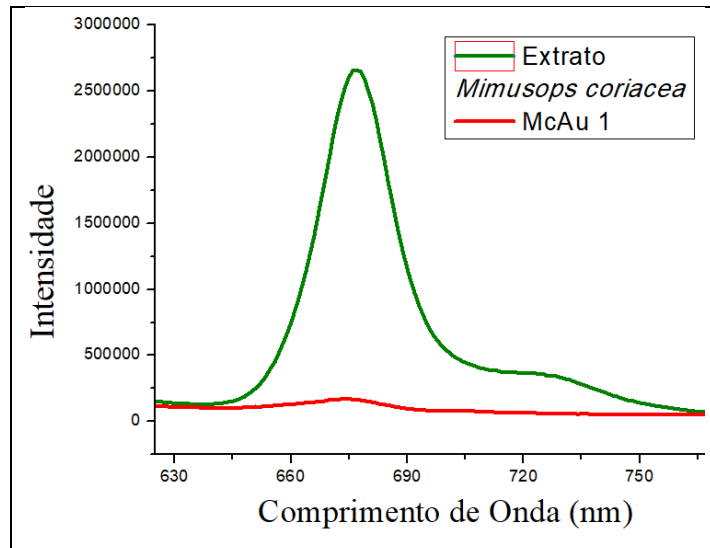
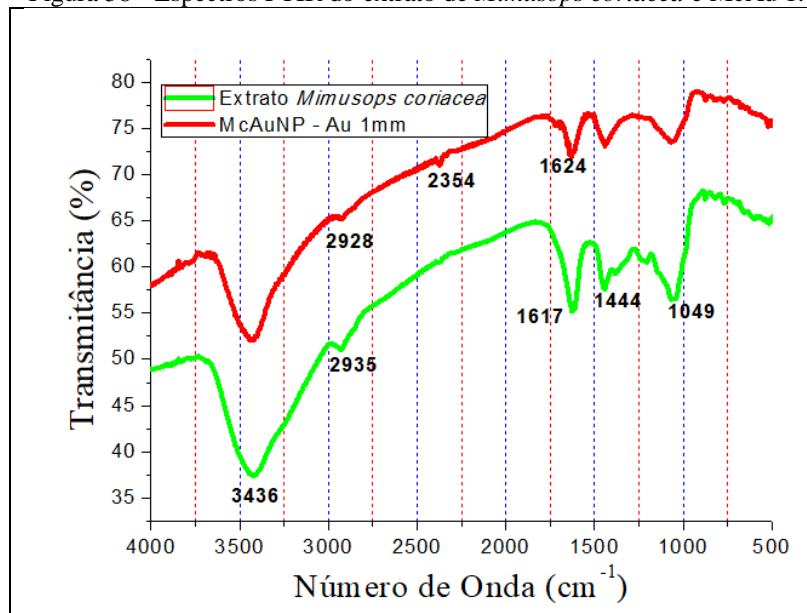


Figura 57 - Espectros de Fluorescência da clorofila e McAuNP.

Figura 58 - Espectros FTIR do extrato de *Mimusops coriacea* e McAu 1.

4.1.2.3 Discussão

Diferentemente do observado na síntese mediada pelo L-Triptofano, o extrato aquoso de folhas *Mimusops coriacea* apresentou melhor resultado na síntese de nanopartículas de prata, uma vez que o volume de nanopartículas obtido é maior, a suspensão é mais monodispersa e estável.

Neste caso, a formação das nanopartículas também acontece por uma reação redox, onde compostos presentes no extrato oxidam na presença do metal iônico reduzindo-os à átomos

neutros, seguidos de crescimento por aglomeração até sua estabilização, que ocorre pelo encapsulamento das partículas também pelos compostos presentes no extrato (ALBERNAZ, 2014).

Em relação extrato aquoso de folhas de *Mimusops coriacea*, não foram encontrados na literatura relatos da síntese de nanopartículas com esta espécie vegetal específica, nem mesmo uma caracterização sobre os compostos presentes em seu extrato, entretanto, outras espécies do mesmo gênero já foram caracterizadas e foi reportada a presença de taninos, alcaloides e outros compostos polifenólicos que podem ser atribuídos a redução dos íons metálicos e encapsulamento das partículas (MASHWANI et al., 2015a; PRAKASH et al., 2013; SATISH et al., 2008). A elucidação e confirmação de compostos específicos presentes neste extrato e envolvidos nos processos de síntese dependem de um estudo elaborado que deverá ser contemplado em etapas posteriores. Entretanto, com base em uma comparação entre os resultados obtidos experimentalmente e estudos anteriores, que demonstram a síntese de nanopartículas através de extrato aquoso de folhas que são conhecidas por apresentarem compostos polifenólicos em sua composição, propõe-se que a coordenação ocorra através dos átomos de oxigênio dos grupos hidroxila de polifenóis oxidados.

Condições como concentração do sal metálico, volume de material vegetal utilizado no preparo do extrato e acidez do meio foram determinantes para o sucesso da reação. Para as McAgNP, o uso do extrato menos concentrado e ajuste do meio para neutro à levemente básico aumentam a cinética da reação, e o aumento da concentração do sal metálico é diretamente proporcional a concentração de McAgNP na suspensão, estando saturado na concentração de 2mmol/L. Por outro lado, quando o precursor metálico utilizado é o HAuCl_4 , as variações nas condições de síntese influenciam diretamente no formato das partículas, sendo que neste caso foi possível observar a formação majoritária de nanotriângulos, porém, também estão presentes esferas e algumas outras formas em menor volume. Considera-se necessário um estudo bastante elaborado, acompanhado por imagens de MET em razão do tempo de reação, acidez e concentrações do extrato e do metal, uma vez que a obtenção de nanotriângulos de ouro através de um processo simples, rápido e de baixo custo é extremamente atraente, visto que estas estruturas podem ser aplicadas em diagnóstico de câncer.

De modo geral, os resultados foram considerados bastante satisfatórios, principalmente na síntese de nanopartículas de prata. A tabela 18 sumariza as condições de síntese consideradas ideais entre as testadas neste processo, além das principais características das McAgNP obtidas. As McAuNP não estão contempladas nesta tabela, pois dependem de estudos complementares para a definição das condições ideais para a síntese.

Tabela 18 - Condições ideais para síntese de McAgNP e suas principais características.

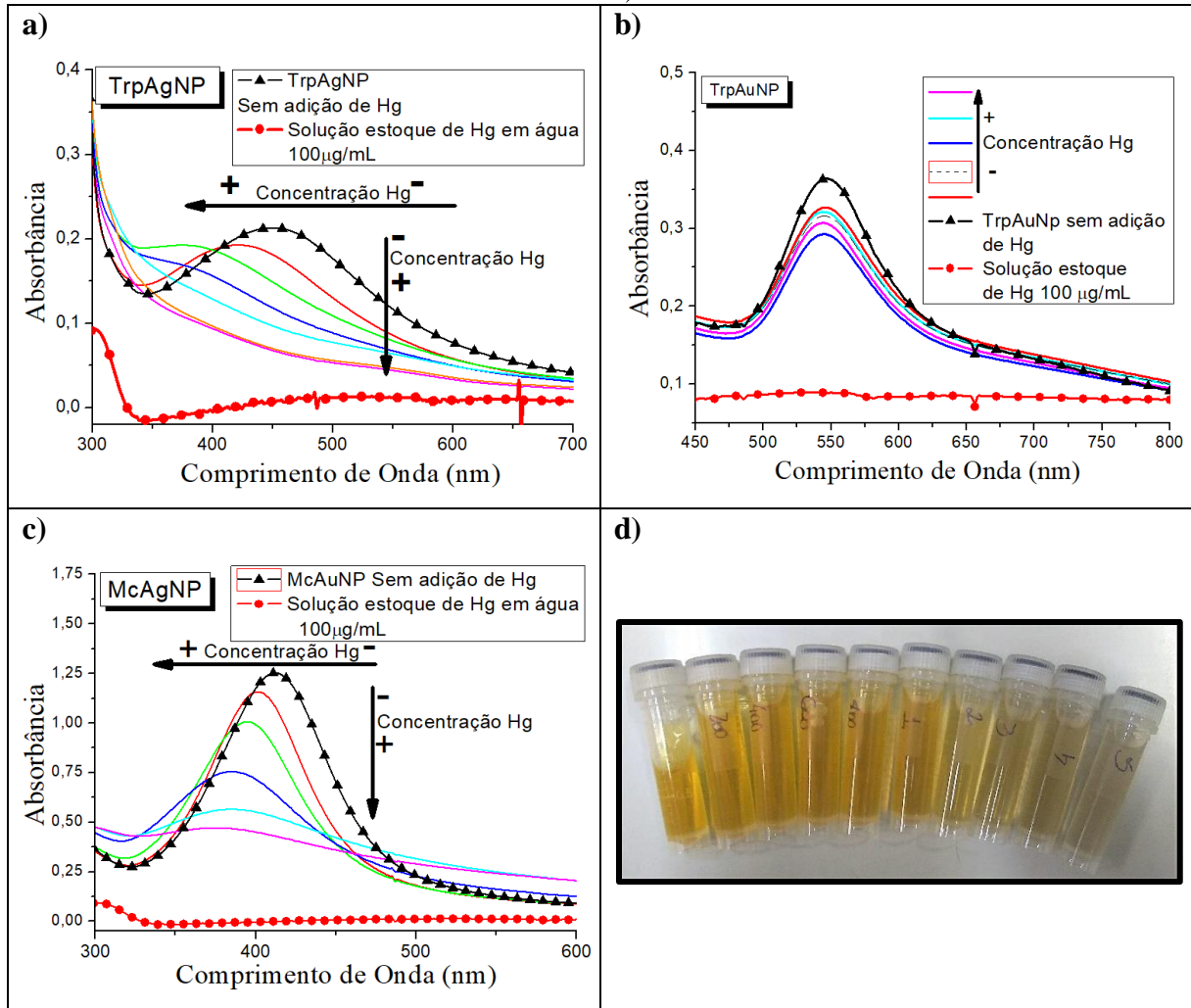
| | Sal metálico (mmol/L) | Material | | Diâmetro | | Potencial | |
|--------|--------------------------|----------------------|--------|---------------|-------|--------------|--|
| | | Vegetal (g/100mL) | Meio | Médio (nm) | PdI | Zeta (mV) | |
| McAgNP | 2,0 | 2,5 | Neutro | ~17 | 0,239 | -28 | |

4.2 APLICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM SOLUÇÃO AQUOSA

Conforme descrito no item 3.3, foi proposta a análise do potencial das nanopartículas sintetizadas no presente estudo na detecção e quantificação de mercúrio em solução aquosa, através de alterações nos espectros UV-vis das nanopartículas na presença deste analito. As análises foram efetuadas sem diluição e nenhum outro tratamento prévio. Foram utilizadas as TrpAgNP, TrpAuNP e McAgNP definidas como as que apresentaram melhores características descritas nas tabelas 13 e 18. Optou-se por não utilizar as McAuNP pois estas dependem de estudos complementares para sua otimização, além disso, condições do meio interferem em seu formato e conseqüentemente em suas propriedades ópticas, podendo influenciar nos espectros UV-vis obtidos, independentemente da concentração do analito.

A primeira etapa deste estudo consistiu na análise de sensibilidade. As amostras foram preparadas conforme descrito no item 3.3.2. A figura 59 a,b e c, apresenta os espectros UV-vis obtidos.

Figura 59 - Espectros UV-Vis das NPs após adição de Hg^{2+} (Médias das triplicatas). a) TrpAgNP; b) TrpAuNP; c) McAgNP; d) alteração na coloração das McAgNP em concentrações crescentes de Hg^{2+} (da esquerda para a direita).



Nos espectros UV-vis das nanopartículas de prata (figura 59 a e c), observamos que a presença de Hg^{2+} na solução leva ao deslocamento hipsocrômico do $\lambda_{\text{máx}}$ e redução da intensidade de absorbância. Estas alterações são mais pronunciadas conforme aumenta a concentração de Hg, chegando a quase extinguir a banda em torno de $\lambda \sim 420\text{nm}$ em altas concentrações, indicando que as TrpAgNP e McAgNP são sensíveis ao Hg em solução.

Esta diminuição na intensidade de absorção e desvio para o azul dos espectros, pode ser explicada pela reação redox que ocorre na superfície das AgNP, devido às diferenças no potencial de redução: 0,80V de $Ag^+ \rightarrow Ag^0$; e 0,85V de $Hg^{2+} \rightarrow Hg^0$. Grupos carboxila presentes no L-triptofano, e agentes orgânicos presentes no extrato vegetal promovem atração eletrostática entre a superfície negativamente carregada das TrpAgNP/McAgNP e os cátions de mercúrio, que removem os agentes estabilizantes da superfície das AgNP. O Hg^{2+} é então

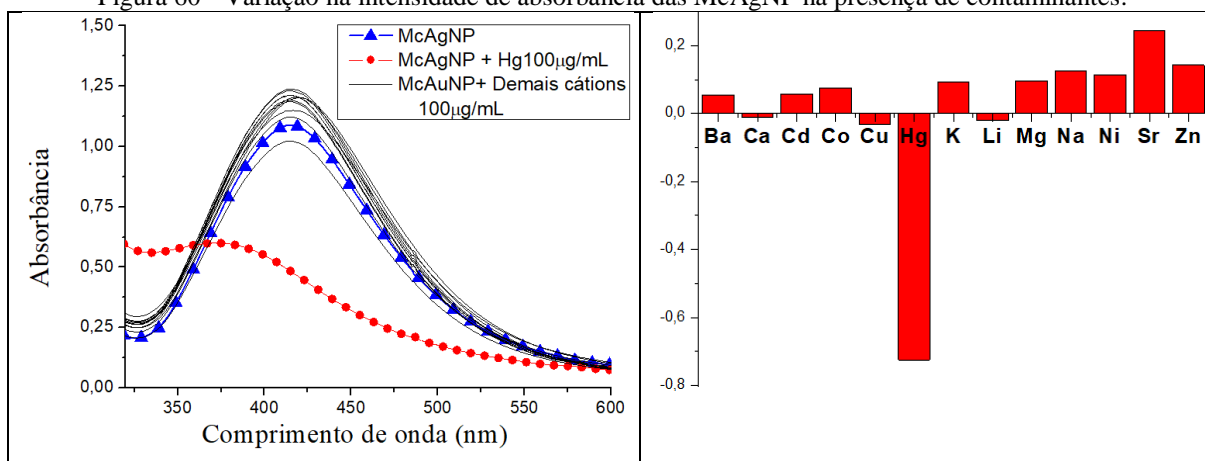
reduzido para Hg^0 na superfície das AgNPs, enquanto oxidam os Ag^0 da superfície para íons Ag^+ . O tamanho de AgNPs reduz à medida que as AgNPs reagem com Hg^{2+} para formar Ag^+ , justificando o deslocamento azul da banda plasmônica. Como as AgNPs são convertidas em íons Ag^+ , a concentração de AgNP na solução coloidal diminui, reduzindo a intensidade de absorvância e tornando a solução incolor (Figura 59 d) (BIAN et al., 2014; DEVADIGA; VIDYA SHETTY; SAIDUTTA, 2017).

Por outro lado, a posição do $\lambda_{\text{máx}}$ da banda plasmônica das TrpAuNP (figura 59 b), não se desloca mesmo com altas concentrações do Hg, além disso a redução da intensidade de absorvância não é proporcional à sua concentração de na solução, ou seja, concentrações maiores de Hg apresentam redução da intensidade de absorvância menos pronunciada do que concentrações menores. Já foi relatado que na presença de íons Hg^{2+} , AgNP apresentam maior deslocamento para o azul do que as AuNP, dado um mesmo tamanho de partícula, e que em AuNP menores (~5nm de diâmetro) o deslocamento azul é mais pronunciado do que as com maiores diâmetros (~15nm) (MORRIS et al., 2002). Sabendo que as TrpAuNP aqui utilizadas apresentam diâmetros de cerca de 44nm, esta afirmação pode justificar a ausência do deslocamento neste caso. Além disso, inversamente ao que ocorre com Ag^+ , o potencial de redução do $\text{Au}^{3+} \rightarrow \text{Au}^0$ é de 1,5V, superior ao do Hg^{2+} , e no caso das TrpAuNP aqui utilizadas, a carga superficial das partículas é positiva, ou seja, não há atração eletrostática entre a sua superfície e os cátions Hg^{2+} .

Embora os resultados sejam satisfatórios para as TrpAgNP e McAgNP, o processo de síntese utilizado para obtenção das McAgNP é mais sustentável, uma vez que o redutor utilizado se trata de um material natural e renovável e não há a dependência de iluminação ou aquecimento para a redução dos íons metálicos, tornando o processo mais rápido, mais barato, mais simples e com maior rendimento, o que a torna mais favorável para a aplicação proposta.

A etapa seguinte foi a análise da seletividade do método, onde soluções com concentração de $100\mu\text{g/mL}$ de diferentes cátions (sumarizados na tabela 6 do item 3.3.1.1), foram adicionadas às McAgNP. O preparo das soluções e as análises de espectrofotometria UV-vis foram efetuadas nas mesmas condições utilizadas na etapa anterior. Os resultados obtidos, apresentados na figura 60 a e b, indicam que o método é altamente seletivo, visto que a expressiva redução da intensidade de absorvância e deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$ da banda plasmônica são observados apenas quando os íons Hg^{2+} estão presentes na solução.

Figura 60 - Variação na intensidade de absorvância das McAgNP na presença de contaminantes.

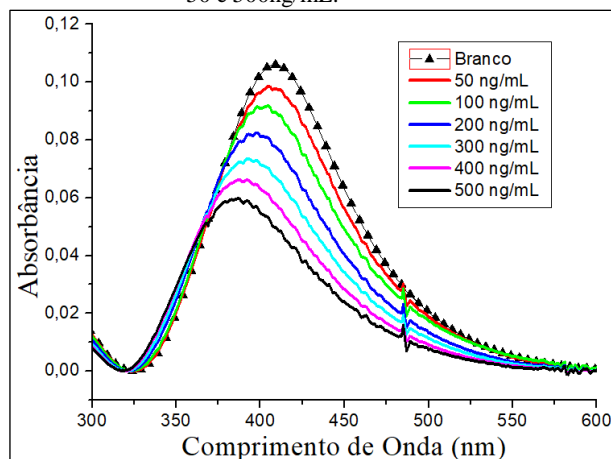


Diante da comprovação da seletividade, variações no preparo das amostras foram efetuadas com o objetivo de aumentar a sensibilidade do método, permitindo detectar a presença de íons de mercúrio com concentrações da ordem de ng/mL.

Os melhores resultados foram obtidos diluindo as McAgNP à 10%. Uma vez que estas suspensões são preparadas com AgNO_3 na concentração de 2mmol/L, a concentração de Ag na solução é de 0,203mg/mL, logo, diluindo as suspensões à 10% a concentração de Ag é de 20,3µg/mL. Quanto a proporção entre McAgNP e solução de Hg, os melhores resultados foram observados quando as amostras foram preparadas utilizando 1mL de McAgNP já diluídas, e adicionado 5mL da solução de Hg (proporção 1:6), sendo estas as condições utilizadas para o preparo das amostras utilizadas nas análises para criação da curva de calibração e determinação de LOD e LOQ do método.

As análises e respectivos cálculos foram efetuados conforme descrito nos itens 3.3.3 e 3.3.4, entretanto, como as amostras foram muito diluídas, foi necessário aumentar o caminho óptico da luz, utilizando uma cubeta de quartzo de 1cm. A figura 61 apresenta as médias das triplicatas dos espectros UV-vis das McAgNP e Hg em concentrações da ordem de ng/mL.

Figura 61 - Espectros UV-vis das McAgNP diluídas a 10% na presença de soluções aquosas de Hg com concentrações entre 50 e 500ng/mL.



Observa-se que as alterações na banda plasmônica das McAgNP na presença do Hg^{2+} foram proporcionais e lineares em razão do aumento da concentração (fig. 61), além disso estas alterações podem ser observadas em três parâmetros: intensidade de absorbância, posição do $\lambda_{\text{máx}}$ e área de banda entre 320 e 600nm.

Diante destes resultados, foram criadas curvas de calibração independentes para cada um dos parâmetros alterados. Quando consideradas a redução da intensidade de absorbância e da área da banda entre 320 e 600nm, os limites de detecção (LOD) encontrados foram de 7,87ppb e 6,52ppb respectivamente, enquanto quando considerado o deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$ o LOD foi de 34,66ppb. A média de redução da intensidade de absorção e da área de banda foi de 7,5%(±1,3) a cada aumento de concentração de Hg na solução, enquanto o deslocamento azul foi de 1%, justificando o LOD e LOQ menores quando se considera os dois primeiros parâmetros.

As figuras 62,63 e 64 apresentam as curvas de calibração criadas considerando cada parâmetro, com seus respectivos LOD e LOQ.

Figura 62 - Curva analítica para quantificação de Hg²⁺ em razão da intensidade de absorbância. Linhas verdes representam a banda de confiança e a inserção representa a banda de previsão (95%).

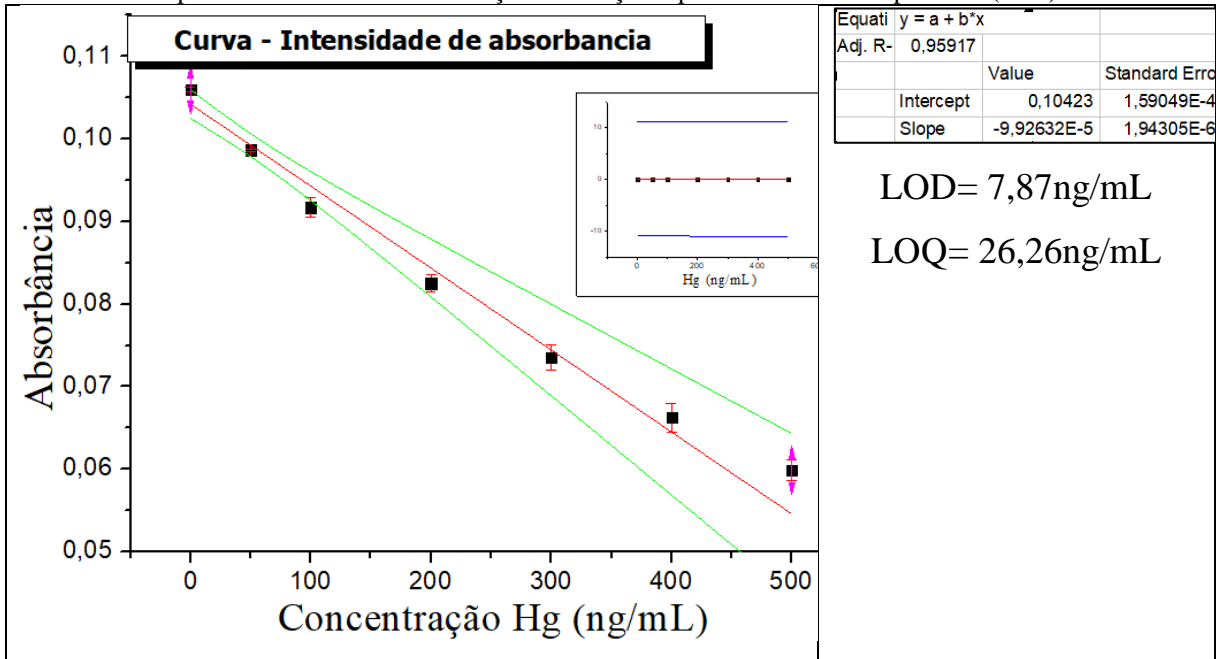


Figura 63 - Curva analítica para quantificação de Hg²⁺ em razão da área de banda entre 320 e 600nm. Linhas verdes representam a banda de confiança e a inserção representa a banda de previsão (95%).

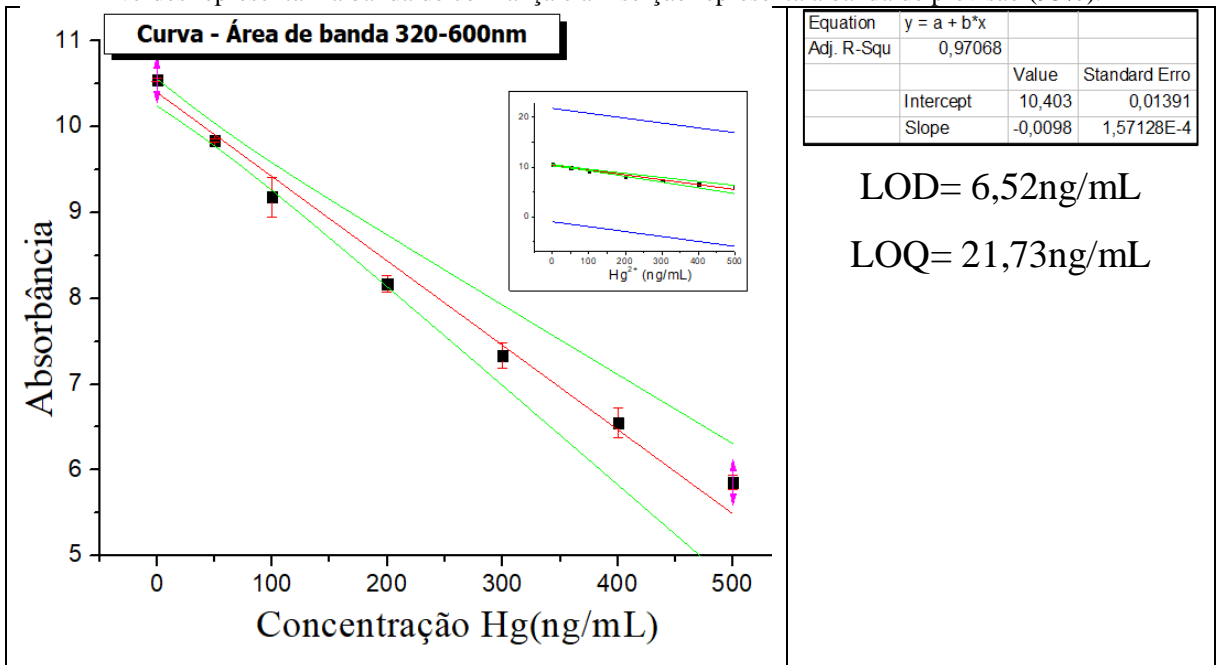
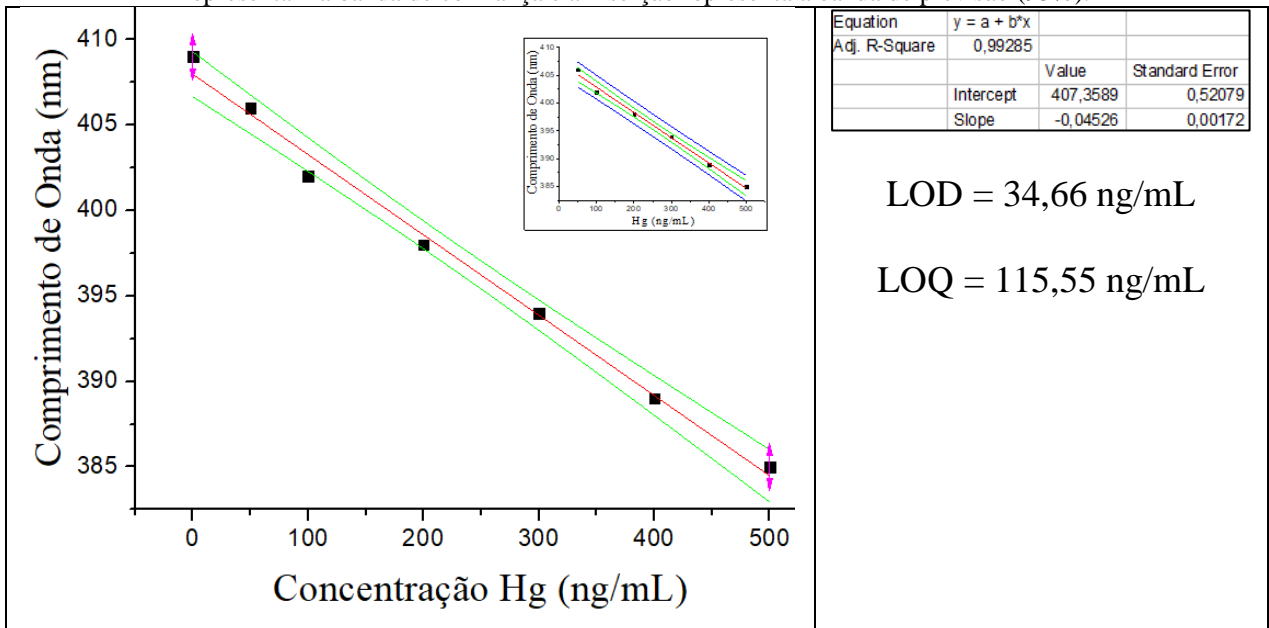
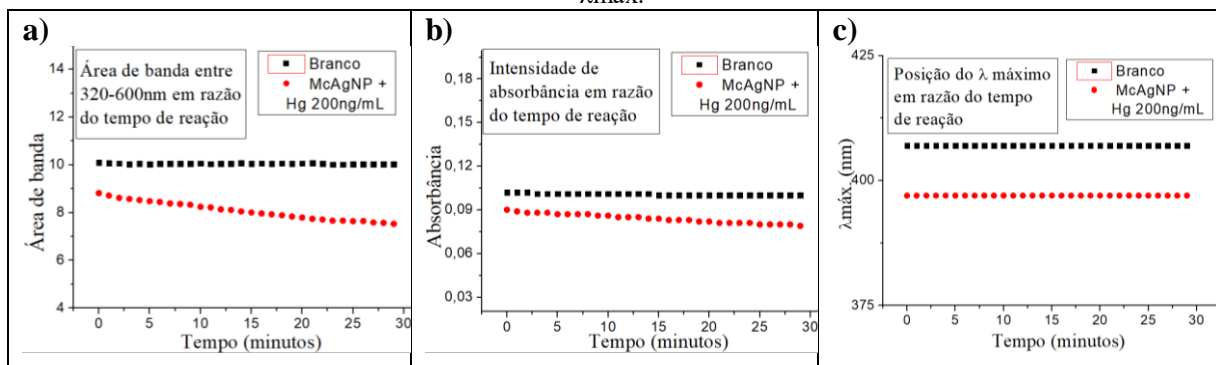


Figura 64 - Curva analítica para quantificação de Hg^{2+} em razão do deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$. Linhas verdes representam a banda de confiança e a inserção representa a banda de previsão (95%).



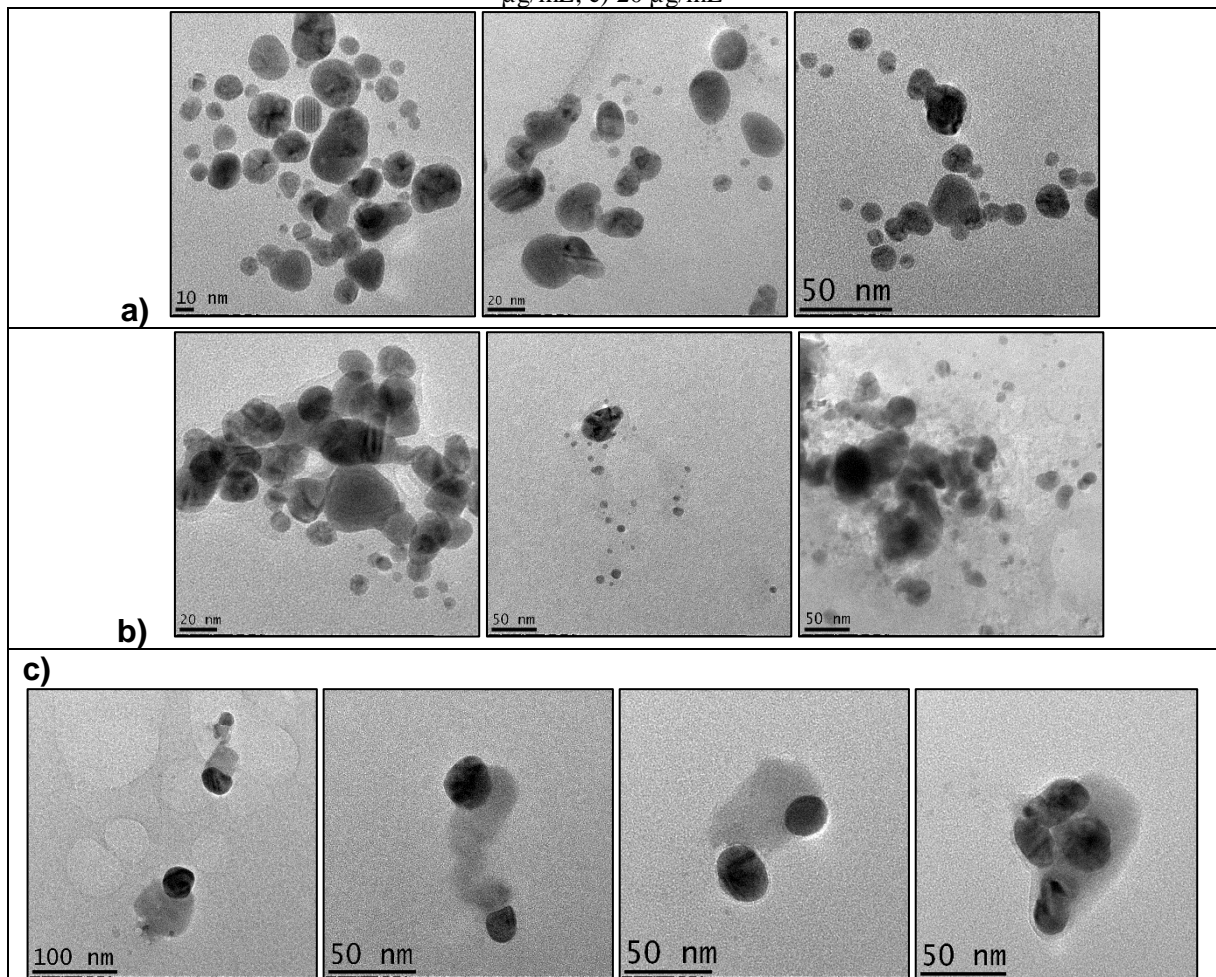
A análise da estabilidade da reação foi efetuada através de medidas de espectrofotometria UV-vis, com intervalos de 1 minuto durante 30 minutos, de uma amostra de branco (McAgNP 1mL + 5mL água MiliQ), e de uma amostra preparada de McAgNP + Hg na concentração 200ng/mL. Embora se observe alterações nos parâmetros da banda de absorção ao longo do tempo, esta não compromete a confiabilidade do método, visto que após 10 minutos de reação, que é o tempo indicado por estudos anteriores para a amalgamação, a variação não passa de 7% até completar os 30 minutos para redução da área de banda (figura 65 a) e intensidade de absorbância (figura 65 b), além de não se observar alterações na posição do $\lambda_{\text{máx}}$ (figura 65 c).

Figura 65 - Análise da estabilidade da reação durante 30 minutos, obtida por análises do branco e na adição de Hg na concentração 200ng/mL. a) área de banda entre 320 e 600nm; b) intensidade de absorbância; c) posição do $\lambda_{\text{máx}}$.



Foram obtidas imagens de MET das McAgNP após 30 minutos de reação com o Hg^{2+} . Observa-se que conforme já relatado, o aumento da concentração do Hg^{2+} na solução leva inicialmente a aglomeração das McAgNP e em altas concentrações o número de partículas é reduzido, além de apresentarem uma espécie de membrana escura aderida à sua superfície, que possivelmente se trata do Hg presente na solução. Como as McAgNP não foram diluídas para esta análise, foram utilizadas concentrações mais altas de Hg: $1\ \mu\text{g/mL}$ (figura 66 a), $5\ \mu\text{g/mL}$ (figura 66 b) e $20\ \mu\text{g/mL}$ (figura 66 c).

Figura 66 - Imagens MET das McAgNP na presença de diferentes concentrações de Hg^{2+} . a) $1\ \mu\text{g/mL}$; b) $5\ \mu\text{g/mL}$; c) $20\ \mu\text{g/mL}$

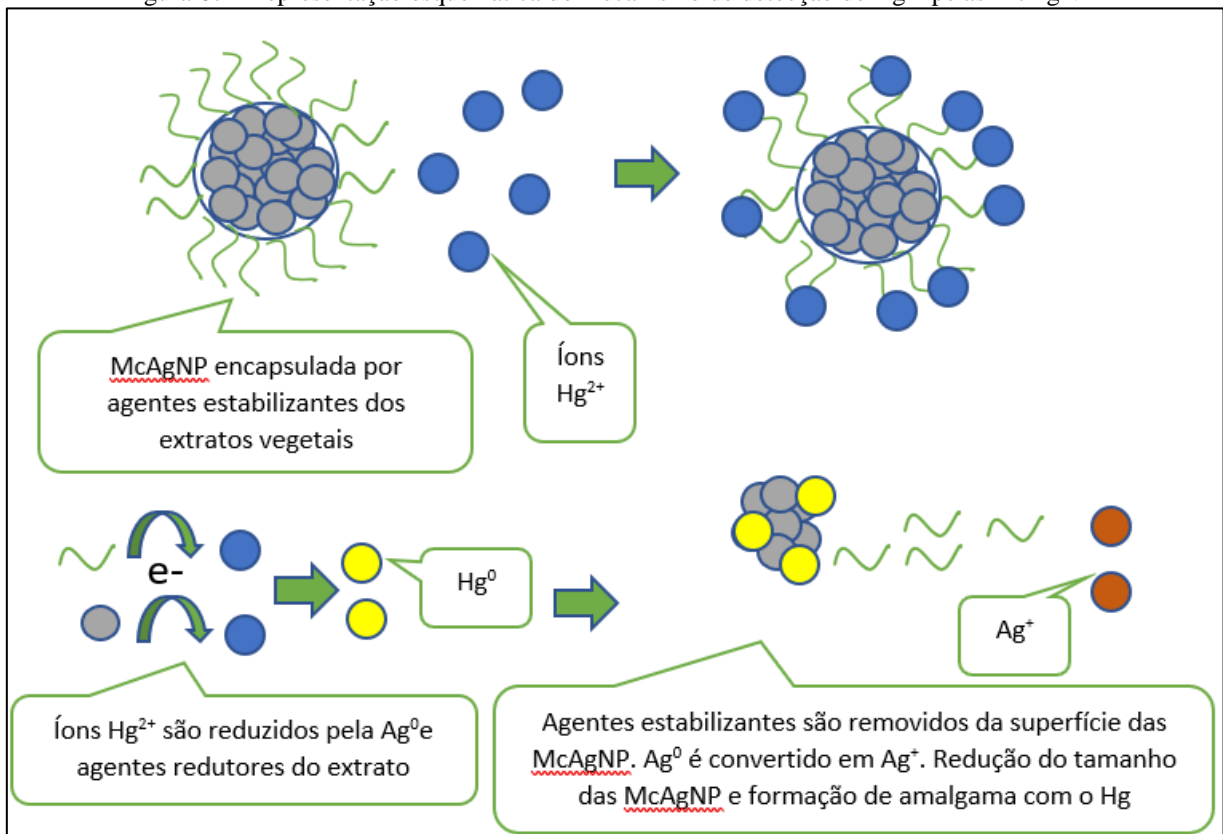


4.2.1 Discussão

As McAgNP demonstraram excelente potencial para detecção de íons Hg^{2+} em solução aquosa pelo método proposto, com limite de detecção a partir de $6,5\text{ng/mL}$ ($32,5\text{nM}$) determinado a partir da construção de curva analítica em razão de alterações nas bandas plasmônicas.

O mecanismo de detecção consiste nos efeitos de uma reação redox entre os íons Hg^{2+} e a prata zero valente devido ao maior potencial de redução do Hg^{2+} em relação à Ag^+ . Compostos fenólicos e seus derivados presentes nas folhas de espécies do gênero *Mimusops*, apresentam grupos multifuncionais como hidroxilas e carboxilas que interagem com metais e facilitam a ligação do mercúrio com a nanopartícula de prata, além disso, as McAgNP encapsuladas por estes ligantes fenólicos apresentam carga superficial negativa, capazes de atrair os íons Hg^{2+} na solução para a superfície das nanopartículas. Os compostos presentes nos extratos também atuam como agentes redutores, visto que reduzem o Ag^+ a Ag^0 no processo de síntese, e reduzem os íons Hg^{2+} a Hg^0 neste caso. Estas reações redox levam a remoção do agente estabilizante da superfície das nanopartículas, facilitando a interação dos íons Hg^{2+} com o Ag^0 que oxida é convertido em Ag^+ . Este processo reduz o tamanho das partículas interferindo nas bandas plasmônicas e tornam a solução incolor indicando que os átomos Ag^0 disponíveis na suspensão coloidal foram oxidados. A figura 67 esquematiza este processo.

Figura 67 - Representação esquemática do mecanismo de detecção de Hg^{2+} pelas McAgNP



Fonte: a própria autora. Adaptado de (DEVADIGA; VIDYA SHETTY; SAIDUTTA, 2017)

Adicionalmente, uma nova análise de sensibilidade foi efetuada com as TrpAgNP com concentrações de Hg na ordem de ng/mL, empregando as mesmas condições utilizadas com as

McAgNP na construção da curva analítica. Os resultados não foram satisfatórios e estão apresentados no apêndice C, confirmando a preferência pela McAgNP neste processo.

5 CONCLUSÃO

A síntese de nanopartículas de prata e ouro utilizando o AgNO_3 e o HAuCl_4 como precursores metálicos, através dos métodos propostos foi possível por uma reação redox, onde o L-Triptofano ou os compostos presentes no extrato das folhas de *Mimusops coriacea* oxidam e reduzem os íons metálicos a átomos neutros, que aglomeram-se formando as nanopartículas. Estas moléculas também são responsáveis pelo seu encapsulamento, estabilizando o crescimento. Com exceção das McAuNP, onde se observou a formação de nanotriângulos, em todos os outros processos foi possível obter nanopartículas esféricas com alta estabilidade. Os procedimentos utilizados foram simples, rápidos, de baixo custo e com alto rendimento.

A concentração dos reagentes e a acidez do meio foram determinantes nestes processos, sendo que cada método apresentou resultados diferentes para cada fator avaliado, entretanto, é consenso que o meio ácido é mais favorável para redução dos íons Au^{3+} , enquanto meio neutro e básico favorecem a redução de Ag^+ .

Analisando as características de cada método de síntese e seus resultados, procurando enquadrá-los nos princípios da sustentabilidade e da química verde, consideramos o procedimento utilizado para obtenção das McAgNP mais vantajoso, uma vez que se utiliza matéria-prima natural e renovável, em uma reação rápida em meio neutro, temperatura e pressão ambientes, com alto rendimento e que resultou em nanopartículas esféricas com estabilidade superior a 180 dias. Este resultado é extremamente atraente, visto que não foram encontrados na literatura relatos anteriores da síntese de nanopartículas com esta espécie do gênero *Mimusops*, dando margem à novos estudos com o intuito de elucidar os mecanismos e compostos orgânicos envolvidos na síntese. Além disso, o extrato de *Mimusops coriacea* também demonstrou potencial para síntese de nanopartículas de ouro de diferentes formatos, como nanotriângulos, com possíveis aplicações no campo da medicina diagnóstica, entretanto, a otimização deste processo depende de novos estudos acompanhados por imagens de MET a cada variação aplicada.

Quanto à aplicação proposta, o resultado se mostrou bastante satisfatório, visto que a McAgNP, considerada com procedimento de síntese mais vantajoso entre os testados também apresentou excelente sensibilidade e seletividade aos íons Hg^{2+} em solução aquosa, com LOD a partir de 6,5ng/mL e LOQ de 21,7ng/mL. Este limite de detecção é compatível com o relatado por métodos colorimétricos tradicionais (tabela 2), e é inferior ao limite estabelecido para amostras ambientais como produtos da pesca, solo e lançamento de efluentes (tabela 1).

De modo geral, os objetivos propostos foram atingidos, servindo como base para novos estudos, focados em cada um dos métodos apresentados, resultando no desenvolvimento de nanomateriais sustentáveis com potencial para aplicações que visem a proteção à saúde humana e manutenção do meio ambiente equilibrado.

6 ATIVIDADES REALIZADAS NO PERÍODO

Além de desenvolver os experimentos, as seguintes atividades foram desenvolvidas no período:

- Publicação de 3 artigos em revistas internacionais:

LOPES, C.R.B.; COURROL, L.C. Green synthesis of silver nanoparticles with extract of *Mimusops coriacea* and light. JOURNAL OF LUMINESCENCE, v. 199, p. 183-187, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2018.03.030>

BORGES, C. R.; SAMAD, R. E.; COURROL, L.C.; GONÇALVES, K. O.; VIEIRA, D. P. Interaction between protoporphyrin IX and tryptophan silver nanoparticles. JOURNAL OF NANOPARTICLE RESEARCH, v. 20 p. 166, 2018.

<https://doi.org/10.1007/s11051-018-4269-4>

SANTOS, C, D; **LOPES, C. R. B.;** CORDEIRO, T. S.; FRANZOLIN, M. R.; VIEIRA JUNIOR, N. D.; SAMAD, R. E.; COURROL, L. C. Optical properties and antimicrobial effects of silver nanoparticles synthesized by femtosecond laser photoreduction. OPTICS AND LASER TECHNOLOGY, v. 103, p. 233-238, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2018.01.044>

- Apresentação de 2 trabalhos em forma de pôster em conferência internacional:

18th International Conference on Luminescence

João Pessoa-PB – Brasil – agosto/2017

“Green synthesis of silver nanoparticles with extract of *Mimusops coriacea* and light”

“Mercury colorimetric sensor using a green silver nanoparticles synthesized with tryptophan and light”

- Apresentação de trabalho em forma de pôster, com recebimento de menção honrosa por nota recebida.

Encontro Regional das Centrais Multiusuários 2017

Santo André-SP – Brasil – agosto/2017

“Green Synthesis of Silver Nanoparticles with *Mimusops coriacea* leaf extract applied to the quantification of mercury in aqueous solutions”

- Participação em mini-curso:

End Note Basic e Mendeley

Biblioteca da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema

- Cumprimento de todos os créditos necessários.

Unidades Curriculares:

Ciência da Sustentabilidade (obrigatória, 10 créditos) – Conceito A

Termodinâmica e Cinética Avançada (obrigatória, 10 créditos) – Conceito A

Tópicos em Nanotecnologia para Sustentabilidade (eletiva, 8 créditos) – Conceito A

- Cumprimento do Programa de Aperfeiçoamento Didático (PAD)

U.C. Ondas e Óptica I

- Aprovação na prova de proficiência em inglês aplicada pela Cultura Inglesa em março de 2017 com 62% de aproveitamento.
- Aprovação no exame de qualificação em outubro de 2017
- Adicionalmente, foi analisado o potencial das nanopartículas sintetizadas neste estudo para inibição de crescimento microbiano, através da técnica de Concentração Mínima Inibitória (MIC). Estas análises foram realizadas no Laboratório Multidisciplinar em Saúde e Meio Ambiente (LABMSMA), na UNIFESP Campus Diadema, em parceria com a Prof.^a Suzan P. de Vasconcelos, com o auxílio do aluno de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular Vitor Baptista Ferrari, e estão apresentados no apêndice A.

REFERÊNCIAS

- AFROOZ, A. R. M. N. et al. Spheres vs. rods: The shape of gold nanoparticles influences aggregation and deposition behavior. **Chemosphere**, v. 91, n. 1, p. 93–98, 2013.
- AHMED, M. A.; HASAN, N.; MOHIUDDIN, S. Silver Nanoparticles: Green Synthesis, Characterization, and Their Usage in Determination of Mercury Contamination in Seafoods. **ISRN Nanotechnology**, v. 2014, p. 5, 2014.
- ALBERNAZ, V. L. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização fisicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico**. 2014. 122 f. Dissertação (mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas- Universidade de Brasília Brasília, 2014.
- ALVES, O. Nanotecnologia, nanociência e nanomateriais: quando a distância entre presente e futuro não é apenas questão de tempo. **Parcerias Estratégicas**, v. 18, p. 23–40, 2004.
- ANASTAS, P. T.; KIRCHHOFF, M. M. Origins, current status, and future challenges of green chemistry. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 9, p. 686–694, 2002.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC No 42, de 29 de Agosto de 2013. p. 17, 2013.
- BAE, C. H.; NAM, S. H.; PARK, S. M. Formation of silver nanoparticles by laser ablation of a silver target in NaCl solution. **Applied Surface Science**. v.197-198, p. 628-634, 2002
- BAI, H.-J. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Rhodobacter Sphaeroides*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 11, p. 2–4, 2011.
- BARAZZOUK, S.; KAMAT, P. V; HOTCHANDANI, S. Photoinduced electron transfer between chlorophyll a and gold nanoparticles. **The journal of physical chemistry. B**, v. 109, n. 2, p. 716–723, 2005.
- BIAN, P. et al. A silver complex with tryptophan: Synthesis, structural characterization, DFT studies and antibacterial and antitumor assays in vitro. **Journal of Molecular Structure**, v. 1031, n. 40, p. 252–257, 2013.
- BIAN, P. et al. Functionalized-tryptophan stabilized fluorescent Ag nanoclusters: Synthesis and its application as Hg²⁺ ions sensor. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 203, p. 252–257, 2014.
- BRASIL. Diagnóstico Preliminar sobre o Mercúrio no Brasil. **Ministério do Meio Ambiente**, p. 107, 2013.
- BRUNDTLAND, G. H. Our Common Future: Report of the World Commission on Environment and Development. **United Nations Commission**. 1987.
- BULUT, E. Rapid , Facile Synthesis of Silver Nanostructure Using Hydrolyzable Tannin. p. 5686–5690, 2009.

CAI, W. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. **Nanotechnology, Science and Applications**, v.1 2008, p. 17-32. 91

CALLEGARI, A.; TONTI, D.; CHERGUI, M. Photochemically Grown Silver Nanoparticles with Wavelength-Controlled Size and Shape. **Nano Letters**, v. 3, n. 11, p. 1565–1568, 2003.

CAO, G. **Nanostructures and Nanomaterials - Synthesis, Properties and Applications**. Imperial College Press. 2004.

CARVALHO, M. A. et al. A silver complex with tryptophan: Synthesis, structural characterization, DFT studies and antibacterial and antitumor assays in vitro. **Journal of Molecular Structure**, v. 1031, p. 125–131, 2013.

CENTRO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Ambientes e Processo de Trabalho. Trabalhador exposto ao mercúrio metálico**. Disponível em:
<http://www.cvs.saude.sp.gov.br/prog_det.asp?te_codigo=19&pr_codigo=14>.

CHAI, F. et al. L-cysteine functionalized gold nanoparticles for the colorimetric detection of Hg²⁺ induced by ultraviolet light. **Nanotechnology**, v. 21, n. 2, p. 025501, 2010.

CHANDRAN, S. P. et al. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract. **Biotechnol. Prog.**, v. 22(2), p.577-583, 2006.

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE Resolução n. 357, 18 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, n. 053, p. 58–63, 2005.

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. Resolução 396, de 3 de abril de 2008. **Diário Oficial da União**, p. 308–318, 2008.

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. Resolução 420. **Diário Oficial da União no 249**, v. 2013, p. 81–84, 2009.

COURROL, L. C.; SILVA, F. R. DE O.; GOMES, L. A simple method to synthesize silver nanoparticles by photo-reduction. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 305, n. 1–3, p. 54–57, 2007.

CURRIE, L. A. Detection and quantification limits : origins and historical overview. v. 391, n. February 1998, p. 127–134, 1999.

DE LA ESCOSURA-MUÑIZ, A.; MERKOÇI, A. A nanochannel/nanoparticle-based filtering and sensing platform for direct detection of a cancer biomarker in blood. **Small**, 2011.

DE MATOS, R. A. et al. Green synthesis of stable silver nanoparticles using Euphorbia milii latex. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 389, n. 1–3, p. 134–137, 2011.

DE MATOS, R. A.; COURROL, L. C. Saliva and light as templates for the green synthesis of silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 441, p. 539–543, 2014.

DEVADIGA, A.; VIDYA SHETTY, K.; SAIDUTTA, M. B. Highly stable silver nanoparticles synthesized using Terminalia catappa leaves as antibacterial agent and colorimetric mercury sensor. **Materials Letters**, 2017.

DREADEN, E. C. et al. Size matters: Gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery. **Therapeutic Delivery**, 2012.

DUAN, J. et al. Facile colorimetric detection of Hg²⁺ based on anti-aggregation of silver nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 57, p. 139–142, 2014. 92

EUSTIS, S.; EL-SAYED, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. **Chem. Soc. Rev.**, v. 35, n. 3, p. 209–217, 2006.

FEYNMAN, R. P. There's plenty of room at the bottom: An invitation to enter a new field of physics. **Engineering and Science**, v. 23, p. 22–35, 1960.

GARDEA-TORRESDEY, J. L. et al. Alfalfa sprouts: A natural source for the synthesis of silver nanoparticles. **Langmuir**, v. 19, n. 4, p. 1357–1361, 2003.

GAUTIER, L. et al. *Mimusops coriacea* (A. Dc.) Miq. (Sapotaceae): Nomenclature, distribution and ecology. **Candollea**, v. 67, n. 1, p. 148–151, 2012.

HARRIMAN, A. Further Comments on the Redox Potentials. n. 3, p. 6102–6104, 1987.

HUANG, J. C. et al. Preparation of soluble polyimide-silver nanocomposites by a convenient ultraviolet irradiation technique. **Materials Chemistry and Physics**, v. 69, n. 1–3, p. 172–175, 2001.

HUTTER, E.; FENDLER, J. H. Exploitation of localized surface plasmon resonance. **Advanced Materials**, v. 16, n. 19, p. 1685–1706, 2004.

IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chemistry**, v. 13, n. 20, p. 2638, 2011.

ITOH, H.; NAKA, K.; CHUJO, Y. Synthesis of Gold Nanoparticles Modified with Ionic Liquid Based on the Imidazolium Cation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 10, p. 3026–3027, 2004.

JÚNIOR, W. A. D. **Especiação, quantificação, distribuição e transporte de mercúrio em solos contaminados do município de descoberto**, Tese (doutorado). Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. p. 142, 2010.

KAWANAMI, S. **A Misteriosa Doença de Minamata**. Japão em Foco, 2014. Disponível em: <www.japaoemfoco.com/a-misteriosa-doenca-de-minamata/>. Acesso em 10/05/2018

KAZACHENKO, A. S. et al. Synthesis and antimicrobial activity of silver complexes with histidine and tryptophan. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 34, n. 5, p. 257–258, 2000.

KAZACHENKO, A. S. et al. Synthesis and antimicrobial activity of gold complexes with glycine, histidine, and tryptophan. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 33, n. 9, p. 470–472, 1999.

KELLY, K. L. et al. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 3, p. 668–677, 2003.

KHOROSHY, P. et al. Quenching of chlorophyll triplet states by carotenoids in algal light-harvesting complexes related to fucoxanthin-chlorophyll protein. **Photosynthesis Research**, v. 135, n. 1–3, p. 213–225, 2018.

KUMAR, H. A. K. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of *Mimusops elengi* seed extract mediated isotropic silver nanoparticles. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 130, p. 13–18, 2014. 93

LAZARINI, L. **Polissacarídeos de *Mimusops coriacea***. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado), Curso de Ciências Biológicas Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1998.

LEE, C. W. et al. Photocatalytic conversion of CO₂ to hydrocarbons by light-harvesting complex assisted Rh-doped TiO₂ photocatalyst. **Journal of CO₂ Utilization**, v. 5, p. 33-40, 2014.

LI, L. et al. Label-free aptamer-based colorimetric detection of mercury ions in aqueous media using unmodified gold nanoparticles as colorimetric probe. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 8, p. 2051–2057, 2009.

LIN, S. et al. Silver nanoparticle-alginate composite beads for point-of-use drinking water disinfection. **Water Research**, v. 47 (12) p. 3959-3965, 2013.

LU, R. et al. Egg white-mediated green synthesis of silver nanoparticles with excellent biocompatibility and enhanced radiation effects on cancer cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 2101–2107, 2012.

MAJUMDAR, R.; BAG, B. G.; GHOSH, P. *Mimusops elengi* bark extract mediated green synthesis of gold nanoparticles and study of its catalytic activity. **Applied Nanoscience**, v. 6, n. 4, p. 521–528, 2016.

MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1434–1446, 2012.

MASHWANI, Z.-R. et al. Synthesis in plants and plant extracts of silver nanoparticles with potent antimicrobial properties: current status and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.99, p.9923-9934, 2015a.

MASHWANI, Z. et al. Synthesis in plants and plant extracts of silver nanoparticles with potent antimicrobial properties: current status and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 9923–9934, 2015b.

MATOS, R. A. DE et al. Synthesis of silver nanoparticles using agar-agar water solution and femtosecond pulse laser irradiation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 423, p. 58–62, 2013.

MATOS, R. A. DE. **Estudo de método verde para produção de nanopartículas metálicas utilizando aminoácidos e luz**. Dissertação (mestrado), Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, 110 f., Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2014.

MEWS, A. *Nanomaterials Handbook*. Edited by Yury Gogotsi. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 13, p. 2143–2143, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria 2914/2011. **Diário Oficial da União**, v. 2011, p. 1–16, 2011.

MIQUEL, F. A. W. *Flora Brasiliensis*. In: **Flora Brasiliensis**. 1863.

MISHRA, A. et al. Microbial synthesis of gold nanoparticles using the fungus *Penicillium brevicompactum* and their cytotoxic effects against mouse mayo blast cancer C2C12 cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 3, p. 617–630, 2011.

MITTAL, A. K.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts, **Biotechnology Advances**, v.31 (2), p. 346-356, 2013. 94

MOCK, J. J. et al. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. **The Journal of Chemical Physics**, v. 116, n. 15, p. 6755, 2002.

MONGE, M. Nanopartículas de prata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. **Investigación química**, August, p. 33-41, 2009.

MORRIS, T. et al. The effects of mercury adsorption on the optical response of size-selected gold and silver nanoparticles. **Langmuir**, v. 18, n. 20, p. 7261–7264, 2002.

MUKHA, I. et al. The pH-Dependent Structure and Properties of Au and Ag Nanoparticles Produced by Tryptophan Reduction. **Nanoscale Research Letters**, 2016.

NETTO-FERREIRA, J. C. Reações catalíticas empregando o efeito plasmônico de nanopartículas metálicas suportadas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 165–217, 2015.

NOLASCO, L. G. **Regulamentação jurídica da nanotecnologia**. 437 f., Tese (doutorado), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

OTUBO, L. **Técnicas de Caracterização de Nanopartículas Metálicas Funcionalizadas**. Monografia, 26 f., Instituto de Química – Universidade de Campinas, 2005.

PAJOVIĆ, J. D. et al. Tryptophan-functionalized gold nanoparticles for deep UV imaging of microbial cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135. p. 742-750, 2015.

PARK, J. et al. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using gallic acid: catalytic activity and conversion yield toward the 4-nitrophenol reduction reaction. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 18, n. 6, p. 166, 2016.

PARK, J. J. et al. Pattern formation of silver nanoparticles in 1-, 2-, and 3D microstructures fabricated by a photo- and thermal reduction method. **Advanced Functional Materials**, v. 20, n. 14, p. 2296–2302, 2010.

PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O MEIO AMBIENTE. **Convenção de Minamata sobre mercúrio**, Kumamoto, 2013

POLIAKOFF, M. et al. Green chemistry: Science and politics of change, **Science**, v. 297, p. 807-810, 2002.

PRAKASH, P. et al. Green synthesis of silver nanoparticles from leaf extract of *Mimusops elengi*, Linn. for enhanced antibacterial activity against multi drug resistant clinical isolates. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 108, p. 255–259, 2013.

PUBCHEM. **PubChem Compounds Database**. Tryptophan, Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6305>>.

QUINA, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 1028–1029, dez. 2004.

RAJESHKUMAR, S.; BHARATH, L. V. Mechanism of plant-mediated synthesis of silver nanoparticles – A review on biomolecules involved, characterisation and antibacterial activity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 273, p. 219–227, 2017. 95

RAO, K. J.; PARIA, S. Green synthesis of silver nanoparticles from aqueous *Aegle marmelos* leaf extract. **Materials Research Bulletin**, v. 48, n. 2, p. 628–634, 2013.

RAUWEL, P. et al. A review on the green synthesis of silver nanoparticles and their morphologies studied via TEM, **Advances in Materials Science and Engineering**, 2015.

RODRIGUES, J. **Aminoácidos: uma abordagem teórica**. Disponível em: <<http://www.fcencias.com/2013/11/07/aminoacidos-uma-abordagem-teorica-laboratorio-online/>>.

RUIKAR, A. D. et al. Larvicidal potential of *Mimusops elengi* against *Aedes aegypti* (L) and *Culex quinquefasciatus* (Say). **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 49, n. 2, p. 111–113, 2012.

SAHA, M. R. et al. in Vitro Free Radical Scavenging Activity of Methanol Extract of the Leaves of *Mimusops Elengi* Linn. **Bangl. J. Vet. Med**, v. 6, n. 2, p. 197–202, 2008.

SATISH, S. et al. Antifungal activity of a known medicinal plant *Mimusops elengi* L. against grain moulds. **Journal of Agricultural Technology**, v. 4 (1), p. 151-165, 2008.

SELVAKANNAN, P. R. et al. Water-dispersible tryptophan-protected gold nanoparticles prepared by the spontaneous reduction of aqueous chloroaurate ions by the amino acid. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 269, n. 1, p. 97–102, 2004a.

SELVAKANNAN, P. R. et al. Water-dispersible tryptophan-protected gold nanoparticles prepared by the spontaneous reduction of aqueous chloroaurate ions by the amino acid. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 269, n. 1, p. 97–102, 2004b.

SENER, G.; UZUN, L.; DENIZLI, A. Lysine-Promoted Colorimetric Response of Gold Nanoparticles: A Simple Assay for Ultrasensitive Mercury(II) Detection. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 514-520, 2014.

- SHARMA, P. et al. Thiol terminated chitosan capped silver nanoparticles for sensitive and selective detection of mercury (II) ions in water. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 268, p. 310–318, 2018.
- SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities, **Advances in Colloid and Interface Science**, 2009.
- SINGH, P. et al. Synthesis and characterization of silver and gold nanoparticles in ionic liquid. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 73, n. 1, p. 218–220, 2009.
- SONG, J. Y.; KIM, B. S. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, n. 1, p. 79–84, 2009.
- SOUZA, G. D. DE; RODRIGUES, M. A.; PEREIRA, P. Prata : Breve histórico, propriedades e aplicações. **Educación Química**, v. 24, n. 1, p. 14–16, 2013. 96
- SRIVASTAVA, S. K. et al. Green synthesis of Au, Pd and Au@Pd core–shell nanoparticles via a tryptophan induced supramolecular interface. **RSC Advances**, v. 3, n. 40, p. 18367, 2013.
- SZUNERITS, S. et al. Sensing using localised surface plasmon resonance sensors. **Chemical Communications**, v. 48, n. 72, p. 8999, 13 ago. 2012.
- VIGDERMAN, L.; ZUBAREV, E. R. Therapeutic platforms based on gold nanoparticles and their covalent conjugates with drug molecules, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2013.
- VILAS, V.; PHILIP, D.; MATHEW, J. Catalytically and biologically active silver nanoparticles synthesized using essential oil. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 132, p. 743–750, 2014.
- VIOL, L. C. DE S. et al. Precipitação Seletiva de Tamanhos em Nanopartículas semicondutoras Coloidais de CdTe E CdSe: um estudo por espectroscopia UV-Vis. **Quim. Nova**, v. 34, n. 4, p. 595–600, 2011.
- WANG, S. et al. Influence of speciation of aqueous H₂AuCl₄ on the synthesis, structure, and property of Au colloids. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 133 (16), p. 6506–6510, 2009.
- YOU, Y. H.; ZHANG, C. P. The photochemistry properties on interaction silver with tryptophan. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 69, n. 3, p. 939–946, 2008.
- YU, W. W.; WANG, Y. A; PENG, X. G. Formation and stability of size-, shape-, and structure-controlled CdTe nanocrystals: ligand effects on Monomers and Nanocrystals **Chemistry of Materials**, n. 24, p. 4300–4308, 2003.
- ZHANG, T. et al. Plasmonic Properties of Welded Metal Nanoparticles. **The Open Surface Science Journal**, v. 3, p. 76–81, 2011.
- ZHANG, X.-F. et al. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, 17 (9), p. 1534, 2016.

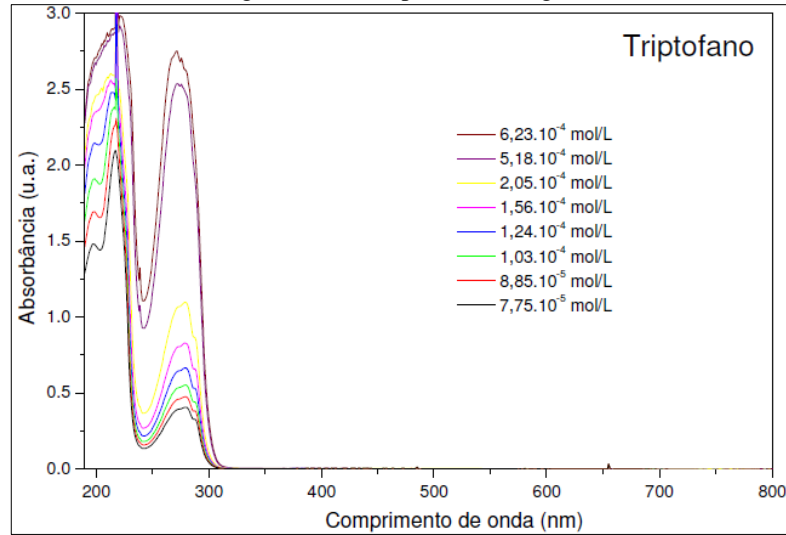
ZHOU, Y. et al. A Convenient Ultraviolet Irradiation Technique for Fabrication of Silver-polymer Nanocomposites. **Chemistry Letters**, n. 7, p. 677–678, 1999.

ZHU, S.; FU, Y. Hybridization of localized surface plasmon resonance-based Au-Ag nanoparticles. **Biomedical microdevices**, v. 11, n. 3, p. 579–83, 2009.

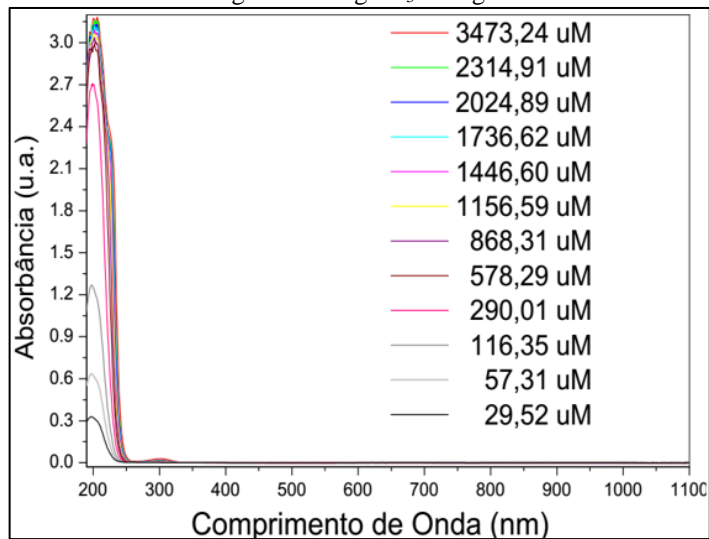
ANEXOS

ANEXO A - Comportamento Espectral do L-Triptofano, AgNO_3 , HAuCl_4 e extrato de folhas de *Mimusops coriacea* em água

Figura 68 - L-Triptofano em água

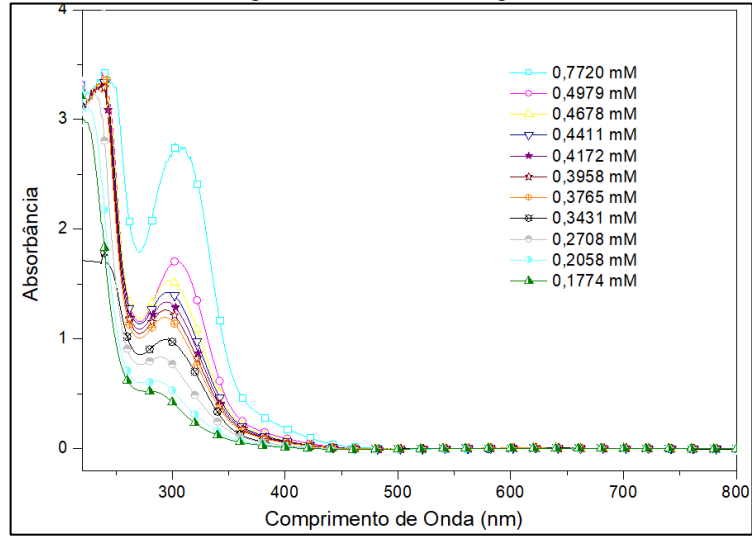


Fonte: (MATOS, 2014)

Figura 69 - AgNO_3 em água

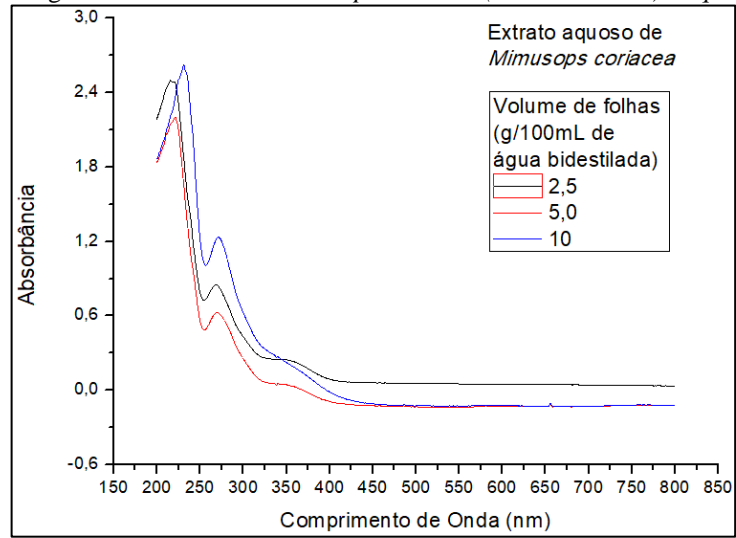
Fonte: (MATOS, 2014)

Figura 70 - H_{Au}Cl₄ em água



Fonte: (MATOS, 2014)

Figura 71 - Extrato de *Mimusops coriacea* (A. de Candolle) Miq.



Fonte: a própria autora

APÊNDICES

APÊNDICE A – Análise de Concentração Mínima Inibitória das Nanopartículas

Análise desenvolvida no LABMSMA da UNIFESP Campus Diadema, em colaboração com a Prof.^a Suzan P. Vasconcelos e do doutorando no PPG- Biologia Molecular.

Para estas análises foram utilizadas as seguintes suspensões, todas com pH ajustado entre 7 e 8: McAg 2; McAu 1; TrpAg 2 Xe 10⁷; TrpAuNP (L-Trp 9mmol/L e HAuCl₄ 2mmol/L)

A concentração mínima inibitória (MIC) é a menor concentração de uma substância antimicrobiana que torna possível a inibição de crescimento detectável de um microorganismo após 24 horas, tornando possível a quantificação da concentração exata necessária ($\mu\text{g} / \text{mL}$) da substância antimicrobiana. Para esses testes foram utilizadas uma bactéria gram positiva (*Staphylococcus aureus*), uma bactéria gram negativa (*Escherichia coli*) e um fungo (*Candida albicans*).

Foi feita a diluição seriada da substância com o meio de cultura respectivo de cada microorganismo (*Luria Bertania* para as bactérias e *YMA* para os fungos) e posteriormente é colocada a suspensão microbiana que foi em solução salina 0,9% para uma concentração de 10⁴ unidades formadoras de colônia (UFC).

Após 24 horas de crescimento foram analisados os resultados, na qual os poços das colunas 1-10 contêm a substância antimicrobiana de concentrações variáveis em ordem decrescente (1 é a concentração mais alta e 10 é a menor concentração). Os poços nas colunas 11 e 12 contêm positivos (sem agente antimicrobiano) e controles negativos (sem bactérias), respectivamente. Os controles positivos e negativos são usados para validar a precisão dos antimicrobianos testados.

Os resultados obtidos neste método são apenas qualitativos em relação a inibição, ou seja, é possível indicar se houve ou não crescimento microbiano em cada diluição da substância antimicrobiana, entretanto, não é possível indicar a porcentagem de inibição.

A coloração dos poços das microplacas indica se houve inibição, sendo a coloração violeta indicativa de crescimento microbiano, assim, a diluição aplicada no poço imediatamente anterior ao primeiro a apresentar crescimento microbiano, se trata da MIC da substância antimicrobiana utilizada.

Resultados Obtidos:

1 - *Staphylococcus aureus*.

McAgNP – MIC 25% (Diluição 1:4).

Figura 72 – Resultado da análise de MIC das McAgNP para *Staphylococcus aureus*.



TrpAgNP – 100% (sem diluição).

Figura 73 - Resultado da análise de MIC das TrpAgNP para *Staphylococcus aureus*.



McAuNP – 100% (Sem diluição).

Figura 74 - Resultado da análise de MIC das McAuNP para *Staphylococcus aureus*.



TrpAuNP – 100% (sem diluição).

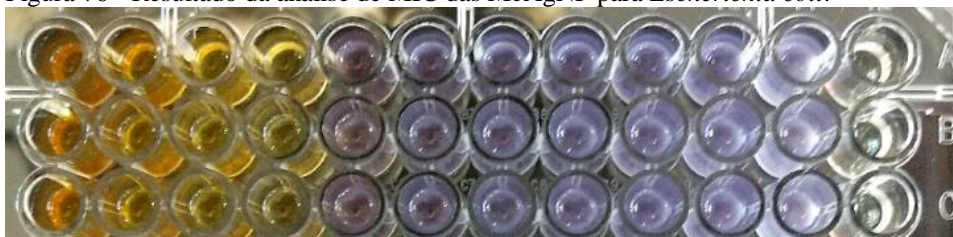
Figura 75 – Resultado da análise de MIC das TrpAuNP para *Staphylococcus aureus*.



2 - *Escherichia coli*.

McAgNP – 12,5% (diluição 1:8)

Figura 76 - Resultado da análise de MIC das McAgNP para *Escherichia coli*.



TrpAgNP – 50% (diluição 1:2)

Figura 77 - Resultado da análise de MIC das TrpAgNP para *Escherichia coli*.



McAuNP – 100% (sem diluição)

Figura 78 - Resultado da análise de MIC das McAuNP para *Escherichia coli*.



TrpAuNP – 100% (sem diluição)

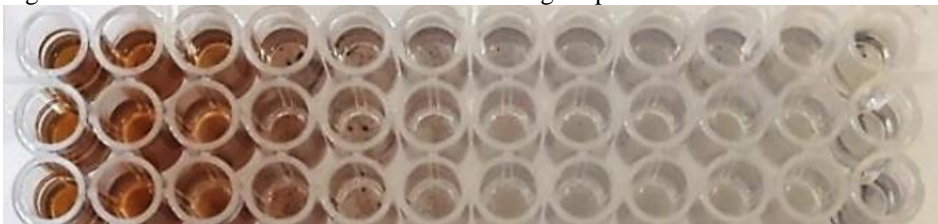
Figura 79 - Resultado da análise de MIC das TrpAuNP para *Escherichia coli*.



3 - *Candida albicans*

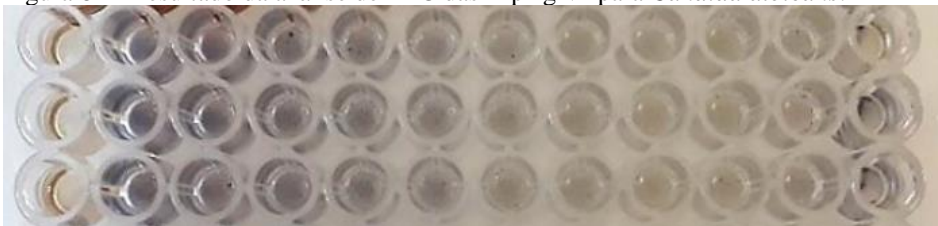
McAgNP – 25% (diluição 1:4)

Figura 80 - Resultado da análise de MIC das McAgNP para *Candida albicans*.



TrpAgNP – 100% (sem diluição)

Figura 81 - Resultado da análise de MIC das TrpAgNP para *Candida albicans*.



McAuNP – não houve inibição

Figura 82 - Resultado da análise de MIC das McAuNP para *Candida albicans*.



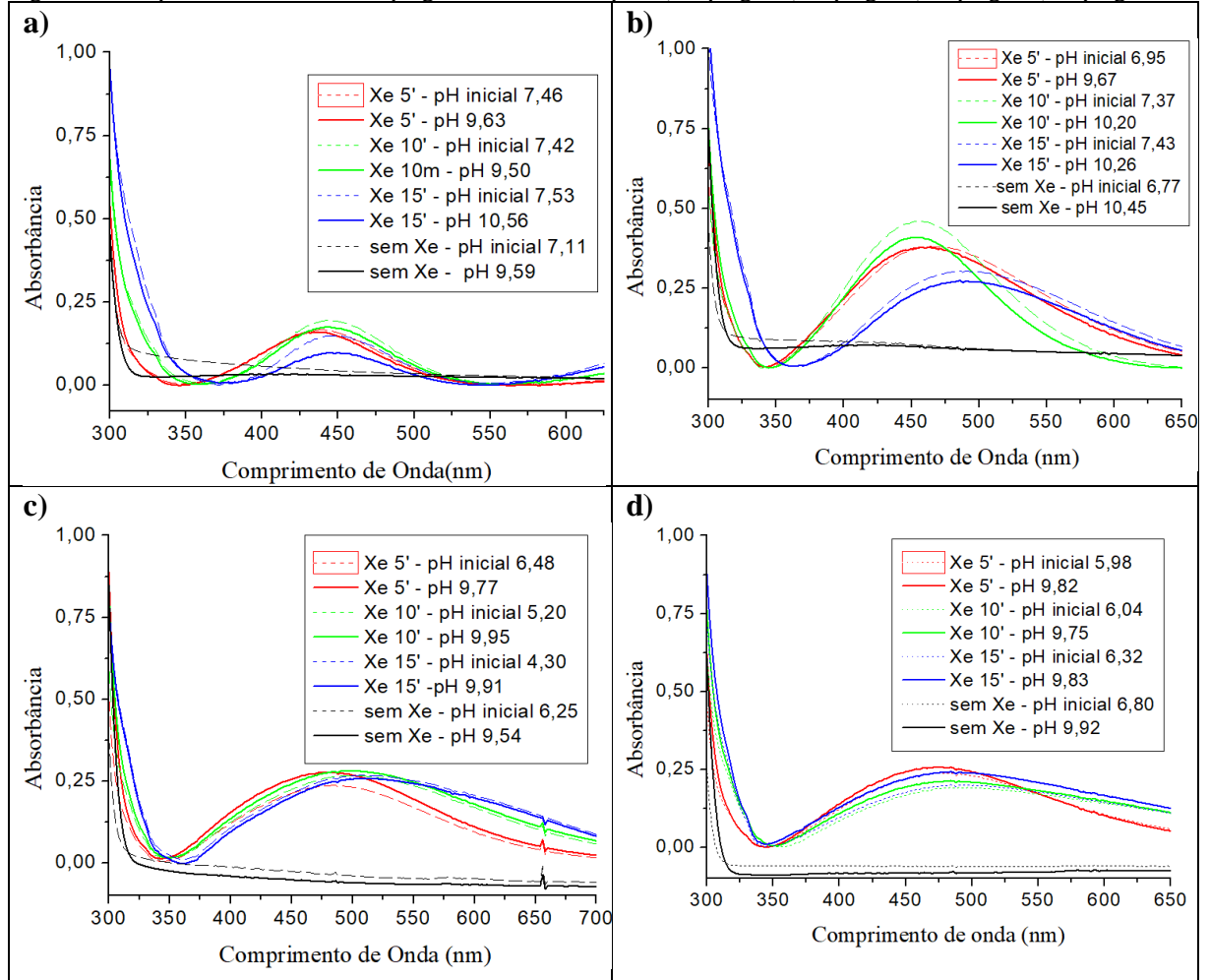
TrpAuNP – não houve inibição

Figura 83 - Resultado da análise de MIC das TrpAuNP para *Candida albicans*.



APÊNDICE B - Espectros UV-Vis das TrpAgNP antes e após o ajuste de pH.

Figura 84 - Espectros UV-vis das TrpAgNP em razão do pH. a) TrpAg1; b) TrpAg2; c) TrpAg3; d) TrpAg4



APÊNDICE C – Análise de sensibilidade das TrpAgNP ao Hg em concentrações entre 100 e 500ng/mL.

Figura 85 - Espectros UV-vis das TrpAg 2 ($Xe 10^7$) na presença de íons Hg^{2+} com concentrações entre 100 e 500ng/mL.

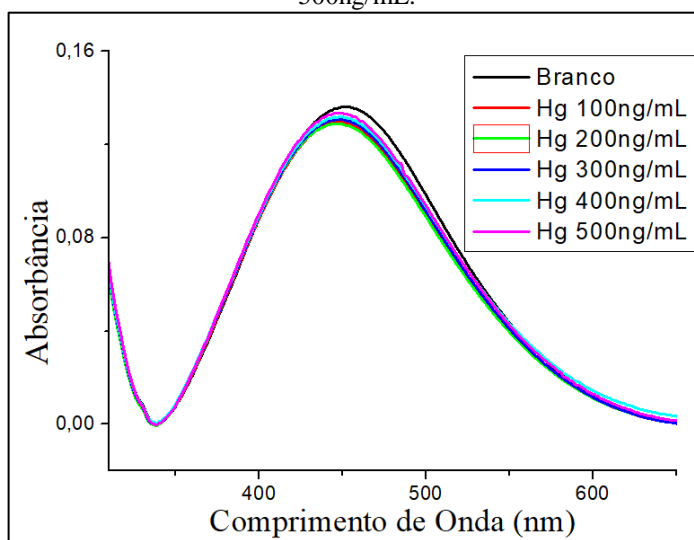


Figura 86 - Curva de redução da intensidade de absorbância das TrpAg 2 ($Xe 10^7$) na presença de íons Hg^{2+} com concentrações entre 100 e 500ng/mL

