Universidade Federal
do Rio de Janeiro
Escola Politécnica

SÍNTESE VERDE PARA OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA A PARTIR DE EXTRATOS NATURAIS

Isabel de Freitas

Projeto de Graduação apresentado ao Curso de Engenharia de Materiais da Escola Politécnica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Engenheiro.

Orientadora: Profa. Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Rio de Janeiro

Setembro de 2019

SÍNTESE VERDE PARA OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA A PARTIR DE EXTRATOS NATURAIS

Isabel de Freitas

PROJETO DE GRADUAÇÃO SUBMETIDO AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS DA ESCOLA POLITÉCNICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE ENGENHEIRO DE MATERIAIS.

Examinada por:

Profa. Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, D. Sc

Profa. Renata Antoun Simão, D. Sc

Dra. Bruna Nunes Teixeira, D. Sc

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

SETEMBRO DE 2019

de Freitas, Isabel

Síntese Verde para obtenção de Nanopartículas de Prata a partir de Extratos Naturais/ Isabel de Freitas – Rio de Janeiro: UFRJ/ Escola Politécnica, 2019

X,59P.: IL;29,7 cm.

Orientadora: Rossana Mara Silva de Moreira Thiré

Projeto de Graduação – UFRJ/ Escola Politécnica/ Curso de Engenharia de Materiais, 2019

Referências Bibliográficas: p 60-62

1. Nanopartícula de prata. 2. Síntese Verde. 3. Extrato de própolis. 4. Seiva de Sangue de Dragão I. Thiré, Rossana Mara da Silva Moreira II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Engenharia de Materiais. III Título

Agradecimentos

A Deus, pela vida, pelos dons que me deu que me auxiliaram para a realização deste projeto e por ter me mantido na trilha correta com saúde e disposição para chegar até o final.

A meus pais, por todo amor, carinho e apoio durante toda a minha vida e por todo esforço investido em minha educação.

A toda a minha família, em especial ao meu irmão João Paulo de Freitas, por me acompanhar de perto e pela certeza de uma amizade por toda a vida.

Ao meu namorado Caio Henrique Bertolo, pela ajuda, por estar ao meu lado em todos os momentos e por me manter motivada durante todo o processo.

À minha orientadora Rossana Thiré, pela sua dedicação e paciência durante todo o projeto. Sua ajuda e conhecimentos fizeram grande diferença no resultado deste trabalho.

A todo o Laboratório de Biopolímeros, em especial o Javier, Agnes, Franz, Marceli e Aline. Sem a ajuda de vocês não acredito que a realização deste projeto teria sido possível.

A todos os amigos do curso de Engenharia de Materiais, que compartilharam comigo dificuldades, vitórias e me ajudaram a me tornar a profissional que sou hoje.

A todos os amigos de outros cursos de engenharia, em especial a Ana Catarina Hristoff, Ana Carolina Dias, Bruna Ticom, Letícia Ribeiro e Bruno Abreu, por todos esses anos de amizade e por me tornarem uma pessoa melhor.

A minhas amigas de uma vida toda, Gabriela Rocha, Juliana Campos e Marina Fernandes, pelo incentivo e por acreditarem que sou capaz de alcançar quaisquer objetivos. A amizade de vocês é sem igual.

A meus amigos da igreja, que desde me sempre me apoiam e torcem por mim. Suas vitórias são as minhas e as minhas, são as suas.

Ao Laboratório de Modificação e Caracterização de Superfícies, PEMM/COPPE/UFRJ, em especial a professora Renata Simão, pelas análises por Microscopia de Força Atômica.

Ao Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais (LMCM) PEMM/COPPE/UFRJ, pelas análises de distribuição de tamanhos de partículas.

Resumo do Projeto de Graduação apresentado à Escola Politécnica/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Engenheiro de Materiais.

SÍNTESE VERDE PARA OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA A PARTIR DE EXTRATOS NATURAIS

Isabel de Freitas

Setembro/2019

Orientadora: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Curso: Engenharia de Materiais

A síntese de nanopartículas metálicas se apresenta como tema de diversos estudos devido as suas propriedades diferenciadas e sua ampla gama de aplicação. A nanopartícula de prata (AgNPs) apresenta grande potencial de uso na área biomédica devido as suas propriedades bactericidas e cicatrizantes. Existem diversos métodos de obtenção dessas AgNPs que resultam em subprodutos tóxicos ou em uma alta demanda energética. Por isso, é essencial o desenvolvimento de técnicas que não agridam o meio ambiente. E a síntese verde (SV) é uma excelente alternativa. Neste trabalho foram produzidas nanopartículas de prata a partir de extrato de própolis e seiva de sangue de dragão via SV. Foi avaliado o efeito da concentração de nitrato de prata ($AgNO_3$) e do tempo de incubação nas propriedades das AgNPs. A utilização do extrato de própolis apresentou-se promissora, pois resultou em partículas na escala nanométrica, esféricas e com ação antimicrobiana contra um patógeno frequentemente associado a infecções hospitalares.

Palavras Chave: Síntese Verde, Nanopartícula de Prata, Extrato de Própolis, Seiva de Sangue de Dragão

Abstract of Undergraduate Project presented to POLI/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Materials Engineer.

GREEN SYNTHESIS FOR SILVER NANOPARTICLES FROM NATURAL EXTRACTS

Isabel de Freitas

September/2019

Advisor: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Course: Materials Engineering

The synthesis of metallic nanoparticles is the subject of several studies due to its differentiated properties and its wide application range. Silver nanoparticles (AgNPs) has great potential for use in the biomedical area due to its bactericidal and healing properties. There are several methods of obtaining these AgNPs that result in toxic products or high energy demand. Therefore, the development of ecofriendly techniques is essential, and green synthesis (GS) is an excellent alternative. In this study, silver nanoparticles were produced from propolis extract and dragon's blood sap by GS. The effect of silver nitrate concentration (AgNO3) and incubation time on AgNPs properties were evaluated. The use of propolis extract was promising because it resulted in spherical nanoparticles with antimicrobial activity against a pathogen often associated with nosocomial infections.

Keywords: Green synthesis, silver nanoparticles, propolis extract, dragon's blood sap.

Sumário

1. INTRODUÇÃO 12

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 14

2.1. Nanopartículas Metálicas 14

2.2. Síntese Verde 17

2.2.1. Extrato de Própolis 19

2.2.2. Seiva de Sangue de Dragão 21

3. OBJETIVO 22

3.1. Objetivos Específicos 22

4. METODOLOGIA 23

4.1. Materiais 23

4.2. Equipamentos 23

4.3. Obtenção das Nanopartículas de Prata 24

4.4. Caracterização das Nanopartículas de Prata 25

4.4.1. Caracterização Visual 26

4.4.2. Espectrofotometria na faixa do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) 27

4.4.3. Analisador de distribuição de tamanho de partículas em escala nanométrica Zetasizer 27

4.4.4. Microscopia de Força Atômica (AFM) 27

4.5. Testes biológicos 28

4.5.1. Teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA) 28

4.5.2. Ensaio de viabilidade celular 29

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES 30

5.1. Caracterização Visual 30

5.2. Espectrofotometria de Ultravioleta-Visível (UV-Vis) 35

5.3. Analisador de distribuição de tamanho de partículas em escala nanométrica Zetasizer 42

5.4. Microscopia de Força Atômica (AFM) 53

5.5. Caracterização das Nanopartículas de Prata sintetizadas a partir de Seiva de Sangue de Dragão 54

5.6. Teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA) - Antibiograma 56

5.7. Ensaio de viabilidade celular 57

6. CONCLUSÃO 58

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 60

1. INTRODUÇÃO

Materiais na forma de nanopartículas possuem uma gama de aplicações que contempla desde itens para área da saúde, como implantes e sistemas de liberação controlada de fármaco, até dispositivos eletrônicos [1, 2, 3] As nanopartículas são materiais que possuem suas dimensões na nanoescala entre 1-100 nanômetros [3], entretanto na biotecnologia e na medicina essa definição é mais flexível, dependendo da aplicação [4].

Atualmente, diversos estudos tratam da obtenção de nanopartículas metálicas devido as suas propriedades únicas. São aplicadas em catálises, diagnóstico e tratamento de doenças, sensores tecnológicos, entre outros. Em geral, sua fabricação ocorre por métodos físicos ou químicos a partir de metais nobres. Porém muitas delas envolvem equipamentos caros, várias etapas e geram subprodutos tóxicos. Por esses motivos, a implementação de técnicas mais simples, baratas e sem prejudicar o meio ambiente é muito atraente [5].

Uma alternativa para a sua fabricação de nanopartículas é a síntese verde, que se mostra cada vez mais uma tecnologia em crescimento [5]. As nanopartículas metálicas podem ser produzidas em uma única etapa utilizando materiais oriundos de recursos renováveis, sem subprodutos indesejáveis e com ótimo custo-benefício. A síntese a partir de extratos naturais é uma das opções existentes e é fundamentada no princípio da biorredução de um sal, transformando metal de nox zero para forma de íons e depois, nanopartículas metálicas [6].

Dentre os metais nobres utilizados na produção de nanopartículas metálicas, a prata tem recebido grande atenção, não só pelas propriedades ópticas, elétricas e catalíticas, mas principalmente pela sua propriedade antimicrobiana, com imensa capacidade de aplicação na indústria farmacêutica e na área médica [7].

Muitos extratos naturais são utilizados na síntese verde de nanopartículas metálicas devido ao seu poder redutor. O extrato de própolis é uma ótima alternativa, já que por si só possui propriedades medicinais: bactericida, anti-inflamatório, antiviral, antioxidante, anestésico, antitumoral, anticancerígeno e antifúngico. A seiva de sangue também apresenta propriedades antioxidantes, cicatrizantes e anti-inflamatórias [8, 9]. E por isso, ambas se mostram alternativas promissoras em aplicações em biomateriais.

Este trabalho teve como objetivo a síntese de nanopartículas de prata a partir do extrato de própolis e seiva de sangue de dragão como agentes redutores. O método utilizado foi a síntese verde, que é chamado dessa forma exatamente por não gerar efeitos negativos ao meio ambiente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Nanopartículas Metálicas

Nanotecnologia é ciência do projeto, fabricação e aplicação de nanoestruturas ou nanomateriais, e investigação de propriedades de relacionamento cariado de materiais com suas dimensões nanométricas, ou seja, com dimensões entre 1 e 100 nm, que resultam em propriedades diferenciadas [1, 10].

Os nanomateriais apresentam propriedades singulares quando comparadas com as do seu material original. O motivo desta distinção se dá pelas várias formas e sua maior área de superfície e, por isso, são consideradas candidatos atraentes para diversas aplicações, inclusive a ciência biomédica [11]. As suas aplicações como biomateriais são das mais diversas. Dentre elas estão:

- Detecção e formação de imagem: como as nanopartículas possuem propriedades diferenciadas, são capacitadas a detectar biomoléculas, já que podem ter tamanhos semelhantes, funcionando como sondas em processos biomoleculares. Um ótimo exemplo desta aplicação é o uso de pontos quânticos, que com as suas propriedades fluorescentes, identificaram um câncer de mama [4].
- Liberação de fármaco: devido ao tamanho das nanopartículas são ótimas opções para a liberação, principalmente pelo seu potencial de liberação, já que partículas nano se acomodam em maior quantidade em um citoplasma, por exemplo, do que partículas na ordem de microns (µm). São constituídas basicamente de superfície (relação superfície/volume alta) e pode ser modificada, seja a partir das próprias biomoléculas a serem liberadas, aumentando a sua capacidade de carreação, ou conjugadas a moléculas alvo para direcionar as nanopartículas para um local premeditado. Por fim, é possível

a liberação controlada de fármacos, de forma que o corpo fique em contato mais tempo com a droga, aumentando sua eficiência [4].

- Tratamento terapêutico: As nanopartículas podem ser aplicadas para o tratamento direto de doenças. Uma opção para o tratamento de câncer era a hipertermia (morte de tecidos devido a altas temperaturas) a partir da aplicação direta de um fluido quente no sistema sanguíneo, entretanto, o uso dessa técnica gerava muitos efeitos colaterais. Uma melhor alternativa para esse tratamento pode ser o uso de nanopartículas, pois devido ao seu pequeno tamanho e capacidade de direcionamento, pode prover hipertermia localizada, diminuindo os impactos no corpo [4].

Esforços foram feitos para sintetizar essas minúsculas partículas empregando métodos físicos, químicos e biológicos. No caso de processos físicos, há sempre a necessidade de manter alta temperatura, pressão e energia, enquanto a maioria dos produtos químicos como reagentes, materiais de partida e solventes usados nas rotas químicas sintéticas são tóxicos e potencialmente perigosos não apenas ao meio ambiente, mas também aos sistemas biológicos. Outro problema associado a este método é a formação de subprodutos tóxicos. Além disso, tem havido séria preocupação quanto à sua estabilidade e segurança em sistemas vivos [12].

Recentemente, nanopartículas metálicas foram aplicadas em xampus, sabonetes, detergentes, cosméticos, cremes dentais e produtos médicos e farmacêuticos [13].

2.1.1.1. Nanopartículas de prata (AgNP)

Dentre as várias nanopartículas metálicas, as nanopartículas de prata vêm ganhando cada vez mais espaço em todo o mundo. A atividade bactericida da prata é um fato bem estabelecido e já vem sendo longamente discutido. Semelhante à prata não nano (macroscópica), as nanopartículas de prata também inibem o crescimento de microrganismos. No entanto, a prata da forma nano desempenha uma atividade antimicrobiana mais elevada em comparação com a sua contraparte macroscópica. Além disso, as nanopartículas de prata demonstraram possuir melhores propriedades antioxidantes e anticancerígenas e têm o potencial de serem desenvolvidas como novos agentes terapêuticos [13].

A prata metálica é inativa, mas reage com a umidade na pele e fluidos corporais, tornando-se ionizada. O íon de prata é altamente reativa e pode se ligar a componentes celulares de microrganismos, acarretando mudanças estruturais na parede celular e/ou na membrana do núcleo e, consequentemente, à morte [10].

As AgNPs podem ser encontradas em diferentes formatos. A configuração esférica é termodinamicamente mais estável devido a sua alta relação superfície/volume. Entretanto novos métodos estão sendo desenvolvidos para a obtenção de nanopartículas não esféricas, como cubos, nanofios, nanobarras, pirâmides e em até forma de flores. No geral, a síntese de nanopartículas em uma solução se dá em dois passos: nucleação e crescimento. A obtenção desses diferentes formatos se dá pela alteração termodinâmica e cinética de cada um desses estágio, podendo resultar em propriedades totalmente novas [4].

As propriedades das nanopartículas, como tamanho, forma e fases, estão intrinsecamente relacionadas aos seus métodos de síntese. Uma variedade de

metodologias químicas e físicas são utilizadas para a síntese de nanopartículas de prata [1, 6].

Os métodos químicos envolvem redução, técnicas eletroquímicas, pirólise e assistidos por irradiação, porém, muitas vezes, envolvem agentes e subprodutos tóxicos. Os métodos físicos, como ablação a laser, moagem de bolas e deposição física de vapor (PVD) não envolvem produtos tóxicos, são mais rápido, entretanto exigem uma grande demanda de energia [6].

A síntese de nanopartículas utilizando fontes naturais exclui a necessidade de empregar produtos químicos tóxicos como agentes redutores e de proteção e fornece um método de síntese de nanopartículas favorável ao meio ambiente e com boa relação custo-benefício [2].

2.2. Síntese Verde

Metodologias verdes para a síntese de nanomateriais são pontos de foco devido à preocupação com a saúde e biocompatibilidade [1]. A produção de nanopartículas a partir de plantas vem ganhando importância nos últimos anos devido à sua natureza livre de solventes e menor toxicidade. Além disso, sua produção é mais rápida, o que também é rentável [13].

Muitos dos métodos químicos e físicos de produção de nanopartículas de prata são caros e são usados para estruturar substâncias tóxicas e perigosas que podem ter riscos ambientais e biológicos potenciais e devem ser evitados em aplicações médicas. Portanto, etapas ambientalmente e economicamente compatível são necessárias para a preparação de nanopartículas [10].

Existem três vertentes mais importantes para a síntese de nanopartículas de prata por métodos biológicos como bactérias, fungos e extrato naturais [10].

A síntese verde para obtenção de nanopartículas a partir de bactérias é de grande interesse, principalmente pela sua abundância no meio ambiente. As bactérias possuem a vantagem de se multiplicarem rápido. Porém há desvantagens para o uso deste método: como as bactérias são muito diversas e os seus parâmetros de cultivo também, muitas vezes são desconhecidos e, por isso, pode dificultar sua manipulação e cultivo. Esse método apresenta a segurança como uma preocupação, pois há o risco de proliferação desenfreada [5].

A síntese verde para obtenção de nanopartículas a partir de fungos ocorre a partir de enzimas e proteínas que são secretadas pelos fungos. Esses produtos, por possuírem potencial redutor, transformam um sal iônico em nanopartícula metálica. As grandes desvantagens desse método também são a segurança e a dificuldade de achar os melhores parâmetros para o desenvolvimento do fungo. Além disso, as nanopartículas obtidas pelo fungo apresenta grande variação de tamanhos [5].

A principal vantagem de usar extratos naturias para síntese de nanopartículas de prata é a fácil acessibilidade. Plantas são seguras e na maioria dos casos, não-tóxicas, e podem reduzir os íons de prata [10]. Os métodos de síntese de AgNP baseados em plantas e seus extratos são não patogênicos, são simples, envolvem apenas uma única etapa e, além disso, têm maior potencial de biorredução em comparação com os filtrados microbianos. Podem ser produzidos usando toda a planta ou seu extrato, no entanto, a disponibilidade do agente redutor é mais concentrada no extrato do que na planta inteira. Assim, a maioria dos estudos tem se concentrado na utilização de extratos vegetais [6].

Os métodos de síntese de NP baseados em plantas envolvem a mistura de um extrato vegetal natural com uma solução aquosa de sal metálico (Figura 1) [6]. Compostos bioativos, como alcaloides, fenóis, taninos, terpenóides, aminoácidos e proteínas, que são encontrados em produtos naturais, são responsáveis pela redução de íons Ag em AgNPs. Ou seja, estes elementos funcionam como agentes redutores, reagindo com o metal iônico e reduzindo o seu nox para zero. Em seguida, os íons metálicos se agregam e formam as nanopartículas metálicas. Em algumas situações, os biocompostos podem formar uma camada estabilizantes em torno das nanopartículas, evitando que se agreguem. Plantas como o híbrido de eucalipto, Aloe vera, Allium sativum são exemplos utilizados na produção biológica de AgNPs [14].

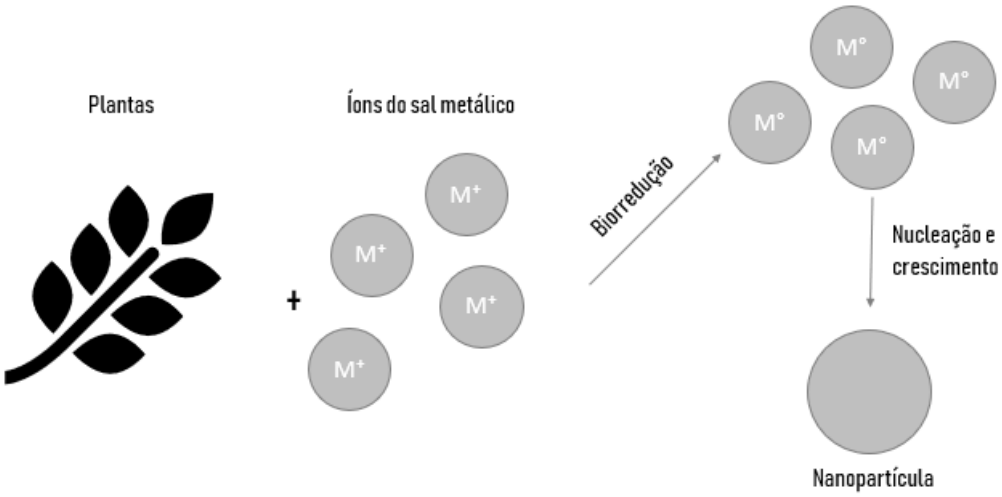


Figura 1 - Esquema da obtenção da nanopartícula a partir da síntese verde.

2.2.1. Extrato de Própolis

Própolis é uma substância resinosa com cores variáveis (verde, vermelho, amarelo e marrom) que são coletadas e processadas por abelhas operárias a partir de

folhas, brotos de flores, caules e fissuras na casca de numerosas espécies de árvores, incluindo álamo, amieiro, bétula, eucalipto e acácia [8, 15].

A principal função do uso da própolis pelas abelhas é a proteção da colmeia. A palavra própolis já expõe sua aplicação: oriunda da palavra grega pro(defesa) e polis (cidade ou comunidade). Além de auxiliar na defesa contra predadores naturais, também veda e reduz aberturas na colmeia, regulando a temperatura interna (Figura 2). Outra função importante é a higienização da colmeia e para cobrir animais mortos que não foram removidos de dentro do ninho [16,17]

Figura 2 - Própolis produzida pelas abelhas sendo usada nas colmeias.

A própolis obteve um grande sucesso como um produto natural que, nas últimas décadas, ganhou ampla aceitação em vários países como um suplemento para melhorar a saúde e prevenir doenças. Em geral, a própolis tem um impacto favorável na saúde humana. É usada para fins terapêuticos devido as suas propriedades farmacológicas [8, 16, 17].

Atualmente, a própolis é usado como bactericida, anti-inflamatório, antiviral, antioxidante, anestésico, antitumoral, anticancerígeno, antifúngico [15].

2.2.2. Seiva de Sangue de Dragão

A seiva de sangue de dragão é um resina de vermelho intenso (Figura 3), oriunda de uma árvore chamada Dragoeiro (Figura 4), que se escontra na Amazônia, Colômbia, Peru e Equador. É composto por ativos antiinflamatórios, como a taspina, e substâncias antioxidantes, que funcionam como agentes redutores [9].

Figura 3 - Árvore Dragoeiro, local de origem da seiva de sangue de dragão.

A taspina possui propriedades anti-inflamatórias e cicatrizantes já que intensifica a migração dos fibroblastos – células responsáveis pela síntese de colágeno e elastina do tecido conjuntivo -, sendo usada de forma tópica em cortes e sangramentos, além do que, quando aplicada sobre o ferimento, endurece, formando uma camada protetora de infeccções [18].

Figura 4 - Tronco da árvore Dragoeiro, exibindo a seiva de sangue de dragão.

3. OBJETIVO

Este trabalho visou a obtenção de nanopartículas de prata pela redução do nitrato de prata a partir do extrato natural de própolis e de seiva de sangue de dragão e a caracterização das partículas produzidas.

3.1. Objetivos Específicos

- Sintetizar nanopartículas de prata utilizando extrato de própolis como agente redutor.
- Sintetizar nanopartículas de prata utilizando seiva de sangue de dragão como agente redutor.
- Avaliar a influência da concentração do nitrato de prata e do tempo de incubação no tamanho e na concentração de nanopartículas produzidas.

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais

Para a elaboração das nanopartículas de prata, alguns materiais foram utilizadas e estão descritos abaixo:

- PROPOMAX® - Extrato de Própolis verde sem álcool, LOTE 003000919, Apis Flora.
- PHYTOTERÁPICA Seiva de Sangue de Dragão, LOTE PSD19.01
- Nitrato de Prata (AgNO3), pureza ≥99,0%, lote MKBD2163V, ACS Regent, Sigma-Aldrich.

4.2. Equipamentos

Para a elaboração e caracterização das nanopartículas de prata, alguns equipamentos foram utilizadas e estão descritos abaixo:

- Incubadora de bancada com Agitação Orbital -– Shaker, Mod. MSM 130/B, MS Mistura – Laboratório de Biopolímeros e Bioengenharia, PEMM/COPPE/UFRJ.
- Analisador de distribuição de tamanho de partículas em escala nanométrica, Mod. Zetasizer Zs, Malvern – Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais, PEMM/COPPE/UFRJ
- Microscópio de Força Atômica mod.Alpha 300AR Microscope, WITec – Laboratório de Modificação e Caracterização de Superfícies, PEMM/COPPE/UFRJ
- Espectrofotômetro na faixa de em UV-Vis mod. Lambda 25, Perkin Elmer - Laboratório de Biopolímeros e Bioengenharia, PEMM/COPPE/UFRJ.

4.3. Obtenção das Nanopartículas de Prata

Para a obtenção das nanopartículas, foi preparada uma solução com concentração de própolis ou seiva de sangue de dragão 10% em água. Em seguida, essa solução foi vertida sobre quantidades específicas de nitrato de prata dependendo da concentração final da solução desejada. Após a dissolução de todo o nitrato de prata (que ocorreu sob agitação e temperatura ambiente), a solução foi mantida no Shaker com velocidade de rotação de 100 rpm e temperatura de 60ºC por até 96 horas para a formação das nanopartículas. Essa metodologia de síntese das nanopartículas, que pode ser observada na Figura 5, teve como base o procedimento descrito por Silva (2018).

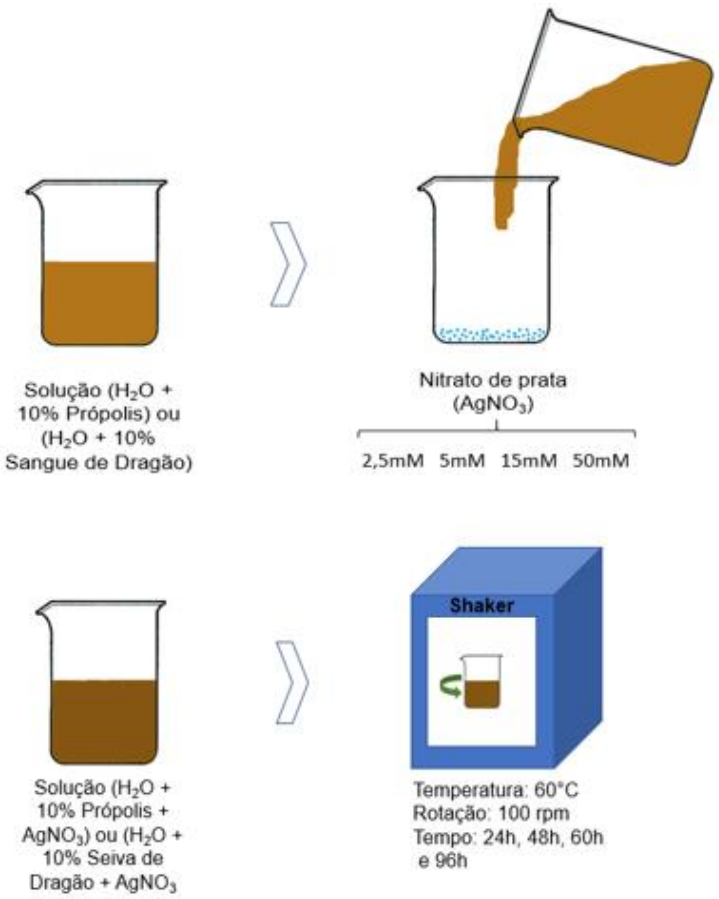


Figura 5 - Metodologia de síntese das nanopartículas de prata.

Para o extrato de própolis, o método foi repetido alterando os parâmetros de concentração do nitrato de prata na solução, que foram 2,5 mM, 5 mM, 15 mM e 50 mM. Enquanto o tempo de incubação para a formação das nanopartículas dentro do Shaker também variou em 24h, 48h, 60h e 96h.

Para a seiva de sangue de dragão, o método foi repetido algumas vezes com concentração do nitrato de prata na solução de 5mM. Enquanto o tempo de incubação para a formação das nanopartículas dentro do Shaker variou em 48h e 96h.

As amostras foram identificadas com o seguinte padrão:

- “PROP10” corresponde ao extrato própolis e a sua concentração na solução;
- “DRAG10” corresponde à seiva de dragão e a sua concentração na solução;
- “AgX” se refere a concentração molar de nitrato de prata também na solução, variando em 2.5mM, 5mM, 15mM e 50 mM.

4.4. Caracterização das Nanopartículas de Prata

Para a caracterização das nanopartículas de prata produzidas foram realizadas uma série de análises para identificar seu aspecto visual, tamanho de partícula e sua distribuição, morfologia e concentração na solução.

As caracterizações realizadas estão apresentadas nas tabelas 1 e 2:

Tabela 1 - Caracterizações das nanopartículas de prata a partir do extrato de própolis.

Caracterização das Nanopartículas				
Concentração	Tempo	UV-Vis	AFM	SIZER
PROP10Ag2,5	24h	x		x
	48h	x		x
	60h	x		x
	96h	x	x	x
PROP10Ag5	24h	x		x
	48h	x		x
	60h	x		x
	96h	x	x	x
PROP10Ag15	24h	x		x
	48h	x		x
	60h	x		x
	96h	x		x
PROP10Ag50	24h	x		x
	48h	x		x
	60h	x		x
	96h	x		x

Tabela 2 - Caracterizações das nanopartículas de prata a partir da seiva de sangue de dragão.

Caracterização das Nanopartículas				
Concentração	Tempo	UV-Vis	AFM	SIZER
DRAG10Ag5	96h			x

4.4.1. Caracterização Visual

A caracterização visual das amostras foi realizada comparando uma solução “branca” de 10% extrato de própolis em água (controle) com as amostras que continham

diferentes concentrações do nitrato de prata e foram produzidas com diferentes tempos de incubação. Para isso as amostras foram colocadas lado a lado em frascos transparentes para uma melhor análise. A solução “branca” de cada série foi mantida na incubadora de agitação orbital – Shaker na mesma temperatura e pelo mesmo tempo que as amostras com prata.

4.4.2. Espectrofotometria na faixa do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Para a caracterização por espectrofotometria de ultravioleta-visivel (UV-Vis) duas cubetas de quartzo foram introduzidas no equipamento, sendo uma a solução “branca” contendo apenas 10% de extrato de própolis ou seiva de dragão em água e a outra cubeta contendo a amostra a ser avaliada. As soluções foram diluídas na proporção de 1/100 para uma varredura efetiva da técnica.

4.4.3. Analisador de distribuição de tamanho de partículas em escala nanométrica Zetasizer

A distribuição do tamanho das PCS foi determinada pela técnica de espalhamento de luz com o auxílio do equipamento ZETASIZER/NANO-ZS. As soluções contendo nanopartículas foram diluídas de 1/100 antes de cada análise.

4.4.4. Microscopia de Força Atômica (AFM)

O modo de contato intermitente foi usado neste estudo.

A preparação para a caracterização consistiu na preparação da base a ser colocada a amostra e a própria amostra:

- A base escolhida foi de silício. Para a sua limpeza foi colocada na Cuba Ultrassônica imersa em acetona por 5 minutos e depois com auxílio de uma pinça foi colocada na capela para secagem.
- A amostra foi diluída em 1/100 e então uma gotícula foi posta na base de silício e a secagem foi realizada dentro de uma capela por 24 horas.

4.5. Testes biológicos

As amostras PROP10Ag5 (96 h), DRAG10Ag5 (48h) e DRAG10Ag5 (96h) foram submetidas a testes de viabilidade celular e de sensibilidade a antimicrobianos (TSA). Esses ensaios foram conduzidos pela equipe da Profa. Ariane de J. Sousa-Batista, do Programa de Engenharia de Nanotecnologia (PENt)/COPPE/UFRJ.

4.5.1. Teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA)

O Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA) ou Antibiograma é uma técnica utilizada para avaliar a sensibilidade de bactérias e fungos a diferentes agentes antimicrobianos. Neste teste, um disco de papel absorvente é embebido na solução a ser estudada e depositado em uma placa contendo ágar inoculado com o microrganismo escolhido. Após a incubação desse sistema, a análise é feita pelo tamanho do halo de inibição formado ao redor do disco de papel. Quanto maior o halo, maior o potencial antimicrobiano daquela solução.

Neste trabalho, 20 microlitros das amostras contendo as nanopartículas (PROP10AG5 (96h), DRAG10AG5 (48h) e DRAG10AG5 (96h)) e dos extratos puros (PROP e DRAG) foram utilizados para embeber os discos de difusão. Todas as amostras testadas foram previamente diluídas para a concentração final de 30% (v/v) em água destilada. Os discos foram postos nas placas previamente semeadas em meio ágar com os microrganismos: *Staphylococcus aureus* sensível à oxacilina (MSSA), *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (MRSA), *Candida albicans* sensível a Fluconazol e *Candida albicans* resistente a Fluconazol. Foi possível avaliar o tamanho do halo de inibição com o auxílio de um paquímetro digital. Cefoxitina (FOX30 – 30 µg fármaco) e Fluconazol foram usados como controle nos testes com *S. aureus* e *C. albicans*, respectivamente.

4.5.2. Ensaio de viabilidade celular

As amostras contendo as nanopartículas (PROP10AG5 (96h), DRAG10AG5 (48h) e DRAG10AG5 (96h)) e o extrato de própolis foram submetidos a ensaios de viabilidade celular em queratinócitos humanos (HaCat), a fim de se determinar as concentrações letais das amostras.

As células foram plaqueadas ($1,5x10^4$ células/poço) em placas de 96 poços em meio RPMI com 10% SFB e mantidos sob as condições de 37 °C a 5% CO_2 por 24 h. Em seguida, as células foram tratadas com 0,3%; 3% e 30% das soluções das amostras. Foram feitos três ensaios independentes em triplicata para cada concentração, durante 72 h a 37°C em atmosfera de 5% CO_2. Após 72h de tratamento, adicionou-se 10% de resazurina em todos os poços, incubou-se durante 4 h a 37 °C/5% CO_2 e, por fim, mediu-se a fluorescência em fluorímetro de placa (555 – 585 nm). A avaliação da viabilidade

celular foi realizada pela detecção da fluorescência gerada através da oxidação da resazurina a resorufina pelas células viáveis.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Caracterização Visual

Estudos sugerem que quando há presença de nanopartículas de prata na solução formada, a solução se torna mais escura, indo de transparente para um castanho acinzentado [21].

As Figuras 9-12 mostram fotografias das amostras contendo nanopartículas de prata produzidas na presença do extrato de própolis com diferentes concentrações de nitrato de prata e com diferentes tempos de reação. De maneira geral as amostras nas Figuras 6 a 9 não apresentaram mudanças muito evidentes das colorações. O que é explicado pela coloração do próprio extrato de própolis, que é marrom escuro.

Porém, ao analisar com mais afinco, é possível perceber que as amostras PROP10Ag2,5, PROP10Ag5 e PRO10Ag15 para todos os tempos de incubação, possuem diferenças em seus aspectos quando comparadas a solução “branca”: Esta solução corresponde ao extrato de própolis puro submetido às mesmas condições de reação.

Enquanto a solução “branca” é límpida e brilhosa, as amostras contendo prata apresentam um aspecto turvo e opaco, indicando que produtos foram formados a partir de reações que ocorreram no tempo de incubação.

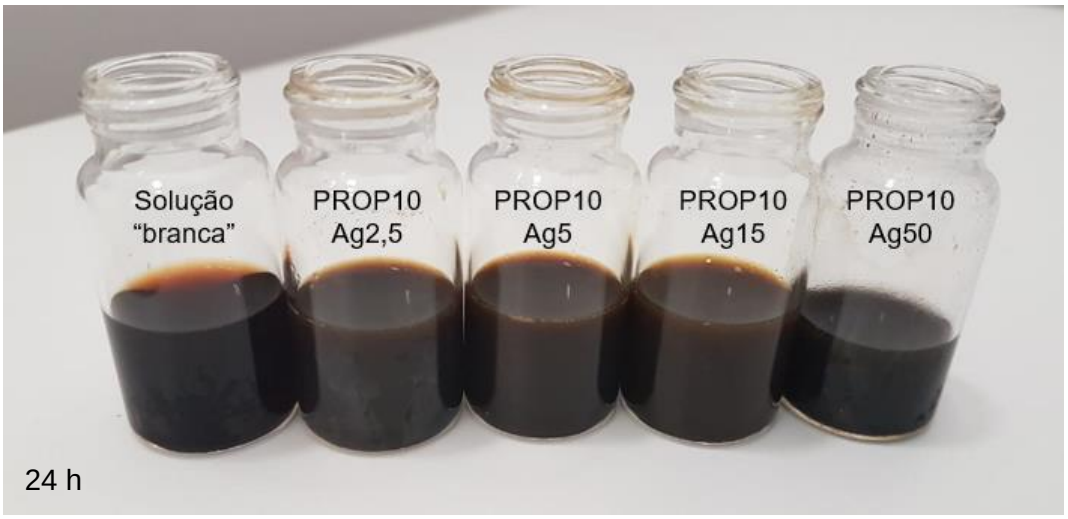


Figura 6 - Caracterização visual das soluções de extrato de própolis com diferentes concentrações para tempo de incubação de 24 horas.

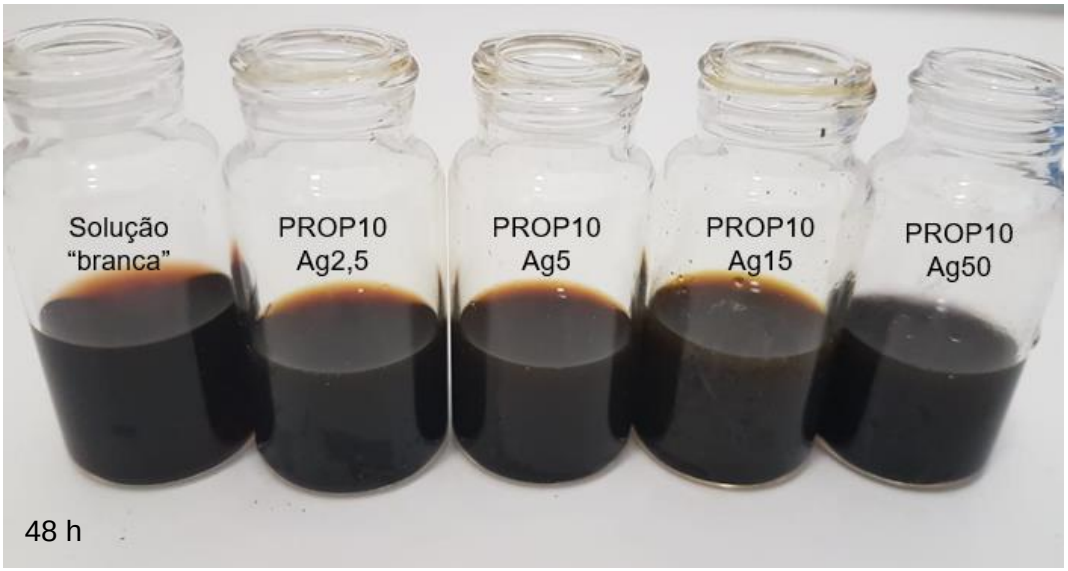


Figura 7 - Caracterização visual das soluções de extrato de própolis com diferentes concentrações para tempo de incubação de 48 horas.

As amostras de PROP10Ag50 possuem coloração mais acinzentadas e mostraram a formação de precipitados. Esta coloração acinzentada pode estar relacionada à formação de prata metálica em tamanho micro e/ou macrométrico.

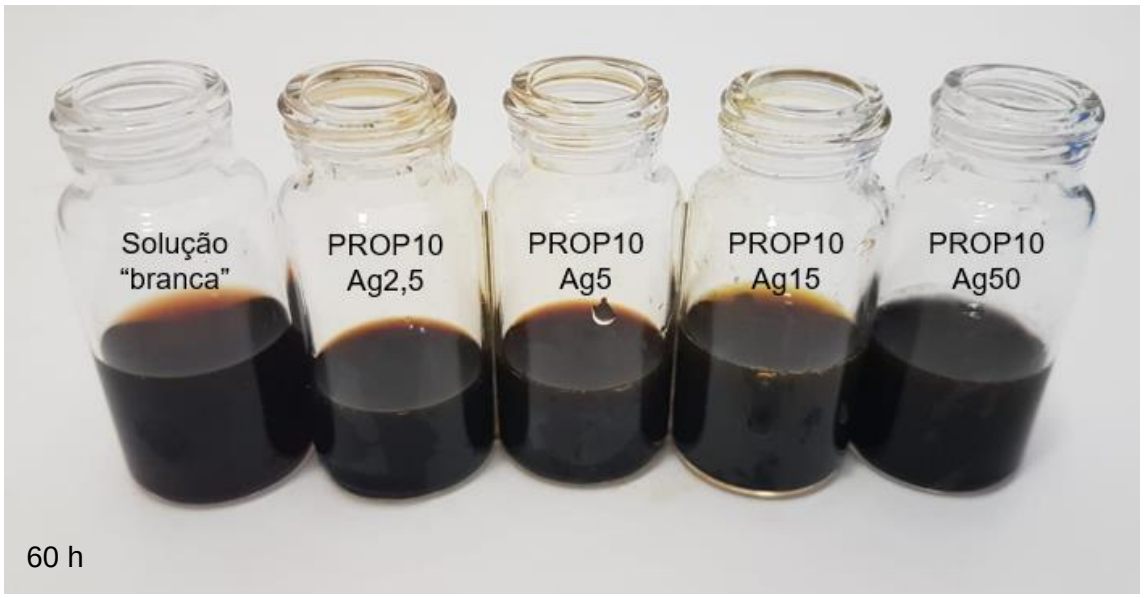


Figura 8 - Caracterização visual das soluções de extrato de própolis com diferentes concentrações para tempo de incubação de 60 horas.

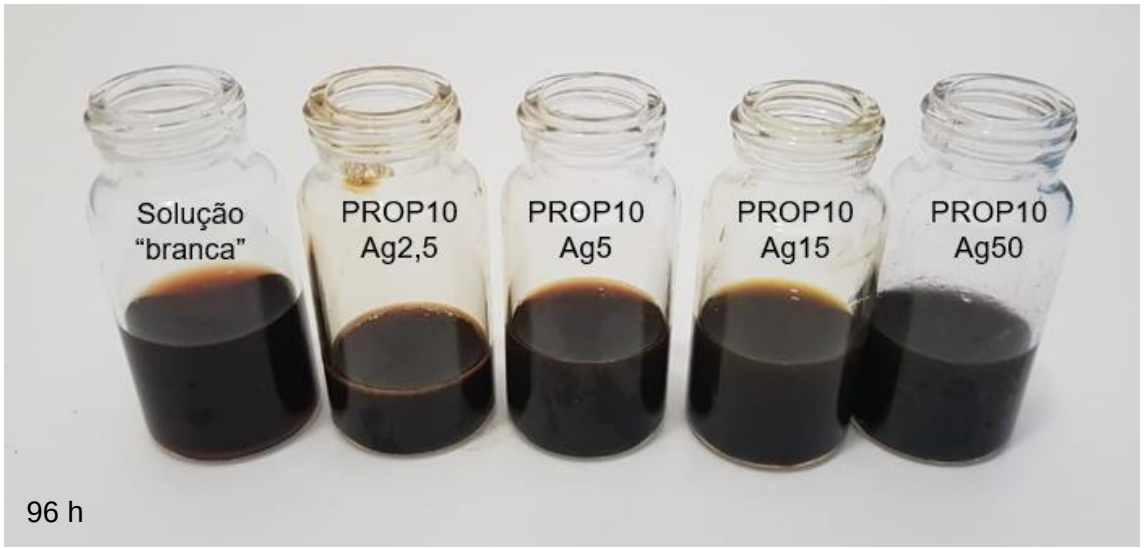


Figura 9 - Caracterização visual das soluções de extrato de própolis com diferentes concentrações para tempo de incubação de 96 horas.

Uma alternativa melhor para a análise das colorações foi a diluição das soluções de 1:50 e pode ser observada nas Figuras 10 a 13.

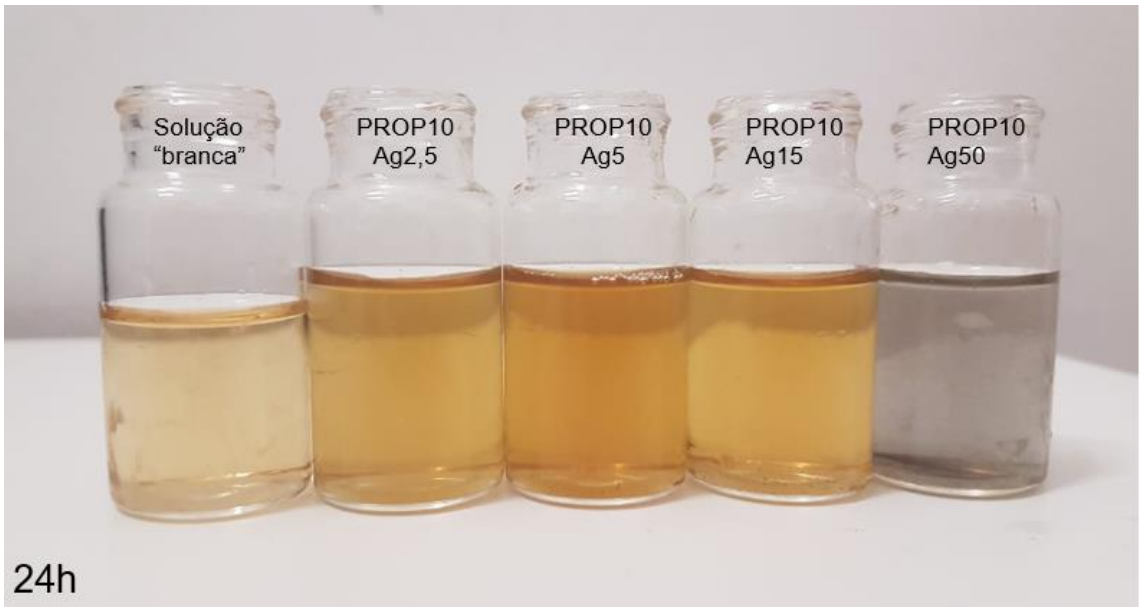


Figura 10 - Caracterização visual das soluções de extrato de própolis com diferentes concentrações para tempo de incubação de 24 horas com diluição de 1:50.

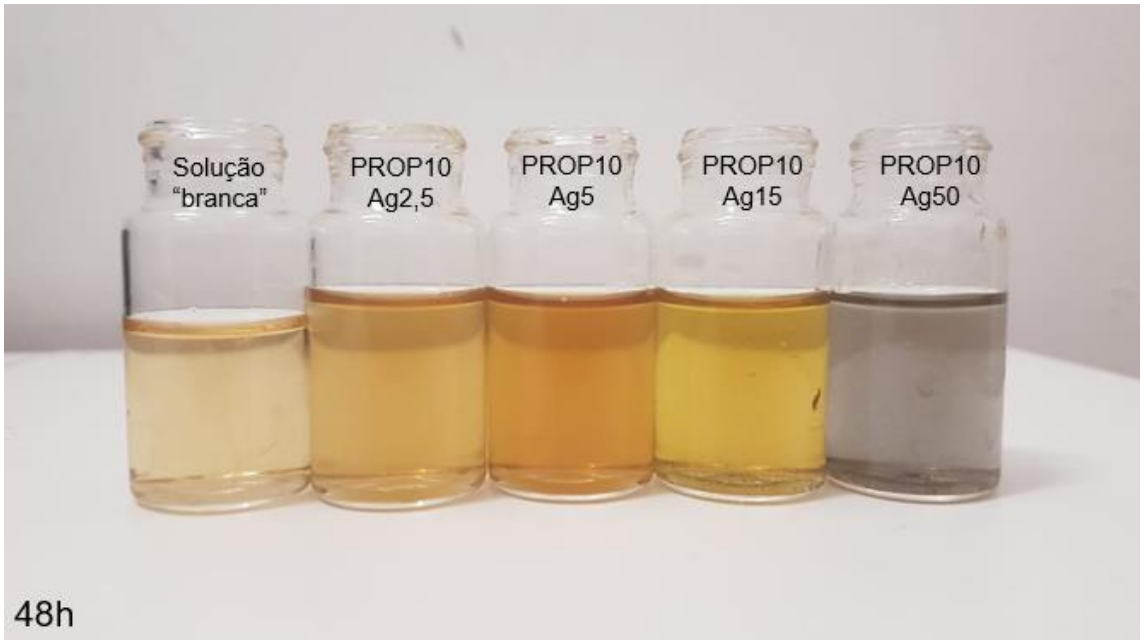


Figura 11 - Caracterização visual das soluções de extrato de própolis com diferentes concentrações para tempo de incubação de 48 horas com diluição de 48 horas.

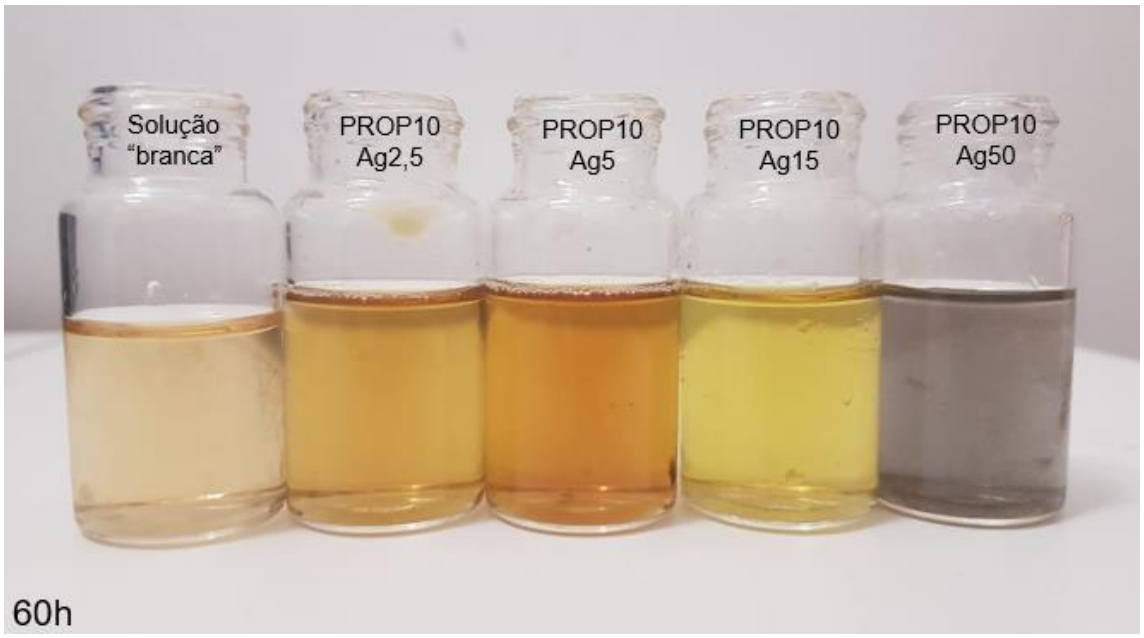


Figura 12 - Caracterização visual das soluções de extrato de própolis com diferentes concentrações para tempo de incubação de 60 horas com diluição de 1:50.

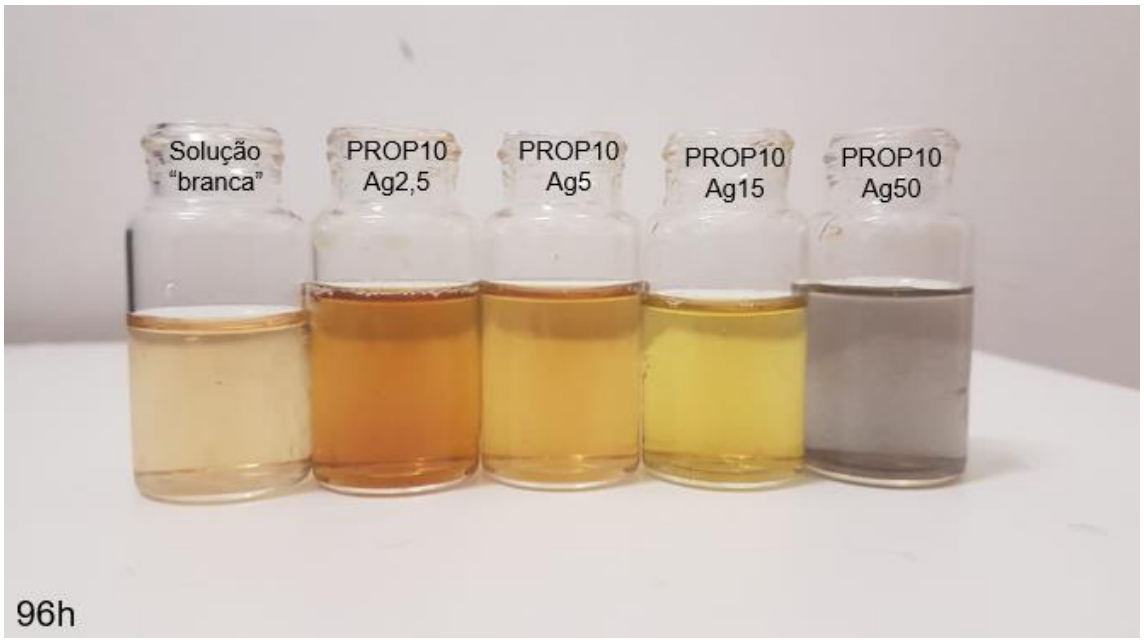


Figura 13 - Caracterização visual das soluções de extrato de própolis com diferentes concentrações para tempo de incubação de 96 horas com diluição de 1:50.

As mudanças de coloração das amostras diluídas, como previsto, são mais visíveis do que as amostras sem diluição. Para todos os tempos de incubação, as amostras PROP10Ag2,5, PROP10Ag5 e PROP10Ag15 apresentaram coloração mais escura do que a solução “branca”, indicando presença de nanopartículas de prata,

A amostras de PROP10Ag50 não apresentaram as mesmas características do que as outras concentrações de nitrato de prata. A coloração acinzentada e a visualização de partículas na solução são evidências de que há partículas com tamanho acima da escala nanométrica.

5.2. Espectrofotometria de Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Primeiramente, ao analisar as amostras elaboradas a partir de extrato de própolis, a técnica foi realizada nas diferentes concentrações para um mesmo tempo de incubação e podem ser observados nas Figuras 14 a 17

A Figura 14 mostra as curvas de absorbância de amostras obtidas com diferentes concentrações para um tempo de incubação de 24h. As curvas de PROP10Ag2,5 e PROP10Ag5 possuem pontos similares, seguindo uma mesma tendência com uma absorbância mais baixa, quando comparada as outras concentrações, que cresce conforme aumenta a quantidade de nitrato de prata.

As soluções PROP10Ag2,5, PROP10Ag5 e PROP10Ag15 exibiram uma banda de absorção proeminente em 420 nm, enquanto que o PROP10Ag50, não apresentou essa banda.

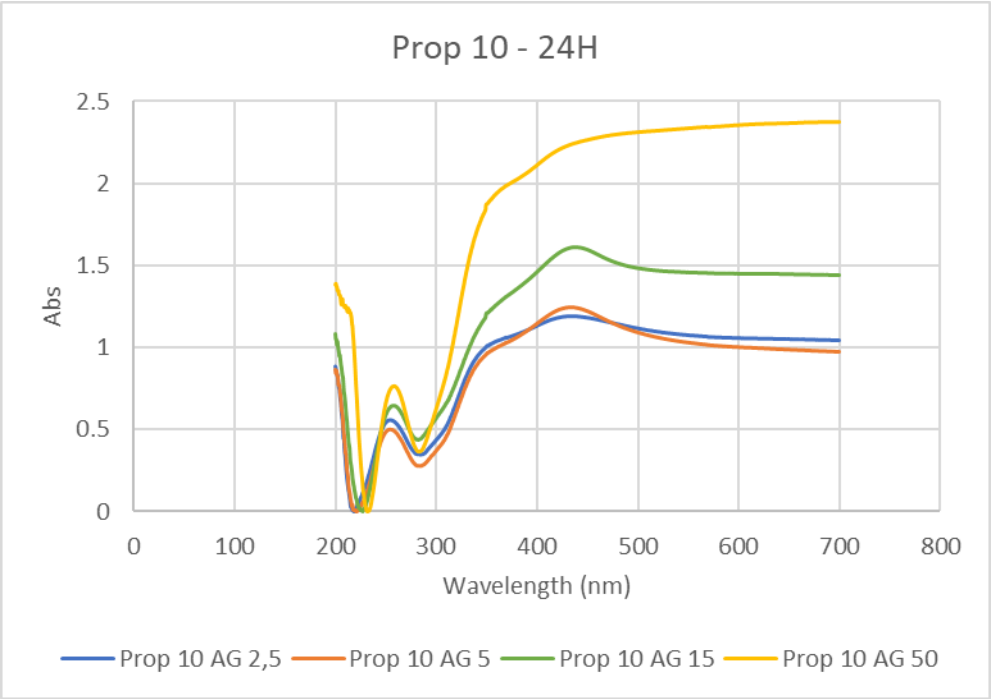


Figura 14 - Resultados obtidos pelo UV-Vis para nanopartículas com tempo de incubação de 24 horas.

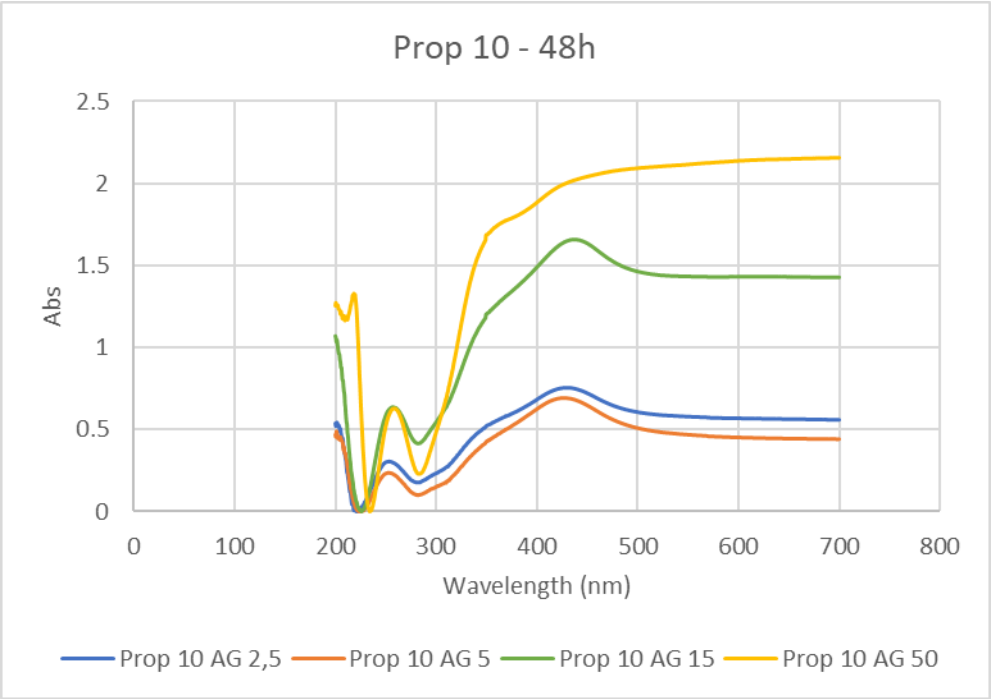


Figura 15 - Resultados obtidos pelo UV-Vis para nanopartículas com tempo de incubação de 48 horas.

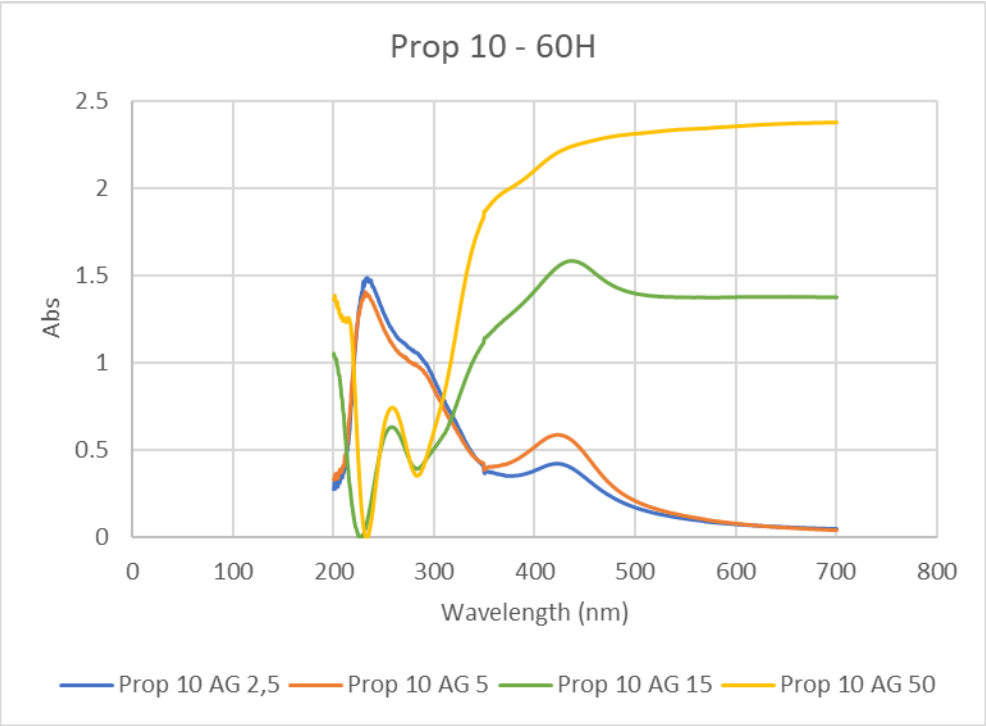


Figura 16 - Resultados obtidos pelo UV-Vis para nanopartículas com tempo de incubação de 60 horas.

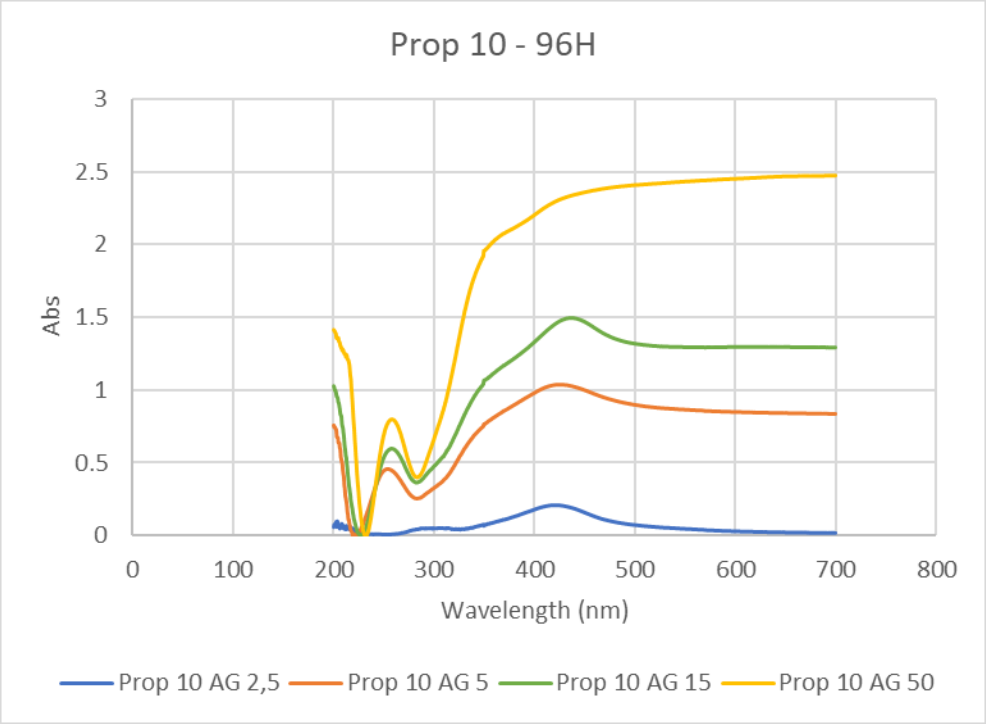


Figura 17 - Resultados obtidos pelo UV-Vis para nanopartículas com tempo de incubação de 96h horas.

A Figura 15 apresenta os resultados do UV-Vis para as quatro concentrações realizadas para um tempo de incubação de 48 horas. É possível observar que as linhas seguem a mesma disposição que o gráfico de 24 horas, porém com menores absorbâncias.

A Figura 16, em que o tempo de incubação é de 60h, se diferencia das anteriores pois as bandas do PROP10Ag2,5 e PROP10Ag5 estão mais acentuadas e levemente separadas. Enquanto, na Figura 17, as curvas estão ainda mais separadas. Com o passar do tempo, as absorbâncias diminuíram.

A partir de todos os resultados obtidos, algumas conclusões podem ser tomadas:

- Ao analisar as curvas que estão compiladas pelos tempos, observa-se que para cada um dos gráficos, as bandas estão na mesma direção, chegando-se à conclusão que um maior tempo de incubação provavelmente não influencie o formato das partículas e sim, a concentração do nitrato de prata.
- É possível observar que para todos os tempos de incubação, quanto maior foi a concentração do nitrato de prata, maior foi a sua absorbância. Desta forma, pode-se sugerir que quanto mais nitrato de prata é introduzido, maior é o número de partículas formadas na solução [11].

Outra análise importante é a compilação de gráficos de uma mesma concentração de nitrato de prata para os diferentes tempos de incubação.

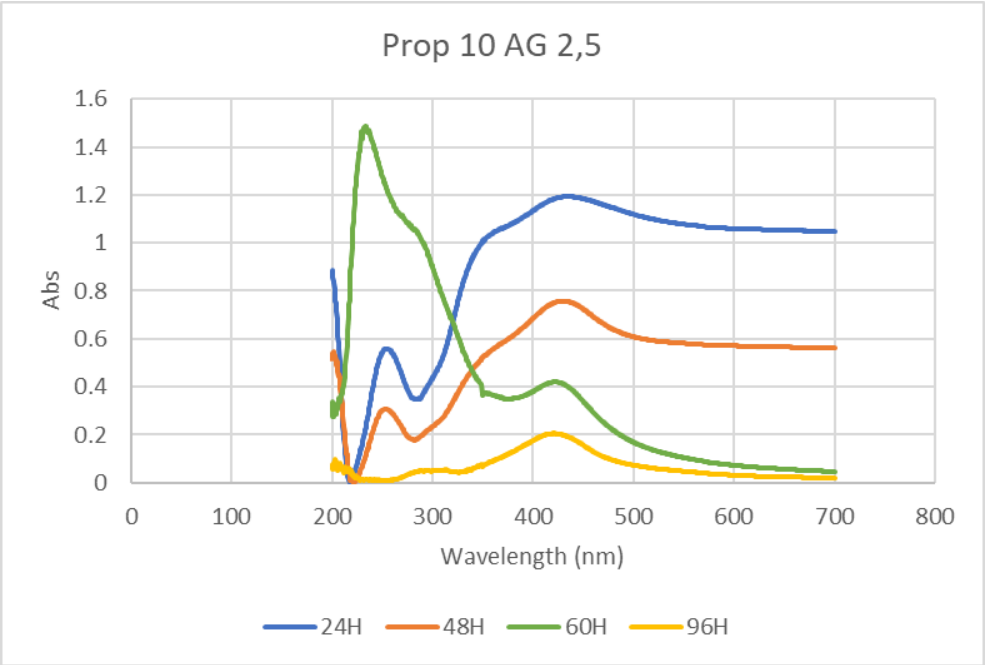


Figura 18 - Resultados obtidos pelo UV-Vis para nanopartículas com concentração de nitrato de prata de 2,5 mM.

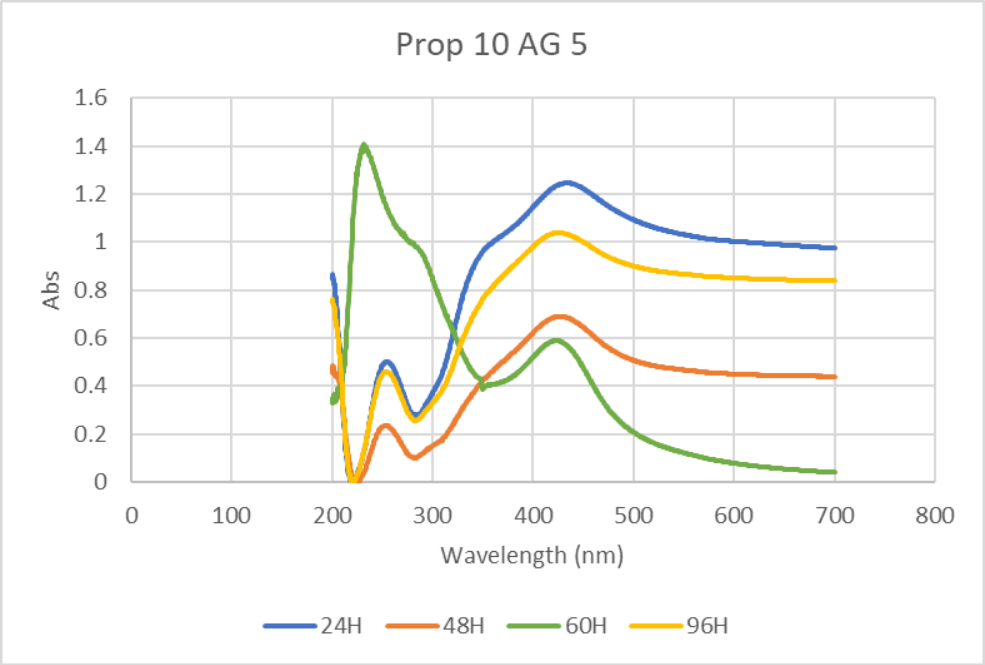


Figura 19 - Resultados obtidos pelo UV-Vis para nanopartículas com concentração de nitrato de prata de 5 mM

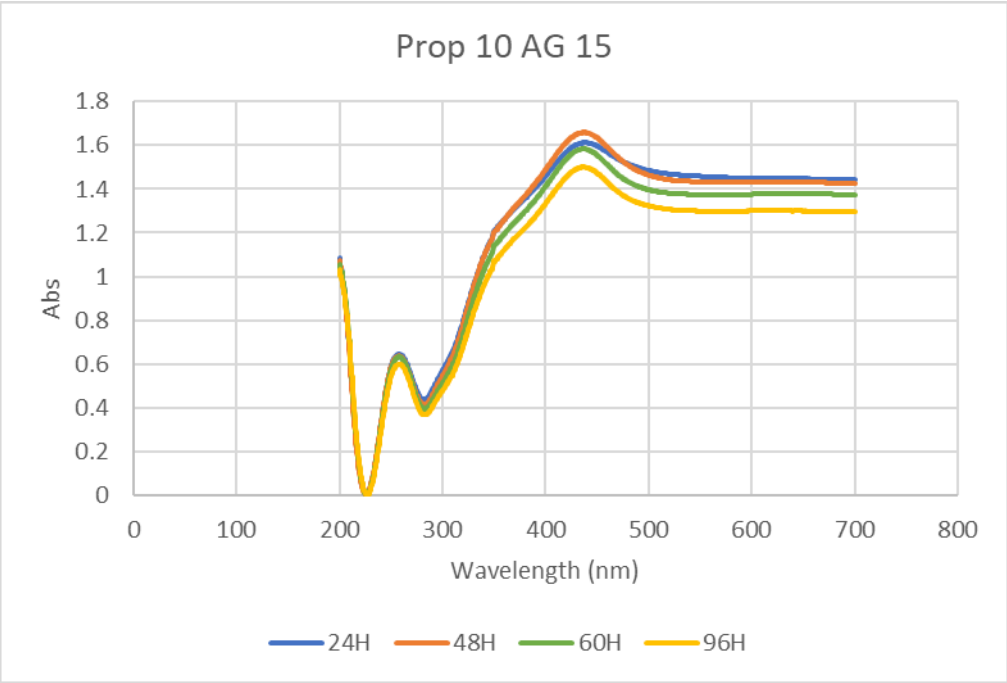


Figura 20 - Resultados obtidos pelo UV-Vis para nanopartículas com concentração de nitrato de prata de 15 mM

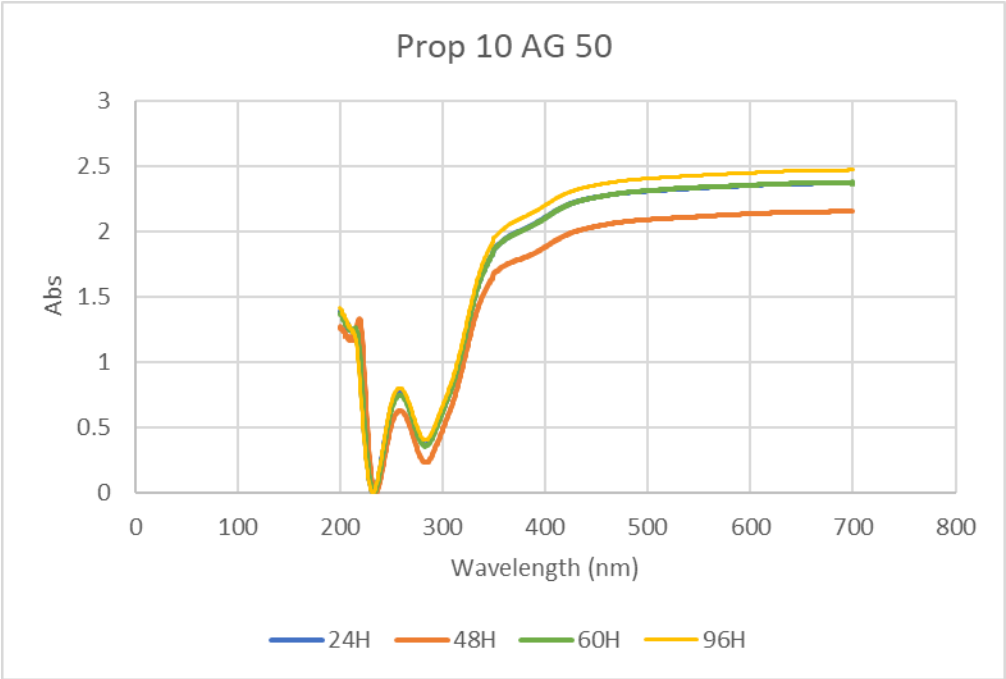


Figura 21 - Resultados obtidos pelo UV-Vis para nanopartículas com concentração de nitrato de prata de 50 mM

De acordo com a Figura 18, em que o gráfico exibe a mesma concentração de 2,5 mM, para quatro tempos diferentes, todas as curvas apresentam bandas em torno de 260 nm e 420 nm. As curvas de 24 horas e 48 horas, apresentam um “ombro” entre essas bandas. As absorbâncias diminuem com o aumento do tempo de incubação.

A Figura 19, para a concentração de 5 mM de nitrato de prata, apresentam as mesmas bandas explicitadas anteriormente e a absorbância em 24 horas continuou maior do que nas outras curvas.

Para as amostras de PROP10Ag15, apresentado na Figura 20, há uma grande diferença para os gráficos anteriores, já que as curvas estão muito próximas umas das outras, com as bandas no mesmo formato.

Na Figura 21 é possível observar que para as amostras de PROP10Ag50, há apenas a banda de 260 nm, com a irrelevância do tempo. A curva de 24 horas está apresentando pontos muito próximos da curva de 60 horas.

Desta forma, outras conclusões também podem ser realizadas:

- A partir desta caracterização, pode haver evidências da presença de nanopartículas de prata, do seu formato e de sua distribuição de tamanhos de acordo com as bandas de absorbância. Bandas no comprimento de onda em torno de 420 nm, indicam a presença de nanopartículas de prata com formato esférico. A banda não proeminente de 50 mM, aponta a não formação de nanopartículas de prata [22].
- A banda existente em torno de 260 nm indica presença de própolis na solução e pode ser observada em todas as análises [23].

- Em diversas curvas, entre os dois picos proeminentes existia um “ombro”, sendo uma evidência de que as nanopartículas não estivessem no formato esférico e sim, em um formato poliédrico [24].

5.3. Analisador de distribuição de tamanho de partículas em escala nanométrica Zetasizer

A partir dos gráficos, podem ser analisadas as influências das alterações dos parâmetros da síntese verde quanto ao tamanho das nanopartículas.

As Figuras 22 a 25 exibem as distribuições de tamanhos das amostras com concentração de 2,5 mM para os quatro tempos de incubação. É possível perceber que para os tempos de 24h, 48h e 60h, a maior porcentagem de tamanhos está em torno de 2 nm. Porém, quanto maior é o tempo, menos homogênea é a distribuição. O tempo de 96h implicou em aglomeração com uma ampla população de tamanho das partículas.

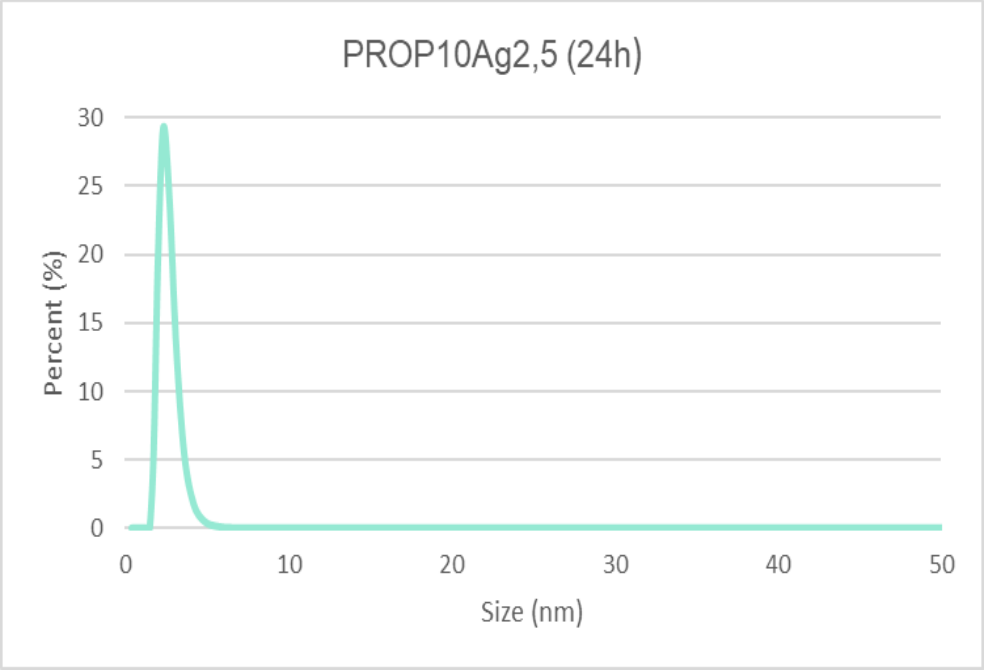


Figura 22 - Gráfico de distribuição de tamanhos da amostra PROP10Ag2,5 em 24 horas

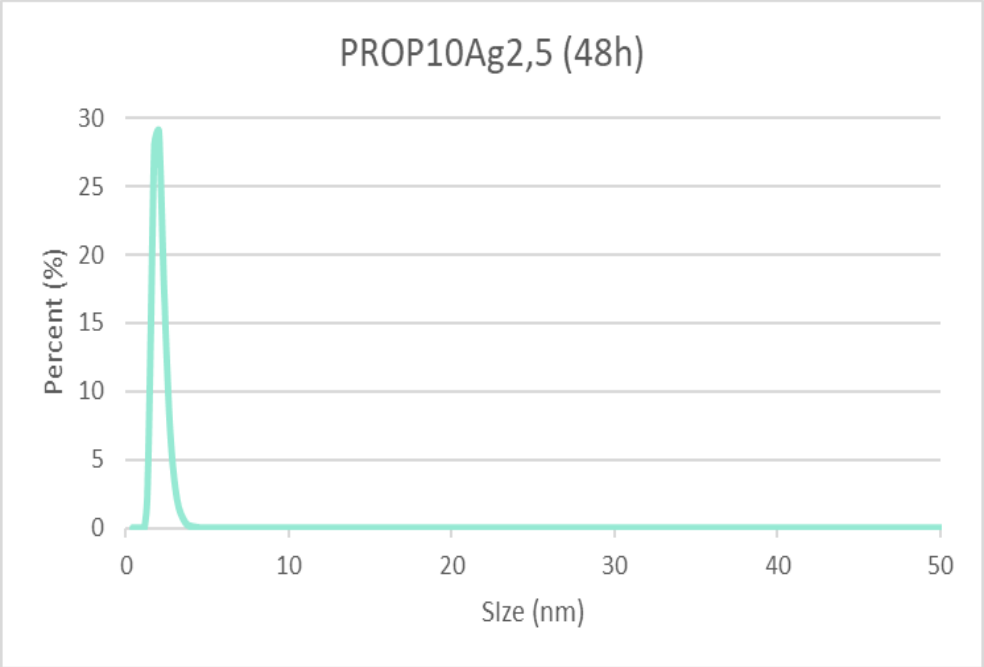


Figura 23 - Gráfico de distribuição de tamanhos da amostra PROP10Ag2,5 em 48 horas

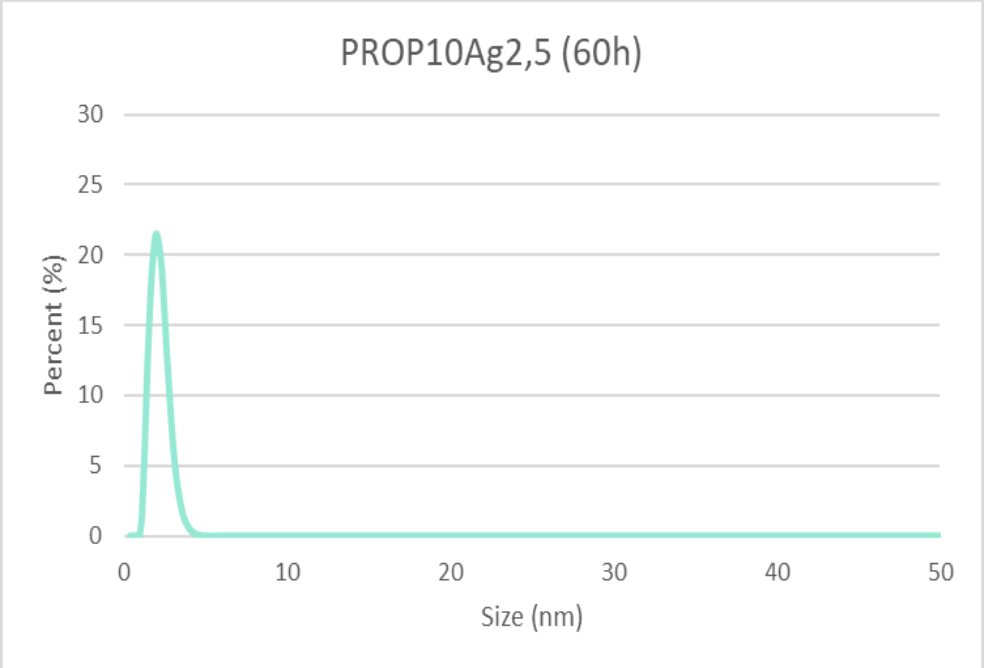


Figura 24 - Gráfico de distribuição de tamanhos da amostra PROP10Ag2,5 em 60 horas

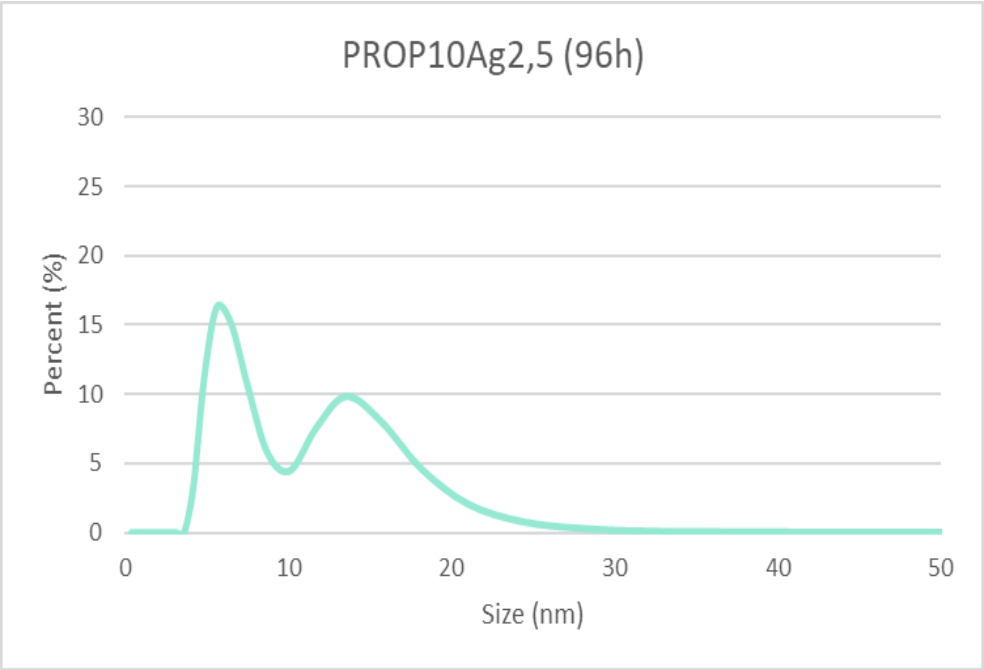


Figura 25 - Gráfico de distribuição de tamanhos da amostra PROP10Ag2,5 em 96 horas

As amostras com concentração de nitrato de prata de 5 mM com tempo de incubação de 24h, 48h e 60h (Figuras 26 a 28) apresentaram distribuições menos homogêneas do que a amostra com tempo de incubação de 96h (Figura 29).

Apesar das distribuições menos homogêneas, os tempos 48h e 60h, uma parte significativa dos tamanhos se encontra em torno de 9nm, ou seja, partículas menores do que as que ficaram em 96h tempo em agitação.

Ao comparar as amostras de concentração de nitrato de prata 2,5 mM e 5 mM com mesmos tempos de incubação, houve um aumento nos tamanhos das partículas com o aumento da quantidade de do sal metálico.

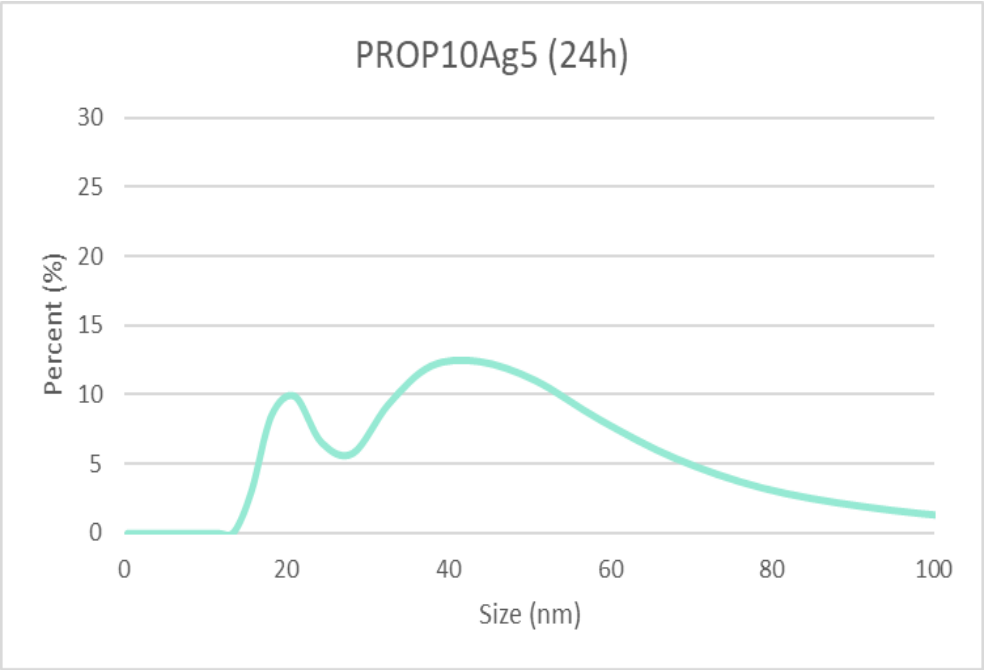


Figura 26 - Gráfico de distribuição de tamanhos da amostra PROP10Ag5 em 24 horas

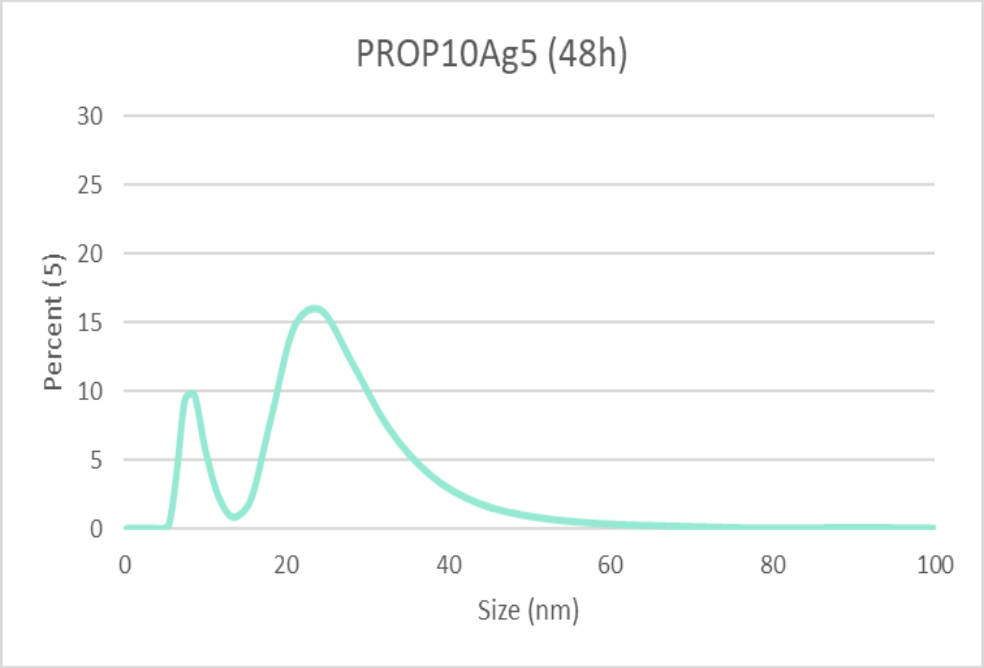


Figura 27 - Gráfico de distribuição de tamanhos da amostra PROP10Ag5 em 48 horas

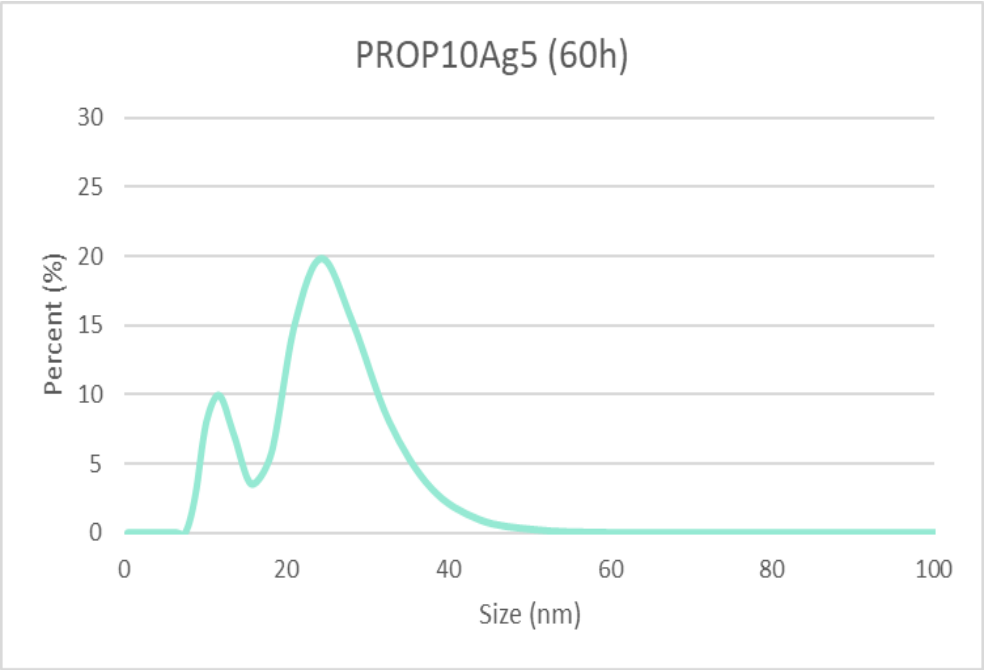


Figura 28 - Gráfico de distribuição de tamanhos da amostra PROP10Ag5 em 60 horas

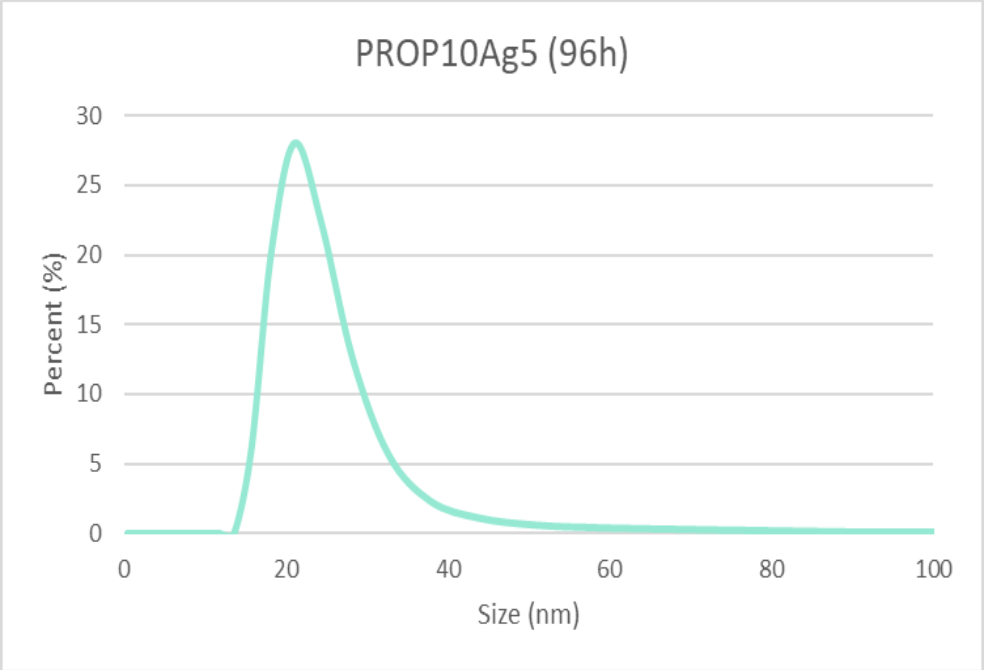


Figura 29 - Gráfico de distribuição de tamanhos da amostra PROP10Ag5 em 96 horas

A amostra com concentração do nitrato de prata de 15 mM, que apresentou a distribuição de tamanhos mais estreita foi a de 96h (Figura 33).

A curva da solução que ficou 24h (Figura 30) em agitação está deslocada para direita em comparação com a de 48h (Figura 31), ou seja, apresenta partículas menores.

As amostras com parâmetros de concentração de nitrato de prata de 15 mM e tempo de incubação de 60h (Figura 32) apresentaram partículas muito pequenas, em torno de 1 nm.

Não há evidências de que o tempo influenciou diretamente o tamanho das partículas das amostras com concentração de $AgNO_3$ de 15 mM.

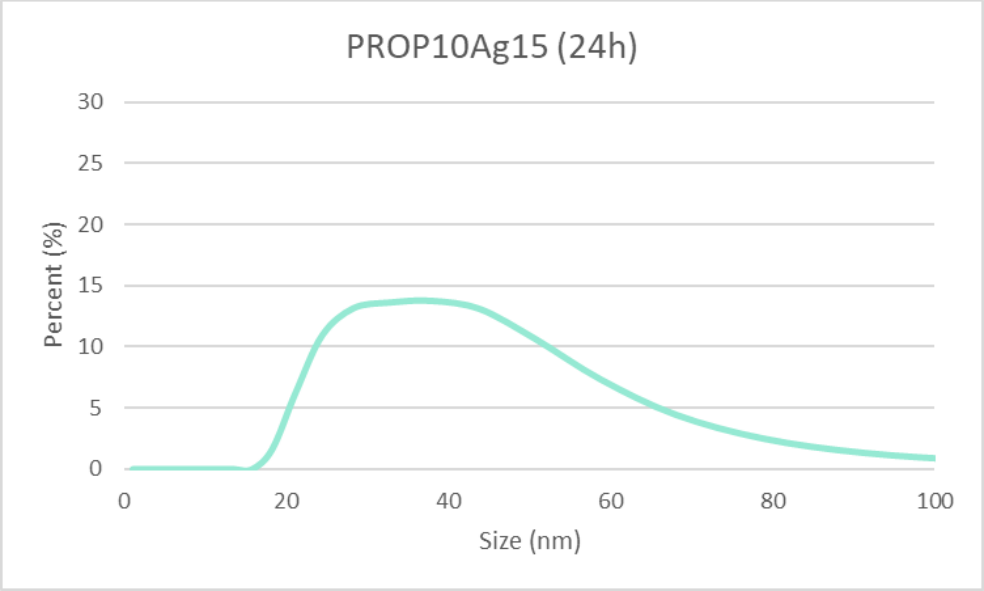


Figura 30 - Gráfico de distribuição de tamanhos da amostra PROP10Ag15 em 24 horas

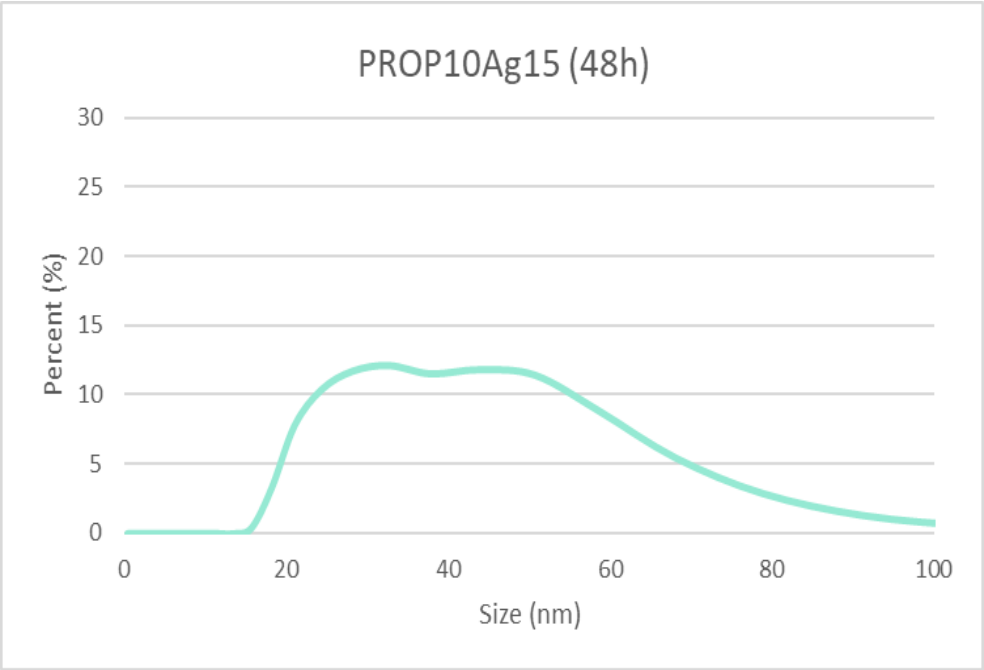


Figura 31 - Gráfico de distribuição de tamanhos da amostra PROP10Ag15 em 48 horas

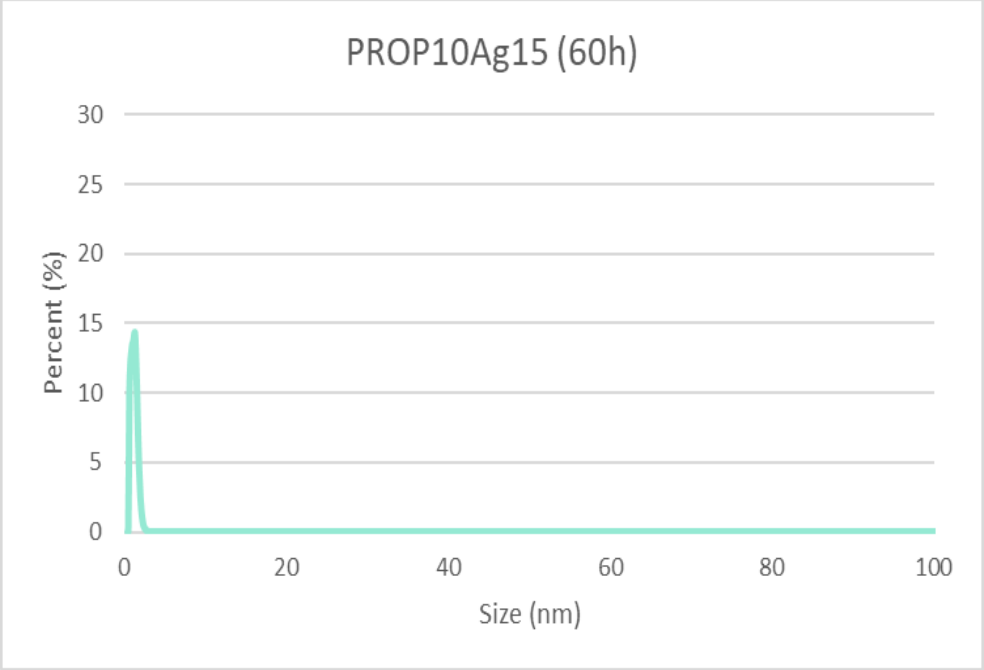


Figura 32 - Gráfico de distribuição de tamanhos da amostra PROP10Ag15 em 60 horas

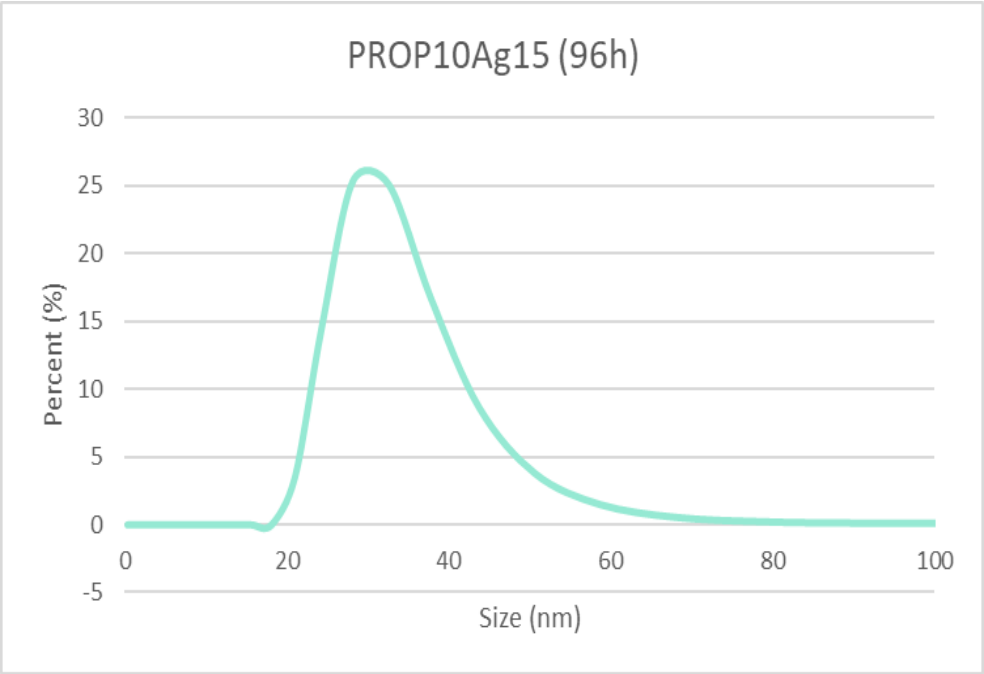


Figura 33 - Gráfico de distribuição de tamanhos da amostra PROP10Ag15 em 96 horas

A grande concentração de nitrato de prata (50 mM) parece ter implicado em um grande aumento no tamanho das partículas como pode ser notado nas Figura 34Figuras 34 a 37, com populações alcançando 800 nm.

Em 24h, ainda houve formação de uma porcentagem relevante de nanopartículas em torno de 80 nm, porém o maior tempo de incubação gerou aglomeração das partículas.

Em 48h e 60h também houve formação de uma porcentagem considerável de nanopartículas, porém conjugada com populações bem maiores (ampla distribuição de tamanhos).

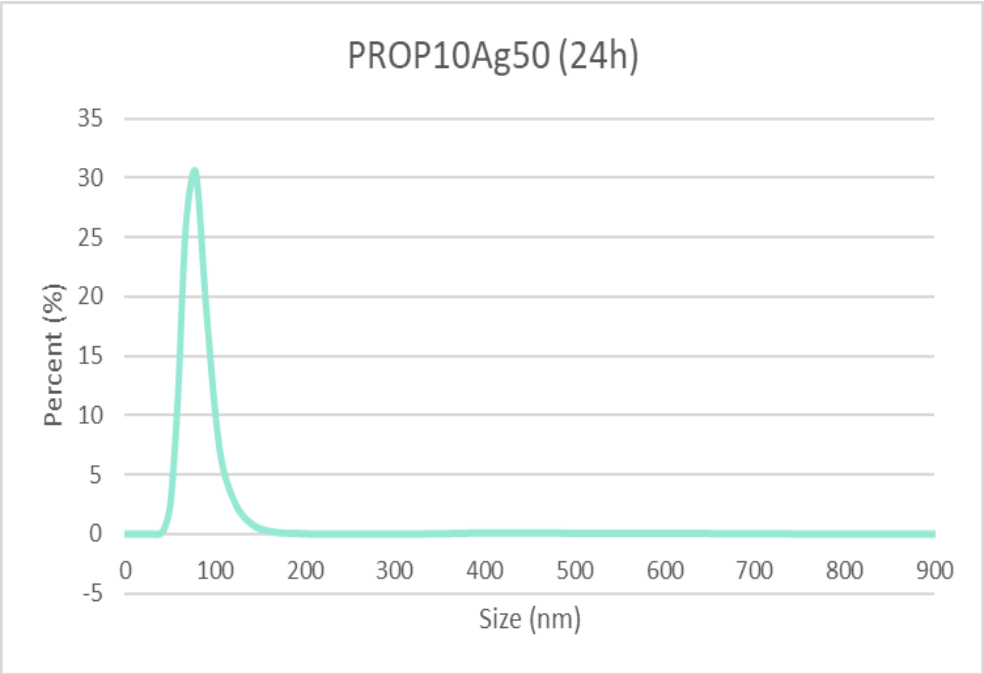


Figura 34 - Gráfico de distribuição de tamanhos da amostra PROP10Ag50 em 24 horas

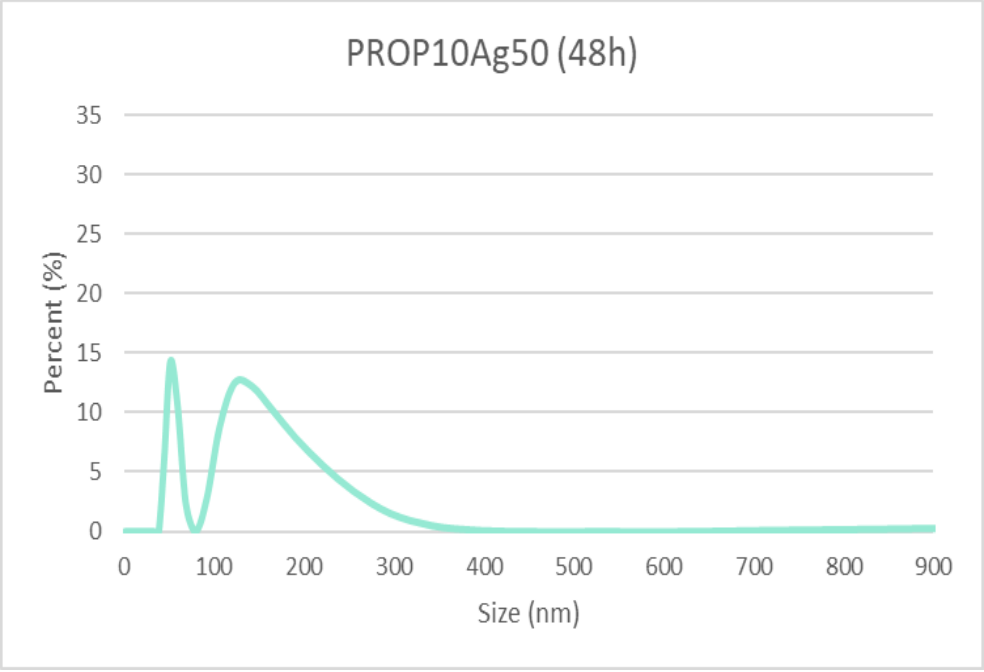


Figura 35 - Gráfico de distribuição de tamanhos da amostra PROP10Ag50 em 48 horas

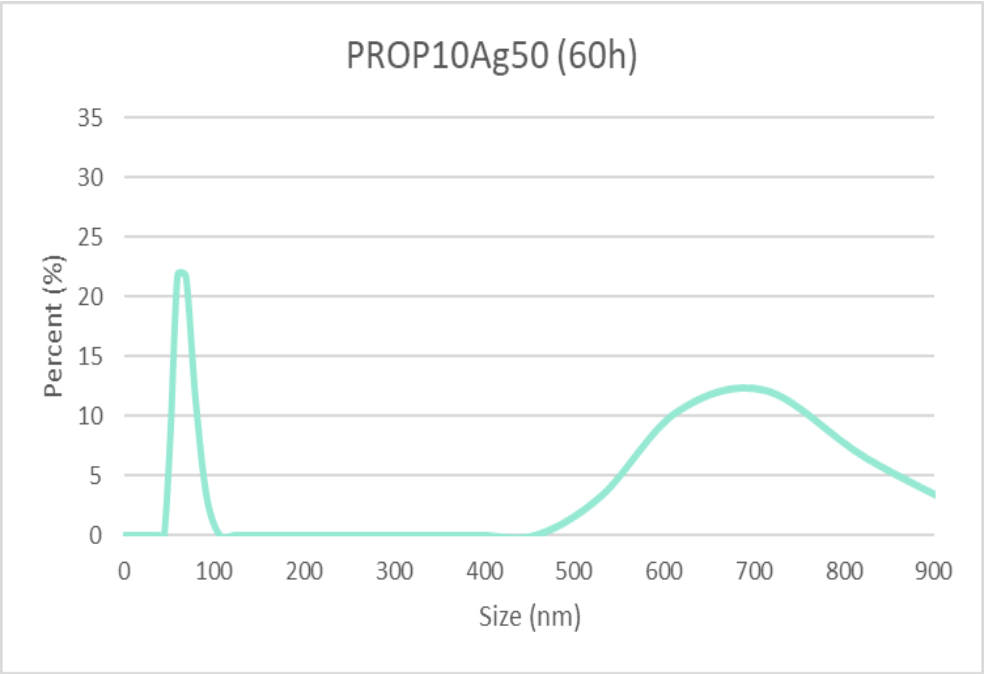


Figura 36 - Gráfico de distribuição de tamanhos da amostra PROP10Ag50 em 60 horas

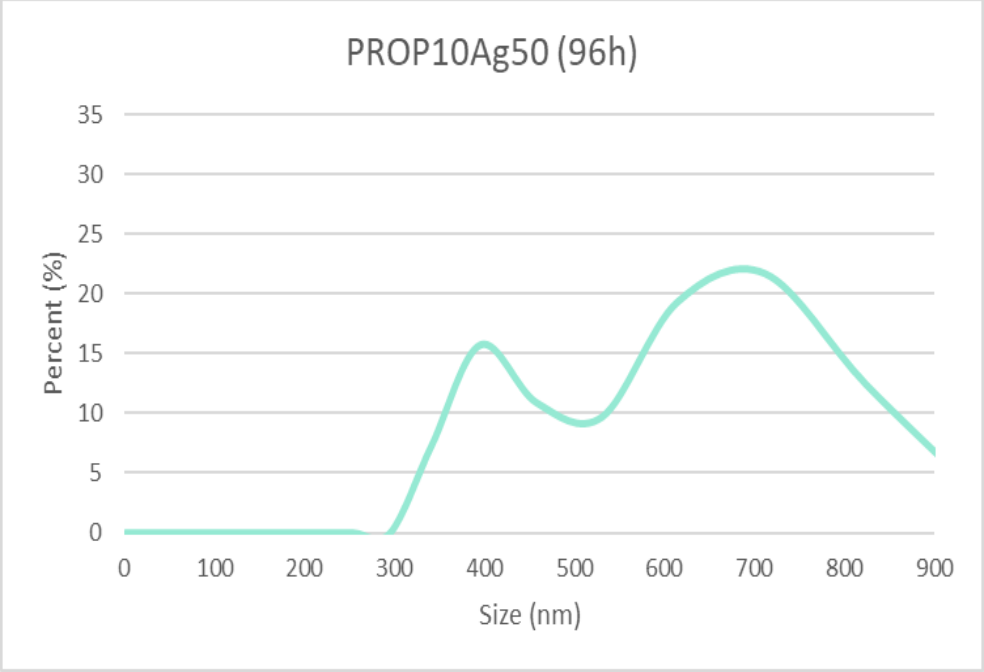


Figura 37 - Gráfico de distribuição de tamanhos da amostra PROP10Ag50 em 96 horas

A (Tabela 3) apresenta as médias de tamanhos de partículas para cada condição e a diferença entre o maior e o menor tamanho de partícula, ou seja, largura da curva de distribuição. Estes valores corroboram com as observações feitas anteriormente em relação aos gráficos de distribuição de tamanho de partículas.

Tabela 3 - Média dos tamanhos de partículas de cada solução e largura da curva de distribuição.

Medidas dos tamanhos das nanopartículas					
Concentração	Tempo	1ª população		2ª população	
		Média dos Tamanhos (nm)	Diferenças entre maior e menor tamanhos (nm)	Média dos Tamanhos (nm)	Diferenças entre maior e menor tamanhos (nm)
PROP10Ag2,5	24h	2,33	4,77	-	-
	48h	2,01	2,89	-	-
	60h	2,01	3,73	-	-
	96h	5,62	5,91	13,54	48,67
PROP10Ag5	24h	21,04	14,67	43,82	313,79
	48h	8,72	7,93	24,36	77,74
	60h	11,70	6,97	24,36	43,08
	96h	21,04	90,01	-	-
PROP10Ag15	24h	37,84	277,13	-	-
	48h	32,67	174,41	-	-
	60h	1,29	2,15	-	-
	96h	32,67	101,36	-	-
PROP10Ag50	24h	78,82	146,28	-	-
	48h	50,75	24,24	122,4	304,82
	60h	58,77	40,53	712,40	496,7
	96h	396,10	189,20	712,40	424,2

5.4. Microscopia de Força Atômica (AFM)

Para a avaliação da morfologia das nanopartículas de prata, foi realizada a caracterização por Microscopia de Força Atômica (AFM).

As amostras analisadas foram: PROP10Ag2,5 (96h) e PROP10Ag5 (96h). É possível observar que as nanopartículas estão com formato esférico com alguns aglomerados como pode ser observado nas Figura 38 e Figura 39

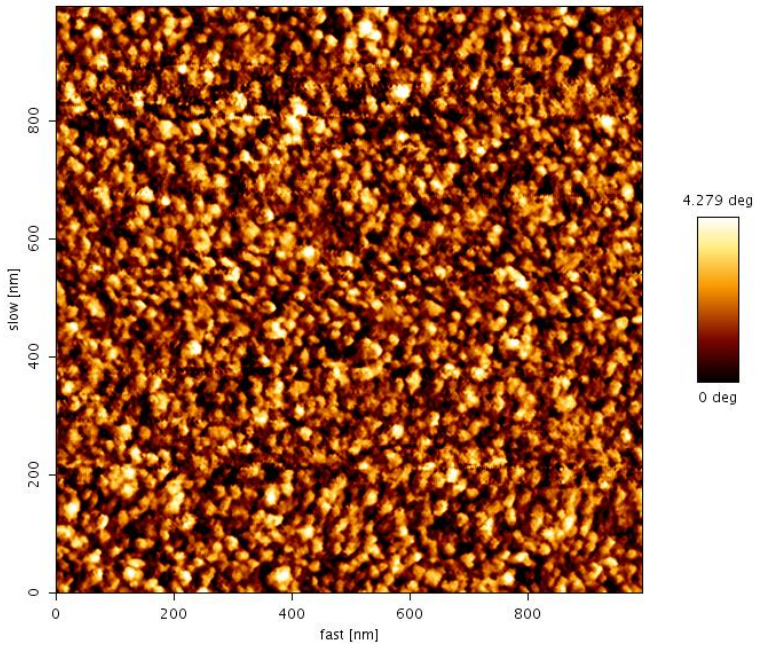


Figura 38 - Caracterização por AFM da amostra PROP10Ag2,5 (96h)

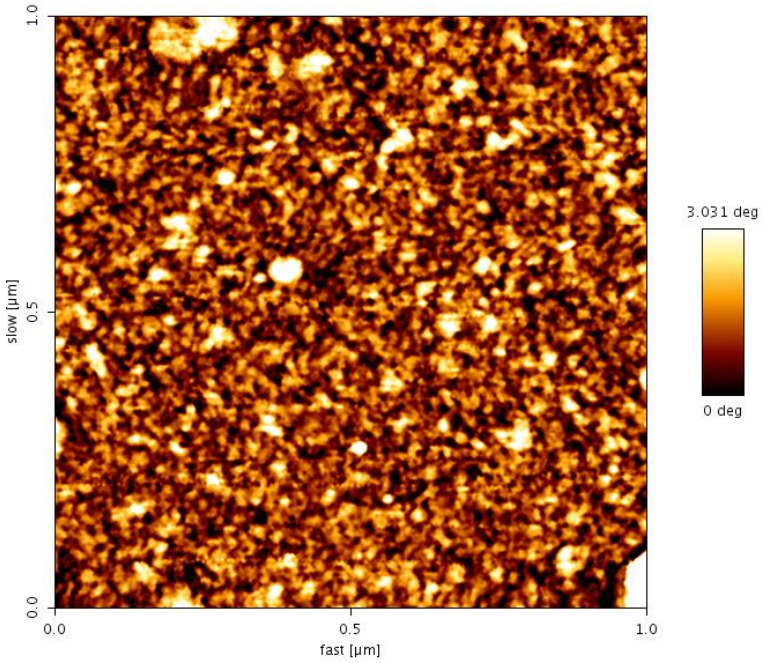


Figura 39 - Caracterização por AFM da amostra PROP10Ag5 (96h)

5.5. Caracterização das Nanopartículas de Prata sintetizadas a partir de Seiva de Sangue de Dragão

Para a síntese das nanopartículas a partir da seiva de sangue de dragão, primeiramente, foi realizada a caracterização visual das amostras (Figura 40)

É possível observar prata aderida na vidraria, indicando que as nanopartículas não mostraram estabilidade. Também era possível observar a olho nu partículas em suspensão na solução, evidenciando aglomeração de partículas com tamanhos fora da escala nanométrica.

Para uma avaliação dos tamanhos, foi realizada a caracterização pelo Analisador de distribuição de tamanho de partículas em escala nanométrica Zetasizer (Figura 40). A distribuição das partículas evidência maiores aglomerações em torno de 500 nm.

Figura 40 - Aspecto visual da amostra da solução de nanopartículas DRAG10Ag5 (96h)

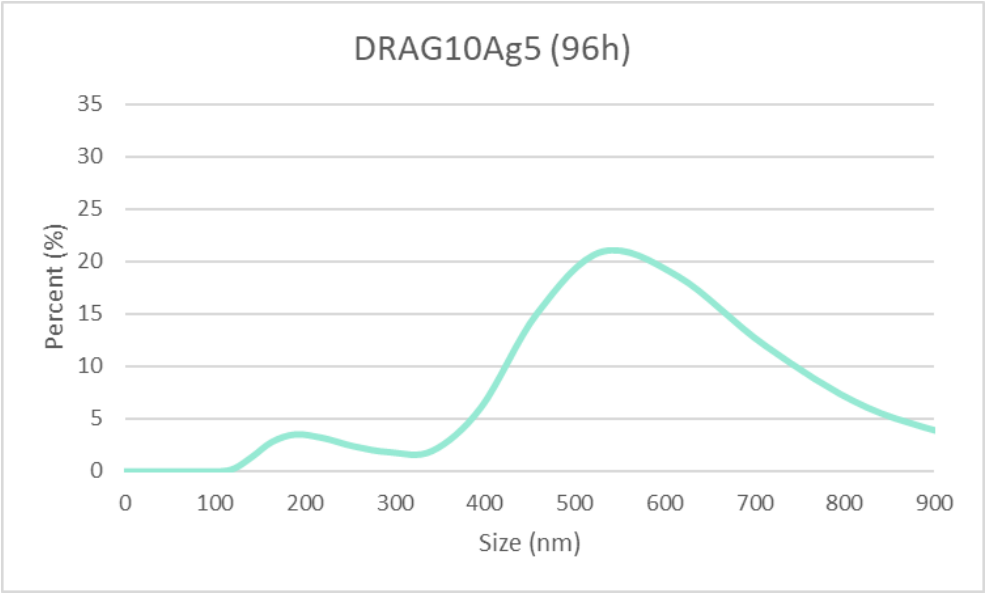


Figura 41 - Gráfico de distribuição de tamanhos da amostra DRAG10Ag5 em 96 horas

Não foi possível a realização de testes biológicos com as nanopartículas fabricadas a partir da seiva de sangue de dragão, pois formou um grumo quando foi adicionado ao meio de cultura.

5.6. Teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA) - Antibiograma

Os testes de sensibilidade a antimicrobianos foram realizados com o extrato de própolis e com a amostra PROP10AG5 (96h). Os diâmetros médios e o desvio padrão dos halos de inibição observados nas placas de ágar semeadas com *S. aureus* sensível (MSSA) e resistente à oxicilina (MRSA) são apresentados na Tabela 4. O cefoxitina (FOX30 – 30 µg fármaco) foi usado como controle. Todas as amostras testadas foram diluídas para a concentração final de 30% (v/v) em água destilada.

Tabela 4 - Diâmetros médios e desvio padrão dos halos de inibição gerados após 24 h, utilizando cepa resistente de Staphylococcus aureus à oxaciclina (MRSA) e cepa sensível de Staphylococcus aureus à oxaciclina (MSSA).

Amostras	Diâmetros dos halos de inibição (cm)	
	MSSA	MRSA
PROP10AG5_96h	1,0 ± 0,0	0,8 ± 0,0
Extrato de própolis	-	-
Cefoxitina	2,7 ± 0,2	-

Os resultados mostram que o extrato de própolis puro não possui ação antimicrobiana em relação a nenhuma das duas cepas de S. aureus testadas. No entanto, na presença das nanopartículas de prata, foi possível observar atividade mesmo contra a cepa resistente. Este resultado é importante, tendo em vista que o *Staphylococcus aureus* é considerado um patógeno humano oportunista e frequentemente está associado a infecções adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar.

A sensibilidade das amostras a *Candida albicans* também foi avaliada. *Candida albicans* é a espécie mais comum do gênero *Candida* a causar infecções invasivas em humanos [25]. Essas infecções estão associadas à alta morbidade e alta mortalidade nos pacientes acometidos. A Figura 42 mostra o resultado do teste após 24 h de ensaio. Nota-se a ausência de halo de inibição em todas as amostras testadas, independente da cepa ser sensível ou resistente a Fluconazol (fármaco utilizado como controle positivo). Portanto, pode-se concluir que, nas concentrações testadas, nem o extrato de própolis nem a amostra PROP10AG5 (96h) produzida seriam eficientes no combate a infecções provocadas por este microrganismo.

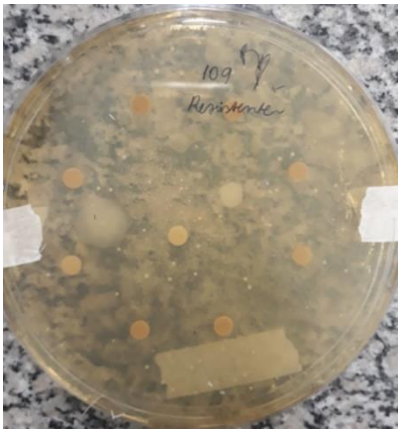
(a) (b) 

Figura 42 - Placas de ágar utilizadas no teste de sensibilidade a antimicrobianos. (a) cepa de Candida albicans sensível a Fluconazol, (b) cepa de Candida albicans resistente a Fluconazol. O disco central das placas foi embebido com Fluconazol, fármaco utilizado com controle positivo

5.7. Ensaio de viabilidade celular

A concentração de amostra capaz de causar a morte de 50% da população de células (CC_{50}) é um parâmetro utilizado para relacionar concentrações específicas à viabilidade celular. De acordo com os resultados obtidos após o fim do ensaio de citotoxicidade, o CC_{50} para o extrato de própolis sozinho foi de 6,4% e para a amostra contendo as nanopartículas PROP10AG5 (96h) foi de 4,5%. Apesar da diminuição do valor de CC_{50} com a associação da própolis com as nanopartículas, esse dado não tem

diferença significativa, como pode ser visto na Figura 44, onde fica evidente a sobreposição das curvas de inibição das amostras.

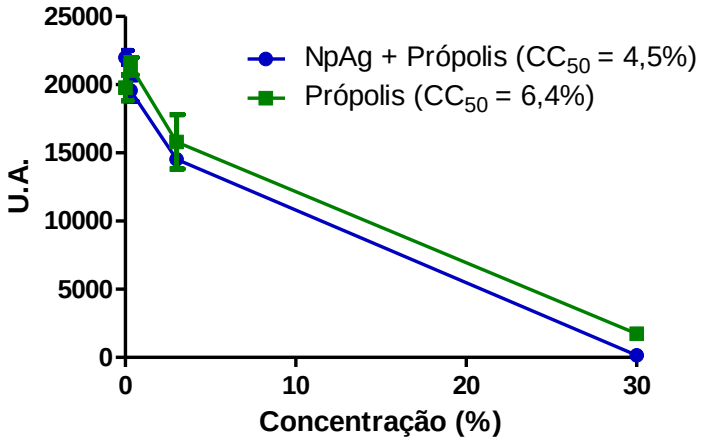


Figura 43 - Avaliação de viabilidade celular em linhagem de queratinócitos humanos tratados com 0,3; 3 e 30% (v/v) de extrato de própolis contendo ou não nanopartículas de prata (PROP10AG5 (96h)).

Desta forma, pode-se concluir que a presença das nanopartículas de prata no extrato de própolis não alterou a toxicidade desse extrato em queratinócitos humanos, sendo um indício da segurança do produto gerado.

6. CONCLUSÃO

Foi possível a fabricação de nanopartículas de prata a partir do extrato de própolis via síntese verde. As caracterizações sugerem que as concentrações de nitrato de prata nas soluções influenciaram diretamente nas propriedades das nanopartículas.

Ao analisar os resultados das caracterizações das soluções contendo 15 mM de nitrato de prata, é possível observar que o tempo de incubação pouco influenciou no tamanho das partículas e nos níveis de absorbância no UV-Vis. O tempo de 60 horas apresentou-se favorável a produção de nanopartículas muito pequenas (<1nm).

A concentração de nitrato de prata de 50 nM não se mostrou benéfico para produção de nanopartículas como exposto pela caracterização visual e corroborado pela não exibição de picos em torno de 420 nm no UV-Vis e pela distribuição dos tamanhos das partículas. Grandes quantidades de $AgNO_3$ geraram grandes aglomerações de partículas.

Os testes biológicos foram realizados apenas com a PROP10Ag5 (96h), já que as amostras DRAG10Ag5 (48h e 96h) formaram grumo ao ser adicionado ao meio de cultura.

A seiva de sangue de dragão, com os parâmetros utilizados, não foi vantajosa para a formação das nanopartículas de prata, que apresentaram grande instabilidade como mostrado na caracterização visual e grandes aglomerações como atestado na análise de distribuição de tamanho de partículas.

O teste de sensilidade a antimicrobianos (TSA), para o patógeno *Staphylococcus aureus,* mostrou que a própolis pura não apresentou atividade antimicrobiana nas cepas testadas, porém as nanopartículas de prata apresentaram ação antimicrobiana contra a cepa resistente. Para o patógeno *Candida albicans,* na concentração testada, a própolis e as nanopartículas não apresentaram ação antimicrobiana.

A partir do ensaio de viabilidade celular, houve indicativos de que o produto é seguro para utilizar em humanos já que não houve alteração de toxicidade ao juntar as nanopartículas de prata com o extrato de própolis.

A utilização do extrato de própolis apresentou-se promissora, pois resultou em partículas na escala nanométrica, esféricas e com ação antimicrobiana contra um patógeno frequentemente associado a infecções hospitalares.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1]. S. P. DESHMUKHA, B, S.M. PATILA, C, S. B. MULLANIA, *et al.* “Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review”, **Materials Science & Engineering C** v. 97, pp. 954-965, 2019.

[2]. AGARWAL, H., NAKARA, A., SHANMUGAM, V. K., “Anti-inflammatory mechanism of various metal and metal oxide nanoparticles synthesized using plant extracts: A review”, **Biomedicine & Pharmacotherapy** v. 109, pp. 2561-2572, 2019.

[3]. DASA, P., GHOSALB, K., JANA, N. K., *et al.* “Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using belladonna mother tincture and its efficacy as a potential antibacterial and anti-inflammatory agent”, **Material Chemistry and Physics** v.228, pp. 310-317, 2019.

[4]. RATNER, BUDDY; HOFFMAN, ALLAN; SCHOEN, FREDERICK; *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine.* 3 ed, Academic Press, 2013.

[5]. JAMKHANDE, P.G., GHULE, N.W., BAMER, A.H., *et al*, “Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications”, **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 53, 101174, 2019.

[6]. SOUZA, T. A. J., SOUZA, L. R. R., FRANCHI, L. P., “Silver nanoparticles: An integrated view of green synthesis methods, transformation in the environment, and toxicity”, **Ecotoxicology and Environmental Safety,** v. 171, pp. 691-700, 2019.

[7]. REN, Y., YANG, H., WANG T., *et al,* “Bio-synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity”, **Material Chemistry and Physics,** v. 235, 121746, 2019

[8]. POBIEGA, K. KRASNIEWSKA, K. GNIEWOSZ, M. “Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review”, **Trends in Food Science & Technology,** v. 83, pp. 53-62, 2019

[9]. OLIVEIRA, R. N., MANCINI, M. C., OLIVEIRA, F. C. S., “FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing”, **Revista Matéria,** v. 21, n.03, pp. 767-779, 2016

[10]. BEHRAVAN, M., PANAHI, A. H., NAGHIZADEH, A., *et al, “*Facile green synthesis of silver nanoparticles using *Berberis vulgaris* leaf ond root aqueous extract and its antibacterial activity”, **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 124, pp. 148-154, 2019

[11]. ARYA, G., KUMARI, R. M., SHARMA, N., *et al,* “Catalytic, antibacterial and antibiofilm efficacy of biosynthesized silver nanoparticles using *Prosopis juliflora* leaf extract along with their wound healing potential”, **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology,** v. 190, pp. 50-58, 2019

[12]. RAJAN, R., CHANDRAN, K., HARPER, S. L., *et al,* “Plant extract synthesized silver nanoparticles: An ongoing source of novel biocompatible materials”, **Industrial Crops and Products,** v. 70, pp. 356-373, 2015

[13]. LAKSHMANAN, G., SATHIYASEELAN, A., KALAICHELVAN, P. T., *et al, “*Plant-mediated synthesis of silver nanoparticles using fruit extract of *Cleome viscosa* L.: Assessment of their antibacterial anticancer activity”, **Karbala Internacional Journal of Modern Science,** v. 4, pp. 61-68, 2018

[14]. RESENDE, R. R., “*Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria – Vol.4”, 1 ed, 2017.*

[15]. ANJUM, S. I., ULLAH, A., KHAN, K. A., *et al, “*Composition and fuctional properties of propolis (bee glue): A review”, **Saudi Journal of Biological Sciences,** 2018

[16]. LUSTOSA, S. R., GALINDO, A. B., NUNES, L. C. C., *et al, "*Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia", **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 18, n. 3, pp.447-474, 2008.

[17]. PEREIRA, A. dos S., SEIXAS, F. R. M. S., AQUINO NETO, F. R. "Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras", **Química Nova,** v. 25, n. 2, pp. 321-326, 2002.

[18]. https://phytoterapica.com.br/site/blog/1001-beneficios-do-sangue-de-dragao

[19]. SILVA, J. A. das N., **Síntese de Nanopartículas de Prata a partir do extrato de *Aloe vera.*** Projeto de Graduação, UFRJ, Duque de Caxias, RJ, Brasil, 2018

[20]. BALLOTTIN, D. P. M., **Caracterização de nanopartículas de prata e sua aplicação na produção de tecidos antimicrobianos.** Tese de D.Sc, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil, 2014

[21]. JINI, D., SHARMILA, S., "Green shyntesis of silver nanoparticles form *Allium cepa* and its *in vitro* antidiabetic activity", **Materials Today: Proceedings,** 2019

[22]. ANTUNES, F. S., DAL'ACQUA, N., BERGMANN, C. P., "Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos", **Estudos Tecnológicos em Engenharia,** v. 9, pp.20-26, 2013

[23]. LIMA, G. G., DEVINE, D., NUGENT, M. J. D., *et al,* "Extraction Method Plays Critical Role in Antibacterial Activity of Propolis-Loded Hydrogels", **Journal of Pharmaceutical Sciences,** 2016

[24]. KHODASHENAS, B., GHORBANI, H. R., "Synthesis of silver nanoparticles with different shapes", **Arabian Journal of Chemistral,** 2015

[25]. VIEIRA, A.J.H.; SANTOS, J.I., "Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina**", Revista Brasileira de Análises Clínica**, 49(3), pp. 235-239, 2017