

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE- UNICENTRO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANGÉLICA PANICHI SANTOS

**SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM EXTRATO
AQUOSO DE *Calendula officinalis* E DIODOS EMISSORES DE LUZ (LED)**

**PONTA GROSSA
2017**

ANGÉLICA PANICHI SANTOS

**SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM EXTRATO
AQUOSO DE *Calendula officinalis* E DIODOS EMISSORES DE LUZ (LED)**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre no ao Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa em parceria com a Universidade Estadual do Centro-Oeste. Área de concentração: Desenvolvimento e controle de fármacos, medicamentos e correlatos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Josiane Padilha de Paula.
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Christiane Philippini
Ferreira Borges.

**PONTA GROSSA
2017**

S237	Santos, Angélica Panichi Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de <i>Calendula officinalis</i> e diodos emissores de luz (LED)/Angélica Panichi Santos Ponta Grossa, 2017. 89 f.; il. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração – Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa; Universidade Estadual do Centro-Oeste. Orientadora: Profa. Dra. Josiane Padilha de Paula Coorientadora: Profa. Dra. Christiane Philippini Ferreira Borges 1. Síntese verde com plantas. 2. Nanopartícula de prata. 3. Extrato aquoso de <i>Calendula officinalis</i>. 4. Diodos emissores de luz (LED). I. Paula, Josiane Padilha de. II. Borges, Christiane Philippini Ferreira. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. IV. Universidade Estadual do Centro-Oeste- Mestrado em Ciências Farmacêuticas. V. T. CDD : 544.92
------	---

Ficha catalográfica elaborada por Maria Luzia F. Bertholino dos Santos CRB9/986

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS—
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS
APLICADAS À FARMÁCIA, NÚMERO DA ATA 03/2017, DA MESTRANDA ANGÉLICA
PANICHI SANTOS REALIZADO NO DIA 08 DE MARÇO DE 2017, NA UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos oito dias de março de dois mil e dezessete, às 14h00min no Auditório do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Bloco M, sala 115, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência da Professora Doutora Josiane Padilha de Paula, reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da mestranda Angélica Panichi Santos na linha de pesquisa: Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos, constituído pelos demais Doutores (membros titulares): Franciane Dutra de Souza (UEPG/PR) e Maria Helene Giovanetti (UTFPR/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidatas normas que regem a defesa de dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título do trabalho foi: SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM EXTRATO AQUOSO DE *Calendula officinalis* e DIODOS EMISSORES DE LUZ (LED) Encerrado a defesa, a banca pronunciou-se APROVADA a dissertação, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. A aluna deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da dissertação de Mestrado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário):

Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título:

Josiane Padilha de Paula (Defar - UEPG) - Presidente

Franciane Dutra de Souza
Franciane Dutra de Souza (Dequim - UEPG) - Titular

Maria Helene Giovanetti (Dequim - UTFPR) - Titular

Ponta Grossa, 08 de março de 2017.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitórias e nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente o Grande Cientista da Vida, Senhor Deus, pois sem Seu Amor, Misericórdia e Honra, não estaria aqui escrevendo este texto. A Ele minha gratidão eterna, pois Nele encontrei refúgio, conforto e respostas em vários momentos de tribulações e desesperos. Sempre acreditei e acredito que o Senhor Jesus tem Seus propósitos e se forem árduos, é para tornar a vitória mais grandiosa.

À minha família, pelo amor e desvelo incondicionais. Especialmente, ao meu esposo Giovan George Santos que demonstrou em todos os momentos um apoio e incentivo incontestável, pela compreensão dos meus filhos Vithor e Lavínia, que mesmo sentindo minha falta, torciam e acreditavam no meu crescimento pessoal e profissional. A minha mãe, a quem eu serei eternamente grata, pela incansável e constante dedicação para comigo. Ao meu sogro Paulo, minha sogra Irene e Lourdes principalmente pelo apoio e cuidados com minha família nos momentos de minha ausência afetiva e física. A minha irmã que sempre torce por meu crescimento profissional.

Agradeço aos novos amigos que contribuíram para meu aperfeiçoamento na pesquisa científica e aos antigos pelo ombro amigo, incentivo e aceitação dos meus momentos de ausência. A Rose Iurko pela ajuda no cultivo da *Canlenda officinalis*.

À minha coorientadora Prof.^a Dr.^a Christiane Philippini Ferreira Borges por confirmar meu apreço pela química e pelo apoio didático.

Aos técnicos do C-Labimu, em especial a Ana Mary, Vanessa, Simone, Medina e o André por repetir pacientemente e por muitas vezes minhas análises.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e Fundação Araucária, pelo suporte financeiro que permitiu a realização desse trabalho.

Finalmente à minha orientadora Prof.^a Dr.^a Josiane Padilha que me amparou e aceitou como aluna, diante do desafio de orientar uma aluna há anos longe do meio acadêmico, pela condução com destreza e compreensão. Além de ter sido uma orientadora dedicada, amiga e um exemplo a ser seguido. Incansável e extremamente motivada, a sua vida mostra que não se deve desistir e que se deve sempre olhar adiante, de cabeça erguida, com vistas a um ideal maior. A minha estima por ela caminha em paralelo com a minha consciência de que ela foi a grande responsável pelo meu crescimento acadêmico e pelo caminho que escolhi trilhar.

RESUMO

SANTOS, ANGELICA PANICHI. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de *Calendula officinalis* e diodos emissores de luz (LED)**. 89 f. Dissertação Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2017.

A síntese verde é uma alternativa segura, ecologicamente correta e sustentável para produzir nanopartículas metálicas menos tóxicas, mais toleráveis ao organismo humano, com efeitos biológicos melhorados e mínima agressão ao meio ambiente. A utilização de plantas para esta finalidade tem sido amplamente estudada, entretanto, existem poucos estudos que atentam para o uso de LED (Light Emitting Diodes) isoladamente ou associado às plantas, para esta finalidade. Assim, o objetivo deste trabalho foi sintetizar e caracterizar nanopartículas de prata (AgNPs) obtidas por síntese verde, usando extrato aquoso de flores de *Calendula officinalis* sem e com fotoredução por LEDs de diferentes comprimentos de onda, além da determinação do tempo necessário para a total redução da prata. Foi realizada, ainda, a caracterização morfológica, de superfície e espectroscópica das nanopartículas obtidas. Os resultados indicaram que as condições ideais para a redução total dos íons Ag^+ para Ag^0 e formação das AgNPs foram: a utilização do extrato *Calendula officinalis* obtido por infusão, em uma proporção de 1/20 entre o extrato e a solução de nitrato de prata (AgNO_3), e 48 horas de reação. Em relação à aplicação do LED, não se observou a formação de AgNPs pela irradiação isolada dos LED sobre a solução de AgNO_3 , entretanto a exposição aos LEDs associada à presença do extrato de *Calendula officinalis* produziu efeitos fotoquímicos, determinando alterações nas formas das partículas formadas. Nas micrografias por MEV-FEG observou-se que AgNPs obtidas pelo extrato de *Calendula officinalis* apresentaram formato esférico, enquanto as expostas aos LEDs verde e azul apresentaram geometrias diferentes, como hexagonais, prismáticas, quadradas e retangulares. O LED vermelho não promoveu mudança na morfologia das AgNPs. A presença de prata (Ag^0) nas nanopartículas foi comprovada pelo EDS. No DRX o aparecimento de picos de cristalinidade relativos à prata metálica. Foi possível confirmar a presença dos constituintes químicos do extrato de *Calendula officinalis* na superfície das AgNPs, por meio da identificação de bandas específicas no FT-IR e aumento na intensidade do espalhamento da luz observado na espectroscopia Raman. Foi possível concluir que o extrato aquoso de *Calendula officinalis* 5% é uma alternativa excelente para a síntese verde de AgNPs e que a exposição aos LEDs associada ao extrato de *Calendula officinalis* promoveu efeitos fotoquímicos, determinando a forma das AgNPs.

Palavras chaves: Síntese verde com plantas, nanopartícula de prata; extrato aquoso de *Calendula officinalis*; Diodos emissores de luz (LED).

ABSTRACT

SANTOS, ANGELICA PANICHI. **Green synthesis of silver nanoparticles with aqueous extract of *Calendula officinalis* and light emitting diodes (LED)**. 89 f. Dissertação Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2017.

Green synthesis is a safe, environmentally friendly and sustainable alternative to produce less toxic metallic nanoparticles, more tolerable to the human body, presenting improved biological effects and minimal environmental impact. The use of plants for this purpose has been widely studied, however, there are few studies that attempt to use Light Emitting Diodes (LED) alone or associated with plants. Thus, the aim of this work was to synthesize and characterize silver nanoparticles (AgNPs) obtained by green routes, using aqueous extract of *Calendula officinalis* flowers with and without photoreduction by LED in different wavelength. It was determined yet, the ideal time to complete silver reduction, and morphological, surface and spectroscopic characterization was performed. The results indicated that the ideal conditions to complete reduction of ion Ag^+ to Ag^0 were: use of aqueous extract of *Calendula officinalis* obtained by infusion of flowers, in proportion of 1/20 to AgNO_3 solution, and 48 hours of reaction. It was showed that, the exposition of AgNO_3 solution to LED alone, was not capable to produce AgNPs. However, when associated to the extract of *Calendula officinalis* the exposition to LED promoted photochemistry effect, that determined the shape of AgNPs. It was observed by SEM-FEG that AgNPs obtained by extract of *Calendula officinalis* presented spherical shape, but AgNPs irradiated by green and blue LED showed different geometries, as prismatic, cubic and cylindrical. Red LED didn't promoted changes in the spherical shape of AgNPs. The presence of silver (Ag^0) in the AgNPs was confirmed by EDS and presence of crystallinity peak at DRX, that was related to metallic silver. Chemical compounds of *Calendula officinalis* on the AgNPs surface were identified by specific bands in the FT-IR and by improve of intensity of light scattering showed in Raman spectroscopy. It was possible to conclude that aqueous extract of *Calendula officinalis* 5% flowers is an excellent alternative to green synthesis of AgNPs and that LED exposition associated to extract of *Calendula officinalis* promoted photochemical effects, determining AgNPs shape.

Keywords: Green synthesis using plants; aqueous extract *Calendula officinalis*; silver nanoparticle; Light emitting diodes (LED).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da oscilação plasmônica para uma esfera em resposta à excitação eletromagnética, mostrando o deslocamento da nuvem dos elétrons de condução relativa à partícula.	19
Figura 2 - AgNPs em vários formatos, suas absorções em UV-visível e as soluções coloidais correspondentes com diferentes cores.	20
Figura 3 - Esquema ilustrativo da agregação a partir de átomo isolado, formação dos clusters, pequenos aglomerados de átomos e o material nanoestruturado.	21
Figura 4 - Métodos de síntese de nanopartículas metálicas	23
Figura 5 - Esquema de redução dos íons Ag^+ pelo extrato de plantas.....	31
Figura 6 - Formas anisotrópicas que as AgNPs podem adquirir a partir do cluster de Ag^0	33
Figura 7 - Esquema representativo do possível mecanismo das AgNPs na indução da citotoxicidade. Os círculos vermelhos indicam as espécies reativas de oxigênio (ERO).....	36
Figura 8 - Flores de <i>Calendula officinalis</i>	38
Figura 9 - Estruturas dos constituintes químicos da <i>Calendula officinalis</i> , isoramnetina, cadinol, geranilacetona, β – ionona-5,6-epóxido, calendoflavosídeo e calendoflasídeo.	38
Figura 10 - Fluxograma da 1ª, 2ª e 3ª etapa dos experimentos realizados no estudo.....	45
Figura 11 - Aparatos com a fita contendo pontos de LEDs RGB (Red, Green e Blue) de 1 W.	48
Figura 12 - Progressão da coloração no meio reacional (contendo 5mL de infuso 95mL de AgNO_3 1 mM), no intervalo de 2 a 48 horas. 5I2 (2 horas), 5I4 (4 horas), 5I6 (6 horas), 5I24 (24 horas) e 5I48 (horas).....	54
Figura 13 - Espectro das AgNPs logo após o gotejamento, depois de 4 horas e 48 horas.....	55
Figura 14 - Avaliação da presença de precipitação para avaliar a presença dos íons Ag^+	56
Figura 15 - Espectro de UV-Vis das AgNPs expostas aos LEDs (AgNPEB, AgNPEG, AgNPER) no tempo zero.	58
Figura 16 - Espectro de UV-Vis das AgNPs expostas aos LEDs (AgNPEB, AgNPEG, AgNPER), após 24 horas.....	59

Figura 17 - Espectro de UV-Vis das AgNPs expostas aos LEDs (AgNPEB, AgNPEG, AgNPER), após 48 horas.....	60
Figura 18 - Espectro de FT-IR do extrato aquoso de <i>Calendula officinalis</i> a 5 % m/V e número de ondas (cm^{-1}) e transmitância correspondentes aos grupos funcionais.....	62
Figura 19 - Os espectros FT-IR do extrato de flores de <i>Calendula officinalis</i> e os espectros das AgNPE, AgNPEB, AgNPEG E AgNPER respectivamente, após 48 horas de exposição aos LEDs.	63
Figura 20 - Difractogramas de raios X do extrato aquoso a 5% da <i>Calendula officinalis</i> e das AgNPs.	65
Figura 21 - Micrografia das AgNPE.....	67
Figura 22 - Micrografia das AgNPER	68
Figura 23 - Gráfico do diâmetro médio das AgNPE	68
Figura 24 - Micrografia das AgNPEB	69
Figura 25 - Micrografia das AgNPEG.	70
Figura 26 - Espectro por energia dispersiva mostrando o pico da presença de Ag nas AgNPE.	71
Figura 27 - Espectro por energia dispersiva mostrando o pico da presença de Ag na AgNPEB.....	72
Figura 28 - Espectro de Raman do extrato aquoso de flor de <i>Calendula officinalis</i> a 5%, das AgNPE e das nanopartículas expostas ao LEDs.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Histórico da atividade antimicrobiana da prata.....	28
Tabela 2 - Características típicas de LED	41
Tabela 3 - Caracterização das AgNPs obtidas por duas formas de extrato e dois diferentes volumes.....	53
Tabela 4 - Características das AgNPs obtidas com extrato aquoso de <i>Calendula officinalis</i> 5%) e exposição aos LEDs por 48 h. Diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta (PZ).....	57
Tabela 5 - Tabela de valores das vibrações correspondentes aos grupos funcionais encontrados na literatura.....	61
Tabela 6 - Valores dos ângulos e planos cristalinos encontrados nos difratogramas das AgNPE, AgNPEB e AgNPEG.....	66
Tabela 7 - Características físico-químicas das AgNPs obtidas pela redução da solução do AgNO ₃	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNP	Nanopartícula de prata
AgNPs	Nanopartículas de prata
AgNPE	Nanopartículas de prata obtidas somente com extrato aquoso
AgNPEB	Nanopartículas de prata obtidas com extrato aquoso e LED Azul
AgNPEG	Nanopartículas de prata obtidas com extrato aquoso e LED Verde
AgNPER	Nanopartículas de prata obtidas com extrato aquoso e LED Vermelha
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
DMF	Dimetilformamida
DH	Diâmetro hidrodinâmico
d.nm	Diâmetro em nanômetros
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNAs	Ácido desoxirribonucleico
DRX	Difração de raios X
EDX	Energia Dispersiva de Raios X
FDA	Food and Drug Administration
FEG	Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (Espectroscopia Infravermelho no transformada de Fourier)
keV	Quiiloelétron-volt
kV	Quilovolts
LED	<i>Light Emitting Diode</i> (diodos emissores de luz)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mV	Mili-volt
NASA	<i>National Aeronautics and Space Administration</i> (Administração Nacional da Aeronáutica e Espaço)
PET	Polietileno tereftalato
p53	Gene supressor tumoral, que codifica uma fosfoproteína nuclear que desempenha um papel importante no controle do ciclo celular, no reparo do DNA e na indução da apoptose
PFT- α	Pifitrina-alfa cíclica
μm	Micrômetro
rpm	Rotação por minutos
SERS	Surface Enhanced Raman Scattering (Espectroscopia Raman amplificada por superfície)
UV – Vis	Ultravioleta visível

LISTA DE SÍMBOLOS

Ag	Prata
Ag ⁺	Prata com Nox +1
Ag ⁰	Prata com Nox 0
Au	Ouro
C	Carbono
Cu	Cobre
Fe	Ferro
K	Potássio
NaBH ₄	Borohidreto de sódio
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	Citrato de sódio
Si	Silício
θ	Graus teta.

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	17
2.1.1 Breve Histórico	18
2.1.2 Propriedades Ópticas e Magnéticas.....	18
2.1.3 Sistema Coloidal e Estabilização das Nanopartículas Metálicas.....	21
2.1.4 Métodos de Síntese de Nanopartículas Metálicas	23
2.1.4.1 Métodos físicos (<i>top - down</i>)	24
2.1.4.2 Métodos químicos e biológicos (<i>bottom-up</i>)	24
2.2 APLICAÇÕES DAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	25
2.3 NANOPARTÍCULAS DE PRATA.	27
2.3.1 Prata.....	27
2.3.2 Síntese de Nanopartículas de Prata.....	29
2.3.2.1 Síntese verde	30
2.3.3.2 Síntese fotoquímica e nanopartículas anisotrópicas	33
2.5 DIODOS EMISSORES LUZ – LDE	40
3. OBJETIVOS.....	43
3.1. OBJETIVO GERAL	43
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 LISTA DE EQUIPAMENTOS	44
4.2 REAGENTES	44
4.3 MÉTODOS	45
4.3.1 Síntese das Nanopartículas de Prata.....	46
4.3.1.1 Obtenção do material botânico.....	46
4.3.1.2 Preparo do extrato aquoso das flores de <i>Calendula officinalis</i>	46
4.3.1.2.1 <i>Extrato por infusão</i>	46
4.3.1.2.2 <i>Extrato por turbólise (turbo-extração)</i>	46
4.3.1.3 Preparo da solução de nitrato de prata	46
4.3.1.4 Obtenção das AgNPs com extrato aquoso de flores de <i>Calêndula officinalis</i> a 5%.	47
4.3.1.5 Síntese das AgNPs por fotorredução	47
4.3.1.5.1 <i>Obtenção das AgNPs a partir da exposição da solução de AgNO₃ aos LEDs</i>	47
4.3.1.5.2 <i>Obtenção das AgNPs a partir da reação de AgNO₃ com o extrato aquoso de Calendula officinalis 5% e com exposição aos LEDs.</i>	48
4.3.2 Caracterização Morfológica e Físico-química das AgNPs.....	49
4.3.2.1 Diâmetro hidrodinâmico, polidispersão e potencial zeta.....	49
4.3.2.2 Espectroscopia de absorção óptica na região do Ultravioleta Visível (UV-VIS)	49

4.3.2.3 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	49
4.3.2.4 Difração de Raios X.....	49
4.3.2.5 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FEG)	50
4.3.2.6 Determinação do diâmetro médio	50
4.3.2.7 Espectroscopia por energia dispersiva (EDS)	50
4.3.2.8 Espectroscopia Raman	50
4.3.2.10 <i>Estudo da estabilidade através do diâmetro hidrodinâmico, polidispersão e potencial Zeta</i>	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs)	52
5.1.1 Obtenção das AgNPs a Partir da Exposição da Solução de AgNO ₃ aos LEDs.....	52
5.1.2 Obtenção das Nanopartículas com Extrato Aquoso de Flores de <i>Calêndula officinalis</i> a 5% (AgNPE)	52
5.1.3 Obtenção das AgNPs a Partir da Reação do AgNO ₃ com o Extrato Aquoso de <i>Calendula officinalis</i> a 5% e com e Exposição aos LEDs.	56
5.1.3.1 Caracterização das AgNPs obtidas com extrato aquoso de <i>Calendula officinalis</i> 5%) e exposição aos LEDs.....	57
5.1.3.1.1 <i>Diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta (PZ)</i>	57
5.1.3.1.3 <i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de fourier (FT-IR)</i>	60
5.1.3.1.4 <i>Difração de Raios X</i>	63
5.1.3.1.5 <i>Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG)</i> ..	67
5.1.3.1.6 <i>Espectroscopia por energia dispersiva (EDS)</i>	71
5.1.3.1.7 <i>Espectroscopia de Raman</i>	72
5.1.3.1.8 <i>Estudo da estabilidade</i>	74
6 CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS.....	78

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico de nanopartículas apresenta constantemente novos avanços, resultando na produção de novos dispositivos e materiais nanoestruturados dos mais diversificados componentes, como metais, cerâmicos, fibras de carbono e polímeros e visando a utilização de métodos mais sustentáveis, rentáveis e eficazes.

A evolução e multiplicidade de muitas doenças no século XX, como a resistência bacteriana, a variabilidade dos tipos de câncer e a morte por estas doenças, tem impulsionado pesquisas de novas formulações e novos compostos. Entretanto, toda essa evolução precisa estar aliada a métodos sustentáveis e que preservem o meio ambiente, abrindo, desta forma, espaço para o crescimento da nanobiotecnologia, da síntese verde ou química verde e da biorremediação.

Considerando os infindáveis recursos da natureza, nanopartículas metálicas foram desenvolvidas através da síntese verde, por meio do uso de plantas, micro-organismo e outros substratos naturais, processo livre de redutores químicos que podem contaminar o meio ambiente. Dessa forma, a síntese verde de nanopartículas metálicas visa utilização de organismos biológicos, ou partes deles (como órgãos, tecidos, células ou biomoléculas), como substituintes de reagentes químicos tóxicos nas reações de síntese de nanocompostos, apresentando-se como uma alternativa sustentável. (LOGESWARI et al., 2015).

Entre as nanopartículas de metais nobres, as nanopartículas de prata (AgNPs) tem despertado grande interesse devido suas propriedades específicas, tais como estabilidade química, boa condutividade, aplicações catalíticas atividade antimicrobiana, antiviral, antifúngica, além de atividade anti-inflamatória conforme análise dos autores, Ahmed et al., (2015), Chen; Schluesener, (2008), e Gorenšek; Recel, (2007).

As AgNPs podem ser obtidas por meio de diferentes métodos, como por redução química ou fotoquímica de solução de nitrato de prata (AgNO_3), entre outros com base em Pacione et al., (2015) e Sulaiman et al., 2013). Todos os métodos trazem vantagens e desvantagens com problemas comuns como custo, estabilidade, tamanho de partícula e polidispersividade (TRAN et al., 2013).

As técnicas físico-químicas utilizadas tradicionalmente na síntese de nanopartículas metálicas envolvem solventes tóxicos e a geração de resíduos potencialmente nocivos à saúde e ao meio ambiente, limitando em diversas circunstâncias o seu amplo uso em aplicações biomédicas. Por esta razão as plantas e outros produtos vegetais se encontram entre as várias fontes naturais disponíveis, capazes de produzir as nanopartículas metálicas. Os extratos vegetais aquosos contêm alcaloides, taninos, esteroides, fenois, saponinas e flavonoides, que podem rapidamente produzir nanopartículas metálicas, originando uma solução com alta densidade e estabilidade. Assim, estes metabólitos secundários dos extratos vegetais reduzem os íons Ag^+ para Ag^0 formando as AgNPs. (GURUNATHAN et al., 2014).

Em função de contribuir na produção de nanoformulações no tratamento do câncer e na potencialização da ação antimicrobiana, propôs-se o desenvolvimento tecnológico de uma AgNP pela redução com extrato aquoso das flores de *Calendula officinalis*, que apresenta relevantes propriedades farmacológicas, como anti-inflamatório, antimicrobiana, antiviral, antitumoral, antiulcerosa, antioxidante e antisséptica e muitos metabólitos secundários capazes de promoverem a redução da prata à AgNPs. (GAZIN, 2007). Essa escolha se deve a tentativa de um sinergismo entre a ação da prata e metabólitos secundários da planta para potencializar ações biológicas como, atividade antimicrobiana e citotóxica.

A fotoquímica é um método bem difundido na produção de nanopartículas de material inorgânico, porque o uso da luz ou radiação pode contribuir para estabilização das nanopartículas, para a formação e principalmente para o desenvolvimento de nanopartículas anisotrópicas. Normalmente as nanopartículas por redução química são esféricas. No entanto, com o uso da luz podem variar as suas formas, sendo possível obter nanopartículas triangulares, cúbicas, quadradas e prismáticas. Essas nanopartículas anisotrópicas causam efeitos diferentes na bactéria ou nas células e relacionados com suas propriedades ópticas, forma e tamanho. (TRAN et al., 2013).

Os Diodos Emissores de Luz (*Light Emitting Diode* - LED) são estruturas compostas por dois materiais semicondutores nos quais, em sua junção, por diferença de cargas, ocorre a emissão de luz, sem aumento de temperatura. Por isso, apresentam um gasto energético baixo e são utilizados na fotoquímica. Estudos recentes mostraram que os LED promovem a fotorredução das sementes

de prata e controlam o tamanho das AgNPs esféricas, (STAMPLECOSKIE; SCAIANO, 2010), e têm sido utilizados frequentemente como fonte de luz de excitação em reações fotoquímicas de síntese de AgNPs. (LEE et al., 2014).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi sintetizar AgNPs por rotas alternativas, empregando a síntese verde, utilizando o extrato aquoso de flores de *Calendula officinalis* e Diodos Emissores de Luz e avaliar as suas atividades biológicas em bactérias e levedura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

A nanotecnologia de materiais metálicos compreende a ciência de materiais inorgânicos que visa o domínio de partículas e interfaces com dimensões extremamente pequenas, da ordem de 1 a 100 nanômetros (nm). As partículas deste tamanho são denominadas de nanopartículas metálicas, apresentam uma grande área superficial e, frequentemente, exibem propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas ou químicas distintas de partículas e superfícies macroscópicas. O tamanho, a forma e as propriedades físico-químicas são mais facilmente trabalhadas e modificadas em nanopartículas metálicas do que em outros tipos de nanopartículas.

O aproveitamento dessas propriedades das nanopartículas metálicas em aplicações tecnológicas juntamente com a da ciência da saúde formam a base da nanobiotecnologia. (RAI, 2013). A nanobiotecnologia representa um moderno e promissor propósito no desenvolvimento de novas formulações à base de nanopartículas metálicas com propriedades diferenciadas e em diversas áreas científica e tecnológica, como na medicina em próteses e material cirúrgico, na química para catálise, na física como materiais optoeletrônicos, na biologia em marcadores celulares e na farmacêutica para bioencapsulação e biosensores. (ALMEIDA et al., 2015; SIGNORI, 2010).

Com o aumento da razão entre a área e o volume do material nanoestruturado, os efeitos de superfície se tornam mais acentuados, conferindo a esses materiais, características específicas para determinadas aplicações como em catálise, na síntese de colóides, em processos fotoquímicos, no desenvolvimento de sensores e dispositivos eletrônicos, em aplicações médicas, na obtenção de novos fármacos e no controle ambiental. (FERREIRA; RANGEL, 2009).

As nanopartículas metálicas adquirem características físicas e químicas importantes diretamente relacionadas com os metais que as formam, como propriedades magnéticas, ópticas, catalíticas e de transporte. Os metais estão ligados por retículos cristalinos, sendo que cada átomo fica circundado por 8 ou 12 outros átomos do mesmo elemento metálico, tendo, portanto, atrações iguais em todas as direções, exceto os átomos na lateral do cristal. Os átomos dos metais

possuem apenas 1, 2 ou 3 elétrons na camada de valência resultando em elétrons livres que transitam livremente pelo reticulado através da ligação metálica, mantendo os átomos unidos. Portanto esta estrutura reticulada e esse tipo de ligação química resultam em uma série de propriedades características dos metais que contribuem para produção de nanopartículas metálicas, pois estes elétrons livres permitem a agregação entre os átomos e nucleação das nanopartículas metálicas.

2.1.1 Breve Histórico

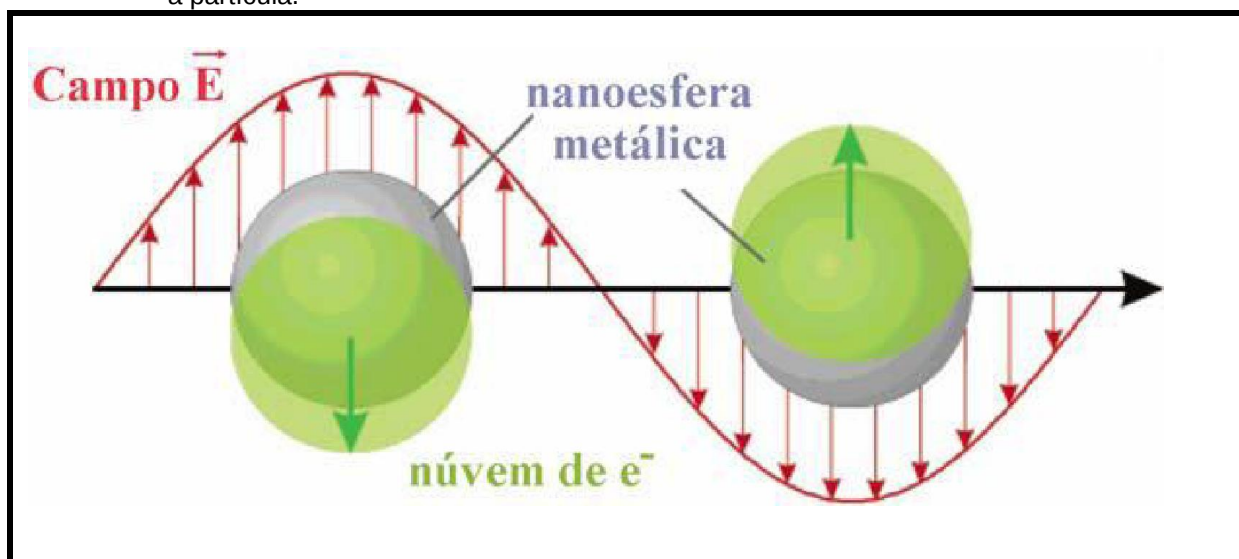
As nanopartículas metálicas podem ser produzidas a partir de vários metais, especialmente nobres, como ouro, prata, platina, titânio e cobre. As primeiras nanopartículas metálicas foram desenvolvidas intencionalmente em 1857, por Michael Faraday que sintetizou nanopartículas de ouro e demonstrou a relação entre as propriedades e o tamanho de partículas de ouro, observando que esse tamanho influenciava na absorção de luz. Em sua forma natural, o ouro exibe uma coloração amarela, porém, dependendo do tamanho das partículas, pode se mostrar negro, rubi ou arroxado, sendo possível obter materiais baseados em ouro em diferentes cores, dependendo do tamanho das partículas. (FERREIRA; RANGEL, 2009; LIZMARZAN, 2004). A prata utilizada desde a antiguidade para o tratamento de feridas e doenças infecciosas foi introduzida há muitos anos na nanotecnologia. As nanopartículas de platina tiveram desenvolvimento promissor como nanocatalisadores. (SANTOS, 2009). Os protetores solares foram precursores na utilização nanopartículas de dióxido de titânio. (FLOR et al., 2007).

2.1.2 Propriedades Ópticas e Magnéticas

As propriedades magnéticas e ópticas das nanopartículas se devem à mobilidade dos elétrons dos metais. Uma onda de luz incidente a um campo eletromagnético oscilante, quando atinge a superfície do campo elétrico da radiação empurra os elétrons móveis para frente e para trás. Esses elétrons oscilantes emitem luz, essencialmente a remissão da luz incidente. Os elétrons oscilam em sintonia com a luz incidente e emitem luz com a mesma frequência, ou seja, a cor da radiação incidida será a cor refletida pelo metal, por exemplo, se incidirmos a luz vermelha em um metal, ele refletirá a cor vermelha. (ATKINS; JONES, 2006). Em

detrimento destas condições, cada solução coloidal de nanopartícula metálica reflete uma cor específica, por exemplo, as soluções de nanopartículas de ouro apresentam uma coloração roxa e as de prata, coloração amarela, consequência dos efeitos quânticos e ressonância do plasmon de superfície. Essa ressonância é o fenômeno que ocorre quando a frequência dos elétrons de condução oscila em resposta ao campo elétrico alternante da radiação eletromagnética incidente, como se demonstra na Figura 1. Esse fenômeno ocorre quando as dimensões do condutor são reduzidas como pode se observar em nanopartículas de ouro, platina, prata e cobre. Além disso, a coloração das soluções de nanopartículas também está diretamente relacionada com o formato e tamanho da partícula.

Figura 1 - Representação da oscilação plasmônica para uma esfera em resposta à excitação eletromagnética, mostrando o deslocamento da nuvem dos elétrons de condução relativa à partícula.



Fonte: OLIVEIRA M. M., 2005.

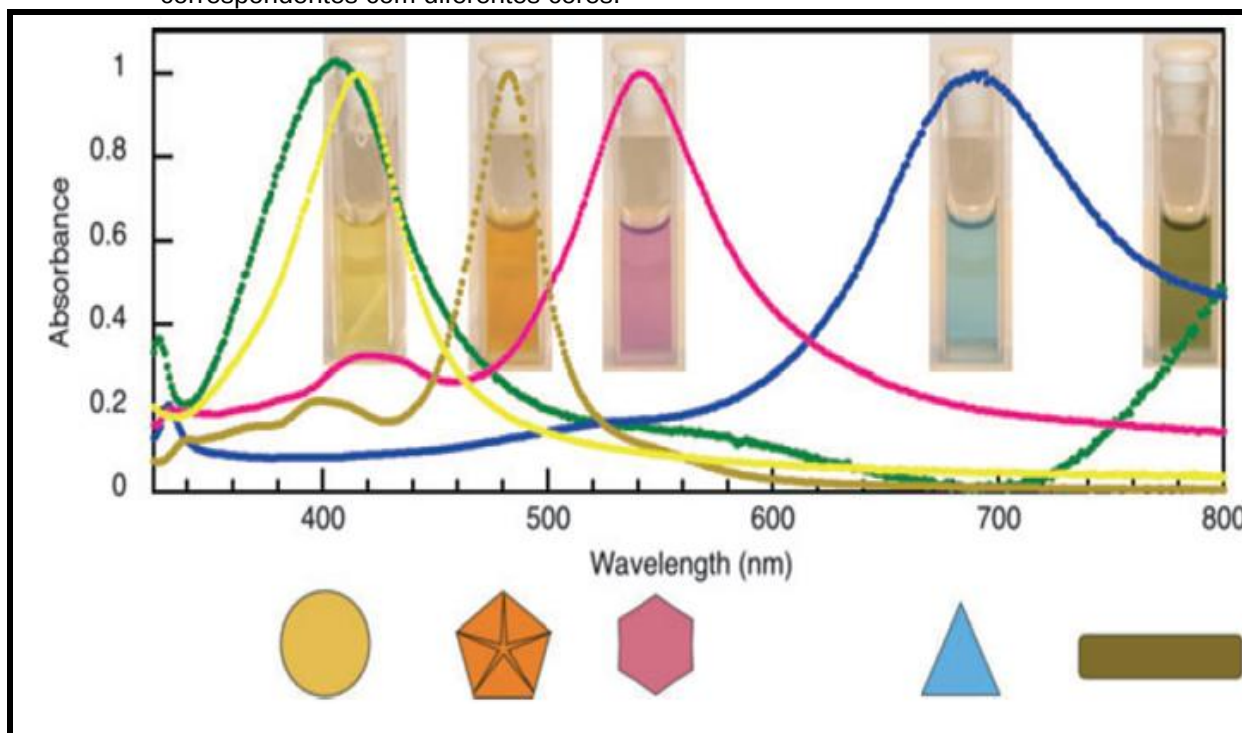
Um dos aspectos mais interessantes das nanopartículas metálicas é que as suas propriedades ópticas dependem fortemente do tamanho e forma das partículas. Uma barra de prata tem a aparência cinza brilhante quando reflete a luz, mas em filmes como espelho transmitem a cor avermelhada, como na taça de Lycurgus, feita pelos romanos em 400 a.C., que apresenta coloração verde e, quando iluminada por dentro, adquire uma cor avermelhada. Sabe-se hoje em dia que o vidro dessa taça contém nanopartículas de prata e ouro. Estes efeitos são o resultado de mudanças na assim chamada ressonância de plasmon de superfície, a frequência na qual elétrons de condução oscilam em resposta para o campo elétrico alternado com a radiação eletromagnética incidente. No entanto, apenas metais com elétrons livres,

essencialmente Au, Ag, Cu, e os metais alcalinos quando nanoestruturados possuem ressonâncias de plasmon de superfície no espectro visível, que dão origem a essas cores intensas, propriedade não visível nos átomos isolados e nem nas macroestruturas. (BINDHU; UMADEVI, 2015).

Nanopartículas alongadas (elipsóides e nanobastões) exibem duas bandas plasmon distintas relacionadas com a oscilação transversal e oscilação longitudinal de elétrons. A oscilação longitudinal é muito sensível ao formato da nanopartícula, de modo que pequenos desvios na esfera geométrica podem levar a mudanças de cor impressionantes. (CARDOSO et al., 2015).

Esses aspectos podem ser confirmados através da caracterização das nanopartículas metálicas, principalmente por espectroscopia de UV-visível (UV-Vis). Como exemplo, as AgNPs apresentam absorbância em comprimento de onda máximo entre 400 a 500 nm, já as nanopartículas de ouro, esta absorbância aparece entre 500 a 600 nm. No trabalho desenvolvido por Stamplecoskie e Scaiano em 2010 foi observado que para cada forma das AgNPs (quadrada, prismática, triangular) há uma banda de absorção plasmônica característica (Figura 2), e as cores emitidas pelas soluções destas nanopartículas também são diferentes.

Figura 2 - AgNPs em vários formatos, suas absorções em UV-visível e as soluções coloidais correspondentes com diferentes cores.



Fonte: STAMPLECOSKIE K. G.; SCAIANO J. C, 2010

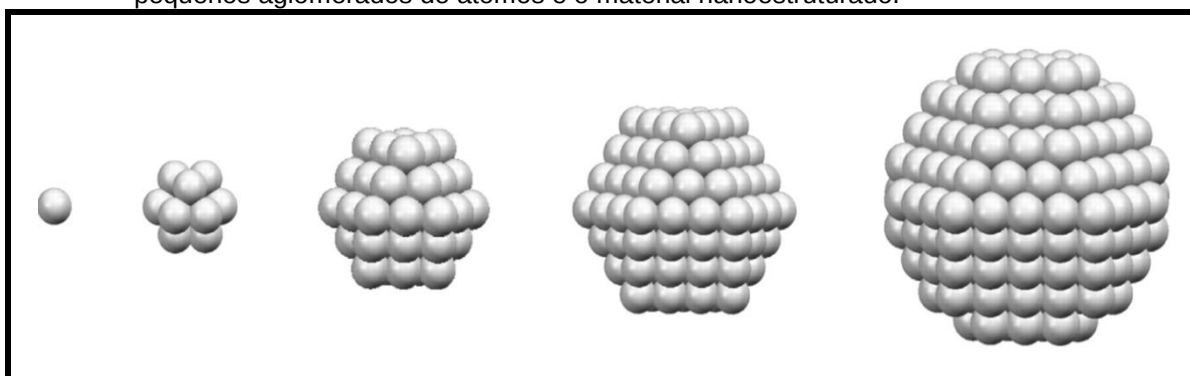
Além das propriedades individuais das nanopartículas metálicas, o ambiente no qual os metais nanoparticulados estão dispersos, sendo que o índice de refração e a distância entre nanopartículas metálicas influenciam nas suas características espectrais e suas propriedades ópticas, tornando-as ainda mais interessantes e pesquisadas. (LIU et al., 2015).

2.1.3 Sistema Coloidal e Estabilização das Nanopartículas Metálicas

As nanopartículas metálicas normalmente são sintetizadas em sistemas coloidais. Uma fase dispersa formada por agregados de átomos com dimensões de até 100 nm aproximadamente. Um átomo mede de 1 a 4 Å e à medida que eles vão se nucleando para formar as nanopartículas suas dimensões passam a ser do aglomerado em nanômetros. As propriedades físicas e químicas desses aglomerados são bem definidas e estes podem ser caracterizados.

A partir dessa coloidização, a estrutura desses pequenos aglomerados (*clusters*) evolui suavemente em direção ao valor limite encontrado no material em nanoescala (Figura 3) com características específicas que podem permitir sua identificação e suas qualidades. A mudança na coloração da solução coloidal é um indicativo da presença do material em nanoescala, por exemplo, na produção de AgNPs a partir da redução da solução de AgNO_3 por citrato ou borohidreto, a solução que inicialmente é transparente e incolor, adquire a coloração amarela quando as nanopartículas estão presentes. Quando são utilizados extratos de planta para redução da solução do AgNO_3 a coloração adquirida pela solução coloidal é marrom avermelhado. Esses são aspectos visuais que podem ser utilizados como parâmetro para determinar que as AgNPs foram formadas.

Figura 3 - Esquema ilustrativo da agregação a partir de átomo isolado, formação dos clusters, pequenos aglomerados de átomos e o material nanoestruturado.



Fonte: Adaptado de SAADE, 2013.

Um dos grandes desafios relacionados aos sistemas coloidais contendo nanopartículas metálicas consiste exatamente em mantê-las estáveis nestas faixas de tamanho, evitando a aglomeração, sendo que estas possuem uma alta energia superficial, favorecendo termodinamicamente imediata agregação destas para a formação de ligações metal-metal.

Apesar de cada método possuir características específicas, de modo geral, a síntese coloidal de nanopartículas se baseia em quatro componentes: meio, precursor, agente redutor e estabilizante. Assim, o meio é a fase líquida onde a reação ocorrerá. O composto químico que irá fornecer o metal é o precursor, geralmente o sal do metal, no caso de nanopartículas metálicas. O agente redutor é geralmente um composto químico que fornece elétrons e que reduzirá o íon, transformando-o na espécie metálica. O agente estabilizante ou de revestimento, é a molécula que recobre a superfície das nanopartículas, mantendo-as afastadas e dispersas no meio. (FERNANDES, 2014). A presença do agente estabilizante, que se adsorve sobre a superfície das nanopartículas, forma uma camada auto-organizada, que impede a coalescência. Para este fim, alguns dos estabilizantes mais eficazes são os poliméricos, como, por exemplo, polivinilpirrolidona (PVP) poli álcool vinílico (PVA) e ácido poliacrílico (PAA), que possuem, em suas estruturas, sítios básicos de Lewis com alta afinidade pelas nanopartículas, e cadeias orgânicas suficientemente compridas que criam um impedimento estérico, evitando interações entre as mesmas. (MELLO et al., 2012).

No caso da síntese verde de nanopartículas metálicas com planta, os constituintes químicos do extrato, as biomoléculas, desempenham duas funções: como agente redutor e estabilizante. Os grupos funcionais como alcoóis, fenóis e cetônicos promovem a redução do íon metálico e adsorvem na superfície das nanopartículas ligando-se ao metal, proporcionando um recobrimento das mesmas, assim limitando o crescimento e evitando que se agreguem. (INGALE et al., 2013).

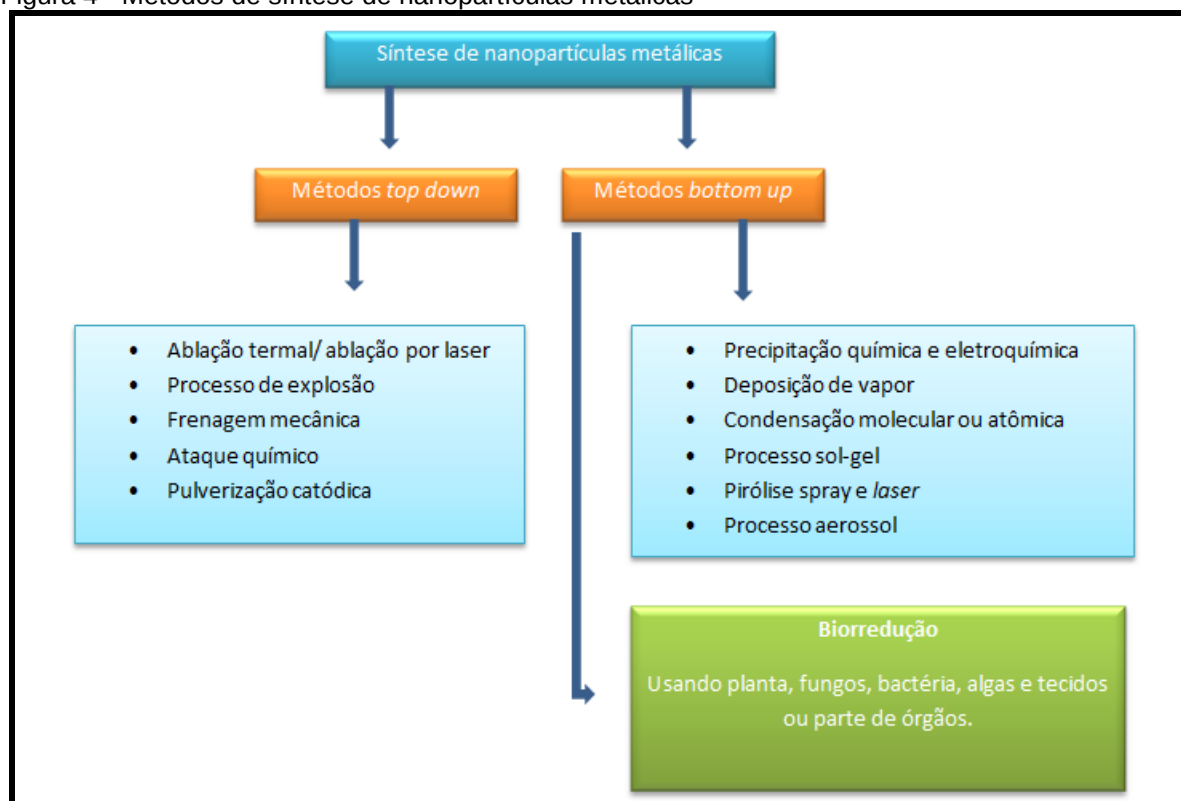
Outro fator determinante para estabilidade é o recobrimento da nanopartícula metálica, seja por biomoléculas presentes no extrato de planta em síntese verde ou outros compostos usados para revestimento e neutralização de cargas. O desempenho das atividades físicas, químicas biológicas das nanopartículas metálicas em soluções coloidais estão diretamente relacionadas com o estado de agregação, com o metal escolhido e com o uso de adjuvantes da síntese como estabilizantes, polímeros e surfactantes.

2.1.4 Métodos de Síntese de Nanopartículas Metálicas

Vários métodos de preparação de nanopartículas metálicas têm sido desenvolvidos, sendo que, a qualidade do colóide, a estabilidade, a distribuição de tamanho das nanopartículas, a rapidez e simplicidade do método, o custo de preparação são considerados os aspectos mais relevantes na escolha de uma boa produção de nanopartículas.

Tecnologicamente os nanomateriais podem ser preparados segundo uma abordagem física, química ou híbrida, utilizando dois métodos (Figura 4). O primeiro método é conhecido como *Top-down* (de cima para baixo), que se baseia na desconstrução de estruturas maiores, utilizando técnicas de fabricação para cortar, moer e moldar materiais até atingir a nanoescala. O segundo é o método *Bottom-up* (de baixo para cima), que explora as propriedades químicas de moléculas/átomos individuais para fazer com que estes se organizem e formem uma estrutura em nanoescala. (MITTAL et al., 2013; FERREIRA; RANGEL, 2009).

Figura 4 - Métodos de síntese de nanopartículas metálicas



Fonte: Adaptado de MITALL et al., 2013

2.1.4.1 Métodos físicos (*top - down*)

Os métodos físicos promovem a quebra de um bloco ou um pedaço do metal, ocorrendo uma subdivisão do material até a obtenção de uma estrutura em nanoescala. Baseia na desconstrução de estruturas maiores, utilizando técnicas de fabricação para cortar, moer e moldar materiais até atingir tamanhos nanométricos. Exemplo desses métodos são sonólise ultrassônica (HUI et al., 2014), nanolitografia, ablação por laser, (DARROUDI, 2015; ZAMIRI, 2010), abrasão (moagem de alta energia), pulverização catódica e cauterização química. Nos métodos físicos de obtenção de nanoestruturas, o controle do tamanho e das formas é mais difíceis de serem alcançados, exige altas temperaturas e grande gasto de energia, com isso tornando-os mais onerosos.

2.1.4.2 Métodos químicos e biológicos (*bottom-up*)

Os métodos químicos, também conhecidos como *bottom-up*, são baseados em reações químicas, de oxidação/redução e utilizam precursores moleculares ou atômicos, geralmente na forma de um sal, para a obtenção das nanopartículas desejadas.

Muitos agentes redutores podem ser utilizados entre os quais estão, citrato de sódio, (SANTANA et al., 2006; MEISEL, 1982 e TURKEVICH et al., 1951), borohidreto de sódio, (MELLO et al., 2012), e hidrazina, (ANSARI; SARTALE, 2015), e hidroquinona, (GENTRY; FREDERICKS; KRCHNAVEK, 2009). Ainda por redução química temos a redução por ácido gálico e solventes orgânicos (dimetilformamida - DMF e dimetilsulfóxido - DMSO) e é preciso acrescentar mais um agente estabilizador com rígido controle da temperatura para obter o tamanho proposto. (PACIONE, 2015).

Outro método que se popularizou foi o de Tollens, conhecido como reação do espelho de prata, sendo uma redução que tem como agente redutor a glucose. Muitos pesquisadores modificaram este método e utilizaram outros sacarídeos como lactose e maltose. (SALLUM, 2014).

Outros métodos utilizados para redução de solução de AgNO_3 são a decomposição térmica dos compostos, radiação assistida, eletroquímica, (HIRSCH et al., 2005), fotoquímica (DINH et al., 2015; STAMPLECOSKIE; SCAIANO, 2012; SAKAMOTO et al., 2009), sonoquímica (KOROTCHENKOV, 2005), método assistido

por micro-ondas (KHURSHEED et al., 2015; NADAGOUDA et al., 2010), uso de micelas (MEHTA, 2010), deposição termal (PLANTE, 2010) e recentemente, através de vias biológicas. (SULAIMAN, 2013).

A matéria inorgânica pode ser reorganizada em nanoescala através de interações fracas, tais como ligações de hidrogênio, força de *van der Waals*, interações hidrofóbicas ou hidrofílicas, aglomeração fluídica e outras formas de agregação. O modo pelo qual a matéria é organizada, em estruturas nanométricas, também desempenha um papel essencial nas características e propriedades do produto final. Dessa forma, deseja-se alcançar o controle em nível de nanoescala e na integração para obter escalas cada vez menores e variadas formas. (FERREIRA; RANGEL, 2009). Nanoestruturar a matéria é potencialmente um método econômico para obter funcionalidade, visando um produto com alto valor agregado.

2.2 APLICAÇÕES DAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

As nanopartículas metálicas possuem aplicações nos mais diversas áreas, como medicina diagnóstica, na nanocatálise, na biorremediação (organismos vivos removem poluentes do meio ambiente), na indústria farmacêutica (sistemas de liberação controlada de fármacos e cosméticos), indústria alimentícia e têxtil (embalagens e roupas com propriedades antimicrobianas), entre outras aplicações. Essas são usadas em um número crescente de aplicações que vão desde desinfetantes domésticos a dispositivos médicos, tratamentos dentários, (BLÖCHER et al., 2015) e para a purificação de água. (DINH et al., 2014). Como as áreas são diversas, para a descrição minuciosa, foram selecionadas as que mais estão relacionadas com as ciências farmacêuticas.

A adição de nanocompósitos ou nanopartículas, (por exemplo, prata, dióxido de titânio, dióxido de silício e argila) em embalagem pode assegurar uma melhor proteção dos alimentos. Esses materiais modificam o comportamento de permeação dos produtos na parte interna da embalagem e também atuam na desodorização, aumentam às propriedades de barreira, bloqueando a luz ultravioleta, promovem melhoramento mecânicos e de resistência ao calor, e apresentam ação antimicrobiana e antifúngica de superfícies. Nanocompósitos de nylon formam uma barreira para o fluxo de oxigênio e dióxido de carbono em garrafas PET de camadas

múltiplas e em latas de cerveja e outras bebidas alcoólicas, para manter o frescor e bloquear odores. (CHAU et al., 2007).

As nanopartículas metálicas contribuem para construção de biossensores e atuam com eficiência tanto no reconhecimento, devido à sua maior área de superfície, como na transdução do sinal dos biossensores. Esses são dispositivos analíticos, compostos de uma biocamada, um transdutor elétrico, elementos de condicionamento e processamento do sinal elétrico. A biocamada pode ser uma enzima, um anticorpo, uma proteína ou DNA. Acoplado ao biossensor está o transdutor que assimila o sinal eletroquímico, óptico (nanopartículas metálicas), piezoelétrico ou calorimétrico. A finalidade do biossensor é produzir um sinal elétrico proporcional em magnitude ou frequência à concentração do analito-alvo, medir de modo seletivo determinadas substâncias, nos quais a interação biológica é mediada diretamente por ligante não catalítico, como receptor celular e anticorpos. A detecção pode ser indireta, na qual o bioanalito é uma enzima imobilizada, que é usada para o reconhecimento do substrato-alvo e um sensor marcado, como anticorpos fluorescentemente marcados ou elementos catalíticos, como enzimas. (LIU et al., 2009; PATHAK et al., 2007).

Os tipos de biossensores produzidos com nanopartículas metálicas podem ser para diagnóstico, utilizados para detecção de patógenos, proteínas, DNAs, como nanossondas para imageamento *in vivo*, rastreamento de células e monitoramento de doenças e terapia. (DORIA et al., 2012). Seu uso traz uma série de vantagens, pois são altamente sensíveis, seletivos e os processos de produção são acessíveis.

As nanopartículas metálicas são especialmente usadas na catálise devido à alta área superficial por unidade de volume ou massa do metal. Os catalisadores podem ser complexos metálicos, estando o metal na forma de nanopartículas, dispersas em superfícies de materiais de áreas superficiais específicas elevadas e estáveis, tais como alumina, sílica ou carvão ativado. Os catalisadores modernos de elevado desempenho são atualmente projetados para considerar a significativa contribuição do suporte e cuidadosamente suportar as nanopartículas metálicas. É também conhecido que a atividade catalítica de partículas metálicas suportadas é fortemente dependente do seu tamanho e forma e, portanto, os catalisadores nanoestruturados são altamente ativos, uma vez que a maioria da superfície da partícula pode estar disponível para a reação. (BINDHU; UMADEVI, 2015).

O espalhamento Raman poderia ser um processo muito pouco eficiente devido à sua pequena seção de choque e faria da espectroscopia Raman uma técnica pouco sensível. Contudo, a presença de superfícies compostas por nanopartículas metálicas apresenta a propriedade de intensificar o sinal Raman de moléculas adsorvidas por fatores da ordem de 10^6 vezes (SANTANA; ZAIA, 2006). A intensificação do sinal Raman de espécies adsorvidas em superfícies metálicas especialmente AgNPs, é chamado de efeito Raman intensificado pela superfície ou SERS (Surface Enhanced Raman Scattering). A intensificação do campo eletromagnético próximo à superfície do metal devido à ressonância com a banda plasmon, ou seja, a intensificações a longas distâncias, e o espectro obtido deve ser similar àquele obtido das moléculas em solução, pois nesse tipo de mecanismo não se espera nenhum tipo de perturbação substancial da molécula espalhadora. (SOBOLEWSKI et al., 2013; OLIVEIRA, 2005). A existência desse efeito permite o uso da espectroscopia Raman de forma muito mais abrangente, abrindo possibilidades de aplicação da espectroscopia vibracional, possibilitando essa técnica de detectar compostos de baixas concentrações, e mesmo analisar pequenas quantidades de analitos. (PIETA et al., 2014).

2.3 NANOPARTÍCULAS DE PRATA.

2.3.1 Prata

A prata é um metal nobre de cor branca, brilhante, mole, maleável, funde-se a $961\text{ }^{\circ}\text{C}$ e entra em ebulição a $2.162\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sua configuração dos elétrons de valência é $[\text{Kr}] 5s^1$ e $4d^{10}$, sua massa atômica $107,8682\text{ u}$, raio atômico de 144 pm e densidade $10,490\text{ kg/m}^3$. Sua estrutura é cristalina e apresenta as condutividades térmica e elétrica mais elevada que se conhecem. (COTTON; WILKINSON, 1978). A prata tem potencial padrão de redução positivo e, por isso, não reduz o $\text{H}^+_{(\text{aq})}$ a hidrogênio, mas reage facilmente com o enxofre promovendo o escurecimento de objetos de prata. (ATKINS, 2006).

A prata em escala macroscópica não apresenta efeito nocivo ao ser humano, salvo em casos de exposição anormais. No entanto, estudos demonstraram que quando em partículas menores, ao serem inaladas podem ser bioacumuladas no cérebro e, quando absorvidas pela pele, podem ocasionar danos a estruturas

Na Tabela 1 pode ser observado o histórico do uso da prata como antimicrobiano.

Tabela 1 - Histórico da atividade antimicrobiana da prata

Ano	História da atividade antimicrobiana da prata
1884	Crede usou 1 % de nitrato de prata em recém-nascidos para prevenção de infecção ocular.
1887	Von Behring mostrou que 0,25% e 0,01% de solução de nitrato de prata foram efetivas contra o Tifo e bacilo Antrax.
1900	Hammered usou prata em folhas e na forma coloidal para o tratamento de feridas que não cicatrizavam, e percebeu que estas diminuíam o rubor, porém não conseguiu explicar a razão.
1920	A prata coloidal foi aceita pelo FDA no tratamento de feridas.
1940	O desenvolvimento dos antibióticos deixa a pesquisa com a prata um pouco de lado.
1960	Moyer e Monafo iniciam o uso de solução de nitrato de Prata a 0,5 % em feridas de queimadura.
1968	Fox introduziu creme de sulfadiazina de prata a 1% em feridas de queimadura.
2004	Surgiram os primeiros curativos (pensos) para feridas e a NASA passou a usá-la para purificar água nos voos espaciais.
Atual	Nanopartículas e outros complexos.

Fonte: DUNN et al., 2004

celulares fundamentais, como as mitocôndrias. (CHEN; SCHLUESENER, 2008). Entretanto devido a ações antimicrobianas descoberta há décadas atrás, os pesquisadores insistiram nos efeitos benéficos.

A exposição prolongada à prata pode provocar argiria um irreversível escurecimento da pele causado por contínuo e prolongado tratamento com prata, único efeito negativo para o ser humano. (RUSSEL; HUGO, 1994). No entanto, esse acúmulo pela prata só ocorre com partículas em escala micrométrica, pois obstruem as membranas celulares. Por outro lado, as AgNPs são tão finamente dispersas e estão em tão baixa concentração que podem circular pelas membranas celulares sem ocasionar danos a organismos superiores, visto que a concentração efetiva para atuação contra microorganismos é de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ e a concentração tóxica a seres humanos é de 10 mg L^{-1} . (BERNI, E; RIBEIRO, C; ZUCOLOTTI, V., 2008).

Soluções alternativas como a prata em forma de nanopartículas ou nanotubos de carbono são alternativas para minimizar a toxicidade e explorar as atividades biológicas. Materiais de apoio como polímeros podem ter a finalidade de aumentar a atividade antimicrobiana e reduzir os efeitos adversos no organismo humano e na ecologia. (ANAND; MANDAL, 2015).

A prata é tipicamente o metal de escolha para a síntese verde de nanopartículas metálicas com extratos de plantas, devido a fácil obtenção dos íons Ag^+ a partir de sais e óxidos de prata, sendo estes precursores inertes e de baixo custo (ZHANG et al., 2005). Entretanto, outros metais foram explorados para a formação de nanopartículas metálicas, entre eles destacam-se o ouro, (MALHOTRA, et al., 2014; DHAS et al., 2014), a platina (SHINY, 2014 e), paládio (BUI et al., 2015 e AKHTAR et al., 2013), o níquel (GUTTA 2015) e o cobre (HUSSAIN, 2015).

2.3.2 Síntese de Nanopartículas de Prata

Para obtenção de AgNPs, a metodologia mais comumente realizada é a reação de redução em meio aquoso. Está é uma reação simples onde o cátion prata (Ag^+) é reduzido a seu estado neutro (Ag^0). Os átomos gerados colidem e formam um núcleo estável, iniciando-se o processo de nucleação, seguido do crescimento, no qual mais átomos colidem e formam partículas maiores, e, finalmente as AgNPs. Esse processo ainda não é muito bem elucidado, mas a seleção dos parâmetros é fundamental para o controle e resultado da síntese, bem como o conhecimento do

mecanismo desenvolvido. O produto final destas reações é uma solução coloidal com nanopartículas de até 100 nm. Por esta razão, este método é chamado de co-precipitação, porque também envolve outros fenômenos como, redução, nucleação, crescimento, engrossamento e/ou aglomeração. (PACIONI et al., 2015).

2.3.2.1 Síntese Verde

A síntese verde, síntese biológica e síntese biogênica são termos comumente usados para a síntese ecologicamente correta de AgNPs. As sínteses físicas e químicas possuem consumo intensivo de energia e, às vezes, podem envolver substâncias químicas tóxicas, enquanto as técnicas biológicas mostram-se limpas, atóxicas e ecologicamente corretas e pouco onerosas, porque utilizam recursos naturais. A via de síntese biológica tem sido realizada principalmente através do uso de bactérias, fungos, plantas, cianobactérias e actinomicetos. (CAUERHFF; CASTRO, 2013).

O método de fitossíntese, síntese via plantas, é rápido, ecologicamente correto, rentável e mais fácil que a microsíntese. A microsíntese é realizada por fungos ou bactéria e quando comparada à fitossíntese é mais demorada, porque depende do crescimento do microorganismo, da obtenção da biomassa e purificação do substrato redutor. (RAI, 2009). Geralmente, AgNPs biosintetizadas possuem formas esféricas e dimensões entre 5 a 100nm.

São três fatores chaves na síntese dessas AgNPs, (i) o agente redutor, (ii) o meio de reação e (iii) o agente estabilizador. (VIJAYAKUMAR, 2013). As proteínas de fungos, os polímeros das bactérias e as substâncias do metabolismo das plantas agem como agentes de redução, proteção e estabilização das AgNPs biosintetizadas. Nessas rotas de síntese, organismos biológicos ou partes deles, como biomoléculas, apresentam potencial redutor e, portanto, são largamente utilizados para obtenção de AgNPs. A biossíntese de AgNPs é realizada tanto por organismos procarióticos, como bactérias, quanto eucarióticos, como plantas, sendo mediada por componentes biológicos capazes de reduzir o íon metálico, sem a geração de resíduos tóxicos e sem impacto ao meio ambiente, um processo amigo da natureza.

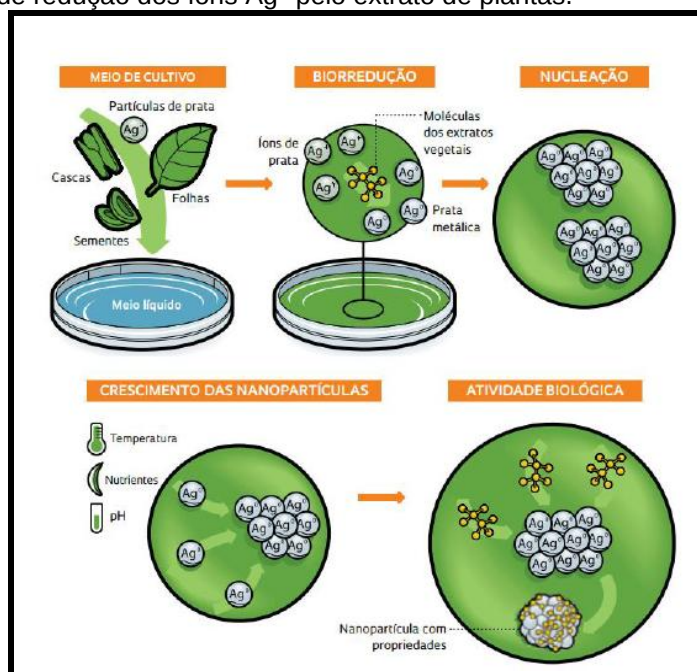
As plantas têm atraído à atenção de pesquisadores nos últimos 30 anos e têm sido sistematicamente exploradas para a biossíntese de AgNPs com extrato vegetal.

Nessas rotas de síntese (Figura 5) são utilizados tecidos da planta, a planta viva ou extrato da planta. (IRAVANI et al., 2011).

A redução de um íon metálico por um extrato vegetal é conhecida desde o início do século XX, apesar do processo de redução ainda não ser claramente elucidado, e geralmente envolve a mistura de um extrato aquoso com a solução do íon metálico em questão. (MITTAL, et al., 2013). Entretanto, sabe-se que a biossíntese por plantas, em geral, é realizada por uma combinação de biomoléculas como aminoácidos, proteínas, polissacarídeos, além de metabólitos secundários como flavonoides, ácido tânico e terpenoides. (AKTAR et al., 2013).

Nos extratos vegetais, além dos redutores biológicos, podem ser também encontrados agentes estabilizantes das AgNPs. A origem desses componentes redutores e estabilizantes influencia nas características das AgNPs, porque diferentes extratos apresentam concentrações e combinações diferentes desses compostos, o que torna este processo complexo e pouco conhecido. (MITTAL et al., 2013).

Figura 5 - Esquema de redução dos íons Ag^+ pelo extrato de plantas.



Fonte: Adaptado de Silva, 2014.

A escolha da planta, o estágio de maturação, a parte utilizada (folhas, caules, raiz e sementes) influenciam diretamente nos resultados obtidos, principalmente no tamanho da nanopartícula. (BAGHIZADEH et al., 2015; LOGESWARI et al., 2015). A

quantidade de extrato vegetal também pode influenciar no tamanho da partícula e na distribuição desse tamanho, como demonstrado na síntese de AgNP com extrato aquoso de folhas de *Melia dubia*, no qual foram obtidas partículas de 7,3 nm. (KATHIRAVAN et al., 2014). As etapas de redução e a de recobrimento também podem ser diferenciadas de acordo com o tipo de metal utilizado, havendo a atuação de diferentes compostos do mesmo extrato.

A síntese verde pode também acontecer via microrganismos. As células microbianas para sua sobrevivência têm a capacidade de tolerar situações estressantes na presença de metais tóxicos, e desenvolvem vários mecanismos específicos de resistência aos metais, incluindo sistemas de efluxo, alterando a solubilidade, toxicidade do metal e o estado redox dos metais, precipitação extracelular de metais, e a incapacidade da função de transportar o metal. As tarefas como biomineralização, bioacumulação, biorremediação, biolixiviação e corrosão microbiana são responsáveis pela fabricação mais recente de nanopartículas metálicas e são baseadas em interações de microrganismos com os metais. (SALUNKHE et al., 2011).

A micossíntese, síntese verde via fungos, é muito semelhante à síntese com bactéria, porém mais trabalhosa porque precisa do preparo da biomassa ou substrato a partir do microrganismo. As proteínas, polissacarídeos e aminoácidos presentes na biomassa fúngica ou bacteriana são responsáveis pela produção de nanopartículas metálicas. Para a síntese de nanopartículas metálicas diferentes espécies de fungos foram utilizadas, *Fusarium*, nomeadas como *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium acuminatum*, *Fusarium culmorum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamarii*, *Phoma glomerata*, *Alternaria alternata*, e fungos endofíticos *Pestalotia sp.* Excelentes resultados foram encontrados com biomassa celular de *Cochliobolus lunatus* e *Trichoderma viride*. (BIRLA et al., 2013; MOHANTY et al., 2012).

O extrato de algas também pode ser utilizado para sintetizar AgNPs. As proteínas, principalmente os polissacarídeos e outros constituintes presentes no extrato têm a dupla função de reduzir os íons Ag^+ e controlar tamanho das nanopartículas durante a síntese das nanopartículas. (SATAPATHY et al., 2015).

Outra síntese que pode ser chamada de verde é a redução do íon prata por matriz polimérica. Esta utiliza matrizes poliméricas, facilmente obtidas, porém utilizadas para aplicações particulares, como por exemplo, função de revestimento e

para aumentar adesão celular. Diferentes biopolímeros podem ser usados, tais como amido, quitosana, ciclodextrinas. (AMIRI et al., 2015).

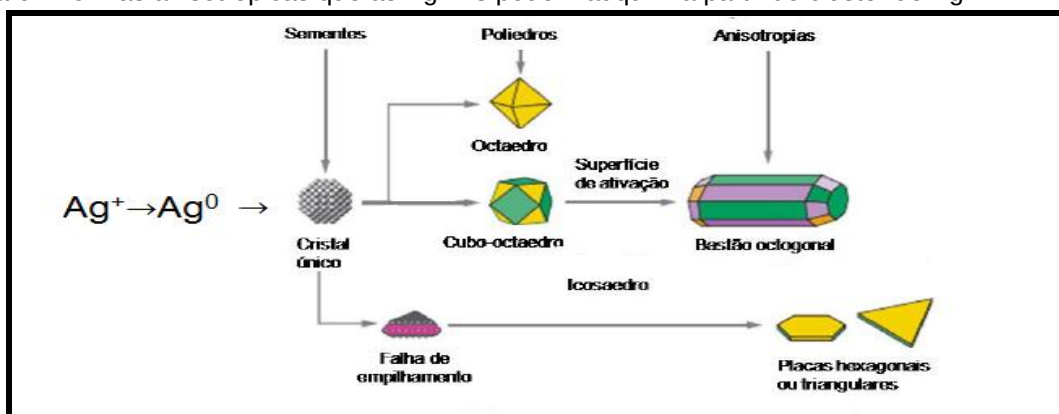
2.3.3.2 Síntese fotoquímica e nanopartículas anisotrópicas

As técnicas fotoquímicas para obtenção de nanopartículas metálicas utilizam de dois métodos diferentes: o fotofísico e o fotoquímico. O fotofísico depende de preparações que utilizam radiação UV e contam com a ajuda de agentes redutores, como alcoóis, carboximetilcelulose e quitosana, em vários meios reacionais diferentes, como polímeros, micelas, vidro e emulsão. Na técnica fotoquímica, as nanopartículas metálicas são sintetizadas por fotorredução do precursor, os íons prata (Ag^+), utilizando intermediários fotoquimicamente ativados tais como protoporfirinas. (AVILA et al., 2015)

Para estes métodos de produção AgNPs que foram sintetizadas com radiação UV e solução aquosa contendo Triton X-100, que atua como agente estabilizante. (HAIDER; KANG, 2015). Em outro caso, um laser de emissão de radiação na região do infravermelho próximo foi utilizado para fotorredução direta na produção de AgNPs, utilizando-se corantes como agente fotoativo. (BALAN et al., 2012).

O uso de métodos fotoquímicos tem permitido a produção de nanoprismas triangulares de prata em grandes quantidades e com o tamanho controlado pelo comprimento de onda da radiação incidente. (ROCHA, 2008). Quando a solução de nanopartículas recebe a radiação incidente ocorre a redução do precursor, e as primeiras nanopartículas formadas são pequenas esferas que se aglomeram, originando nanopartículas anisotrópicas, como observado na Figura 6.

Figura 6 - Formas anisotrópicas que as AgNPs podem adquirir a partir do cluster de Ag^0



Fonte: Adaptado de WILEY, 2005.

Entre as sínteses fotoquímicas, destaca-se a síntese fotoquímica com fase líquida ou com o uso de solvente, no qual os poliedros produzidos são bastante variados devido às interações anisotrópicas de diferentes faces do nanocristal. Esses atributos tornam este método mais vantajoso do que os métodos de fotofísicos.

A origem da palavra anisotropia em grego, (*ani*: não, *iso*: igual, *tropia*: volta), e é definida como a característica que uma substância ou produto possui em que uma certa propriedade física varia com a direção. Costuma-se designar qual a propriedade em que existe a anisotropia, por exemplo, anisotropia elétrica, óptica ou magnética. Na óptica os materiais cristalinos revelam propriedades anisotrópicas face à luz, característica própria de certos minerais que se manifesta de modo diferente, conforme a direção cristalográfica considerada.

As nanopartículas anisotrópicas são assim chamadas porque, quando adquirem formas diferenciadas do padrão as esféricas, elas assumem propriedades ópticas diferentes, relacionadas com a alta sensibilidade a mudança na vizinhança química local, a localização dos campos eletromagnéticos da radiação incidente de difração e a geração de campos próximos de alta intensidade em função do rearranjo cristalino difração e a geração de campos próximos de alta intensidade em função do rearranjo cristalino.

As AgNPs apresentam anisotropias relacionadas a suas formas, e possuem uma maior facilidade de adquirir formas variadas.

O seu campo electromagnético é induzido e as nanopartículas que estão próximas umas das outras ou agregadas são excitadas por este campo, sofrem uma nucleação e mudam suas formas. E este campo eletromagnético nas AgNPs é extremamente elevado quando comparados com outras nanopartículas metálicas, sendo provável que esta seja a razão para fotoconversão para diversificadas formas. Essa característica é mais pronunciada nas nanopartículas em que o agente precursor é a prata comparativamente a outros metais. As variações na morfologia das nanopartículas alteram inclusive a ressonância de plasmon de superfície e com isso suas propriedades ópticas também são alteradas, tendo como consequência ações biológicas distintas em função destas propriedades. (STAMPLECOSKIE; SCAIANO, 2010; PAL et al., 2007).

Nanopartículas anisotrópicas de metais nobres, ouro e prata, vêm recebendo muita atenção devido às novas aplicações científicas e tecnológicas que exploram suas propriedades ópticas, como em diagnósticos por imagem. Além disso, o recobrimento das nanopartículas por receptores moleculares tem permitido a fabricação de sensores específicos para diferentes biomoléculas, proteínas e DNA, com um desempenho superior aos métodos de detecção tradicionais, mais rápidos e com menor quantidade de amostra.

2.3.3 Atividade Biológica das Nanopartículas de Prata

Dentre as nanopartículas com atividade antimicrobiana existentes, as nanopartículas metálicas, em especial as AgNPs, são as mais atraentes, devido à sua excelente capacidade bactericida e ação oxidativa de componentes celulares.

As AgNPs tem despertado expectativas no controle da resistência de microrganismo aos antibióticos utilizados atualmente, sendo a resistência bacteriana um problema global no controle de doenças infecciosas que levam à morte de muitas pessoas ao redor do mundo. Neste sentido, muitos estudos tem sido realizados na associação de AgNPs com antibióticos no controle da proliferação de microrganismo, buscando também, um sinergismo entre a prata e os compostos utilizados na produção das AgNPs, buscando intensificar a ação bactericida. (RAI, 2013).

Estudos demonstraram que as nanopartículas podem ser citotóxicas para algumas células e suas biomoléculas, como o DNA e proteínas. As AgNPs, principalmente, são promotoras da citotoxicidade via apoptose e necrose em diferentes tipos de células cancerígenas. Essa toxicidade promovida pelas AgNPs normalmente é dependente do seu tamanho, concentração e superfície de contato, causando danos as estruturas intracelulares e, consequente, morte celular. (TRAN et al., 2013; PRABHU; POULOSE, 2012).

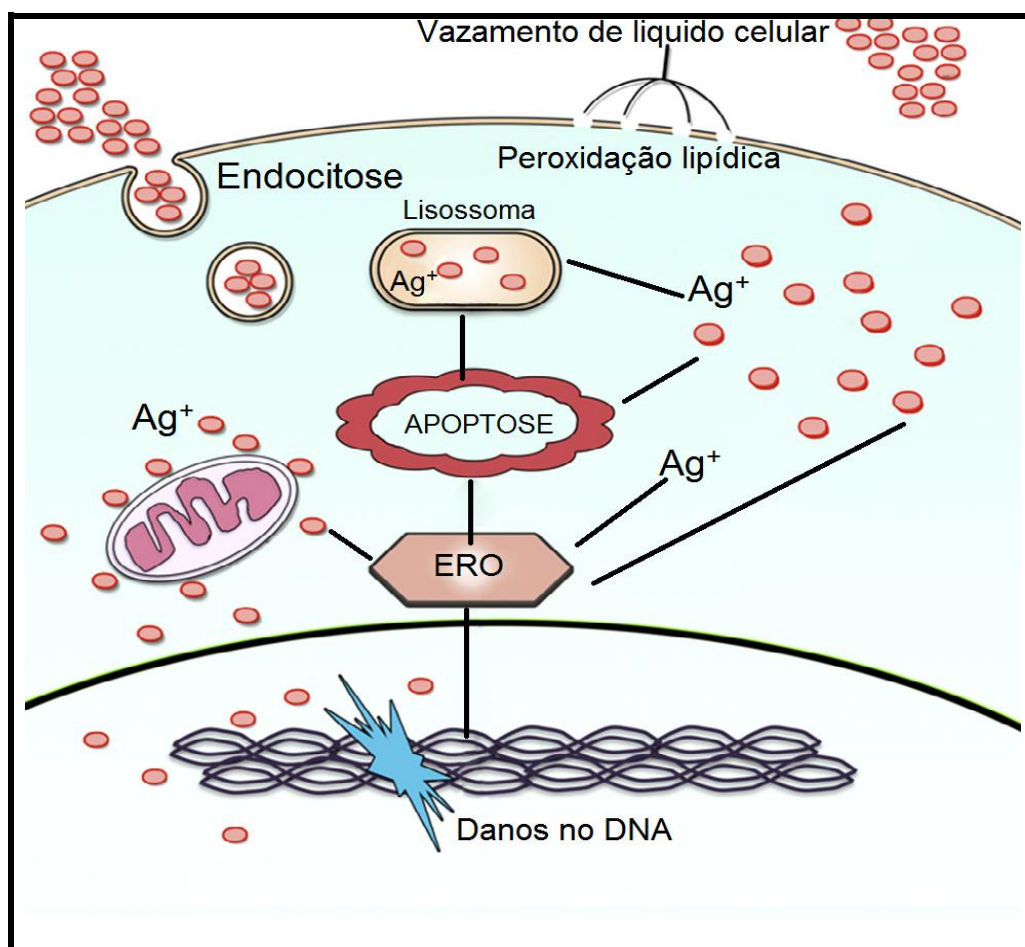
Os efeitos biológicos da AgNPs que levam à ação antimicrobiana citotoxicidade ou até a morte celular, ainda não estão bem elucidados. Acredita-se que a ação das AgNPs seja similar a dos íons prata, que penetram no interior da célula, oxidam as biomoléculas e promovem a geração de espécies reativas do oxigênio (ERO) interferindo no desenvolvimento funcional da célula. Os íons prata são tóxicos para as células diferindo das ações das AgNPs. (EBRAHIMINEZHAD et al., 2016).

As AgNPs interagem com os microrganismo e células de duas formas: aderindo a parede celular, destruindo a permeabilidade e as funções da membrana celular. E penetrando nas células através dos poros formados na membrana celular pelas AgNPs.

Como apresentado resumidamente na Figura 7, as AgNPs, ao entrarem em contato com parede celular são internalizadas no citoplasma de células eucarióticas, devido aos danos causados à membrana, tornando-as mais permeáveis e aumentam o influxo.

Assim alteram o transporte celular. Após serem internalizadas e passarem ao sistema endocítico e lisocítico, podem ser degradadas; os íons Ag^+ são liberados, e estes promovem a liberação de constituintes como as espécies reativas de oxigênio (ERO), como: radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). (PARK et al., 2009).

Figura 7 - Esquema representativo do possível mecanismo das AgNPs na indução da citotoxicidade. Os círculos vermelhos indicam as espécies reativas de oxigênio (ERO).



Fonte: Adaptado de WEI et al., 2015

Essas ERO causam danos às proteínas, à membrana das organelas e ao DNA. Danos à membrana dos lisossomos podem liberar enzimas degradadoras que uma vez no citosol, podem atacar a membrana da mitocôndria, provocando danos e até ruptura desta organela. Ao danificar a mitocôndria, são produzidas mais ERO, entrando em um processo cíclico, no qual as ERO produzidas induzem mais danos à mitocôndria, gerando ainda mais ERO. Esse processo, na maioria dos casos, pode levar mutagenicidade do material genético (DNA) e morte celular.

Várias linhagens celulares têm sido testadas. Em um estudo realizado em células de câncer de mama por Gurunathan em 2015, foram avaliados o mecanismo de toxicidade de dois tipos diferentes de AgNPs, uma obtida por cogumelos e a outra de cultura de *Bacillus tequilensis*. A pesquisa demonstrou que o gene supressor tumoral (p53), que codifica uma fosfoproteína nuclear que desempenha um papel importante no controle do ciclo celular, no reparo do DNA e na indução da apoptose. O p53 desempenha um papel crítico na resposta celular, nos danos ocasionados no DNA e na indução da apoptose por ERO. Sugeriram que as AgNPs ativam o p53, e este pode mediar a apoptose. Juntamente foi investigado o papel de p53 em apoptose induzida por de AgNPs usando um inibidor de p53, a pifitrina-alfa cíclica (PFT- α) e concluíram que as AgNPs também promovem a formação de ERO, sendo que as ERO também podem induzir a apoptose e morte celular. Em outro estudo as AgNPs foram obtidas a partir da planta *Moringa oleifera* e estas exibiram excelente atividade anticancerígena contra células HeLa. As AgNPs aumentaram a produção de ERO e sua subsequente ação na inibição da replicação celular e na indução da apoptose na linhagem de carcinoma cervical humano. (VASANTH, 2014). Os efeitos citotóxicos de AgNPs produzidas com extrato de *Artemisia princeps* foram avaliados em células de câncer de pulmão, bem como sua ação antimicrobiana e formação de biofilme por *Helicobacter pylori* e constataram que as nanopartículas promoveram ações que levaram a morte celular. (GURUNATHAN et al., 2015).

2.4 CALENDULA OFFICINALIS

A *Calendula officinalis* L. pertence à família Asteraceae, sendo uma planta herbácea, nativa em toda região do Mediterrâneo e cultivada em toda a Europa,

onde floresce quase o ano todo. (OKUMA et al., 2015). No Brasil ela está aclimatada na região sul e também é produtiva o ano todo, (Figura 8).

É extensamente utilizada pelas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia e pela população em geral devido as suas atividades anti-inflamatória e antiedematosa. (EFSTRATIOU et al., 2012). Essa planta apresenta grande quantidade de compostos fenólicos e flavonoides, responsáveis por suas atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antifúngica, antioxidante antiviral, antibacteriana e propriedades antissépticas. (CHANDURKAR et al., 2015; MOREIRA, 2015). Outras atividades farmacológicas foram reportadas tais como: imunomodulatória por estimulação na granulocitose, antitumoral, antimutagênica, antiviral e antimicrobiana. Também foram reportadas atividades biológicas, tais como moluscicida e o óleo essencial como nematicida, genotóxica, larvicida e antiplasmódica. (GAZIM et al., 2007).

Figura 8 - Flores de *Calendula officinalis*



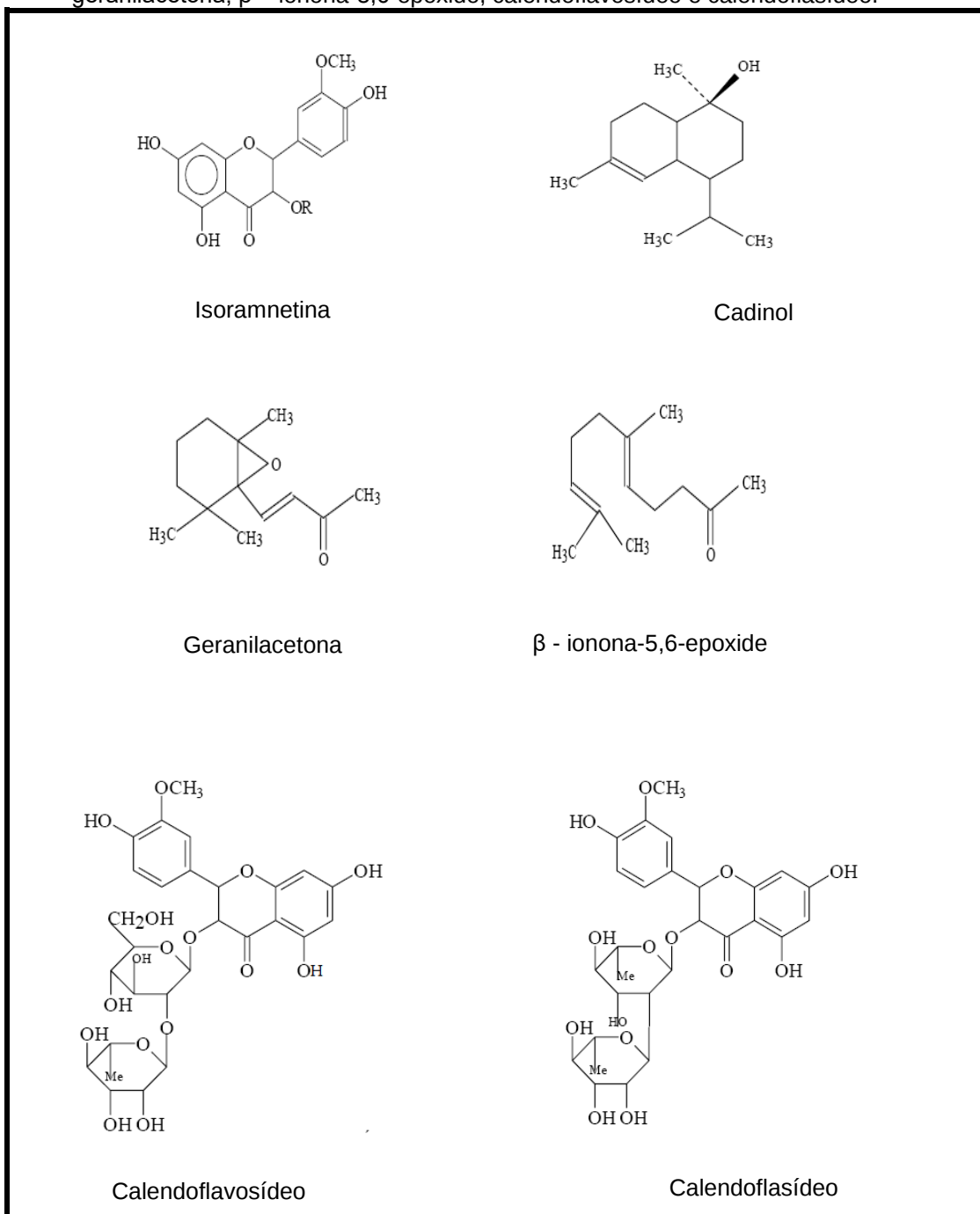
Fonte: A autora

Em estudos recentes, um gel oral de extrato de flores de *Calendula officinalis* demonstrou bons resultados no tratamento de mucosite orofaríngea causada pela radiação usada para câncer de pescoço. (BABAEE et al., 2013). Foram identificadas outras frações fitoquímicas com ações farmacológicas como ação antimicrobiana,

cicatrizante e anticancerígena. (AMBROSIO et al., 2015; OKUMA et al., 2015; BABAEE et al., 2013).

O teor princípios ativos extraídos de plantas medicinais pode variar em função da temperatura, duração da extração e o tipo de solvente, além da influência dos fatores ambientais como clima, solo, época de coleta e estágio de crescimento da planta.

Figura 9 - Estruturas dos constituintes químicos da *Calendula officinalis*, isoramnetina, cadinol, geranilacetona, β - ionona-5,6-epóxido, calendoflavosídeo e calendoflasídeo.



Fonte: Adaptado de VOLPATO, 2005.

Na Figura 9 estão alguns exemplos das estruturas dos constituintes químicos da *Calendula officinalis* planta pesquisada há décadas. Devido a essas propriedades e constituintes químicos, a *Calendula officinalis* vem sendo utilizada e estudada na biorredução para produção de AgNPs, (CHIDAMBARAM et al., 2014; BAGHIZADEH et al., 2015), e foi escolhida para a produção de AgNPs deste estudo.

Dentre os constituintes químicos mais investigados da *Calendula officinalis* L, devido sua importância na farmacologia, estão:

- Carotenoides (α , β e γ -caroteno), violaxantina, rubixantina, citroxantina, flavocromo, flavoxantina, galenina, luteína, licopeno, valentiaxantina, auroxantina, microxantina, 5,6 epoxicaroteno, β -zeacaroteno, mutatoxantina e luteína epóxido. (ANDREEVA, 1961).
- Flavonoides, sendo os principais os flavonoides glicosídicos (MASTEROVÁ 1991), isoramnetina, isoquercitrina e quercitina (KOMISSARENKO, 1988) e derivados flavônicos como calendoflasídeo, calendoflavosídeo e calendoflavobiosídeo também foram isolados. (KOMISSARENKO, 1988).
- Óleo essencial apresenta principalmente os constituintes álcoois e lactonas terpênicas, (GRACZA, 1986), mentona, isomentona, cariofileno, uma epóxide e derivados cetônicos, pedunculatina, α e β - ionona, um derivado epóxido β -ionona e dihidroactinidiolida.

2.5 DIODOS EMISSORES LUZ – LDE

A abreviatura LED vem do inglês, *Light Emitting Diode*, um tipo especial de diodo semicondutor (junção P-N), a ligação P-N, consiste em dois lados distintos, onde o lado P contém lacunas, falta de elétrons e o lado N contém excesso de elétrons. Quando esta junção é polarizada ocorre o deslocamento das cargas de uma lacuna para outra, promovendo a emissão de fótons, que quando é energizado emite luz visível, por isso LED (Diodo Emissor de Luz). Portanto o funcionamento do LED se baseia na circulação de cargas por meio da liberação de portadores livres na estrutura dos cristais. O deslocamento de portadores de banda de condução provoca a liberação de energia, emissão de fótons, em forma de luz. (SKOOG, 2009).

Nos LEDs, a luz não é monocromática, como em um laser, mas consiste de uma banda espectral relativamente estreita, é produzida pelas interações

energéticas do elétron. O processo de emissão de luz pela aplicação de uma fonte elétrica de energia é chamado eletroluminescência. Uma característica importante observada na radiação emitida pelos LEDs é que, em lugar de sua frequência ser aleatória, como no caso da lâmpada incandescente que se espalha pelo espectro, ela tem uma frequência muito bem definida, que depende do tipo de material usado no semicondutor. Os LEDs podem ser configurados para produzir comprimentos de onda múltiplos, podendo ser arranjados em larga escala, não produzindo calor. (ALVES, 2011).

Os diodos LED são encontrados com as mais diversas formas e dimensões e são classificados em categorias: Indicativos, alto brilho e potência. A cor depende do material que compõe o semicondutor, que pode ser gálio, arsênio, alumínio, fósforo, índio e nitrogênio, proporcionando um amplo espectro de cores, (Tabela 2).

Tabela 2 - Características típicas de LED

Material semicondutor	Comprimento de Onda (nm)	Cor visível
Gálio/Arsênio	850-940	Infravermelho
Gálio/Arsênio/Fósforo	630-660	Vermelho
Gálio/Arsênio/Fósforo	605-620	Âmbar
Gálio/Arsênio/Fósforo (Nitreto)	585-595	Amarelo
Alumínio/Gálio/Fósforo	550-570	Verde
Silício	430-505	Azul
Gálio/ Índio/Nitreto	450	Branco

Fonte: Adaptado de Malvino, 2007.

Os LEDs não podem ser ligados diretamente à rede elétrica, pois operam com níveis de tensão diferente do fornecido pela rede, sendo necessário montar um circuito para que estes dispositivos funcionem adequadamente. Os LEDs normalmente são alimentados em correntes contínuas, possuem tensão de

condução baixa e diferentemente das lâmpadas fluorescentes não necessitam de ignição. Os semicondutores são dispositivos pequenos, eficientes e com excelente iluminação. (PINTO et al., 2008).

As vantagens destes emissores são: baixo consumo, alta resistência a vibrações e grande durabilidade, sendo frequentemente utilizados como a fonte de luz de excitação em reações fotoquímicas de síntese de AgNPs. (LEE, 2014).

Ye e colaboradores em 2015, produziu AgNPS com formatos dodecaédricas, utilizando LEDs de comprimento 455 nm (azul). AgNPs esféricas (diâmetro 3 nm) foram transformadas por meio de técnicas fotoquímicas, usando LEDs superluminescentes e sendo obtidas nanopartículas arredondadas (21 nm) com luz azul e nanopartículas decaédricas (78nm) com a luz verde. (CARDOSO et al., 2015). Stamplecoskie e Scaiano, em 2010 expuseram as nanopartículas esféricas a 5 diferentes LEDs (405, 455, 505, 627 e 720 nm) e obtiveram soluções coloidais com nanopartículas de varias formas, entre elas nanoplacas, hastes e dodecaédricas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver AgNPs utilizando a síntese verde, a partir de extrato aquoso de flores de *Calêndula officinalis* com e sem exposição ao LED.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar o extrato aquoso das flores de *Calendula officinalis* obtido por meio de infusão e turbólise no desenvolvimento das AgNPs;
- Avaliar a fotorredução por três diferentes cores de LEDs na produção das AgNPs;
- Investigar o potencial dos LEDs para otimização da produção das AgNPs e sua interferência na morfologia das partículas formadas;
- Caracterizar as AgNPs formadas quanto ao tamanho, morfologia, carga de superfície e disponibilidade de grupamentos químicos por análise espectroscópica;
- Comparar os resultados de obtenção das rotas utilizadas, a partir dos dados da caracterização;
- Verificar a presença de resíduos o extrato aquoso das flores de *Calendula officinalis* depositados na superfície das AgNPs, utilizando FTIR e Espectroscopia de Raman;
- Investigar a estabilidade quanto ao tamanho e carga de superfície das AgNPs produzidas;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LISTA DE EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético (SOLAB, modelo SL-91);
- Balança semi-analítica de prato único (SHIMADZU, modelo UX420H);
- Difratômetro de raios X (RIGAZU, modelo Ultima IV, Tóquio Japão).
- Espectrofotômetro de auto-correlação a laser (MALVERN INSTRUMENTS, modelo ZetaSizer Nano ZS 90);
- Espectrofotômetro UV-Vis (AGILENT TECHNOLOGIES, modelo Cary Win 50UV);
- Espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier – FT-IR (SHIMADZU, modelo IR Prestige 21, Japão);
- Estufa (QUIMIS, modelo Q316M4);
- Filtro 0,22 μm (KASVI, modelo K18-230);
- Fita de LEDs RGB;
- Metalizador (SHIMADZU, modelo IC-50Ion Coater);
- Microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3);
- Papel filtro (QUALY, modelo DIN53.887);
- Ultracentrifuga refrigerada (HITACHI, modelo Himac CR21GII);

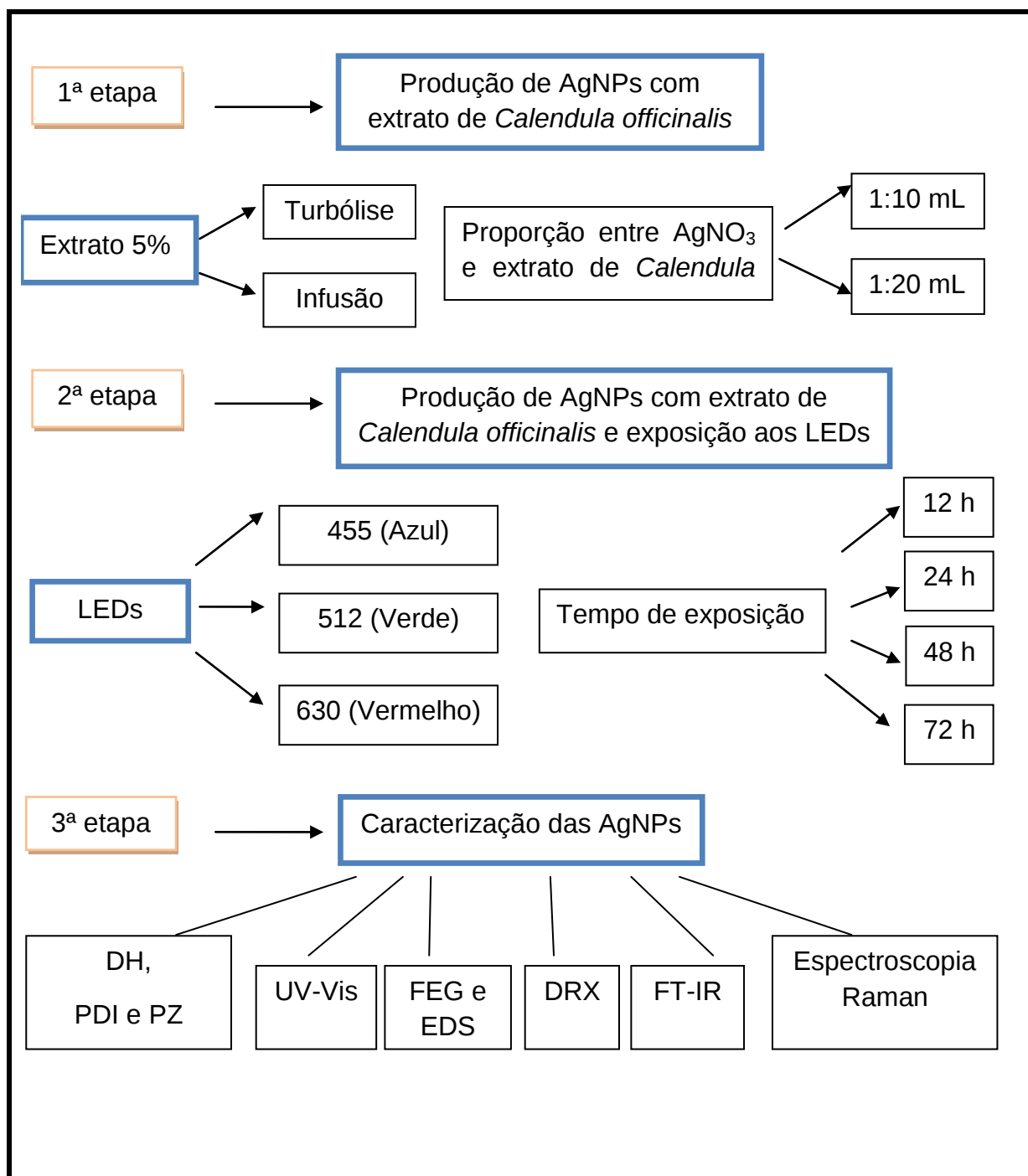
4.2 REAGENTES

- Água purificada MILI-Q;
- Nitrato de prata – (AgNO_3), (BIOTEC);
- Ácido clorídrico - (HCl), (BIOTEC);
- Brometo de potássio grau espectroscópico, SIGMA-ALDRICH.

4.3 MÉTODOS

O delineamento experimental está apresentado na Figura 10.

Figura 10 - Fluxograma da 1ª, 2ª e 3ª etapa dos experimentos realizados no estudo.



Fonte: A autora

4.3.1 Síntese das Nanopartículas de Prata

4.3.1.1 Obtenção do material botânico

Foram utilizadas flores de *Calendula officinalis*, cultivadas na região central de Ponta Grossa, identificadas pela exsicata depositada no horto medicinal da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob o número 21682. As coletas foram realizadas durante todo o ano de 2015.

As flores coletadas foram selecionadas, lavadas em água deionizada, depositada sobre papel, protegida da poeira e secas por 20 dias a temperatura ambiente no laboratório de pesquisa.

4.3.1.2 Preparo do extrato aquoso das flores de *Calendula officinalis*

4.3.1.2.1 Extrato por infusão

Foi preparado um extrato aquoso das flores de *Calêndula officinalis* a 5%. Para tanto foram pesados 5 g de flores e triturado em multiprocessador. Foram então, adicionado 100 mL de água deionizada, aquecida entre 60°C a 80°C. Esta solução permaneceu em repouso por 30 minutos, e em seguida, foi filtrada em filtro de papel.

4.3.1.2.2 Extrato por turbólise (turbo-extração).

Para a preparação do extrato aquoso das flores de *Calêndula officinalis* a 5% por turbólise, foram pesados 5 g de flores de *Calêndula officinalis* e colocados no multiprocessador com 100 mL de água deionizada, por 5 minutos, para a obtenção um líquido denso, filtrado em filtro de papel.

4.3.1.3 Preparo da solução de nitrato de prata

Para a obtenção da solução de AgNO_3 a 1 mM, foram pesados 17 mg de AgNO_3 e diluídos em 100 mL de água deionizada. A solução foi aquecida até ebulição, para garantir a total solubilização do sal de prata. Esta foi deixada em repouso até esfriar. Após, a solução foi mantida em temperatura ambiente.

4.3.1.4 Obtenção das AgNPs com extrato aquoso de flores de *Calêndula officinalis* a 5%.

As AgNPs foram obtidas através da adição do extrato aquoso de flores de *Calêndula officinalis* a 5%, obtido pelos processos de infusão e turbólise em duas proporções diferentes em relação ao AgNO_3 , de 1/10 e 1/20.

Em um erlenmeyer foram colocados 95 ou 100 mL da solução de AgNO_3 e 5 ou 10 mL do extrato aquoso das flores de *Calêndula officinalis* a 5%, (preparado por infusão ou turbólise), por gotejamento, a uma velocidade de 1 gota/s. As soluções foram mantidas sob agitação de 1000 rpm, resultando em quatro diferentes amostras.

As amostras obtidas conforme descrito acima, foram mantidas sob agitação por diversos períodos de tempo (0 h, 2 h, 4h, 6 h, 24 h e 48 h), nos quais foram avaliados os parâmetros: mudança de cor, tamanho médio a partir de medidas de diâmetro hidrodinâmico (DH), potencial Zeta (PZ) e absorbância na faixa de comprimento de onda de 400 a 500 nm no espectrofotômetro de UV-Vis, para se determinar as melhores condições de síntese das AgNPs.

O pH das suspensões de AgNPs foi verificado no início e ao final da síntese.

4.3.1.5 Síntese das AgNPs por fotorredução

Para a fotorredução das AgNPs foram confeccionados três aparatos, com 10 cm de diâmetro por 15 cm de altura, nos quais foram fixadas uma fita de LED, sistema RGB (*Red, Green e blue*), de forma circular por todo interior do aparato (Figura 11).

4.3.1.5.1 Obtenção das AgNPs a partir da exposição da solução de AgNO_3 aos LEDs

Uma solução de AgNO_3 a 1mM, 5mM ou 10mM foi colocada em recipiente de vidro e posicionado dentro dos aparatos contendo o LED ficando exposta aos LEDs de comprimento de onda de 455 nm (azul), 512 nm (verde) e 630 nm (vermelho). O desenvolvimento da coloração, indicativo da formação das AgNPs foi acompanhado em espectroscopia de UV-Vis.

4.3.1.5.2 Obtenção das AgNPs a partir da reação de AgNO_3 com o extrato aquoso de *Calendula officinalis* 5% e com exposição aos LEDs.

As AgNPs obtidas a partir do extrato aquoso de flores de *Calêndula officinalis* a 5%, preparado pelo processo de infusão (AgNPE), foram selecionadas para dar continuidade ao trabalho.

Figura 11 - Aparatos com a fita contendo pontos de LEDs RGB (Red, Green e Blue) de 1 W.



Fonte: A autora.

Logo após a sua preparação as AgNPE foram expostas aos LEDs de comprimento de onda de 455 nm (azul), 512 nm (verde) e 630 nm (vermelho).

As amostras preparadas desta forma foram denominadas; AgNPEB (AgNPs obtidas pela redução da solução de AgNO_3 pelo extrato aquoso de *Calendula officinalis* e exposição a LED azul); AgNPEG (AgNPs obtidas pela redução da solução de AgNO_3 pelo extrato aquoso de *Calendula officinalis* e exposição a LED verde); AgNPER (AgNPs obtidas pela redução da solução de AgNO_3 pelo extrato aquoso de *Calendula officinalis* e exposição a LED vermelha).

Os tempos de exposição aos LEDs, estipulados com base na literatura, foram de 12h, 24h, 48h e 72h.

4.3.2 Caracterização Morfológica e Físico-Química das AgNPs

4.3.2.1 Diâmetro hidrodinâmico, polidispersão e potencial zeta

As medidas foram realizadas no instrumento ZetaSizer Nano ZS 90. Para cada análise, utilizou-se uma diluição das amostras em água destilada na proporção de 1:20, ângulo de espalhamento fixado em 173° e temperatura de 25°C ; tempo de equilíbrio de 2 minutos; índice de refração para AgNPs de 1.390 e para solvente, água de 1.330; coeficiente de absorção de 0,002 e viscosidade de 0,8872.

4.3.2.2 Espectroscopia de absorção óptica na região do Ultravioleta Visível (UV-VIS)

As análises foram realizadas com espectrofotômetro UV-Vis Varian modelo Cary 50. Vários espectros de absorção da solução coloidal em função do tempo foram obtidos, variando-se os comprimentos de onda entre 300 e 600 nm, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. As amostras foram diluídas em uma proporção de 1/10 em água destilada.

4.3.2.3 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de *Infravermelho por transformada de Fourier* (FTIR) foi obtida por um espectrômetro Shimadzu modelo IR-Prestige. As amostras foram liofilizadas e adicionadas em um gral de ágata com 100 mg de KBr na proporção de 1:50. A mistura foi então, colocada em um acessório próprio e comprimida em uma prensa sob pressão de 80 kN/cm^2 sob vácuo. Os espectros foram obtidos no modo absorbância no intervalo de $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$, usando 64 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} , com laser He-Ne.

4.3.2.4 Difração de Raios X

As medições foram realizadas em um difratrômetro da marca Rigaku (Ultima IV). Para estas análises, as amostras foram liofilizadas. Os difratogramas são do tipo $\theta - 2\theta$ na geometria Bragg-Bretano. A fonte de raios X operou sob 40 kV e 30 mA contra um alvo de cobre (radiação $\text{CuK}\alpha = 1,5418\text{ \AA}$), com ângulo inicial (2θ) de 10°

e ângulo final ($2\theta_f$) de 60° . A velocidade de varredura contínua utilizada foi de $1^\circ/\text{min}$ com passos de $0,02^\circ$.

4.3.2.5 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FEG)

A morfologia e a avaliação da superfície das AgNPs foram feitas em microscópio eletrônico de varredura. As amostras de cada solução coloidal foram colocadas no suporte metálico para microscopia e secas em estufa a 36°C . Logo após as amostras passaram por processo de metalização com ouro no metalizador IC-50 Coater. Foi utilizado uma voltagem de aceleração de 15 kV para visualização das nanopartículas, sendo o registro das imagens através da utilização do *software* MIRA^{TC} 3, Tescan Orsay Holding, República Tcheca.

4.3.2.6 Determinação do diâmetro médio

O diâmetro médio foi determinado utilizando o programa ImageTool 2.0. As imagens foram feitas pelo MEV-FEG. Foram medidas 100 nanopartículas para cada amostra. As contagens foram feitas em triplicata.

4.3.2.7 Espectroscopia por energia dispersiva (EDS)

Para o EDS as amostras de extrato, AgNPs sintetizadas somente com extrato (AgNPE) e as nanopartículas sintetizadas com extrato e exposição ao LED (AgNPEB, AgNPEG e AgNPER) foram liofilizadas, depositadas em fita de carbono e a realização EDS aconteceu nas mesmas condições já citadas anteriormente para o FEG.

4.3.2.8 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram registrados por um espectrômetro Brüker modelo Senterra. Operando com laser (He-Ne) de excitação em 532 nm com potencia de 20 mW, em uma grade de 1200 linhas/mm ($60\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$). O tempo de integração de aquisição foi de 10 s com 3 co-adições usando uma objetiva com aumento de 100x e com abertura óptica de $50 \times 1000\text{ }\mu\text{m}$. As análises foram efetuadas nas amostras depositadas e secas em lâminula de vidro.

4.3.2.9 Análise da presença de íons prata (Ag^+)

A identificação dos íons Ag^+ nas AgNPs foi realizada qualitativamente colocando-se em um tubo de ensaio, 10 gotas da solução coloidal de AgNPE e 10 gotas de HCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. O aparecimento de precipitado confirma a presença de íons Ag^+ . O teste foi realizado em triplicata.

4.3.2.10 Estudo da estabilidade através do diâmetro hidrodinâmico, polidispersão e potencial Zeta

O estudo da estabilidade foi realizado avaliando as características físico-químicas das nanopartículas após 30 e 60 dias, realizando a análise do diâmetro hidrodinâmico, polidispersão e potencial Zeta nas mesmas condições das análises logo após a produção. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando-se o teste *t* de student no programa BioEstat 5.3, para diferenças significativas $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs)

5.1.1 Obtenção das AgNPs a Partir da Exposição da Solução de AgNO₃ aos LEDs

A exposição do AgNO₃ aos LEDs de cor azul, verde e vermelho, não resultaram em mudança de cor no meio reacional, nem absorção no espectro de UV-Vis, indicando que não ocorreu a formação das nanopartículas.

5.1.2 Obtenção das Nanopartículas com Extrato Aquoso de Flores de *Calêndula officinalis* a 5% (AgNPE)

A *Calendula officinalis* mostrou ser uma planta adequada para a síntese verde de AgNPs. Os constituintes químicos antioxidantes que se encontram presentes no extrato aquoso foram eficazes na redução dos íons Ag⁺ para Ag⁰ e, foi capaz, também, de promover nucleação, crescimento e a formação das AgNPs.

Um estudo preliminar foi realizado para determinar as proporções dos reagentes e o tempo necessário para formação das AgNPs, baseado nos parâmetros: diâmetro hidrodinâmico (DH), polidispersão (PDI), potencial zeta e absorção no espectro de UV-Vis entre 400 a 500 nm (Tabela 3).

O DH relaciona-se com o diâmetro das partículas em suspensão pelo espalhamento de luz devido ao movimento Browniano. Quando uma partícula é dispersa em um meio líquido, forma-se uma camada de solvatação em sua superfície. O DH inclui essa camada de solvatação, o que faz com que esse dado possa ser superestimado quando comparado, ao diâmetro obtido por meio de técnicas de microscopia, que estimam o diâmetro das partículas secas.

O PDI se refere à variedade do tamanho da amostra relativo à sua distribuição por intensidade (MALVERN, 2010). Esse valor varia de 0 a 1 e, quanto menor, menos polidispersa e mais homogênea é a distribuição do tamanho da amostra.

A carga de superfície das partículas determinada pelo potencial Zeta (PZ) de refere-se à carga da bicamada elétrica que recobre a partícula sendo um indicativo da estabilidade coloidal, pois quanto maior o valor das cargas em módulo, maior a

repulsão eletrostática entre as partículas e menor o estado de agregação e a probabilidade de floculação ou sedimentação.

O pH, a temperatura e concentração dos eletrólitos da solução são parâmetros que podem influenciar nos valores esperados, por isso todas as medidas foram tomadas nas mesmas condições. O pH da solução foi de 5,5.

Verificou-se que os melhores resultados para a formação das AgNPs foram alcançados quando se utilizou o extrato aquoso de *Calendula officinalis* obtido por infusão, na proporção de 1/20 em relação à solução de AgNO_3 a 1mmolL^{-1} . Nessa proporção observou-se os menores tamanhos de partícula, baixa polidispersão e carga de superfície alta e negativa. Pode-se observar, também, que as amostras obtidas com o infuso apresentaram absorção entre 400 a 500 nm no espectro de UV-Vis.

Tabela 3 - Caracterização das AgNPs obtidas por duas formas de extrato e dois diferentes volumes.

		Tempo (h)	DH (nm)	PDI	PZ (mV)	UV-Vis (400 a 500 nm)
I N F U S Ã O	1:20	2	58	0,306	-29,7	N/A ¹
		4	51	0,490	-30,4	N/A
		6	114	0,345	-28,1	N/A
		24	86	0,388	-27,2	A ²
		48	87	0,331	-28,3	A
	1:10	2	79	0,511	-21,2	N/A
		4	111	0,351	-18,8	N/A
		6	127	0,319	-26,9	N/A
		24	591	0,500	-22,1	A
		48	632	0,605	-26,7	A
T U R B Ó L	1:20	2	248	0,511	-30,3	N/A
		4	249	0,416	-26,9	N/A
		6	294	0,303	-26,8	N/A
		24	369	0,651	-19,7	N/A
		48	812	0,724	-19,7	N/A
I S E	1:10	2	336	0,373	-30,6	N/A
		4	324	0,282	-27,1	N/A
		6	366	0,352	-29,6	N/A
		24	394	0,351	-30,0	N/A
		48	783	0,463	-32,4	N/A

Fonte: A autora

¹ Não absorve no espectro Uv-vis entre 400 a 500 nm

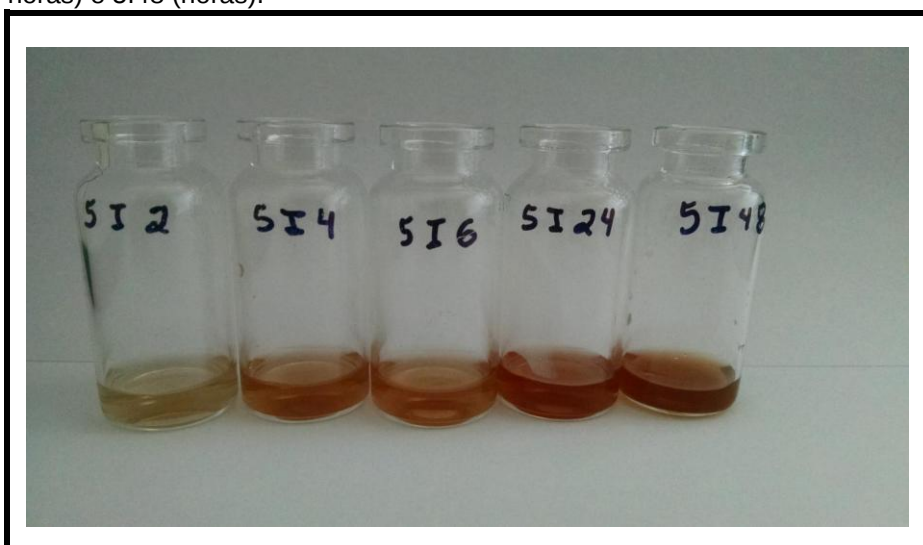
² Absorve no espectro Uv-vis entre 400 a 500 nm

No preparo de AgNPs com o extrato da planta ocorreu a mudança de cor do amarelo claro para o marrom avermelhado, indicando a formação das AgNPs.

O extrato aquoso de *Calendula officinalis* a 5% promoveu a redução dos íons Ag^+ presentes no AgNO_3 , dando início à mudança na coloração, intensificada com no decorrer do tempo, demonstrando o consumo total dos íons Ag^+ e determinando a nucleação e formação das (AgNPs), nas quais se encontra Ag^0 . Após 48 horas, foi observada a coloração marrom avermelhado indicando o final da redução. (Figura 12).

Esta mudança de coloração ocorrida na obtenção das AgNPs, pode ser observada, também, no espectro de UV-Vis, uma técnica muito utilizada para examinar a formação, controlar o tamanho e a forma das AgNPs em suspensões aquosas. (BINDHU e UMADEVI, 2015).

Figura 12 - Progressão da coloração no meio reacional (contendo 5mL de infuso 95mL de AgNO_3 1 mM), no intervalo de 2 a 48 horas. 5I2 (2 horas), 5I4 (4 horas), 5I6 (6 horas), 5I24 (24 horas) e 5I48 (horas).



Fonte: A autora

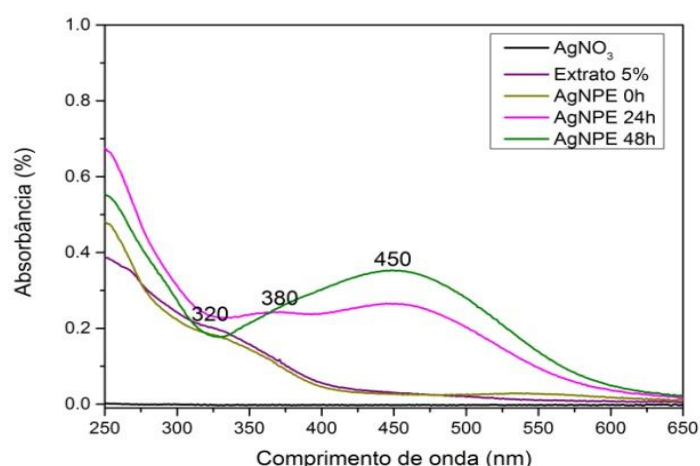
Um dos fatores primordiais para identificar a formação de AgNPs é absorção no espectro visível em aproximadamente 400 a 500 nm. Chidambaram e colaboradores em 2014 e Baghizadeh e colaboradores em 2015 também utilizaram uma infusão de *Calendula officinalis* e obtiveram AgNPs que tiveram absorção máxima no comprimento de onda entre 440 a 460 nm.

O tamanho e a forma das AgNPs podem ser caracterizados pela espectroscopia de absorção óptica na região do Ultravioleta Visível (UV-Vis).

A absorção óptica de AgNPs no espectro de UV-Vis é denominado de plasmon ressonante de superfície (PRS). A posição e a forma da absorção do plasmon das AgNPs são fortemente dependentes do tamanho de partícula, do meio dielétrico, e dos compostos adsorvidos na superfície. Os comprimentos de onda ficam mais longos com o aumento do tamanho da partícula.

Os espectros do UV-vis, (Figura 14), mostram que a solução de AgNO_3 a 1 mmolL^{-1} não absorveu, enquanto o extrato aquoso de *Calêndula officinalis* a 5%, absorveu próximo a 320 nm, o meio reacional em zero horas (AgNPE 0h) apresentou uma absorção relativa aos grupos cromóforos do extrato, enquanto as AgNPE 24h e 48 h apresentaram uma intensidade de absorbância máxima em 450 nm.

Figura 13 - Espectro das AgNPs logo após o gotejamento, depois de 4 horas e 48 horas. AgNO_3 (cor preta); extrato aquoso de *Calêndula officinalis* a 5 % (vermelho); espectro da AgNPE no início da redução (azul); AgNPE após 24 h (rosa); AgNPE após 48h (verde).



Fonte: A autora.

Esses resultados demonstraram que a redução total dos íons Ag^+ ocorreu quando a solução apresentou absorção máxima em 450 nm. Chidambaram, e colaboradores em 2014, também encontraram resultados semelhantes, no qual observaram a formação de AgNPs com extrato aquoso de *Calêndula officinalis* com absorção entre 440 a 460 nm.

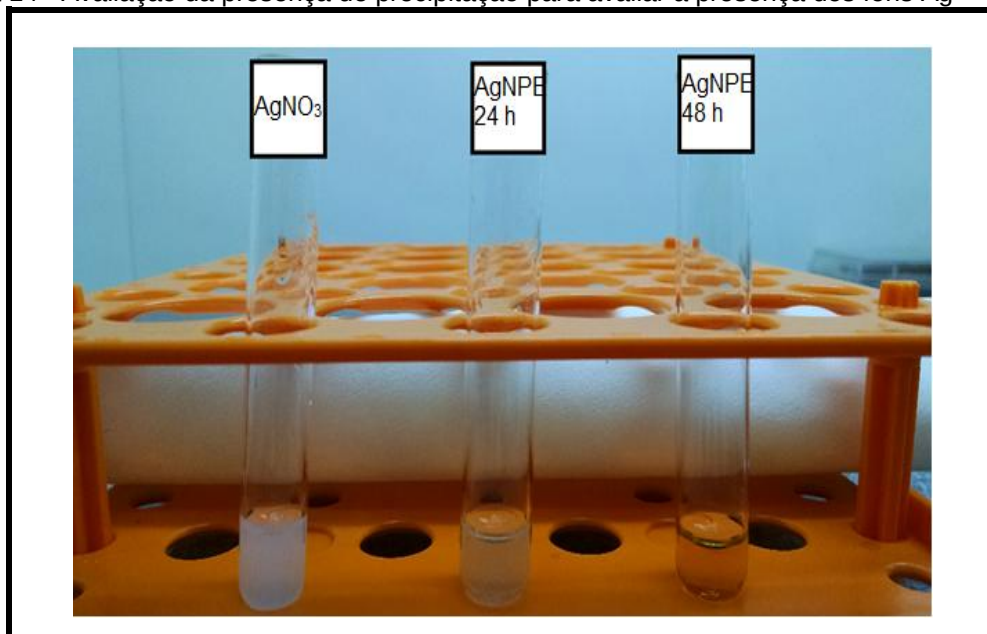
É importante salientar que houve a extinção da banda de absorção em 320 nm, do extrato das flores de *Calêndula officinalis* a 5%, indicativa da presença dos agentes redutores, comprovando a formação das AgNPE. (BUTNARIU E CORADINI, 2012). Outra banda que se extingue com o passar do tempo de reação é a banda,

(“ombro”), entre 350 a 400 nm, que indica os agregados de Ag^0 ainda não bem definidos com a forma de nanopartículas. (BHUI et al., 2009).

Assim, considerando os parâmetros avaliados, o extrato aquoso de *Calendula officinalis* obtido por infusão, na razão de 1:20 para o solução do AgNO_3 1 mmolL^{-1} , foi selecionado para a sequência do trabalho de fotoredução com LED. As AgNPE obtidas com tempo de reação de 48 horas foram avaliadas de forma comparativa juntamente com AgNPs obtidas a partir da exposição do meio reacional aos LEDs.

O tempo de reação necessário para a total redução dos íons Ag^+ a Ag^0 também foi avaliado pela precipitação de íons Ag^+ no meio reacional pela adição de ácido clorídrico (HCL). (VOGEL, 1981). Os resultados desta reação podem ser observados na Figura 13. A presença de precipitado nos tubos contendo AgNO_3 e AgNPE resultante de 24 horas de reação, indica que ainda existem resíduos de prata e, portanto, que a reação não foi totalmente finalizada neste período. Já, no tubo contendo AgNPE resultante de 48 horas de reação, não se observa mais o precipitado, o que comprova a total redução dos íons Ag^+ e formação das nanopartículas em 48 horas.

Figura 14 - Avaliação da presença de precipitação para avaliar a presença dos íons Ag^+



Fonte: A autora.

5.1.3 Obtenção das AgNPs a Partir da Reação do AgNO_3 com o Extrato Aquoso de *Calendula officinalis* a 5% e com Exposição aos LEDs

Foi possível verificar a formação de AgNPs após a exposição do meio

reacional (AgNO_3 com o extrato aquoso de *Calendula officinalis* 5%) aos LEDs das diversas cores testadas: azul (AgNPEB), verde (AgNPEG) e vermelho (AgNPER). As AgNPs obtidas apresentaram diferentes características morfológicas e de superfície, e espectroscópicas avaliadas.

5.1.3.1 Caracterização das AgNPs obtidas com extrato aquoso de *Calendula officinalis* 5%) e exposição aos LEDs

5.1.3.1.1 Diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta (PZ).

Na Tabela 4, estão representados os valores de DH, PDI e PZ das AgNPs (AgNPE, AgNPEB, AgNPEG e AgNPER). Verificou-se pelo DH que as AgNPE e AgNPER apresentaram os menores tamanhos, de aproximadamente 90 nm, podendo ser consideradas uma solução coloidal, uma vez que seu tamanho se encontra abaixo de 100 nm. (SAADE, 2013).

Tabela 4 - Características das AgNPs obtidas com extrato aquoso de *Calendula officinalis* 5%) e exposição aos LEDs por 48 h. Diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta (PZ).

NANOPARTÍCULAS	DH (nm) $\pm$ DP	PDI $\pm$ DP	PZ (mV) $\pm$ DP
AgNPE	89,56 $\pm$ 16,94	0,583 $\pm$ 0,044	- 22,23 $\pm$ 0,97
AgNPEB	175,43 $\pm$ 21,25	0,510 $\pm$ 0,035	- 17,33 $\pm$ 2,08
AgNPEG	138,11 $\pm$ 5,52	0,468 $\pm$ 0,037	- 21,00 $\pm$ 1,44
AgNPER	88,62 $\pm$ 6,02	0,530 $\pm$ 0,028	- 22,86 $\pm$ 1,48

Fonte: A autora

AgNPE - AgNPs obtidas pela redução da solução de AgNO_3 pelo extrato aquoso de *Calendula officinalis*.

AgNPEB - AgNPs obtidas pela redução da solução de AgNO_3 pelo extrato aquoso de *Calendula officinalis* e exposição a LED azul.

AgNPEG - AgNPs obtidas pela redução da solução de AgNO_3 pelo extrato aquoso de *Calendula officinalis* e exposição a LED verde.

AgNPER - AgNPs obtidas pela redução da solução de AgNO_3 pelo extrato aquoso de *Calendula officinalis* e exposição a LED vermelha.

Todas as AgNPs se apresentaram polidispersas. A AgNPEG apresentou o menor desvio padrão corroborando com menor PDI. O controle da distribuição e uniformidade do tamanho nas sínteses de nanopartículas metálicas em solução aquosa com extrato de planta é um grande desafio, porque os agentes redutores são as diversas biomoléculas do extrato vegetal, e cada uma interage com a prata de maneira diferente.

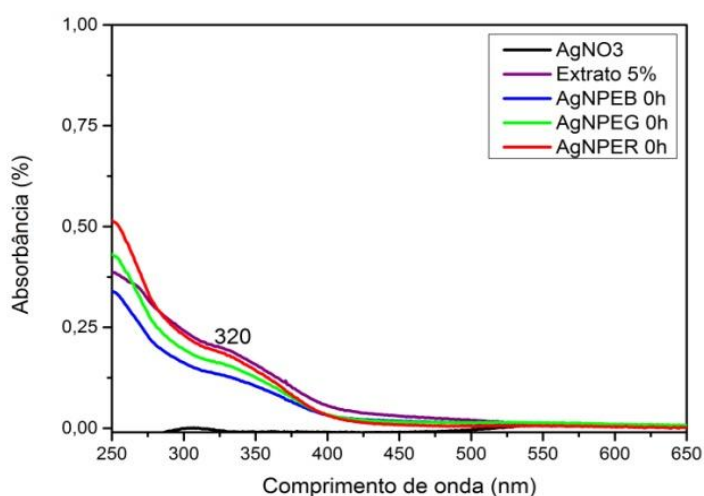
As biomoléculas do extrato aquoso da *Calendula officinalis* também foram responsáveis pelo PZ negativo das nanopartículas, principalmente devido aos grupamentos fenólicos com caráter levemente ácidos, podendo ser responsável pela carga de superfície negativa das AgNPs.

5.1.3.1.2 Espectroscopia de absorção óptica na região do Ultravioleta Visível (UV-vis) das AgNPs obtidas com extrato aquoso de *Calendula officinalis* 5%) e exposição aos LEDs

As AgNPs expostas aos diferentes LEDs e por diferentes períodos de tempo, apresentaram bandas distintas de absorção no espectro de UV-vis.

No tempo zero não se observou absorção próxima à banda de 450 nm por nenhuma das AgNPs testadas, (Figura 15).

Figura 15 - Espectro de UV-Vis das AgNPs expostas aos LEDs (AgNPEB, AgNPEG, AgNPER) no tempo zero.

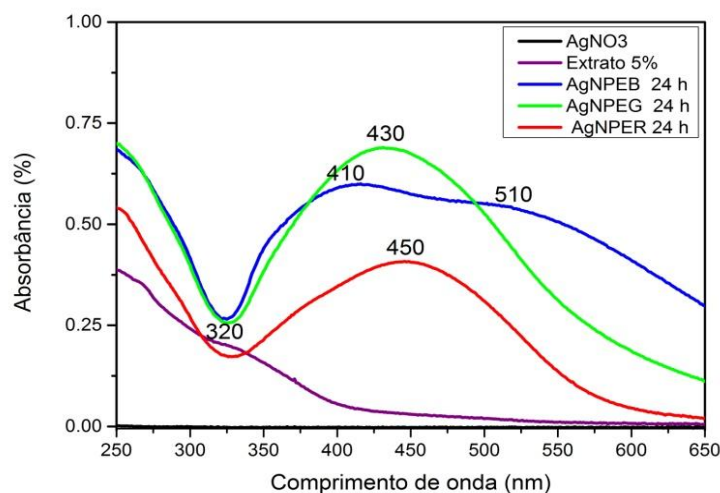


Fonte: A autora

Após 24 horas de exposição todas as AgNPs apresentaram bandas de absorção no espectro UV-Vis. As AgNPEB apresentaram duas bandas de absorção em 410 e 510 nm; as AgNPEG absorveram em 430 nm e a AgNPER em 440 nm, (Figura16).

Uma banda de absorção em 510 nm da AgNPEB pode estar relacionada com AgNPs anisotrópicas (PAL et al., 2007). Ye e colaboradores em 2015 obtiveram AgNPs decaédricas utilizando LED azul.

Figura 16 - Espectro de UV-Vis das AgNPs expostas aos LEDs (AgNPEB, AgNPEG, AgNPER), após 24 horas.



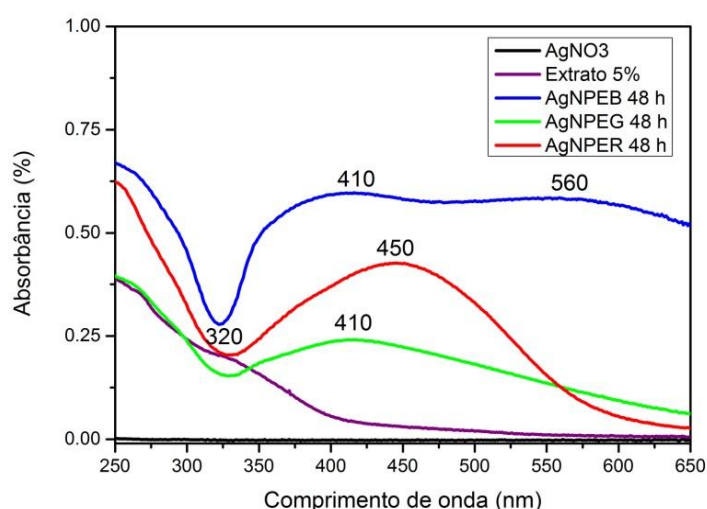
Fonte: A autora

Decorridas 48 horas de exposição (Figura 17), as AgNPEB mantiveram uma banda de absorção em 410 nm, entretanto se observou um deslocamento de 510 nm para 560 nm, reforçando a presença de anisotropia. As AgNPEG apresentaram absorção em 410 nm, sofrendo, assim, um desvio na banda de absorção em relação às 24 horas de exposição, o que é indicativo da redução no tamanho das AgNPEG formadas após 48 horas. Devido às mudanças nas bandas de absorção observadas no espectro de UV-Vis, pode-se postular, ainda, que as AgNPEB e AgNPEG apresentaram alterações em suas formas. (STAMPLECOSKIE; SCAIANO, 2010). As AgNPER não apresentaram alteração na banda de absorção e seu espectro apresenta-se muito semelhante com os das AgNPE.

Após 72 h de exposição observou-se o aparecimento de um precipitado, que inviabilizou a análise do espectro.

Percebe-se que a aplicação dos LEDs alterou o perfil PRS nos espectros de UV-Vis, sendo que as bandas sofreram alargamento e deslocamentos para comprimento de onda menor. Em 2011, Khan e colaboradores descreveram que as AgNPs de aproximadamente 30 nm absorveram entre 380 a 400nm. O achatamento dos picos também está relacionado com a diminuição no tamanho das AgNPs, indicando que a LED finaliza a redução, eliminando os aglomerados, como citado por BHUI et al., em 2009.

Figura 17 - Espectro de UV-Vis das AgNPs expostas aos LEDs (AgNPEB, AgNPEG, AgNPER), após 48 horas.



Fonte: A autora.

5.1.3.1.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de fourier (FT-IR)

Os espectros de absorção, emissão e reflexão no infravermelho de espécies moleculares podem ser racionalizados assumindo-se que todos se originam de numerosas variações de energia produzidas por transição de moléculas de um estado de energia vibracional ou rotacional para outro. A absorção de radiação no infravermelho é limitada principalmente a espécies moleculares com pequenas diferenças de energia entre diversos estados vibracionais e rotacionais. (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Os valores encontrados na Tabela 5 correspondem aos valores encontrados na literatura para os grupos funcionais dos principais constituintes químicos da *Calendula officinalis*. Os grupos (O-H) são provenientes dos fenóis e alcoóis, presentes nos flavonoides, os quais aparecem na faixa de 3500 e 3200 no

espectro de FT-IR. Nos *carotenoides* encontramos os grupos cetônicos, ésteres e ácidos carboxílicos, representados pela vibração do (C=O). O estiramento do grupo funcional cetônicos (C=O) ligados aos anéis aromáticos dos flavonoides apresentam esta faixa de valor de 1680 a 1620 cm^{-1} , para os flavonoides com dois anéis aromáticos a banda em 1623 cm^{-1} é específica. (PRETSCH; BÜHLMANN; AFFOLTER, 2009). Já os terpenoides apresentam cadeias com insaturação, por isso os estiramento e deformação da dupla (C=C) em aproximadamente 1630 cm^{-1} . Os valores aproximadamente em 1600 cm^{-1} também podem estar relacionados com estiramento da ligação (C—C) do anel aromático. Aproximadamente em 1400 cm^{-1} encontramos as vibrações da carbonila dos ácidos carboxílicos e dos ésteres. Em 1060 cm^{-1} a deformação do angular correspondem a da ligação (C-O) nos éteres. A deformação da faixa de 900 a 650 cm^{-1} relaciona-se com a banda dos monosubstituintes e disubstituintes do anel aromático.

Tabela 5 - Tabela de valores das vibrações correspondentes aos grupos funcionais encontrados na literatura.

Grupo Funcional	Tipo de vibração	Valores de literatura cm^{-1}
O-H	Estiramento	3500-3200
	Deformação	1450-1200
C-H	Estiramento	3000-2840
	Deformação	1250-1230
C=O	Estiramento	1775-1705
C=O	Estiramento	1680-1620
C-O	Deformação	1420-1290
C-O-C	Deformação	1310-1000
C-C	Deformação	900-650

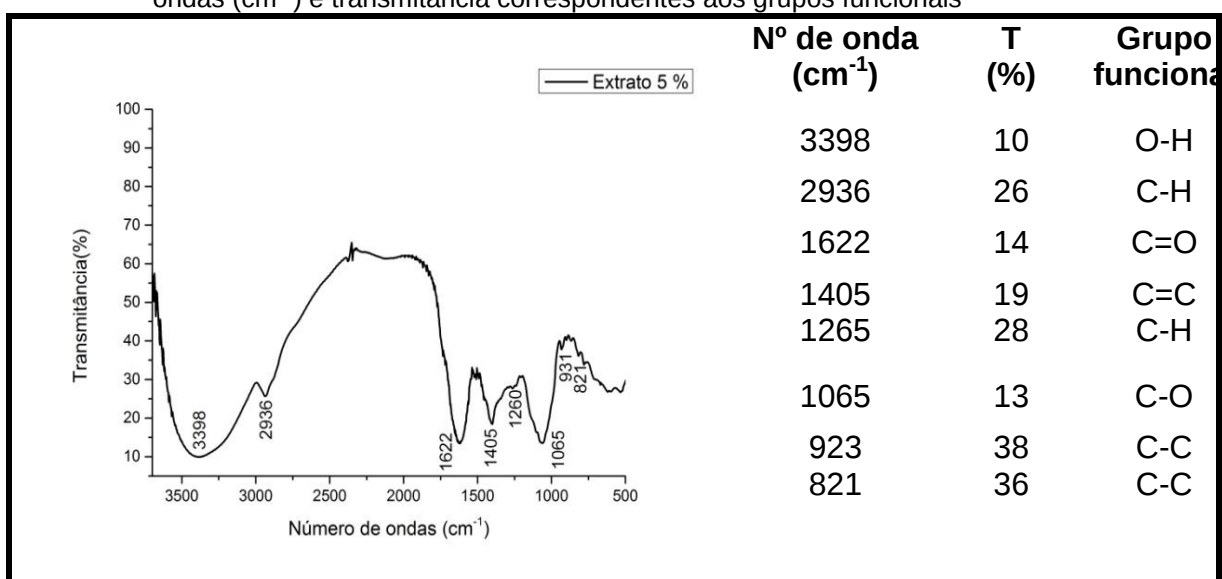
Fonte: Adaptada de PRETSCH, BÜHLMANN e AFFOLTER, 2009; SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J., 2006.

Com a espectroscopia na região do infravermelho é possível relacionar grupos funcionais dos constituintes químicos de compostos orgânicos, como extrato de plantas; no entanto, outras técnicas de análise são importantes para confirmar a

presença do composto investigado. (CHIDAMBARAM et al., 2014). Neste estudo, a espectroscopia de infravermelho foi utilizada para confirmar a presença de metabólitos do extrato aquoso de *Calendula officinalis* a 5% no recobrimento das AgNPs.

Os (C-H) ligados ao grupo funcional epóxido apresentam estiramento em 1265. Em 1065 cm^{-1} observou-se a deformação angular dos éteres (C-O-C). E os valores de 923 e 821 cm^{-1} correspondem substituintes de anel aromático (C-C).

Figura 18 - Espectro de FT-IR do extrato aquoso de *Calendula officinalis* a 5 % m/V e número de ondas (cm^{-1}) e transmitância correspondentes aos grupos funcionais



Fonte: A autora

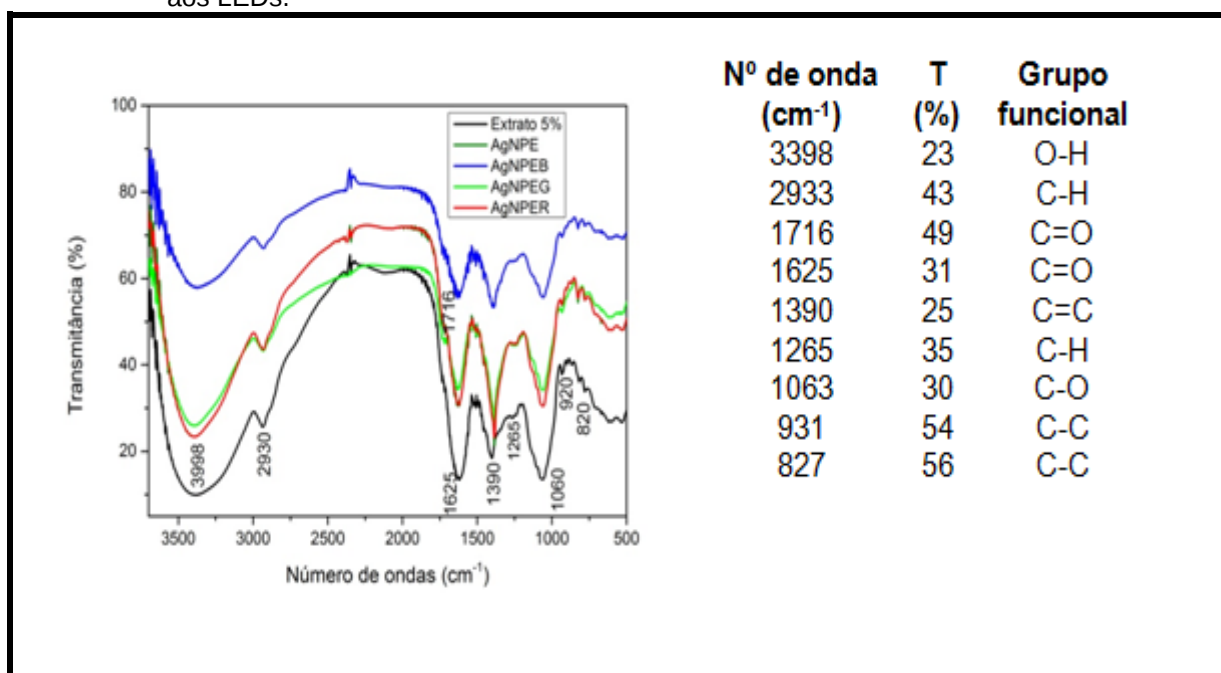
Ao se comparar o espectro do extrato aquoso de flores de *Calendula officinalis* 5% (Figura 18), aos espectros das AgNPs produzidas (Figura 19), foi observada presença das mesmas bandas. Entretanto, todas as AgNPs apresentam uma banda de vibração em aproximadamente 1715 cm^{-1} que corresponde ciclohexanona. A ciclohexanona é proveniente da oxidação de um álcool durante a redução da prata, principalmente pelo ciclohexanol, para formação das nanopartículas. A reação de oxiredução também promoveu o aparecimento da vibração em aproximadamente em 1390 cm^{-1} correspondente da insaturação do C=C de anel aromático. (PRETSCH; BÜHLMANN e AFFOLTER, 2009). O espectro das AgNPE e o das AgNPER apresentaram o mesmo perfil.

Os deslocamentos dos números de onda também estão relacionados com a formação das AgNPs e com alteração dos estados vibracionais das moléculas,

demonstrando que os metabólicos secundários (compostos fenólicos, terpenos e alcaloides) do extrato utilizado reduziram a prata e ficaram aderidos nas estruturas.

O aumento da transmitância do grupo funcional O-H nos espectros da AgNPs indica o envolvimento dos O-H livres no processo de redução. Assim como demonstrado por Anand e colaboradores em 2015, a presença de diferentes grupos funcionais na superfície da AgNPs ou a possível encapsulação das biomoléculas estão envolvidas na estabilização e aglomeração das AgNPs. A formação das AgNPs resulta nas mudanças das estruturas moleculares e interação com os íons prata. Esses resultados demonstram que os componentes do extrato ficaram aderidos nas AgNPs produzidas.

Figura 19 - Os espectros FT-IR do extrato de flores de *Calendula officinalis* e os espectros das AgNPE, AgNPEB, AgNPEG E AgNPER respectivamente, após 48 horas de exposição aos LEDs.



Fonte: A Autora.

5.1.3.1.4 Difração de Raios X

A difração é um fenômeno ondulatório, no qual uma onda sofre um desvio na sua trajetória ao atravessar um obstáculo cuja dimensão seja da mesma ordem de grandeza que a onda que o atravessa. Ao se incidir um feixe de raios X em uma amostra desconhecida, este difrata, e a medida dos ângulos de difração permite determinar a distância entre os átomos da amostra, e assim prever a estrutura

cristalina do material, visto que a posição das linhas de difração é característica de cada substância. A difração de raio X tem por base a Lei de Bragg, pois a partir do ângulo difratado 2θ e do comprimento de onda da radiação incidida é possível calcular a distância entre os átomos (d).

$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

n = número inteiro

λ = comprimento de onda dos feixes de raio

d = distância entre as camadas

θ = ângulo de incidência

Pode-se estimar o tamanho da nanopartícula através:

D = diâmetro da partícula

K=constante que depende da morfologia da partícula

$$D = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta}$$

β = largura na metade da altura do pico de difração de maior intensidade

λ = comprimento de onda dos feixes de raio

θ = ângulo de incidência

Essa técnica possibilita uma medida indireta do tamanho médio das nanopartículas pelo alargamento dos picos de difração causado pela diminuição no tamanho dos objetos que difratam os raios X. (CALLISTER, 2005).

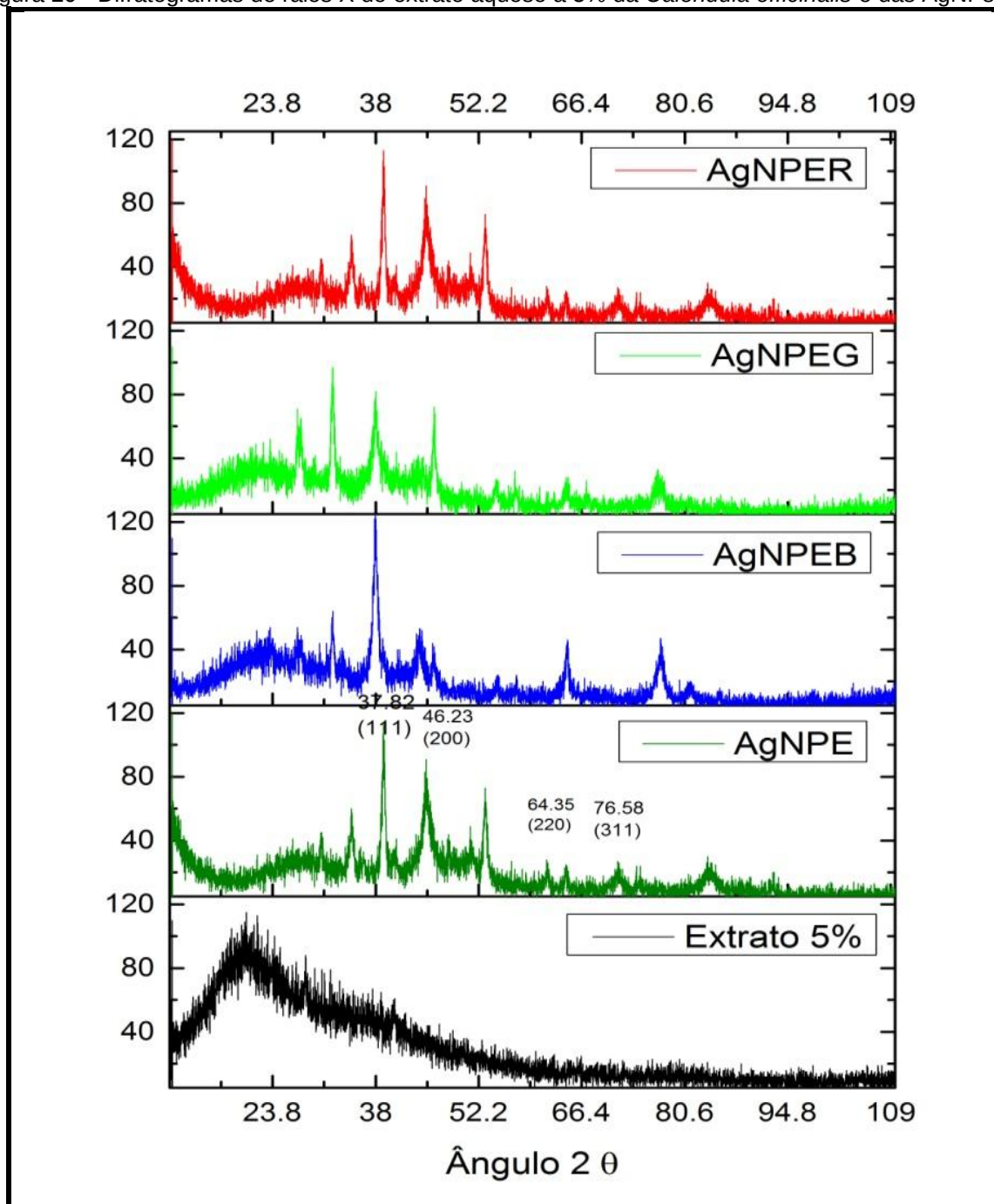
A técnica de DRX foi utilizada para a comprovação da cristalinidade da prata metálica presente na AgNPs, adicionalmente também se observou um padrão de difração típico de estruturas cristalinas, um perfil de difração e seus planos cristalográficos.

A prata possui uma estrutura cristalina cúbica de face centrada, na qual é possível visualizar maior intensidade de difração nos planos (111), (200), (220), (222) e (311). Através da análise das intensidades dos sinais nos planos identifica-se a faceta predominante na estrutura da nanopartícula, ou seja, maior intensidade no plano (200) indica a abundância da faceta {100} e, assim, maior intensidade no plano (220) ou (111) corresponde a maior percentual da faceta {110} ou {111}, respectivamente. (YALLAPPA et al., 2013; WYNN, 2012).

Na Figura 20 estão apresentados os difratogramas do extrato aquoso *Calendula officinalis* a 5%, das AgNPE, AgNPEB, AgNPEG e AgNPER.

Filmes poliméricos foram investigados com difração de raios X em 1999 por Fragalà e colaboradores, para identificação de cristais de prata e apresentaram pico mais intenso no plano (111) em ($2\theta = 38,1^\circ$), enquanto os picos menos intensos são no plano (200) em ($2\theta = 44,36^\circ$), (220) em ($2\theta = 64,17^\circ$) e (311) em ($2\theta = 77,54^\circ$), todos sumarizando a presença dos cristais de prata.

Figura 20 - Difratoogramas de raios X do extrato aquoso a 5% da *Calendula officinalis* e das AgNPs.



Fonte: A autora.

O difratograma do extrato aquoso de *Calendula officinalis* não apresentou planos de cristalinidade. Já os difratogramas das AgNPs pode ser observado um padrão de difração típico de estruturas cristalinas da prata, com os seguintes padrões de difração de raios X, em aproximadamente entre 37° e 38°, de 44° e 46°, 64° e 65° e 76° e 77°, que correspondem aos planos cristalográficos (111), (200), (220), (222) e (311), respectivamente, (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores dos ângulos e planos cristalinos encontrados nos difratogramas das AgNPE, AgNPEB e AgNPEG.

Nanopartículas	Ângulo 2 θ	Plano cristalino
AgNPE	37,82°	(111)
	46,23°	(200)
	64,35°	(220)
	76,58°	(311)
AgNPEB	37,84°	(111)
	46,25°	(200)
	64,34°	(220)
	76,82°	(311)
AgNPEG	37,92°	(111)
	44,23°	(200)
	64,65°	(220)
	77,38°	(311)
AgNPER	37,80°	(111)
	46,26°	(200)
	64,35°	(220)
	76,56°	(311)

Fonte: A autora

Estes resultados apresentam-se similares aos relatados na literatura, confirmando a presença de prata metálica nas amostras de AgNPs. (SALLUM, 2014; YANG et al., 2011).

É importante salientar que os picos de difração correspondentes aos planos (111), (200), (220) e (311) são marcantes para identificação da prata cristalina e que eles se mantiveram presentes mesmo nas soluções coloidais que permaneceram em presença das LEDs usada para transformação fotoquímica.

O difratograma das AgNPE se mostrou similar ao AgNPEG e AgNPER, com o mesmo plano cristalino, enquanto a AgNPEB diferiu por apresentar um pico mais

intenso no plano (111) porque suas nanopartículas são maiores e seu formato não é esférico e sim prismático, triangular e cúbico. Na difração de raios X o arranjo estrutural dos cristais pode determinar a variação nos planos e intensidade da difração. (PAL et al., 2007; WILEY et al., 2005).

5.1.3.1.5 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG)

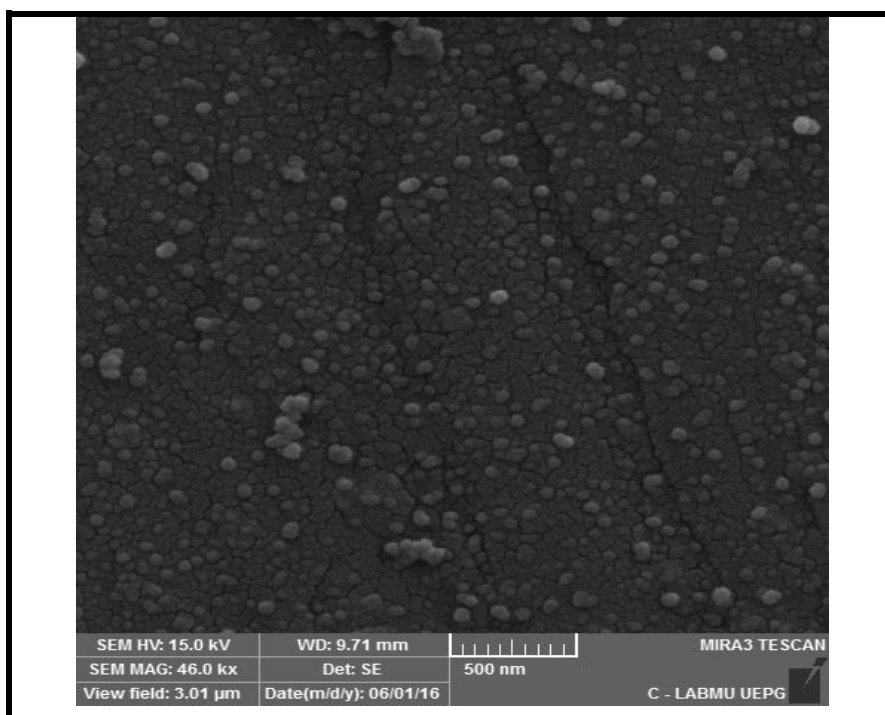
A microscopia eletrônica de varredura é utilizada para avaliar a superfície, forma e tamanho da nanopartículas, complementando os resultados obtidos por meio de outras técnicas de caracterização.

As nanopartículas AgNPE e AgNPER apresentaram forma esférica. As medidas foram realizadas somente nas nanopartículas esféricas.

O tamanho das AgNPE medidas a partir das imagens do MEV-FEG foi menor que os obtidos por DH, o que pode ser justificado pela presença de moléculas de água ao redor da nanopartícula, na técnica empregada para o DH. As medidas feitas nas micrografias do MEV-FEG tende a apresentar valores mais próximos do real (ALBERNAZ, 2014).

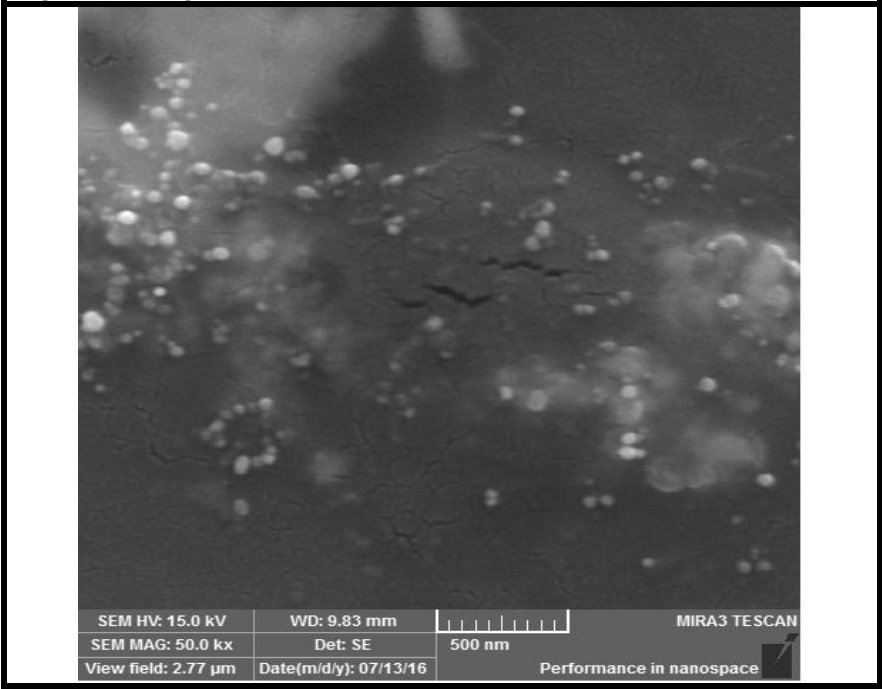
Nas Figuras 21 e 22, podem ser observadas as micrografias das AgNPE e AgNPER.

Figura 21 - Micrografia das AgNPE



Fonte: A autora.

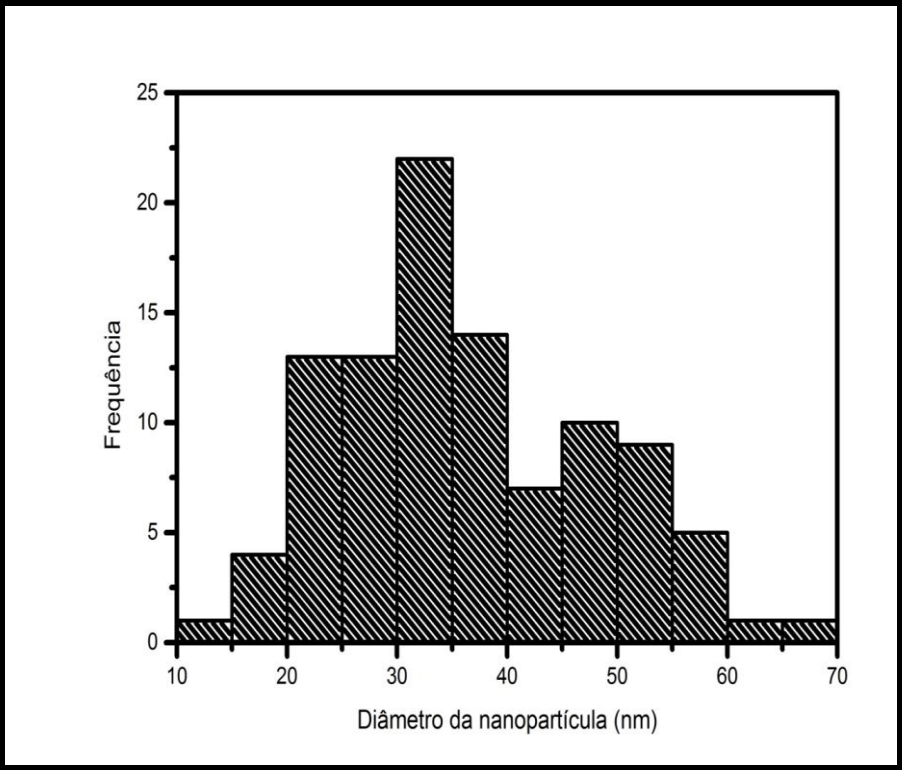
Figura 22 - Micrografia das AgNPER



Fonte: A Autora.

O diâmetro das partículas AgNPE e AgNPER ficou em 35 nm (DP ± 11), observado na Figura 23.

Figura 23 - Gráfico do diâmetro médio das AgNPE



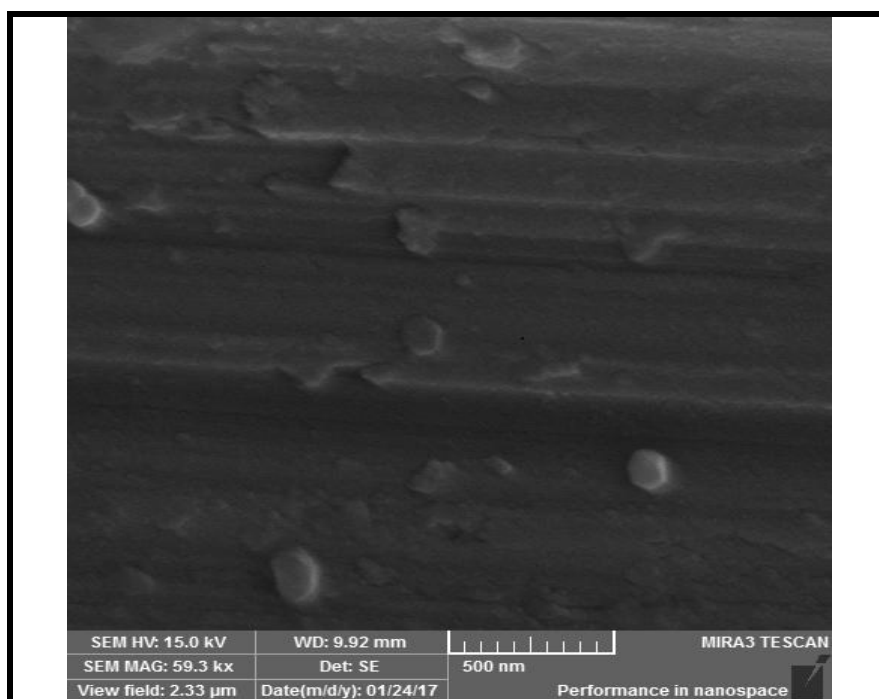
Fonte: A autora

Rajasekar e colaboradores (2013) obtiveram nanopartículas por biorredução, a partir do extrato aquoso de *Andrographis paniculata*, com características similares às encontradas neste trabalho.

As nanopartículas expostas aos LEDs apresentaram variações em suas formas, podendo-se observar nanopartículas esféricas, cúbicas, prismáticas, octaédricas e retangulares, dependendo do comprimento de onda do LED utilizado. Contudo as AgNPER, (Figura 23), apresentaram forma esférica e o mesmo tamanho das AgNPE, indicando que a exposição ao LED vermelho não promoveu modificação nas nanopartículas. O formato esférico era esperado para ambas as nanopartículas (AgNPE e AgNPER), uma vez que apresentaram absorção próxima a 450nm no UV-Vis. Esses resultados corroboram com os espectros de UV-Vis e com os difratogramas.

Na Figura 24, onde se encontram as imagens de MEV-FEG das AgNPEB, observa-se a presença de nanopartículas esféricas, bem como nanopartículas anisotrópicas, principalmente as hexagonais. A presença deste formato justifica a o deslocamento da banda de absorção mostrada no UV-Vis, de 510 para 560. Resultados semelhantes foram relatados por Stamplecoskie e Scaiano, (2010), Pal; Tak; Song, (2007).

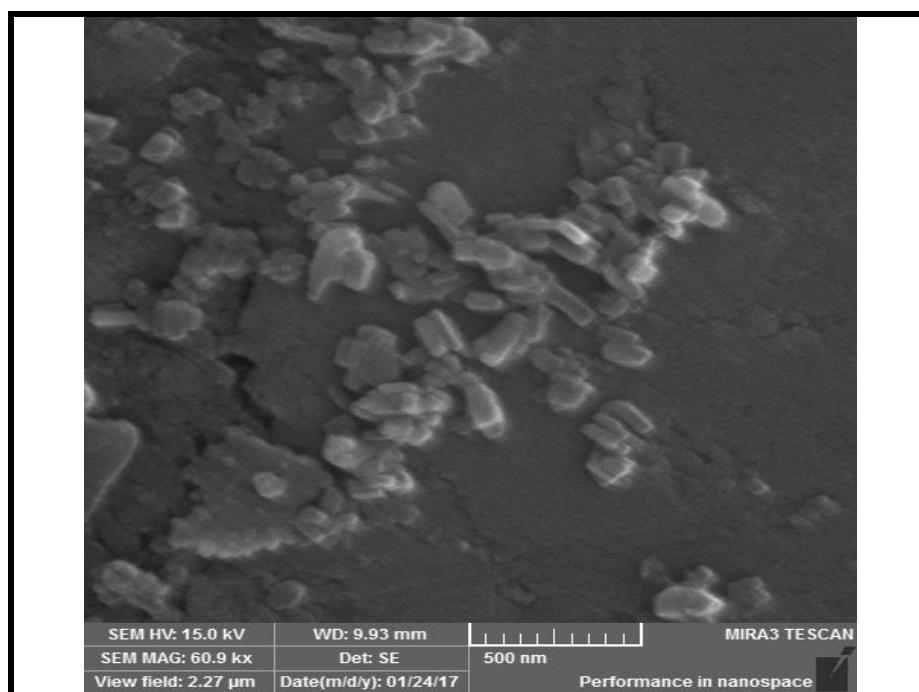
Figura 24 - Micrografia das AgNPEB



Fonte: A autora.

As AgNPEG mostraram formato quadrado e retangulares, como pode-se observar na Figura 25.

Figura 25 - Micrografia das AgNPEG.



Fonte: A autora.

Ao analisar os espectros de UV-Vis, verificou-se que ocorreu uma diminuição na absorbância na região de 400 a 500 nm, porque houve a diminuição da quantidade de nanopartículas esféricas.

Lee e colaboradores em 2014 utilizando LED verde e temperatura obtiveram partículas de outros formatos, quadradas, cúbicas e truncadas. Com auxílio de temperatura e utilizando o LED azul e verde, Cardoso e colaboradores em 2015, também obtiveram nanopartículas de vários formatos entre elas, cúbicas e octaédricas.

Ao se analisar a superfície das AgNPE percebe-se que apresentaram uma superfície de aspecto rugoso, enquanto as nanopartículas que sofreram a ação do LED apresentaram uma superfície lisa. A rugosidade pode estar relacionada com uma maior quantidade de resíduos do extrato sobre a nanopartículas. Outra hipótese para a superfície mais lisa das nanopartículas expostas ao LED e, a finalização da redução dos íons Ag^+ e nucleação das nanopartículas que sofrem um rearranjo e definição da forma após a exposição ao LED.

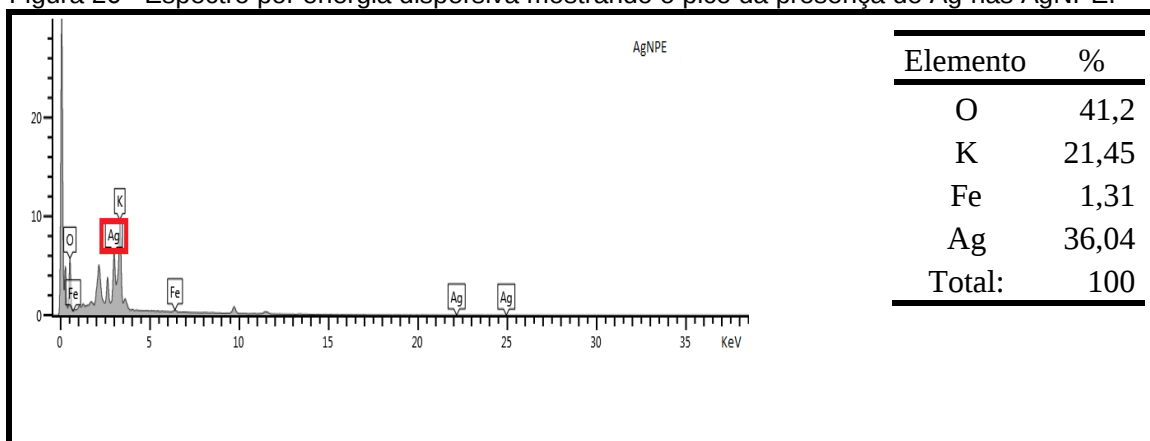
5.1.3.1.6 Espectroscopia por energia dispersiva (EDS)

A EDS (*Energy-Dispersive X-ray Spectrometry*) é um acessório essencial no estudo de caracterização microscópica de materiais. Quando o feixe de elétrons incide sobre um material, os elétrons mais externos dos átomos e os íons constituintes são excitados, mudando de níveis energéticos. Ao retornarem para sua posição inicial, liberam a energia adquirida em comprimento de onda no espectro de raios-X. Quando um elétron do feixe incide na amostra ele ioniza, retira elétrons, das camadas inferiores (K, L ou M). Um elétron de uma camada superior desce para a camada vazia emitindo uma energia característica. (SCHNEIDER, 2014). Um detector instalado na câmara de vácuo do MEV mede a energia associada a esse elétron. Como os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, é possível, no ponto de incidência do feixe, determinar quais os elementos químicos estão presentes naquele local.

Com o objetivo de identificar a distribuição dos elementos constituintes das AgNPs foi realizada a análise por EDS em apenas duas na amostra de AgNPE e uma amostra de nanopartículas exposta ao LED azul (AgNPEB). A espectroscopia EDS foi realizado somente nas AgNPEB porque essa é que apresentou maiores diferença, quando analisado as das outras nanopartículas.

Na Figura 26 pode ser visualizado o espectro EDS da AgNPE e na Figura 27 a do AgNPEB, que trazem informações sobre as amostras e seus constituintes mais predominantes.

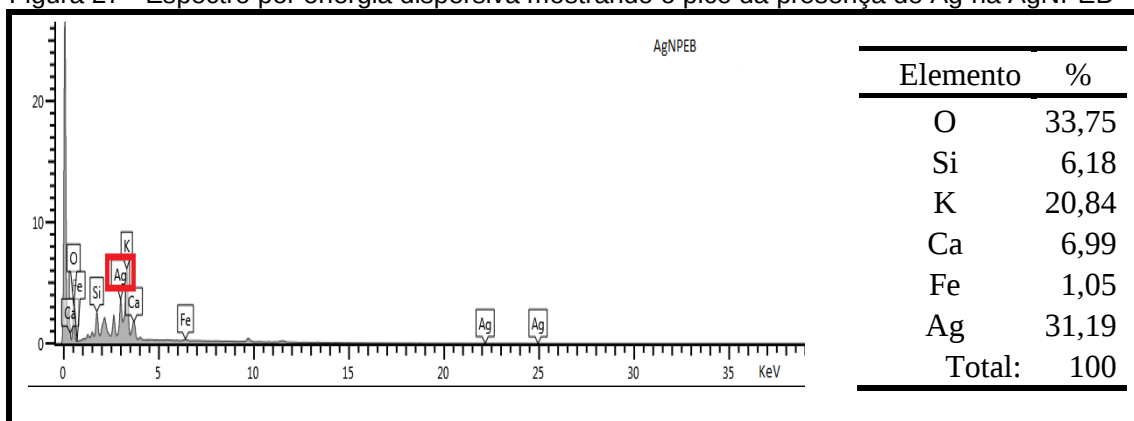
Figura 26 - Espectro por energia dispersiva mostrando o pico da presença de Ag nas AgNPE.



Fonte: A autora

O espectro discreto se deve à dispersão da energia acontecer pelas transições eletrônicas nas camadas mais baixas da configuração eletrônica dos elementos químicos presentes na amostra. Pode-se observar que as ambas as amostras apresentaram pico da prata com uma porcentagem significativa em relação aos outros compostos. Coli em 2014, relatou que a prata se dispersa no início do espectro e próximo a 3 KeV. (SARKAR et al., 2011).

Figura 27 - Espectro por energia dispersiva mostrando o pico da presença de Ag na AgNPEB



Fonte: A autora.

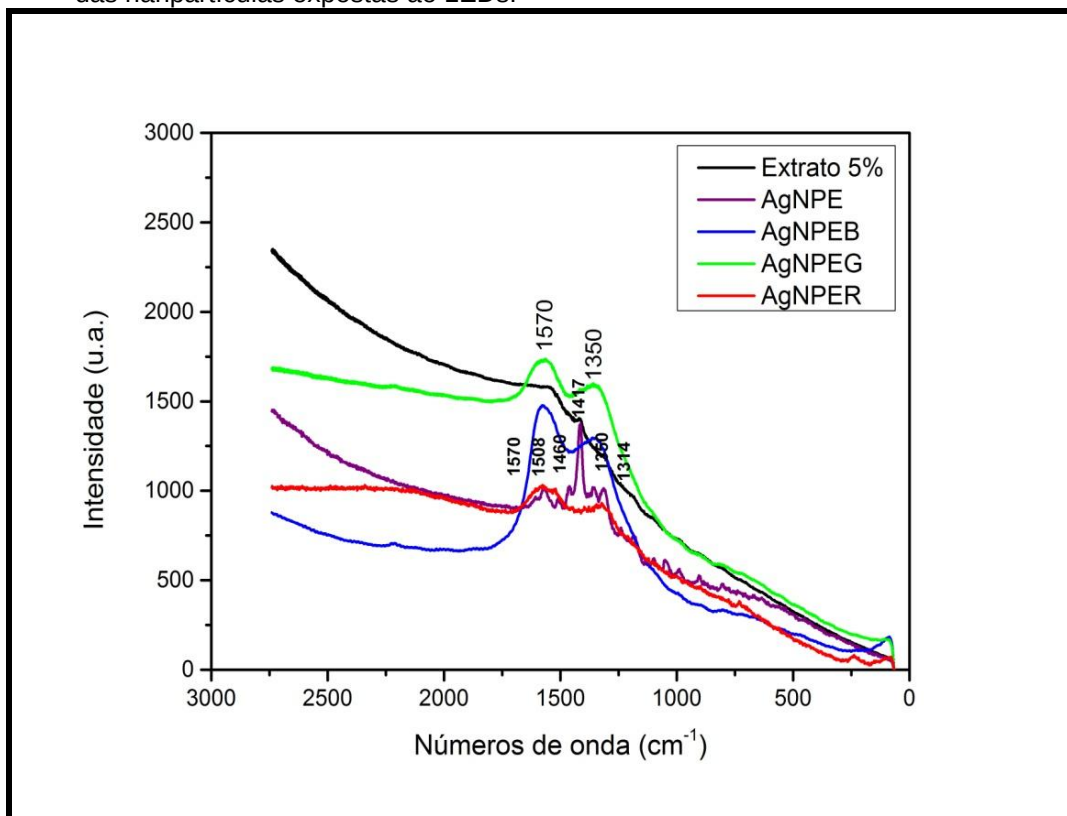
A presença dos outros constituintes pode ser devido ao material orgânico do extrato da planta, como o oxigênio, carbono e alguns metais, como o potássio (K), Silício (Si) e o Cálcio (Ca).

5.1.3.1.7 Espectroscopia de Raman

A espectroscopia Raman pode ser utilizada na identificação de substâncias orgânicas e farmacológicas, e as AgNPs podem intensificar o sinal da substância em análise. A espectroscopia de Raman é um método qualitativo e quantitativo na identificação de diferentes substâncias e suas estruturas. (PIETA, 2014). É também, eficiente na identificação de moléculas em baixas concentrações devido sua alta sensibilidade, auxiliando na identificação de compostos orgânicos que estão aderidos as AgNPs. (SALLUM, 2014). Com a finalidade de confirmar o recobrimento das AgNPs pelo extrato aquoso das flores de *Calendula officinalis* (AgNPE) e avaliar a presença da AgNPs na amostra foi realizado o Raman.

Na Figura 28 o espectro Raman do extrato de *Calendula officinalis* 5% e das nanopartículas.

Figura 28 - Espectro de Raman do extrato aquoso de flor de *Calendula officinalis* a 5%, das AgNPE e das nanopartículas expostas ao LEDs.



Fonte: A Autora.

O espectro em vermelho apresenta o espectro Raman do extrato de *Calendula officinalis* 5%. Observa-se, nesse caso, uma forte fluorescência, o que dificulta grandemente a obtenção de um espectro vibracional de qualidade e distinção entre as bandas. Os dados foram normalizados para melhor visualização e comparação dos resultados. Em condição de ressonância com a radiação excitante de 514,5 nm do aparelho nas soluções coloidais de AgNPs o espalhamento Raman torna-se mais intenso que a fluorescência e a observação dos espectros vibracionais das soluções tornam-se possível, como apresentado no espectro verde que corresponde a AgNPEO espectro azul escuro e o azul claro apresentam os espectros Raman da AgNPEB e AgNPEG, respectivamente, nas quais houve uma maior intensificação do efeito raman ressonante.

Nos espectros da AgNPEB e AgNPEG os picos não apresentaram-se bem definidos como nas AgNPE, pois ocorre uma sobreposição dos picos promovendo um alargamento, dificultando a separação e distinção das vibrações correspondentes aos grupos funcionais. E no espectro vermelho são observadas as AgNPER, no qual também houve sobreposição dos picos, porém suas intensidades foram menores.

No espectro AgNPE a intensidade foi mais baixa quando comparadas com as AgNPEB e AgNPEG, mas apresentou picos mais definidos que podem estar relacionadas com as vibrações das principais funções orgânicas presentes no extrato aquoso da *Calendula officinalis*¹. Os fenóis, por exemplo, podem apresentar deslocamento em aproximadamente 1600 cm^{-1} e outro entre 1200 e 1400 cm^{-1} . No espectro da AgNPE, no qual os picos estão mais definidos, observou-se os picos próximos os da literatura como 1314 e 1360 cm^{-1} e outro em 1570 cm^{-1} . As cetonas podem apresentar deslocamentos raman em aproximadamente 1400 cm^{-1} e um pico intenso em aproximadamente 1570 cm^{-1} , mas especificamente do grupamento cetônico ligado diretamente no anel, como no caso da hexacetona. Já os epóxidos apresentam uma alta intensidade no deslocamento de raman próximo a 1300 cm^{-1} .

A intensidade do espalhamento da luz de raman pode relacionar-se diretamente com o formato e tamanho da AgNPs, pois nas partículas quadradas, prismáticas e outros formatos, apresentam plasmon ressonante de superfícies diferentes das AgNPs esféricas. (STAMPLECOSKIE; SCAIANO, 2012).

Nas soluções das AgNPEB e AgNPEG, além das nanopartículas esféricas encontram-se as nanopartículas triangulares, quadradas e retangulares, que são nanopartículas maiores. Portanto quando adquirem estes formatos não esféricos, a conformação das moléculas ao seu redor é alterada, podendo ocasionar a mudança nos estados vibracionais e aumento da intensidade do espalhamento da luz de raman. Dessa maneira tem-se o chamado efeito *Surface Enhanced Resonance Raman Scattering* (SERS), promovido pelas AgNPs.

As AgNPs são muito utilizadas para aumentar o efeito SERS, assim como podem ter aumentado a intensidade das vibrações correspondentes das biomoléculas do extrato.

5.1.3.1.8 Estudo da estabilidade

Para o estudo da estabilidade foram avaliadas as características físico-químicas das AgNPs após 30 e 60 dias, nas mesmas condições das análises realizadas anteriormente para formação das AgNPs. Na tabela 7 encontram-se os valores do DH, PDI e PZ das nanopartículas após 30 dias de armazenamento. Pode-

¹ SPECTRAL DATABASE FOR ORGANIC COMPOUNDS-SDBS. Disponível em <http://sdb.db.aist.go.jp>. Acesso em 14/11/2016.

se verificar que ocorreu um aumento no tamanho, mais pronunciado nas AgNPEB, AgNPEG e AgNPER. Isso pode ter sido ocasionado pela exposição destas nanopartículas ao LED e degradação dos constituintes do extrato aquoso de flores de *Calendula officinalis* a 5% que recobre as nanopartículas, levando a uma maior instabilidade às nanopartículas.

Tabela 7 - Características físico-químicas das AgNPs obtidas pela redução da solução do AgNO_3 pelo extrato 5% e pelos LEDs após 30 e 60 dias.

	NANOPARTÍCULAS	DH (nm) $\pm$ DP	PDI $\pm$ DP	PZ (mV) $\pm$ DP
30 Dias	AgNPE	105,42 $\pm$ 14,19	0,511 $\pm$ 0,150	-20,03 $\pm$ 1,38
	AgNPEB	246,01 $\pm$ 26,25	0,463 $\pm$ 0,046	-16,01 $\pm$ 4,08
	AgNPEG	201,10 $\pm$ 21,52	0,487 $\pm$ 0,102	-21,40 $\pm$ 1,44
	AgNPER	103,35 $\pm$ 18,63	0,445 $\pm$ 0,257	-20,96 $\pm$ 0,77
60 Dias	AgNPE	107,96 $\pm$ 12,20	0,503 $\pm$ 0,121	-17,46 $\pm$ 3,75
	AgNPEB	237,70 $\pm$ 23,30	0,570 $\pm$ 0,205	-17,10 $\pm$ 0,84
	AgNPEG	211,00 $\pm$ 26,00	0,453 $\pm$ 0,050	-19,2 $\pm$ 2,80
	AgNPER	108,62 $\pm$ 2,60	0,611 $\pm$ 0,014	-18,5 $\pm$ 0,707

Fonte: A autora.

Os valores encontrados após 60 dias mostram que não houve diferenças em relação aos resultados encontrados após 30 dias.

Considerando que as nanopartículas somente contam com os metabólitos da flor de *Calendula officinalis* para estabilidade, essas tiveram um aumento do DH, mas que estatisticamente não significativo ($p > 0,05$) para as AgNPE, porém para as AgNPEB, AgNPEG e AgNPER os resultados tiveram diferenças significativas ($p < 0,05$). O PDI e o PZ não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$).

Os LEDs apresentaram diferentes ações no meio reacional e na obtenção da AgNPs, cada LED possui um comprimento de onda, o azul (455 nm), o verde (512 nm) e vermelho (630 nm), e assim diferentes energias. Os LEDs azul e verde

alteraram as formas das AgNPs, sendo que os formatos presente na solução das AgNPEB foram diferentes dos formatos da solução de AgNPEG, enquanto as AgNPEB apresentaram hexagonais e prismáticas, as AgNPEG retangulares e quadradas. A energia do LED vermelho é a mais baixa, não sendo o suficiente para mudar a forma das AgNPs. As alterações nas formas das AgNPs determinaram diferentes intensidades de absorbâncias nos espectros de UV-Vis, o espectro da AgNPE e AgNPER foram semelhantes, porque essas se mantiveram esféricas. Os difratogramas das AgNPE e AgNPER também apresentaram os mesmos picos de intensidades. O LED vermelho pode ser utilizado para diminuir o tempo de produção das AgNPs.

As AgNPs apresentam um grande potencial de aplicação na área médica. Tendo em vista que foram determinadas as condições de obtenção e as características das AgNPs com extrato aquoso de *Calendula officinalis* sem e com exposição aos LED, considera-se que testes de ação biológica que determinem a ação destas partículas nas suas diferentes formas podem ser realizados.

6 CONCLUSÃO

O extrato aquoso obtido pela infusão das flores da *Calendula officinalis* a 5 % foi uma excelente opção para a síntese verde de AgNPs, visto que promoveu a total conversão dos íons Ag^+ em Ag^0 em 48 horas formando, AgNPs com diâmetro médio de 35 nm, que apresentaram estabilidade no período de 60 dias em que foram avaliadas.

Não foi possível a obtenção de AgNPs a partir da irradiação da solução de AgNO_3 por LEDs de diversos comprimentos de onda, quando utilizados isoladamente. Entretanto, a aplicação dos LED associado ao extrato aquoso de *Calendula officinalis* apresentou efeito fotoquímico, demonstrado na formação de AgNPs de diferentes formas, dependentes do comprimento de onda do LED aplicado.

As AgNPs expostas ao LED azul e ao LED verde apresentaram anisotropia, formando nanopartículas geométricas, hexagonais, prismáticas, quadradas e retangulares, enquanto as AgNPs que receberam a ação do LED vermelho, se apresentaram esféricas, semelhante as AgNPs obtidas com o infuso, sem exposição ao LED.

Todas as AgNPs formadas apresentaram resíduos dos componentes do extrato aquoso de *Calendula officinalis*, indicando que esses componentes aderem à superfície das AgNPs.

O processo de síntese apresentou uma alta reprodutibilidade e está de acordo com os princípios da síntese verde, apresentando-se como uma alternativa sustentável, amiga da natureza, de baixo custo e seguindo os preceitos da nanobiotecnologia.

REFERÊNCIAS

- AKHTAR, M. S.; PANWAR, J.; YUN, Y.-S. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**. v.1, p. 591-602, 2013.
- ALBERNAZ V. L. Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico. Dissertação. Mestrado de Ciências Biológicas da UB, 2014.
- ALVES, O. R. Avaliação da eficiência do diodo emissor de luz (led) emitindo em 460 nm associado à curcumina na fotossensibilização letal de *candida albicans* e de *aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Estudo “*in vitro*”. Dissertação. Mestrado de Engenharia mecânica da UFMG, 2011.
- AMIRI, S.; DUROUX, L.; LARSEN, K. L. Silver nanoparticle colloids with α -cyclodextrin: enhanced stability and Gibbs–Marangoni flow. **Journal Nanoparticle Research** p. 17-21, 2015.
- ANAND K. K. H.; MANDAL B. K. Activity study of biogenic spherical silver nanoparticles towards microbes and oxidants. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v.135 p.639-645, 2015
- ANDREEVA, L. G. Localization and content of carotenoids in highly productive forms of *Calendula officinalis*. **Aptechnoe. Delo**. v.10, p.46. 1961.
- ANSARI, A. A; SARTALE, S. D. Controlled growth of thermally stable uniform-sized Ag nanoparticles on flat support and their electrochemical activity. **Applied Physics A**. v. 119 p.503-516, 2015.
- ATKINS, P.; JONES L. **Princípios de química: questionamento a vida moderna e o meio ambiente**. 3ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2006.
- AZÓCAR M. I. A systematic study of antibacterial silver nanoparticles: efficiency, enhanced permeability, and cytotoxic effects. **Journal of Nanoparticle Research** v.16 p. 2465, 2014.
- BABAEI, N., MOSLEMI, D., KHALILPOUR, M., VEJDANI, F., MOGHADAMNIA, Y., BIJANI, A., BARADARAN, M., KAZEMI, M. T., KHALILPOUR, A., POURAMIR, M. E MOGHADAMNIA, A. A. Antioxidant capacity of *calendula officinalis* flowers extract and prevention of radiation induced oropharyngeal mucositis in patients with head and neck cancers: a randomized controlled clinical study. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21 p. 2-7, 2013.
- BAGHIZADEH, A.; RANJBAR, S., GUPTA, V. K.; ASIF, M.; POURSEYEDI, S.; KARIMI, M J.; MOHAMMADINEJAD, R. Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Calendula officinalis* in liquid phase. **Journal of Molecular Liquids**. v. 207. p. 159-163, 2015.

BAKANOV G.; TOROPOV N. A.; VARTANYAN T. A. Optical Properties of Planar Nanostructures Based on Semiconductor Quantum Dots and Plasmonic Metal Nanoparticles. **Optics and Spectroscopy**. v. 120, p. 502-507, 2016.

BALAN, L.; SCHNEIDER, R.; TURCK, C.; LOUGNOT, D.; SAVARY, F. M. Photogenerating Silver Nanoparticles and Polymer Nanocomposites by Direct Activation in the Near Infrared. **Journal of Nanomaterials** v. 2012 p. 1-7, 2012.

BERNI, E; RIBEIRO, C; ZUCOLOTTI, V. Síntese de Nanopartículas de Prata para Aplicação na Sanitização de Embalagens. Brasil ISSN 1517-4786 São Carlos, SP Novembro, 2008.

BHUI, D. K.; BAR, H.; SARKAR, P.; SAHOO, G. P.; PRASAD DE, S.; MISRA A. Synthesis and UV-vis spectroscopic study of silver nanoparticles in aqueous SDS solution. **Journal of Molecular Liquids** v.145 p.33-37, 2009.

BINDHU, M. R.; UMADEVI M.. Antibacterial and catalytic activities of green synthesized silver nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v.135 p.373-378, 2015.

BIRLA, S. S.; GAIKWAD S. C.; GADE, A. K.; RAI, M. K. Rapid Synthesis of Silver Nanoparticles from *Fusarium oxysporum* by Optimizing Physicocultural Conditions. **The Scientific World Journal**. v. 2013.

BOYLESTAD, R.; NASHELSKY, L. **Dispositivos Eletrônicos e Teoria de Circuitos**, 11^a ed, Prentice-Hall do Brasil, 2013.

BUI T. T. S.; KIM Y.; KIM S. E LEE H. Facile and green cinchonidine-assisted synthesis of ultrafine and well-dispersed palladium nanoparticles supported on activated carbon with high catalytic performance. **Royal Society of Chemistry** v.5 p. 75272-75280, 2015.

BUTNARIU, M. E CORADINI, C. Z. Evaluation of Biologically Active Compounds from *Calendula officinalis* Flowers using Spectrophotometry. **Chemistry. Central Journal**. v.6 p.35, 2012.

CALLISTER, J. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução**. 5^a Ed. Rio de Janeiro, LTC, 2002.

CARDOSO, A. P. E.; PICHARDO-MOLINA J. L.; C. MURALI, K C. M.; CASTRO-BELTRAN, R. Photochemical transformation of silver nanoparticles by combining blue and green irradiation. **Journal of Nanoparticle Research**, v.17 n.3, p.1-10, 2015.

CARLSON, C. HUSSAIN, S. M. SCHRAND, A. M. BRAYDICH-STOLLE, L. K. HESS, K. L. JONES, R. L. e SCHLAGER, J. J. Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. **Journal Physical Chemistry**. v. 112 p. 13608-13619, 2008.

CAUERHFF, A.; CASTRO, G. R. Bionanoparticles, a green nanochemistry approach. **Electronic Journal of Biotechnology**. v.16 p.11-11, 2013.

CHANDURKAR P.; MURAB T.; AHAKEY N.; TRIPATHI, N.; CHOUDHARY A.; Antimicrobial activity of aqueous, acetone and methanol extracts of *Calendula officinalis* L. (Marigold) flower. **International Journal of Pure Applied Bioscience**. V. 3 p. 386-388, 2015.

CHAU, C.; WU, S.; YEN, G. The development of regulations for food Nanotechnology. **Food Science & Technology** v. 18 p. 269 e 280, 2007.

CHEN, X.; SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: A nanoproduct in medical application. **Toxicology Letters**, v. 176, n. 1, p. 1-12, 2008.

CHEVIRONA, P.; GOUANVÉA, F.; ESPUCHE, E. Green synthesis of colloid silver nanoparticles and resulting biodegradable starch/silver nanocomposites. **Carbohydrate Polymers** v.108 p.291–298, 2014.

CHIDAMBARAM J.; SARITHA, K.; MAHESWARI, R.; MUZAMMIL, M. S. Efficacy of Green Synthesis of Silver Nanoparticles using Flowers of *Calendula Officinalis*. **Chemical Science Transactions**. v. 3 n. 2 p. 773-777, 2014.

COLI, M. Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Prata em Matrizes de Hidrogéis Eletro-termossensíveis. Dissertação. Engenharia de materiais. UFI, 2013.

CORTEZ D.A.G. Identificação dos constituintes químicos da fração volátil da *Calêndula officinalis* produzida no Paraná. **Horticultura Brasileira**. v.25 p.118-121.

COTTON, F. A.; WILKINSON, G. **Química inorgânica**; Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, p. 461, 1978.

D'AMBROSIO, M.; CIOCARLAN, A.; COLOMBO, E.; GUERRIERO, A.; PIZZA C.; SANGIOVANNI, E.; DELL'AGLI, M. Structure and cytotoxic activity of sesquiterpene glycoside esters from *Calendula officinalis* L.: Studies on the conformation of viridiflorol. **Phytochemistry**. v.117 p.1–9, 2015.

DHAS, GANESH KUMAR; T. S. V.; KARTHICK, V.; GOVINDARAJU K.; SHANKARA NARAYANA, K. T. Biosynthesis of gold nanoparticles using *Sargassum swartzii* and its cytotoxicity effect on HeLa cells. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 133 p.102–106, 2014.

DARROUDI, M.; ZAK, A. K.; MUHAMAD, M. R.; REZA ZAMIRI, R. Preparation of gelatinous gold nanoparticles by pulsed laser ablation. **Research Chemical Intermediates** . v. 41:p. 4587–4594, 2015.

DINH. X.; CHI D. T.; LAN N. T. ; LAN H.; TUAN H. V.; QUY N.; PHAN V. N.; HUYNH T. Q.; LE A-T. Water-dispersible silver nanoparticles-decorated carbon nanomaterials: synthesis and enhanced antibacterial activity. **Applied Physics A**. v. 119 p. 85–95, 2015.

EBRAHIMINEZHAD, A.; BAGHERI, M.; TAGHIZADEH, S. M.; BERENJIAN, A.; GHASEMI Y. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles using microalgal secretory carbohydrates as a novel anticancer and antimicrobial. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**. v. 7 p. 1-7, 2016.

EFSTRATIOS, E.; HUSSAIN A. I. ; NIGAM P. S. ; MOORE J. E. ; AYUB M. A ; RAO, J. R. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petals extract against fungi, as well as gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complementary therapies in Clinical Practice*. v.18 n.3 p.173-176, 2012.

FARJANA, A.; ZERIN, N.; KABIR, S. Antimicrobial activity of medicinal plant leaf extracts against pathogenic bacteria. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**. v. 4 p. 920-923, 2014.

FERNANDES, P. E. Síntese, caracterização e ação antimicrobiana de nanopartículas de prata. Tese. Ciências e Tecnologia de Alimentos. UFV, 2014.

FERREIRA H. S. E RANGEL M. C. Nanotecnologia: Aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v. 32. p.1860-1870, 2009.

FLOR, J.; DAVOLOS, M.R.; CORREA, M. A. Protetores solares. **Química Nova**, v. 30, p. 153-158, 2007.

FRAGALÀ M.E; G. COMPAGNINI MALANDRINO, G.; SPINELLA C.E PUGLISI O. Silver nanoparticles dispersed in polyimide thin film matrix. **European Physical Journal D**. v. 9, n. 1, p. 631–633, 1999.

GATTU, K. P.; GHULE, K.; KASHALE, A. A.; PATIL V. B.; PHASE D. M.; MANE R. S.; HAN S. H.; SHARMA R.; GHULE A.V. Bio-green synthesis of Ni-doped tin oxide nanoparticles and its influence on gas sensing properties. **Royal Society of Chemistry**. v. 5, p. 72849, 2015.

GAZIM Z. C; FERREIRA G. A; REZENDE C. M; NAKAMURA C.V; DIAS FILHO B. P; GENTRY, S.T., FREDERICKS, S.J.; KRCHNAVEK, R. Controlled Particle Growth of Silver Sols Through the Use of Hydroquinone as a Selective Reducing Agent. **Langmuir**, v.25, n.5, p. 2613-2621. 2009.

GHOSH S.; NITNAVARE R.; DEWLE A.; TOMAR G. B.; CHIPPAKATTI R.; MORE P.; KITTURE R.; KALE S.; BELLARE J.; CHOPADE B. A. Novel platinum–palladium bimetallic nanoparticles synthesized by *Dioscorea bulbifera*: anticancer and antioxidant activities. **International journal of Nanomedicine**. v. 10 p. 7477, 2015.

GOLDSTEIN J. Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis: a text for biologists, materials scientists, and geologists, 2nd ed, **Plenum Press**, New York 1992.

GOŘENŠEK, M.; RECEL J. P. Nanosilver Functionalized Cotton Fabric. **Textile Research Journal**, v.77 p. 138-141, 2007.

GURUNATHAN, S.; HAN, J. W.; KWON, D. N.; KIM J. H. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Nanoscale Research Letter**. v. 9. p.1-17, 2014.

GATTU, K. P.; GHULE, K.; KASHALE, A. A.; PATIL, V. B.; PHASE, D. M.; MANE, R. S.; HAN, S. H.; SHARMA, R.; GHULE, A. V. Bio-green synthesis of Ni-doped tin oxide nanoparticles and its influence on gas sensing properties. **Royal Society of Chemistry**. v. 5 p. 72849, 2015.

HAIDER A.; INN-KYU KANG, I. K. Preparation of Silver Nanoparticles and Their Industrial and Biomedical Applications: A Comprehensive Review. **Advances in Materials Science and Engineering**. v. 2015 p .16. 2015.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**, 6ª edição, Porto Alegre: Bookman, 2009.

HONDOW, N.; BRYDSON R.; WANG P.; HOLTON, M. D.; BROWN, M. R.; REES, P.; SUMMERS, H. D.; BROWN, A. Quantitative characterization of nanoparticle agglomeration within biological media. **Journal Nanoparticle Research**. v. 14. p. 1-15, 2012.

HUANG, S.; CHEN, J.; GAO, H.; GANG GU, G.; LIU, G. Optical cavity-assisted broadband optical transparency of a plasmonic metal film. **Nanotechnology** v. 26 p.185701 , 2015.

HUI, K.S; HUI, K.N; DINH, D.A.; TSANG, C.H. CHO, Y.R.; WEI ZHOU, W.; HONG, X.; HO-HWAN CHUN HO-H.. Green synthesis of dimension controlled silvernanoparticle–graphene oxide with in situ ultrasonication. **Acta Materialia** v.64 p.326-332, 2014.

HUSSAIN N.; GOGOI P.; AZHAGANAND V. K.; SHELKECD M. V. E DAS M. R. Green synthesis of stable Cu(0) nanoparticles onto reduced graphene oxide nanosheets: a reusable catalyst for the synthesis of symmetrical biaryls from arylboronic acids under base-free conditions. **Royal Society of Chemistry**. v.5 p.1251-1260, 2015.

HUSSAINA, J. I.; TALIBA A.; KUMAR, S.; AL-THABAITI, S. A.; HASHMI A. A.; KHANA Z. Time dependence of nucleation and growth of silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 381. p. 23-30, 2011.

INGALE, A. G. et al. Biogenic synthesis of nanoparticles and potential applications: an ecofriendly approach. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 04, n. 02, 2013.

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

KASTHURI, J.; KATHIRAVAN, K.; RAJENDIRAN, N. Phyllanthin-assisted biosynthesis of silver and gold nanoparticles: a novel biological approach. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 11 p. 1075-1085, 2008.

KATHIRAVAN, V.; RAVI, S.; ASHOKKUMAR S. Synthesis of silver nanoparticles from *Melia dubia* leaf extract and their in vitro anticancer activity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 130 p. 116-21, 2014.

KHAN, Z.; AL-THABAITI, S. A.; OBAID, A. Y.; A.O. AL-YOUBI. Preparation and characterization of silver nanoparticles by chemical reduction method. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 82 p.513-517, 2011.

KWANGJIN, A.; ALAYOGLU; S.; EWERS T., SOMORJAI, G.A.; Colloid chemistry of nanocatalysts: A molecular view. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 373 p. 1–13, 2012.

KOMISSARENKO, N. F; CHERNOBAI V. T.; DERKACH A. I. . Flavonoids of inflorescences of *Calendula officinalis*. **Chemistry of Natural Compounds**. v. 6, p. 795-801. 1988.

KOROTCHENKOV, O. A.; CANTARERO, A.; SHPAK A. P.; KUNITSK YU A, A I SENKEVICH, M O BOROVYOY; NADTOCHII, A B. Doped ZnS:Mn nanoparticles obtained by sonochemical synthesis. **Nanotechnology**. v.16 p. 2033-2038, 2005.

KHURSHEED ALI¹, BILAL AHMED¹, SOURABH DWIVEDI¹, QUAISER SAQUIB², ABDULAZIZ A. AL- KHEDHAIRY², JAVED MUSARRAT. Microwave Accelerated Green Synthesis of Stable Silver Nanoparticles with Eucalyptus globulus Leaf Extract and Their Antibacterial and Antibiofilm Activity on Clinical Isolates. **Plos one**, p. 1-20, 2015.

LEE, S.W; CHANG, S. H.; LAI, Y. S.; LIN, C. C; TSAI, C. M.; LEE, Y. C.; CHEN J. C.; HUANG, C. L. Effect of Temperature on the Growth of Silver Nanoparticles Using Plasmon-Mediated Method under the Irradiation of Green LEDs. **Materials**. v. 7. p. 7781-7798, 2014.

LIZ-MARZÁN, L. M.; Nanometals: formation and color, **Materials Today**, v.7 n. 2 p.26-31, 2004.

LOGESWARI, P.; SILAMBARASANS,; ABRAHAM J. Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property. **Journal of Saudi Chemical Society**. v.19, p.311-317, 2015.

LUI, C.; CADY, N. C.; BATT, C. A. Nucleic Acid-based Detection of Bacterial Pathogens Using Integrated Microfluidic Platform Systems. **Sensors**, v.9, p.3713-3744, 2009.,

MALHOTRA, A.; SHARMA, N.; KUMAR, N.; DOLMA, K.; SHARMA; D.; NANDANWAR, H. S.; CHOUDHURY A. R. Multi-analytical approach to understand biomineralization of gold using rice bran: a novel and economical route. **Royal Society of Chemistry**. v. 4 p.39484-39490, 2014.

MALVINO, A. P., **Eletrônica: volume 1**, 7a ed, São Paulo: Makron Books, 2007.

MARTIN A.; BUSTAMANTE P.; **Physical pharmacy**. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

MASTEROVÁ, I.; GRANČAIOVÁ, Z.; UHRÍNOVÁ, S.; SUCHÝ, V.; UBIK, CK.; NAGY M. Flavonoids in flowers of *Calendula officinalis* L. **Chemistry Papers**,v. 45, p. 105-8. 1991.

MEISEL, D; LEE , P. C.; Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. EUA: **Journal Physical Chemistry**. 1982, 86, p. 3391.

MELO J. M.A.; SANTOS, L. S. S.; GONÇALVES, M. C.; A. F. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**. v. 35, n. 9, 1872-1878, 2012.

MEHTA, S.K.; CHAUDHARY, S.; GRADZIELSKI, M. Time dependence of nucleation and growth of silver nanoparticles generated by sugar reduction in micellar media. **Journal of Colloid and Interface Science** v. 343 p. 447-453, 2010.

MIE G. Contributions to the optics of turbid media, especially colloidal metal solutions. **Annals of Physics**. v. 25 p. 377-445, 1908.

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

MITTAL, A. K.; KALER, A.; BANERJEE, U. C. Free radical scavenging and antioxidant activity of silver nanoparticles synthesized from flower extract of *Rhododendron dauricum*. **Nano Biomedicine and Engineering**, v. 4, n. 3, p. 118-124, 2012.

MOHAN, S.; OLUWAFEMI, O. S.; GEORGE C. S.; JAYACHANDRAN, V.; LEWU F.B.; SONGCA S. P.; KALARIKKAL N.; THOMAS, S. Completely green synthesis of dextrose reduced silver nanoparticles, its antimicrobial and sensing properties. **Carbohydrate Polymers**. v.106 p. 469-474, 2014.

MOHANTY, S.; MISHRA, S.; JENA, P.; BIJU JACOB, B.; SARKAR, B.; SONAWANE, A. An investigation on the antibacterial, cytotoxic, and antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v. 8, p. 916-924, 2012.

MUSTATEA, G.; VIDAL, L.; CALINESCU I.; DOBRE, A.; IONESCU, M. BALAN L. A photochemical approach designed to improve the coating of nanoscale silver films onto food plastic wrappings intended to control bacterial hazards. **Journal of nanoparticle research**. v. 17 f. 1. p. 1-12, 2015.

NADAGOUDA, N. M.; SPETH, T. F.; VARMA, R. S. Microwave-Assisted Green Synthesis of Silver Nanostructures. **Accounts of Chemical Research**. v. 44 p. 469-478, 2011.

OKUMA, C.H.; ANDRADE, T.A.M.; CAETANO, G.F.; FINCI, L.I.; MACIEL, N.R.; TOPAN, J.F.; CEFALI, L.C.; POLIZELLO, A.C.M; CARLO, T. ROGERIO, A.P.; SPADARO, A.C.C.; ISAAC, V.L.B; FRADE, M.A.C.; ROCHA-FILHO P.A. Development of lamellar gel phase emulsion containing marigold oil (*Calendula officinalis*) as a potential modern wound dressin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** v.71 p. 62-72, 2015.

PACIONI, N. L.; BORSARELLI, C. D.; VEGLIA, A. V. Synthetic Routes for the Preparation of Silver Nanoparticles. In book: **Silver Nanoparticle Applications: In the Fabrication and Design of Medical and Biosensing Devices**, Chapter: 2, Publisher: Springer, Editors: Emilio I. Alarcón, May Griffith, Klas I. Udekku, pp.13-46, 2015.

PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73 p. 1712–1720, 2007.

PATHAK, P.; KATIYAR, V. K.; GIRI, S. Cancer Research - Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research. **AZojono Journal of Nanotechnology** Online, v.3, 2007.

PARALIKAR, K. M.; BALASUBRAMANYA, R. H. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. **Materials Letter**. v. 66. p. 1413-1418, 2007.

PARK, H. J.; KIM, J. Y.; LEE, J. H., HAHN, J. S.; GU, M. B. ; YOON, J. Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. **Water research**. v. 43 p. 1027, 2009.

PLANTE, I. J.; ZEID, T. W. YANGAB, P.; MOKARI T. Synthesis of metal sulfide nanomaterials via thermal decomposition of single-source precursors. **Journal of Materials Chemistry**. v.20, p.6612–6617, 2010.

PRABHU, S., POULOSE, E. K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects, **International Nano Letters**, v.2 p.1-10, 2013.

PIETA, E.; PRONIEWICZ, E; KIM Y; PRONIEWICZ, L. M. Vibrational characterization and adsorption mode on SERS-active surfaces of guanidino-(bromophenyl) methylphosphonic acid). **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v 121 p. 121–128, 2014.

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

PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; BADERTSCHER, M. Structure **Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data**. 4th edition. Berlin: Springer-Verlag, 2009.

RAI, M. Nanobiotecnologia verde: biossínteses de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos. **Ciência e Cultura**, v.65, 2013.

RAJARAMA, K.; AISWARYA, D. C.; SURESHKUMAR, P. Greensynthesis of silver nanoparticle using *Tephrosia tinctoria* and its antidiabetic activity. **Materials Letters** v.138 p. 251–254, 2015.

RAJASEKAR, P.; PRIYADHARSHINI, S.; RAJARAJESHWARI, T.; SHIVASHRI, C. Bio-inspired Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Andrographis paniculata* Whole Plant Extract and their Anti-microbial Activity over Pathogenic Microbes. **International Journal of Research in Biomedicine and Biotechnology**. v. 3 p.47-52, 2013.

ROCHA, T.C.R. Nanopartículas metálicas anisotrópicas: Mecanismos de formação e aplicações ópticas. Tese. Física. UNICAMP. 2008.

RUSSEL, A. D.; HUGO, W. B. Antimicrobial activity and action of silver. **Progress in Medicinal Chemistry**. v. 31 p, 351-70, 1994

SAADE J. Síntese/Fabricação e caracterização de micro e nanoestruturas para aplicação na fotônica e plasmônica. Tese. Ciências de Materiais. UFP, 2013.

SARKAR, P.; DIPAK K. BHUI, D. K.; BAR, H.; SAHOO G. P.; SADHAN SAMANTA S.; PYNE S.; MISRA A. DDA-Based Simulation of UV–vis Extinction Spectra of Ag Nanorods Synthesized Through Seed-Mediated Growth Process. **Plasmonics** v. 51, 2011.

SAKAMOTO, M.; FUJISTUKA, M.; MAJIMA, T. Light as a construction tool of metal nanoparticles: Synthesis and mechanism. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews** v.10 p. 33-56, 2009.

SALLUM, F. L. Avaliação de Espectroscopia de Raman intensificada por superfície em papel de filtro e métodos quimiométricos na quantificação de fármacos. Tese, Ciências Exatas e da Tecnologia. UFSC, 2014.

SALUNKHE, R. B; PATIL, S. V.; SALUNKE B. K.; CHANDRASHEKHAR D. PATIL, C.D.; SONAWANE A. M. Studies on Silver Accumulation and Nanoparticle Synthesis By *Cochliobolus lunatus*. **Applied Biochemistry Biotechnology**. v.165. p. 221-234, 2011.

SANTOS, V. Preparação e caracterização de nanopartículas de platina incorporadas ao polímero de 3-n-propilpiridínio silsexquioxano. Dissertação, Química Aplicada. UEPG, 2009.

SANTOS, C. A.; SECKLER, M. M.; INGLE, A. P.; GUPTA I.; GALDIERO, S.; GALDIERO, M.; GADE, A.; RAI M.. Silver Nanoparticles: Therapeutical Uses, Toxicity, and Safety Issues. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 103, n. 7, p. 1931-1944, 2014.

SANTANA H; ZAIA D. A. M. Preparação e caracterização de substratos sers ativos: um estudo da adsorção do cristal violeta sobre nanopartículas de prata. **Química Nova**. v. 29, p.194-199, 2006.

SATAPATHY, S. R.; MOHAPATRA P.; PREET R.; DAS D.; SARKAR B.; CHOUDHURI T. Silver-based nanoparticles induce apoptosis in human colon cancer cells mediated through p53 .**Nanomedicine**. v. 8 p. 1307, 2013.

SHNEIDER, T. L. Processamento e caracterização do compósito supercondutor $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-x}/\text{Au}$. Dissertação. Física. UEPG, 2014.

SEDRA, A.S.; SMITH, K.C, **Microeletrônica**. 5ª ed, Saunders College Publing, 2007.

SHARMA V. K.; YNGARD R. A.; LIN Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science** v.145 p. 83-96, 2009.

SHINY, P.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Haemocompatibility assessment of synthesised platinum nanoparticles and its implication in biology. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 37 n. 6, p.991-997, 2014.

SIGNORI, A. M. Desenvolvimento de uma Nova Metodologia para Preparação de Nanopartículas de Prata estabilizadas pela Polietilenoimina Funcionalizada e Aplicação na Catálise. Tese. UFSC. Florianópolis, 2010.

SILVA L. P. Síntese verde, caracterização e atividade biológica de nanopartículas de prata obtidas utilizando extratos de *Hancornia speciosa* Gomes - Apocynaceae (mangabeira). Dissertação. Nanociência e Nanobiotecnologia. UB. Brasília, 2014.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D.J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7ª edição. Rio de Janeiro LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., 2006.

SIMON P.; OLIVEIRA S. F.; STEFAN SEEGER, S. Nanocatalysis: Academic Discipline and Industrial Realities. **Journal of Nanotechnology**. v. 3 p. 1-19, 2014.

SOBOLEWSKI, D.; PRONIEWICZ, E.; SKOLUBA D.; PRAHL A.; OZAKI Y.; KIM D Y.; PRONIEWICZ L.M. Characterization of adsorption mode of new B₂ bradykinin receptor antagonists onto colloidal Ag substrate. **Jornaul Raman Spectroscopy**. v. 44. p. 212-218, 2013.

SPECTRAL DATABASE FOR ORGANIC COMPOUNDS-SDBS. Disponível em <http://sdb.db.aist.go.jp>. Acesso em 14/11/2016.

STAMPLECOSKIE K. G.; SCAIANO J. C. Light Emitting Diode Irradiation Can Control the Morphology and Optical Properties of Silver Nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**. v.132 p.1825-1828, 2010.

STOBIECKA M.; HEPEL M. Double-shell gold nanoparticle-based DNA-carriers with poly-L-lysine binng surface. **Biomaterials**. v.32 p.3312e3321, 2011.

SULAIMAN, G. M.; MOHAMMED W.; MARZOOG T.; AL-AMIERY AAA. ; KADHUM A.; MOHAMAD, A.B.; SULAIMAN, G . Green synthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles using Eucalyptus chapmaniana leaves extract. **Asian Pacífico Journal Tropical Biomedice**, v.3 p. 58-63. 2013.

SUN, L.; LIU, A.; TAO, X.; ZHAO, Y. A green method for synthesis of silver nanodendrites, **Journal of Material Science**, v. 46. p. 839-845, 2011.

THEODORE G. Os elementos: uma exploração visual dos átomos conhecido no universo. 1ª. Blucher, São Paulo, 2011.

TRAN Q. H.; NGUYEN, V. Q.; LE, A-T. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. **Advances in natural sciences: nanoscience and nanotechnology**. v. 4. p. 033001-033002, 2013.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Faraday Discussions London**, v. 11, p.55, 1951.

VASANTHA, K. ; ILANGO, K.; KUMARA, R. M.; AGRAWALA A.; DUBEY, G. P.. Anticancer activity of Moringa oleifera mediated silver nanoparticles on human cervical carcinoma cells by apoptosis induction. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 117, p. 354-359, 2014.

VIGNESHWARAN, N.; ASHTAPUTRE, N.M.; VARADARAJAN, P.V; NACHANE R.P.; VIJAYAKUMAR, M.; PRIYA, K.; NANCY, F.T.; NOORLIDAH, A.; AHMED A.B.A. Biosynthesis, characterisation and anti-bacterial effect of plant-mediated silver nanoparticles using Artemisia nilagirica. **Industrial Crops and Products**, v. 41 p.235-240, 2013.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE R. L. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, p. 51-64, 2010.

VIVEKANANDHAN S.; MISRA M.; MOHANTY A.K. Biological synthesis of silver nanoparticles using Glycine max (soybean) leaf extract: an investigation on different soybean varieties. **Journal Nanoscience Nanotechnology** v. 9 p.6828-6833, 2009

VOGEL, A. I. **Química Analítica Qualitativa**; São Paulo: Editora Mestre Jou, 1981.

WEI L.; JINGRAN L.; XU H.; PATEL A., CHEN Z-S; CHEN G. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. **Drug Discovery Today**. v. 20, n. 5, 2015.

WILEY B. SUN Y.; MAYERS B.; XIA Y. Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanostructures: The Case of Silver. **Chemistry a European Journal**. v. 11. p. 454-463, 2005.

WUITHSCHICK M.; PAUL, B.; BIENERT, R.; SARFRAZ A.; VAINIO U., SZTUCKI M.; KRAEHNERT R.; STRASSER P.; RADEMANN, K., EMMERLING F. E POLTE J. Size-Controlled Synthesis of Colloidal Silver Nanoparticles Based on Mechanistic Understanding. **Chemistry Material**, v. 25 n.23 p. 4679-4689, 2013.

WYNN M. The Synthesis and Characterization of Gold and Silver Nanoparticles in Formal and Informal Settings. Dissertação. Engenharia de materiais. California. US, 2012.

YE S.; SONG, J.; TIAN Y.; CHEN L.; WANG, D.; NIU, H.; JUNLE QU J. Photochemically grown silver nanodecahedra with precise tuning of plasmonic resonance. **Nanoscale**, v. 7, p.12706, 2015.

YALLAPPA, S; J. MANJANNA J.; PEETHAMBAR, S. K.; RAJESHWARA, A. N; SATYANARAYAN, N. D. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Acacia farnesiana (Sweet Acacia) Seed Extract Under Microwave Irradiation and Their Biological Assessment. **Journal of Cluster Science** (2013) 24:1081-1092, 2013.

YANG, J.; DENNIS, R. C.; SARDAR, D. K. Room-temperature Synthesis of Flowerlike Ag Nanostructures Consisting of Single Crystalline Ag Nanoplates. **Materials Research Bulletin**, v.46, p. 1080–1084, 2011.

XIU, Z.M.; PUPPALA, H. L. COLVIN, V.L.; ALVAREZ, P.J.J Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. **Nano Letters**, v. 12, p. 4271-4275, 2012.

ZAMIRI, R.; ZAKARIA, A; HOSSEIN ABBASTABAR AHANGAR, H. A.; AMIR REZA SADROLHOSSEINI, A. R.; MOHD ADZIR MAHDI M. A. Fabrication of Silver Nanoparticles Dispersed in Palm Oil Using Laser Ablation **International Journal of Molecular Sciences**.v. 11p. 4764-4770.

ZHANG, J.; MALICKA, J.; GRYCZYNSKI, I.; LAKOWICZ, J. R. Surface-enhanced fluorescence of fluorescein-labeled oligonucleotides capped on silver nanoparticles. **Journal Physical Chemistry B**. v. 109 p. 7643, 2005.

ZHANG, F.; WU, X.; CHEN, Y.; LIN, H. Application of Silver Nanoparticles to Cotton Fabrics as an Antibacterial Textile Finish. **Fibers and Polymers**, v. 12, n. 4, p. 496-501, 2009.

ZIELINSKA A.; SKWAREK E; ZALESKA A.; GAZDA, M.; HUPKA, J. Preparation of silver nanoparticles with controlled particle size. **Procedia Chemistry**. v. 1 p.1560-1566, 2009.