

Matheus Vinicius de Oliveira Brisola Maciel

**SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
UTILIZANDO ÓLEO ESSENCIAL E APLICAÇÃO EM
NANOFIBRAS OBTIDAS POR ELETROFIAÇÃO**

Florianópolis
2019

Matheus Vinicius de Oliveira Brisola Maciel

**SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
UTILIZANDO ÓLEO ESSENCIAL E APLICAÇÃO EM
NANOFIBRAS OBTIDAS POR ELETROFIAÇÃO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito final para obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto.

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC

Maciel, Matheus Vinicius de Oliveira Brisola
Síntese verde de nanopartículas de prata
utilizando óleo essencial e aplicação em nanofibras
obtidas por eletrofiação / Matheus Vinicius de
Oliveira Brisola Maciel; orientador, Pedro Luiz
Manique Barreto, 2019.
165 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis,
2019.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Nanotecnologia. 3.
Nanopartículas de prata. 4. Óleo essencial. 5.
Nanofibras. I. Barreto, Pedro Luiz Manique. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

**SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
UTILIZANDO ÓLEO ESSENCIAL E APLICAÇÃO EM
NANOFIBRAS OBTIDAS POR ELETROFIAÇÃO**

Por

Matheus Vinicius de Oliveira Brisola Maciel

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 01 de março de 2019

Profa. Dra. Ana Carolina de Oliveira Costa
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto
Orientador (UFSC)

Profa. Dra. Silvia Maria Martelli
Membro (UFGD)

Prof. Dr. Rafael Dutra de Armas
Membro (Centro Universitário Católica /SC)

Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto
Membro (UFSC)

Profa. Dra. Jane Mara Block
Membro (UFSC)

*“Se posso aprender também posso ensinar,
aberto ao novo e nunca cristalizar.”*

Dead Fish

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

Agradeço a minha amada esposa e companheira de trabalho Aline da Rosa, que sempre esteve do meu lado me apoiando, me compreendendo e incentivando, mesmo nos momentos mais difíceis e estressantes. Você foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho e é fundamental para a minha vida, te amo.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Pedro Barreto, pela confiança e amizade em todos os momentos e por todos esses anos nos quais eu pude aprender muito com você.

Agradeço aos meus pais, Elio e Odete, que sempre acreditaram, me apoiaram e me incentivaram, me mostrando sempre o caminho certo. Aos meus irmãos Marília e Mathias, e a Juliana e Luiz, amo muito todos vocês. Também aos meus sogros Vera e Neivaldo e a minha cunhada Andressa, que sempre apoiaram e incentivaram a mim e a Aline. Obrigado a todos por entenderem a minha constante escassez de tempo.

Aos meus amigos e colegas do Labrinto, Aline, Michelle, Cleonice, Carolina, Ana Paula, Daniele, Bianca e Bruna, pelo companheirismo nas análises, discussões e acima de tudo, na vida.

Aos amigos Rafael e Kelly que sempre estiveram presentes apoiando, incentivando e ajudando nas decisões em muitas decisões. Vocês são exemplos que sempre procuro me espelhar.

Aos amigos Cleonice e Michael pela amizade e pelas longas horas de conversas e as muitas ajudas ao longo de todos esses anos, vocês foram muito importantes.

Aos meus amigos professores, Simone, Ariana, Bizzo, Gabriella, Ana Paula e todos os demais amigos que ganhei nessa jornada.

Agradeço ao amigo Welman pela disposição em sempre ajudar e pensar junto comigo na síntese que custava dar certo, muito obrigado.

A Juliana Dreyer pelo fundamental auxílio e suporte na produção das nanofibras, muito obrigado.

A todos os professores, servidores e técnicos do PPGCAL pelo aprendizado e todo o suporte. Em especial ao amigo Sergio pelas boas conversas e conselhos e por todo o serviço prestado.

Aos laboratórios da UFSC, LaCBio, Polissol, LCME (em especial ao Américo Cruz), Lab. de óleos e gorduras, Lab. de Frutas e Hortaliças.

A Católica de Santa Catarina pela estrutura para a realização de alguns experimentos. E aos meus alunos que sempre me fizeram querer ir além.

A banca avaliadora pelo aceite e disposição em dar as suas contribuições para o trabalho. Em especial a professora Silvia Martelli que me ajudou muito no mestrado e contribuiu para o meu crescimento. E para a professora Jane Mara Block, que fez parte de praticamente todas as minhas bancas desde o mestrado até agora. Muito obrigado.

Aos meus amigos Vavo, Johnny e Guilherme por me ajudarem a aliviar o estresse tocando um bom punk/hardcore. Vida longa Marina Radio Clube!!

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e CNPq pelo aporte financeiro ao longo deste período.

A todos muito obrigado, cada um de vocês foi importante para a realização deste trabalho e para o meu crescimento como pessoa e como profissional.

RESUMO

A redução de resíduos químicos potencialmente tóxicos nos processos industriais e laboratoriais, é uma preocupação crescente atrelada à necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias e produtos. E dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar a síntese verde de nanopartículas de prata utilizando óleo essencial como agente redutor e aplicar em nanofibras poliméricas obtidas por eletrofição. Para isto foram selecionados cinco óleos essenciais, sendo eles os óleos de alecrim, cravo, erva de touro, orégano e tomilho, que foram avaliados quanto a sua composição química e testados para a eficiência na redução do AgNO_3 e formação das nanopartículas (AgNPs). Em um primeiro momento foram preparadas amostras com os cinco óleos e avaliadas por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e espectrofotometria no UV-Vis, e o óleo de cravo mostrou melhor desempenho na formação de AgNPs em diferentes pHs (7, 8, 9 e 10), sendo a maior formação observada em pH 8. As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) mostraram variados formatos e tamanhos que ficaram entre 35,5 e 78,0 nm. O óleo de cravo e o seu composto majoritário eugenol foram selecionados para dar sequência ao trabalho e ambos apresentaram desempenho semelhante na síntese de AgNP que foram estáveis em solução por 12 semanas quando avaliadas por UV-Vis e DLS. As AgNPs também foram caracterizadas por análise de espalhamento de Raio X à baixo ângulo (SAXS) onde foi possível confirmar a predominância dos formatos esféricos e obter o tamanho médio na condição real das AgNPs em solução, obtendo valores de 18,6 nm e 22,4 nm para as AgNP-cravo e AgNP-eugenol, respectivamente. As AgNPs também apresentaram potencial inibitório para *Staphylococcus aureus*, sendo bactericida mesmo na concentração mais baixa testada ($40 \mu\text{L.mL}^{-1}$) quando obtidas com o eugenol e $60 \mu\text{L.mL}^{-1}$ quando obtida com óleo de cravo. As AgNPs foram adicionadas em diferentes soluções de PEO (poli óxido de etileno) e zeína em etanol 85 % para obtenção de nanofibras pelo processo de eletrofição. Neste processo, foram obtidas fibras cilíndricas com diâmetros variando de 335,9 a 870,7 nm. A análise de MET auxiliou na identificação das nanopartículas de prata nas fibras e com isso foi possível confirmar a sua presença e a obtenção de nanofibras impregnadas com as AgNPs.

Palavras-chave: Nanotecnologia, *Syzygium aromaticum*, eugenol, poli óxido de etileno, zeína.

ABSTRACT

In industrial and laboratory processes, the reduction of potentially toxic chemical residues is an increasing concern linked to the need to develop new technologies and products. In this context, the goal of the present work was to accomplish the green synthesis of silver nanoparticles using essential oil as a reducing agent and application in polymeric nanofibers obtained by the electrospinning process. There were five essential oils selected, among them rosemary, clove, bull herb, oregano and thyme oils, which were evaluated for their chemical composition and tested for efficiency in reducing AgNO_3 and formation of nanoparticles (AgNPs). The samples prepared with the five oils were evaluated by dynamic light scattering (DLS) and UV-Vis spectrophotometry, therefore the clove essential oil showed better performance in the formation of AgNPs at different pHs (7, 8, 9 and 10), with the highest formation observed at pH 8. The images obtained by transmission electron microscopy (TEM) presented different shapes and sizes between 35.5 and 78.0 nm. Clove oil and its major eugenol compound was selected to follow the work and both showed similar performance in AgNP synthesis that were stable in solution for 12 weeks when evaluated by UV-Vis and DLS. AgNPs were also characterized by X-ray scattering at low angle (SAXS) where it was possible to confirm the predominance of the spherical shapes to obtain the average size in the real condition of AgNPs in solution, obtaining values between 18,6 nm and 22, 4 nm for the AgNP-clove and AgNP-eugenol, respectively. AgNPs also had an inhibitory potential for *Staphylococcus aureus*, being bactericidal even at the lowest concentration tested ($40 \mu\text{L.mL}^{-1}$) when obtained with eugenol and $60 \mu\text{L.mL}^{-1}$ when obtained with clove oil. AgNPs were added in different solutions of PEO (polyethylene oxide) and zein in 85% of ethanol to obtain nanofibers by electrospinning process. In this process, cylindrical fibers with diameters varying from 335.9 to 870.7 nm were obtained. With the TEM analysis assisted in the identification of silver nanoparticles in the fibers it was possible to confirm their presence and the obtaining of nanofibers impregnated with the AgNPs.

Key words: Nanotechnology, *Syzygium aromaticum*, eugenol, polyethylene oxide, zein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração da porcentagem do número de átomos na superfície em relação ao número total de átomos com o aumento do tamanho da nanopartícula (NP).	36
Figura 2. Etapas de formação da nanopartícula metálica passando pela redução, formação do embrião, nucleação e crescimento.	38
Figura 3. Mecanismos de estabilização de nanopartículas metálicas. a) Estabilização eletrostática; b) estabilização estérica; c) estabilização eletroestérica.	40
Figura 4. Estrutura química de compostos majoritários encontrados no tomilho e orégano (timol e carvacrol), alecrim e erva-de-touro (limoneno), palmarosa (geraniol) e cravo (eugenol).	43
Figura 5. Micrografia de uma amostra de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em que; a) é a célula controle (sem nanopartículas de prata); b) e c) amostras que foram previamente tratadas com nanopartículas de prata onde é observado dano na parede celular quando comparado com o controle.	44
Figura 6. Esquema simplificado do aparato para eletrofiação	47
Figura 7. Formação do cone de Taylor, região de transição e região de espalhamento para o processo de eletrofiação.....	47
Figura 8. Influência da tensão superficial, viscosidade, estresse elétrico tangencial e força da gravidade.	50
Figura 9. A, B e C, mostram os três estágios de deformação de uma gota de polivinilpirrolidona (PVP) com o aumento do campo elétrico. D, E e F mostram o mecanismo de efeito das cargas sobre a gota polimérica. ...	51
Figura 10. Estrutura química geral do PEO	53
Figura 11. Representação da banda de SPR para uma nanopartícula de prata obtida por espectrofotometria de UV-Vis. Os parâmetros de formação das nanopartículas são representados pelas linhas azul, vermelha e verde, que representam respectivamente, absorbância máxima (A_{max}), largura da banda à meia altura (FWHH) e comprimento de onda de máxima absorção (λ_{max}).	68
Figura 12. Representação das Bandas de SPR obtidas para as AgNP sintetizadas com diferentes óleos essenciais. a) Cravo; b) Tomilho; c) Orégano; d) Alecrim; e) Erva de Touro, em diferentes pHs.	74

Figura 13. Representação da Banda de SPR obtida por UV-Vis para as AgNP sintetizadas com 1 mL (A) e 2 mL (B) de óleo essencial de cravo diluído (1:170) em acetona.	77
Figura 14. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) para as AgNP sintetizadas com óleo essencial de cravo em diferentes condições de pH. A: pH 7, B: pH 8, C: pH 9, D: pH 10.	79
Figura 15. Histogramas para distribuição de tamanho das AgNP sintetizadas em diferentes pH e imagens do MET. A: AgNP Cravo pH 7. B: AgNP Cravo pH 8. C: AgNP Cravo pH 9. D: AgNP Cravo pH 10.	81
Figura 16. Esquema simplificado para a análise de SAXS.....	97
Figura 17. Bandas de SPR obtidas por espectrometria no UV-Vis....	100
Figura 18. Avaliação da estabilidade em solução das AgNP obtidas com cravo (a) e com eugenol (b) ao longo de 12 semanas	102
Figura 19. Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão e os histogramas de distribuição de tamanho	105
Figura 20. Dados obtidos por SAXS (esferas) e curva de ajustes correspondentes (linha) para AgNP-Cravo (a) e AgNP-Eugenol (b)..	106
Figura 21. Ensaio de atividade bactericida e bacteriostática para AgNP-Cravo e AgNP-Eugenol contra <i>S. aureus</i>	108
Figura 22. Imagem do <i>Professional Electrospinner</i> da Yflow® <i>Nanotechnology Solutions</i> utilizado para obtenção das nanofibras...	118
Figura 23. Deposição das nanofibras em papel alumínio a partir da solução de PEO 1000 kDa (A) e PEO 5000 kDa (B).....	127
Figura 24. Membrana de nanofibra obtida por eletrofição de soluções de Poli (óxido de etileno) (PEO) 1000 kDa (a) e 5000 kDa (b).....	130
Figura 25. Imagens das nanofibras por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para as amostras utilizando PEO 1000 kDa e zeína com ou sem adição de AgNP. Soluções 1, 2, 3 e 4.....	131
Figura 26. Imagens das nanofibras por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para as amostras utilizando PEO 5000 kDa e zeína com ou sem adição de AgNP. Soluções 5, 6, 7 e 8.....	132
Figura 27. Histogramas de distribuição de tamanho das nanofibras obtidas por eletrofição.....	135

Figura 28. Imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão para nanofibras obtidas com PEO 1000 kDa e impregnadas com AgNP 2%	136
Figura 29. Imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão para nanofibras obtidas com PEO 1000 kDa, zeína 10% e impregnadas com AgNP 2%	137
Figura 30. Imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão para nanofibras obtidas com PEO 5000 kDa e impregnadas com AgNP 2%	137
Figura 31. Imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão para nanofibras obtidas com PEO 5000 kDa, zeína 10% e impregnadas com AgNP 2%	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de aplicações de nanopartículas metálicas em sistemas para embalagens testados contra microrganismos <i>in vitro</i>	55
Tabela 2. Matriz experimental com as variáveis utilizadas para otimizar os parâmetros de síntese da nanopartículas de prata	69
Tabela 3. Compostos majoritários dos óleos essenciais de cravo, tomilho, orégano, alecrim e erva-de-touro, obtidos por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/MS)	71
Tabela 4. Resultados do teste de comparação de médias (Teste de Tukey) para a AgNP Cravo. Letras iguais na mesma coluna indica que não existe diferença significativa ao nível de confiança de 95%.	76
Tabela 5. Resultados para o tamanho médio de partícula obtido por análise das imagens do MET e por DLS	80
Tabela 6. Valores do tamanho médio (Z-ave), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (ζ) das AgNP sintetizadas com óleo essencial de cravo, para verificar a estabilidade ao longo do tempo. Leituras em 0, 30 e 60 dias.	82
Tabela 7. Resultados da análise de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) ao longo de 12 semanas para AgNP-Cravo e AgNP-Eugenol .	103
Tabela 8. Concentrações testadas para as soluções poliméricas no processo de eletrofição utilizando solvente etanol 85 % (v/v)	123
Tabela 9. Índice de Consistência, índice de comportamento, tensão superficial e condutividade elétrica das diferentes soluções poliméricas formadoras de fibras.....	124
Tabela 10. Soluções poliméricas testadas para a eletrofição	127
Tabela 11. Resultados dos testes para os parâmetros aplicados na eletrofição das diferentes soluções	129
Tabela 12. Resultados para os diâmetros médios das nanofibras e seus parâmetros de eletrofição	134

LISTA DE ABREVIATURAS

2 _{ab}	Diâmetro inicial do jato
2 _{ac}	Diâmetro posterior
AA%	Porcentagem de atividade antioxidante
AgNP	Nanopartículas de prata
A _{max}	Absorbância máxima
ANOVA	Análise de Variância
CG/EM massas	Cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas
cm	Centímetros
Da	Dalton
DLS	<i>Dynamic light Scatering</i> / Espalhamento de luz dinâmico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EC50%	Concentração efetiva para inibir 50% do radical livre
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EVOH	Etileno Vinil Álcool
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
FT-IR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
FWHH	Full width at half height/ Largura da banda à meia altura
IP	Índice de polidispersão
kDa	Quilo Dalton
Kg/ha	Quilograma por hectare
kV	Quilovolts
LME	Limite de migração específica
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mL	Mililitros
N/m	Newton por metro
nm	Nanometro
OH	Hidroxila
PCL	Policaprolactona
PCS	Photon correlation spectroscopy/espectroscopia de correlação de fótons
PEO	Poli (óxido de etileno)
PVP	Polivinilpirrolidona
SAXS	<i>Small-angle X-ray scattering</i> /espalhamento de raio X a baixo ângulo
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por mililitro
UV-Vis	Ultravioleta visível

Z-ave	Tamanho médio de partícula
μg	Micrograma
μm	Micrometros
ζ	Potencial zeta
λ_{max}	Comprimento de onda máximo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivos geral	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
1. NANOTECNOLOGIA.....	33
2. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	36
2.1 Síntese de nanopartículas metálicas	36
3. ÓLEOS ESSENCIAIS COMO AGENTES REDUTORES DE METAIS.....	41
4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE PARTÍCULAS METÁLICAS DE PRATA	43
5. NANOFIBRAS OBTIDAS POR ELETROFIAÇÃO	46
6. EMBALAGENS PARA ALIMENTOS	52
6.1 Poli (óxido de etileno) (PEO).....	53
6.2 Zeína.....	54
6.3 Uso de nanopartículas de prata em embalagens para alimentos.....	54
CAPÍTULO 2: SELEÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO AGENTES REDUTORES NA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	59
RESUMO.....	61
1. INTRODUÇÃO	63
2. MATERIAIS E MÉTODOS	65
2.1 Materiais.....	65
2.2 Extração e seleção dos óleos essenciais	65
2.3 Síntese de nanopartículas de prata utilizando óleo essencial.....	65

2.4 Caracterização dos óleos essenciais para a síntese de nanopartículas de prata.....	66
2.5 Espectroscopia UV-Vis.....	67
2.6 Delineamento experimental	68
2.7 Determinação do tamanho de partícula (Z-ave), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (ζ).....	69
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
3.1 Composição dos óleos essenciais.....	71
3.2 Síntese das nanopartículas de prata utilizando óleo essencial.....	73
3.3 Otimização das condições da síntese de AgNP utilizando óleo essencial de cravo	75
3.4 Microscopia Eletrônica de transmissão (MET).....	78
3.5 Estudo da estabilidade das AgNP	82
4. CONCLUSÃO	85
CAPITULO 3: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTICULAS DE PRATA UTILIZANDO ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO E EUGENOL COMO AGENTES REDUTORES E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	87
RESUMO.....	89
1. INTRODUÇÃO	91
2. MATERIAIS E MÉTODOS	93
2.1 Materiais.....	93
2.2 Atividade Antioxidante	93
2.2.1 Ensaio de Inibição do Radical DPPH	93
2.2.2 Ensaio de inibição do radical ABTS ^{•+}	94
2.3 Síntese de AgNP utilizando óleo essencial de cravo e eugenol	94
2.4 Formação de AgNP e estabilidade	95
2.5 Análise de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	95

2.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	96
2.7 Espalhamento de Raio-X a Baixo Ângulo (SAXS).....	96
2.8 Ensaio de determinação da atividade antimicrobiana	97
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
3.1 Ensaio de inibição dos radicais DPPH e ABTS• ⁺	99
3.2 Síntese de AgNP utilizando óleo essencial de cravo e eugenol.....	100
3.3 Análise de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).....	102
3.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	104
3.5 Espalhamento de Raio-X a Baixo Ângulo (SAXS).....	105
3.6 Ensaio de determinação da atividade antimicrobiana	107
4. CONCLUSÃO	109
CAPITULO 4: PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS IMPREGNADAS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA	111
RESUMO.....	113
1. INTRODUÇÃO	115
2. MATERIAIS E MÉTODOS	117
2.1 Materiais.....	117
2.2 Preparo das soluções poliméricas	117
2.3 Preparo das nanofibras por eletrofição	117
2.4 Caracterização das soluções poliméricas.....	119
2.4.1 Parâmetros reológicos	119
2.4.2 Tensão superficial	119
2.4.3 Condutividade elétrica das soluções poliméricas	119
2.5 Caracterização das nanofibras	120
2.5.1 Morfologia e distribuição de tamanho das nanofibras.....	120
2.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	120

2.5.3 Análises estatísticas.....	121
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	123
3.1 Testes preliminares para produção das nanofibras.....	123
3.1.1 Preparo das soluções poliméricas.....	123
3.1.2 Parâmetros das soluções poliméricas	124
3.1.3 Eletrofição.....	126
3.1.4 Morfologia das nanofibras	129
3.1.5 Distribuição de tamanho das nanofibras	133
3.1.6 Avaliação da presença das AgNP nas nanofibras	136
4. CONCLUSÃO	139
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	141
REFERÊNCIAS.....	143

1. INTRODUÇÃO

A função principal de uma embalagem, em especial uma embalagem de alimentos, é a proteção do produto contra fatores como a luz, umidade, ar, agentes microbianos e outros que possam interferir e prejudicar a qualidade destes produtos. Porém, a garantia de transporte seguro, acondicionamento adequado e conveniência para o consumidor, são primordiais para o exigente mercado. Dessa forma, cada vez mais os produtos que apresentam benefícios e conveniências tanto para a indústria como para os consumidores finais, são os que recebem mais destaque. Neste contexto, as embalagens ativas apresentam grande crescimento e destaque com tecnologias que podem reduzir ou até eliminar problemas relacionados a deterioração dos alimentos, como o crescimento de microrganismos ou alterações químicas causadas pela oxidação, e consequentemente, aumentar a vida de prateleira destes produtos (MIHINDUKULASURIYA & LIM, 2014; OTONI et al. 2016). O conceito de embalagem ativa traz tecnologias nas quais o material da embalagem interage com os alimentos visando benefícios e apresentando papel ativo no combate a agentes deletérios (OTONI et al. 2016).

Entre as aplicações e finalidades das embalagens ativas, estão aquelas com atividade antimicrobiana, que inibem ou retardam o crescimento microbiano aumentando a preservação da qualidade do alimento. As propriedades antimicrobianas da maioria dos materiais de embalagens estão baseadas na migração de substâncias ativas da embalagem para o alimento e/ou para o *headspace*, exercendo, então, a sua ação (NERIN et al. 2016).

Um problema recentemente posto à tona por pesquisadores é a grande resistência a antibióticos que microrganismos estão adquirindo com o uso comum dos mesmos (LIU et al. 2015). Com isto a questão da importância da descoberta e aplicação de novos agentes antimicrobianos é destacada não só na área médica, mas em todas as áreas, incluindo a de alimentos. E neste panorama, os nanomateriais podem ser uma alternativa eficaz para esta questão. Estes materiais em escala nanométrica apresentam uma maior área superficial em relação ao volume, quando comparadas a materiais em escala micrométrica ou maior, e propriedades químicas e físicas únicas que atraem cada vez mais a atenção da comunidade científica.

As nanopartículas metálicas, em especial as de metais nobres, como ouro, cobre e prata são aplicadas para uma grande variedade de áreas como medicina, farmacêutica e de alimentos (CASTELLANO et al., 2007 KOTAKADI et al., 2015). As nanopartículas de prata recebem

destaque na aplicação como agentes antimicrobianos por agredirem a parede celular da bactéria impedindo a respiração celular e, conseqüentemente, a sua replicação. Os estudos com as nanopartículas de prata são amplos e descritos por vários autores (CASTELLANO et al., 2007; PAL, TAK & SONG, 2007; KOTAKADI et al., 2015). Porém, a síntese destas partículas se dá muitas vezes pelo uso de agentes redutores como o borohidreto de sódio, a hidrazina e alguns álcoois, que podem apresentar toxicidade e assim, limitar o uso, por exemplo, em aplicações alimentícias. Contudo, o conceito da chamada química “verde”, que pode ser definida como a criação, o desenvolvimento e a aplicação de produtos e processos que visam reduzir ou eliminar o uso ou a geração de produtos químicos que podem ser nocivos à saúde humana e ambiental (CORREA, 2009), pode ser aplicado e a seleção de materiais biodegradáveis, livres de solventes e biocompatíveis, pode ser uma alternativa para a obtenção de nanopartículas “verdes” e possibilitar sua maior aplicação. Assim, o uso de extratos de plantas, óleos essenciais e outros produtos capazes de reduzir os sais de prata em solução para obtenção de nanopartículas pode ser uma alternativa viável. Além disso, a combinação de tecnologias pode potencializar a aplicação, aliando as propriedades características de cada material para um efeito benéfico sinérgico.

Dentro deste contexto, o intento do presente trabalho foi realizar a síntese verde de nanopartículas de prata utilizando óleo essencial como agente redutor e estabilizante e caracterização físico-química e antimicrobiana dessas nanopartículas para posteriormente adicioná-las em soluções poliméricas para obtenção de nanofibras pelo processo de eletrofiação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos geral

Realizar a síntese verde de nanopartículas de prata utilizando óleos essenciais como agentes redutores e aplicar em nanofibras poliméricas obtidas por eletrofição.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a eficiência de diferentes óleos essenciais na redução da prata para obtenção de nanopartículas;
- Caracterizar as nanopartículas obtidas quanto ao tamanho, dispersão de tamanho, estabilidade e morfologia;
- Determinar a atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata obtidas;
- Produzir nanofibras poliméricas pela técnica de eletrofição e impregnar com nanopartículas de prata;
- Caracterizar as nanofibras quanto a distribuição de tamanho, morfologia e propriedades físico-química;

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. NANOTECNOLOGIA

Nanotecnologia é o termo utilizado para a manipulação de materiais ou estruturas em escala nanométrica, isto é, 10^{-9} m = 1 nm. Geralmente estes materiais devem apresentar dimensões entre 1 nm e 100 nm (HANDFORD et al., 2014; GALLOCCHIO, BELLUCO & RICCI, 2015). Com o avanço da ciência e tecnologia, em particular os avanços na nanociência, tais materiais e sistemas ganham cada vez mais destaque, interesse e aplicabilidade em diversas áreas da ciência dos alimentos incluindo a agricultura, processamento de alimentos, nutrição, biossegurança alimentar e embalagens (ARAÚJO et al. 2013; AGRAWAL & RATHORE, 2014; ROSSI et al. 2014; CHELLARAM et al. 2014; HANDFORD et al. 2015; DASGUPTA et al. 2015). Os estudos com materiais em escala nanométrica passaram a ganhar importância significativa nos últimos anos e todo o campo de conhecimento da nanociência foi fortalecido pelo crescimento das pesquisas acerca da manipulação, aplicação, benefícios e malefícios destes materiais. Assim, muitas questões vieram à tona e chamaram a atenção para o grande número de possibilidades de aplicações destes materiais na melhoria de produtos e processos na área médica, esportiva, ambiental, farmacêutica, cosmética, mecânica, têxtil e de alimentos (HANDFORD et al. 2014).

Nos alimentos, que por séculos são consumidos, a presença de compostos em escala nanométrica sempre ocorreu de forma natural em produtos de origem vegetal e animal, como por exemplo, o DNA (2,5 nm), os principais componentes do leite, como as micelas de caseína, proteínas do soro do leite e a lactose com dimensões que podem variar de 0,5 nm a 500 nm, estruturas organizadas de músculos em carnes e peixes, entre outros exemplos. Entretanto, hoje em dia, com a melhoria do conhecimento da estrutura e função dos nanomateriais, tanto que ocorrem naturalmente como os que podem ser adicionados aos alimentos, é possível conduzir novas aplicações para melhorar esses produtos, bem como, desenvolver produtos totalmente novos (MAGNUSON, JONAITIS & CARD, 2011). Dentro desta premissa, a nanotecnologia oferece oportunidades para a indústria de alimentos e agrícola e várias aplicações podem ser encontradas em diferentes fases da cadeia produtiva de alimentos, desde o campo até o produto final. De acordo com o estudo publicado pelo *European Food Safety Authority* (EFSA) em 2014, a lista de aplicações na agricultura, alimentação humana e animal, hoje e futuramente, podem incluir a agricultura, com nanocápsulas para a liberação mais eficiente de pesticidas, fertilizantes e outros agroquímicos, nanomateriais para detecção de patógenos em plantas e animais, na alimentação humana e

animal, com nanocápsulas para melhorar a dispersão, a biodisponibilidade e a absorção de nutrientes, nanoencapsulados para intensificar cor e sabor, nanotubos e nanopartículas como agentes gelificantes para melhorar a viscosidade, nanopartículas para ligação seletiva e remoção de patógenos da alimentação humana e animal, em embalagens de alimentos com nanopartículas para detectar microrganismos patogênicos de alimentos, nanosensores biodegradáveis para monitorar a temperatura e umidade no armazenamento, nanofilmes e nanofibras para atuar como materiais de barreira e evitar a deterioração e ação do oxigênio, nanopartículas para revestimento de superfícies antimicrobianas e antifúngicas, suplementos alimentares, como suspensões de nanopartículas antimicrobiana, antioxidante e de liberação alvo de nutracêuticos (RIKILT & JRC, 2014).

Saharan e colaboradores (2015) estudaram a eficiência da atividade antifúngica de nanopartículas de quitosana e cobre e a influência no crescimento de tomateiros. O estudo destacou o efeito sobre a germinação das sementes de tomate promovido pelas nanopartículas, além da inibição de 70,5% e 73,5% do crescimento do micélio e 61,5% e 83,0% do crescimento de esporos dos fungos *Alternaria solani* e *Fusarium oxysporum*, respectivamente, quando aplicado nas plantas uma solução de nanopartículas na concentração de 0,12% (m/v). O efeito herbicida e genotóxico de nanopartículas de policaprolactona (PCL) carregadas com o herbicida Atrazina, foram avaliados por Pereira e colaboradores (2014). Neste caso, as nanopartículas de PCL carregadas com atrazina mostraram maior eficiência no combate da planta alvo (*Brassica sp.*) quando aplicadas à uma concentração de 2,5 kg/ha (quilogramas por hectare) em comparação com o herbicida livre. Também houve a redução da genotoxicidade do herbicida encapsulado em relação ao herbicida livre o que indica maior segurança do seu uso na agricultura, segundo os mesmos autores.

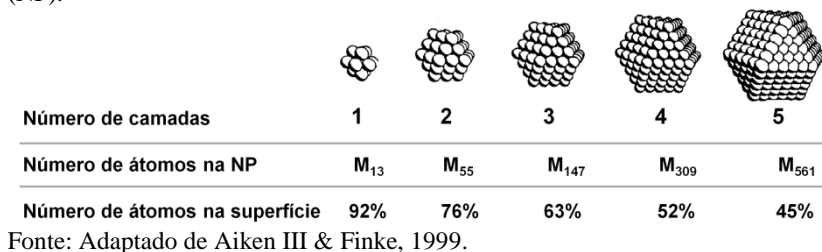
Em estudo conduzido por Krivorotova e colaboradores (2016) a nisina composto que apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e que frequentemente é utilizado para conservar alimentos, foi encapsulada com pectina de alta e baixa metoxilação afim de proteger este composto da interação com o alimento promovendo maior estabilidade durante o processamento e armazenamento. Ainda neste contexto, da Rosa e colaboradores (2015) produziram nanopartículas de zeína carregadas com monoterpenos fenólicos (timol e carvacrol) compostos majoritários dos óleos essenciais de tomilho e orégano. Novamente, as nanopartículas produzidas mostraram inibição

contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, bactérias Gram-positivas e estabilidade ao longo de 90 dias de armazenamento a 6 °C e 20 °C.

Em revisão publicada recentemente por Gómez e colaboradores (2016) estes abordam a utilização da nanocelulose como agente estabilizante ou emulsificante em alimentos como molhos para salada, coberturas para bolos, sopas, sobremesas, entre outros, melhorando as características sensoriais e organolépticas destes produtos, também o uso como ingrediente funcional como substituto de gordura em alimentos de baixa caloria, além de ser considerada uma fibra dietética benéfica para o organismo humano, auxiliando no trânsito intestinal e podendo reduzir o risco de câncer dessa natureza e doenças relacionadas. O uso como material de embalagem para alimentos também é abordado ressaltando a alta capacidade de barreira da nanocelulose contra o oxigênio, onde estudo relata que filmes de nanocelulose de $21 \pm 1 \mu\text{m}$ de espessura apresentaram permeabilidade de $17 \pm 1 \text{ mL m}^{-2}$ por dia, valor que mostra competitividade em relação a outros polímeros sintéticos como o álcool vinil etilênico (EVOH) ($3 - 5 \text{ mL m}^{-2}$ por dia) de aproximadamente a mesma espessura. As aplicações da nanotecnologia estão diretamente ligadas às propriedades únicas destes materiais, que por sua vez, estão relacionadas com as suas dimensões.

A ampla superfície de contato destes materiais provê alta reatividade e interação, porém, as características físico-químicas, tais como forma, composição, carga e solubilidade podem mudar o seu comportamento, assim todos os aspectos devem ser levados em consideração no âmbito de aplicação (GALLOCCCHIO, BELLUCO & RICCI, 2015). No caso de materiais metálicos nanoparticulados existe um maior número de átomos presentes na superfície e que, por sua vez, estão em um ambiente diferente dos átomos presentes no interior. Assim, os átomos da superfície da partícula possuem número menor de átomos ao seu redor, o que diminuí a estabilidade deste e os deixam mais susceptíveis às interações químicas, contribuindo para a reatividade desses materiais. Dessa forma, as partículas com menor tamanho apresentam, em alguns casos, maior número de átomos na superfície do que no interior e o contrário poderá ocorrer quando o tamanho da partícula é maior, por exemplo, uma partícula esférica de 1nm apresenta mais de 75% de átomos na superfície, enquanto que quando esta tem 20 nm de diâmetro esse número é reduzido para 0,5% dos átomos presentes na superfície. Podemos observar outros exemplos na Figura 1.

Figura 1. Ilustração da porcentagem do número de átomos na superfície em relação ao número total de átomos com o aumento do tamanho da nanopartícula (NP).



2. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Há muitos anos que as pesquisas com nanopartículas metálicas vêm crescendo consideravelmente e o início desse crescimento se deu a partir da pesquisa pioneira de Michael Faraday no século XIX, que reduziu em solução aquosa, um sal de ouro (Au) utilizando fósforo em dissulfeto de carbono, obtendo uma solução aquosa de cor rubi com nanopartículas de Au dispersas (BRUST et al. 1994). A partir dessa pesquisa o número de trabalhos com nanopartículas metálicas aumentou de forma significativa. Hoje em dia, uma série de técnicas está disponível, sendo capaz de obter soluções coloidais com partículas em escala nanométrica com tamanho e forma controlados e estreita faixa de distribuição de tamanho (AN et al. 2012). A aplicação de nanopartículas metálicas é ampla e envolve desde a utilização em componentes eletrônicos até o uso como agente antimicrobiano e antioxidante, estando estas propriedades únicas atribuídas especialmente ao tamanho reduzido desses materiais.

Muitos trabalhos recentes avaliaram diferentes sínteses, agentes redutores, estabilizantes e aplicações como, por exemplo, a determinação de traços de nitrito em conservas utilizando eletrodo nanocompósito de nanopartículas de óxido de zinco e platina eletrodepositadas em nanotubos de carbono (ZHANG et al. 2015), ou o uso de nanopartículas de cobre com quitosana para promoção do crescimento de tomateiros e ação antifúngica (SAHARAN, et al. 2015).

2.1 Síntese de nanopartículas metálicas

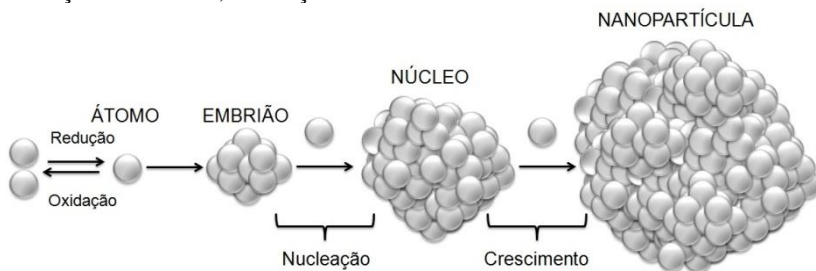
A síntese de nanopartículas metálicas, especialmente de prata e ouro, ocorre por métodos físicos, *top Down* e químicos, *bottom*

Up. Métodos físicos geralmente envolvem a deposição do metal, onde este é evaporado e depositado em um substrato apropriado, também pode ocorrer por processos mecânicos como a pulverização, em que os aglomerados metálicos são subdivididos, ou seja, ocorre a decomposição de um aglomerado metálico para a subdivisão em partículas menores. Porém, os métodos químicos são os mais comuns, e baseiam-se na redução de sais metálicos ou íons metálicos em solução aquosa, esta reação forma primeiramente átomos que por seguinte se agregam formando partículas (nanopartículas). É uma reação relativamente simples que produz partículas com formato quase esférico em sua grande maioria (ZHANG & NOGUEZ, 2008). Um dos fatores de principal importância na reação é a escolha do tipo de agente redutor. Muitos agentes redutores diferentes são utilizados como o hidrogênio (H_2), lignina, β -D-glicose (monossacarídeo), citrato de sódio e o borohidreto de sódio ($NaBH_4$) (EISING et al. 2011; SHERVANI & YAMAMOTO, 2011; LU & AN, 2015; LEE & OH, 2015; HU & HSIEH, 2016). Porém, alguns destes compostos podem apresentar grande toxicidade, o que limita a sua aplicação em algumas áreas, como na indústria de alimentos ou aplicações médicas. Assim, para evitar o uso de substâncias tóxicas, novos métodos são desenvolvidos utilizando substâncias não tóxicas e biodegradáveis como agentes de redução e estabilização de nanopartículas metálicas (CAKIC et al. 2016).

Na síntese química o sal metálico é primeiramente reduzido em solução aquosa e os átomos metálicos formados, insolúveis no líquido, se agregam gradualmente em um processo reversível, formando os embriões. Estes, por sua vez, são espécies dinâmicas envolvidas num processo de dissociação-condensação contínuo, e como tal, ainda representam uma solução verdadeira. Os embriões de tamanho menor são mais estáveis e assim os de tamanho intermediário dissociam-se ou se aglomeram para atingir este estado favorável de estabilidade. À medida que novos átomos são gerados, os embriões atingem tamanho crítico e separam-se da solução, processo chamado de nucleação. O número e o tamanho dos núcleos dependem dos parâmetros da reação de precipitação, tais como a concentração de soluto, o potencial redox da reação de redução, a temperatura, a natureza e a concentração do agente tensoativo, viscosidade do solvente e da tensão superficial. Em seguida, novos átomos de metal vão se adicionando aos núcleos em um processo chamado de crescimento, formando partículas maiores e mais estáveis com tamanho em escala nanométrica. No entanto, apesar de muito mais estáveis do que os núcleos, as nanopartículas metálicas ainda possuem alta energia superficial e enquanto o processo de difusão é lento no

crescimento das partículas primárias, o processo de agregação pode ser rápido e o tamanho pode chegar a vários micrometros, o que formaria um pó cristalino insolúvel formado por ligação metal-metal (GOIA & MATIJEVIĆ, 1998). A Figura 2, mostra de forma ilustrativa o processo de formação da partícula passando pela redução, formação do embrião, nucleação e crescimento.

Figura 2. Etapas de formação da nanopartícula metálica passando pela redução, formação do embrião, nucleação e crescimento.



Fonte: O autor.

Nanopartículas de metais nobres, tal como, ouro, cobre e prata, apresentam uma interessante característica de atividade óptica que os respectivos átomos e aglomerados não apresentam, e assim, essas nanopartículas exibem espectro de absorção na região do visível. Este espectro de absorção é chamado de banda de ressonância de plasmon de superfície, ou banda SPR, do inglês *Surface Plasmon Resonance*. A sua origem é atribuída à oscilação coletiva dos elétrons de condução, quando estes são induzidos por um campo de radiação eletromagnética de luz e é dependente de fatores como tamanho e forma que podem afetar as propriedades dielétricas do metal e conseqüentemente, alterar a posição da banda SPR (LINK & EL-SAYED, 1999; SÖNNICHSEN et al. 2002; EISING et al. 2011; RAJ et al. 2016).

Com a constante evolução da ciência e preocupação cada vez maior com o meio ambiente e saúde, a chamada química verde, que visa processos limpos e não poluentes, também é aplicada à síntese de nanopartículas metálicas. Os agentes redutores, que por sua vez podem apresentar grande toxicidade e gerar resíduos, são substituídos em diversas pesquisas por compostos naturais, não tóxicos e biodegradáveis. Entre os diversos compostos utilizados como agentes redutores “limpos” podemos citar os carboidratos, polímeros naturais, extratos de plantas e óleos essenciais. Estes compostos além de serem de origem natural e

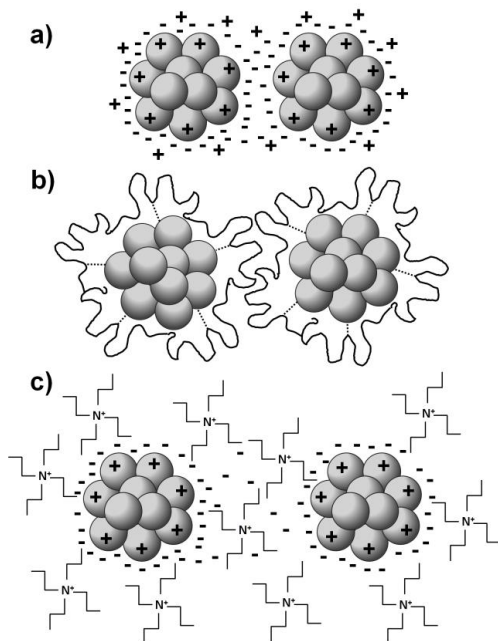
renovável, não agridem o meio ambiente e em alguns casos podem dispensar o uso de estabilizantes, pois funcionam como agentes redutores e de estabilização (VILAS, PHILIP & MATHEW, 2014; DAVID et al. 2014; RAJ et al. 2016; JADHAV et al. 2016).

A pequena distância entre partículas e as forças de atração de Van der Waals, fazem com que as partículas formadas se agreguem. Para isso empregam-se agentes estabilizantes que compensem tais forças, limitando ou evitando o crescimento por agregação e ocorrência de grandes cristais (EISING et al. 2011). A estabilização de partículas metálicas é importante para que o processo de crescimento seja limitado. Normalmente três são os mecanismos envolvidos na estabilização dessas partículas: estabilização estérica, eletrostática e eletrostérica. Em termos gerais a estabilização pode ser dividida em dois grandes grupos, a estabilização por carga (eletrostática) e a estabilização estérica. A estabilização eletrostérica é uma combinação destas duas (eletrostática e estérica). Na estabilização eletrostática, a adsorção de cátions e ânions na superfície metálica forma uma dupla camada elétrica em torno da partícula, isso resulta em uma repulsão coulombiana entre as partículas. Caso o potencial elétrico da dupla camada seja alto o suficiente, ocasionará a repulsão eletrostática evitando que as partículas se aglomerem. As soluções coloidais estabilizadas por repulsão eletrostática são muito sensíveis a qualquer fenômeno capaz de romper a dupla camada como a força iônica e o movimento térmico (ROUCOUX, SCHULZ & PATIN, 2002; HANG et al. 2009; HIERREZUELO et al. 2010; LODEIRO et al. 2016), como mostra a Figura 3a.

A estabilização estérica (Figura 3b) é ocasionada pela adsorção de macromoléculas orgânicas e polímeros na superfície metálica formando uma camada protetora, chamada barreira estérica, esta barreira é que irá impedir a aglomeração das partículas em solução. Neste caso, as moléculas no espaço interpartículas e adsorvidas na superfície metálica, irão restringir o movimento diminuindo a entropia e aumentando a energia livre. Outro efeito para este tipo de estabilização é um aumento local da concentração das macromoléculas adsorvidas em que as camadas protetoras das partículas começam se interpenetrar. Isto resulta na repulsão osmótica, onde o solvente irá estabelecer o equilíbrio diluindo as macromoléculas e, portanto, ocasionará a separação das partículas. Quando a estabilização eletrostática e estérica são combinadas, temos a estabilização eletrostérica (Figura 3c). Este tipo de estabilização é geralmente fornecido pelo uso de surfactantes iônicos. Estes compostos possuem um grupo de cabeça polar capaz de gerar uma dupla camada elétrica e uma cadeia lateral lipofílica capaz de fornecer repulsão estérica

(ROUCOUX, SCHULZ & PATIN, 2002; HANG et al. 2009; HIERREZUELO et al. 2010; LODEIRO et al. 2016).

Figura 3. Mecanismos de estabilização de nanopartículas metálicas. a) Estabilização eletrostática; b) estabilização estérica; c) estabilização eletroestérica.



Fonte: O autor, adaptado de Roucoux, Schilz & Patin, 2002; Hierrezuelo et al. 2010.

3. ÓLEOS ESSENCIAIS COMO AGENTES REDUTORES DE METAIS

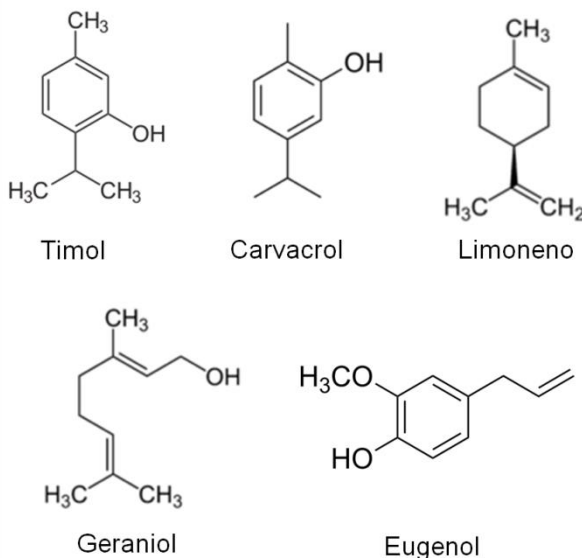
A síntese verde de nanopartículas de metais tem recebido maior atenção e com crescente interesse em relação ao meio ambiente e alterações indesejáveis que podem ser ocasionadas por agentes químicos sintéticos agressivos. Neste contexto, os fitoquímicos são uma alternativa viável e renovável para a substituição dos agentes redutores frequentemente utilizados. Entre essas substâncias “amigas do meio ambiente” podemos citar os óleos aromáticos ou óleos essenciais (VILAS, PHILIP & MATHEW, 2014). Uma variedade de plantas e seus extratos e óleos essenciais são encontrados na literatura sendo utilizados para redução do sal de prata para nanopartículas de prata. Entre elas a *Myristica fragrans*, *Ammannia baccifera*, *Butea monosperma*, *Tagetes erecta*, *Curcuma pseudomontana*, *Piper betle* e até o óleo de girassol (VILAS, PHILIP & MATHEW, 2014; THAKORE et al. 2014; MUNIYAPPAN & NAGARAJAN, 2014; PATRA et al. 2015; PADALIA, MOTERIYA & CHANDA, 2015; JADHAV et al. 2016; ANKAMWAR et al. 2016). Segundo Jadhav e colaboradores, a seleção da planta e seus componentes como agentes redutores na síntese verde de nanopartículas dependerão, da presença de antioxidantes na sua composição. Estes compostos incluem polifenóis, fenóis, flavonoides, carboidratos, terpenos, taninos e também de proteínas, alguns deles presentes em altas concentrações nos óleos essenciais obtidos a partir dessas plantas. Tais compostos são capazes de reduzir a prata de Ag^+ para Ag^0 formando assim a prata coloidal em solução. No caso dos polifenóis e fenóis esta característica se dá pela presença do grupo hidroxila da cadeia, onde o OH^- em solução reage com a Ag^+ reduzindo e estabilizando-a para Ag^0 (AN et al. 2012; VILAS, PHILIP & MATHEW, 2014).

Vilas, Philip e Mathew (2014) utilizaram óleo essencial de noz-moscada (*Myristica fragrans*) na síntese de nanopartículas de prata e confirmaram a eficácia destes na síntese, pelas análises de Espectrofotometria no UV-Vis, Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e Difração de raio-X, na qual as partículas apresentaram tamanho entre 12 e 26 nm quando analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Em outro estudo Singh e colaboradores (2010) atribuíram a presença do composto majoritário do cravo, o eugenol, como responsável pela redução do sal de prata e de ouro. Neste caso, o eugenol devido a presença do grupo $-OH$, libera um próton e muda a sua forma iônica e a capacidade de redução é potencializada.

Assim, os autores afirmam que foram capazes de obter nanopartículas de prata e de ouro utilizando o extrato de cravo-da-índia. Mais tarde Vijayaraghavan e colaboradores (2012) também utilizaram extrato aquoso do cravo-da-índia na síntese de partículas metálicas e obtiveram diâmetros entre 20 nm e 149 nm para nanopartículas de prata de formato esférico, no qual foi atribuída à presença de proteínas da composição do cravo (*C. zeylanicum*) e seus grupos amina livre ou resíduo de cisteína, a capacidade de ligação com o metal proporcionando estabilização. Nestes dois casos os extratos apresentam em sua composição o eugenol, que é responsável pela redução da prata e que é também o principal constituinte do óleo essencial do cravo, dessa forma sugerimos a mesma atividade para o óleo essencial.

Os óleos essenciais de plantas apresentam propriedades biológicas importantes e que despertam grande interesse da comunidade científica principalmente nas aplicações da química verde. Entre estas propriedades pode-se destacar a antioxidante, antiinflamatória, sedativa, uso como fragrâncias e como agente antimicrobiano. Uma variedade imensa de plantas são fontes de óleos aromáticos em diferentes concentrações e presentes em diferentes partes do vegetal como nas folhas, flores, sementes, caules, cascas e frutos, e cada óleo essencial apresenta uma composição química particular (BURTI et al. 2004; BAKKALI et al. 2008). Os compostos majoritários presentes nos óleos são terpenos, fenóis, alcoóis, compostos aromáticos entre outros e normalmente um composto se destaca na composição do óleo essencial como, por exemplo, o timol no tomilho, o carvacrol no orégano, eugenol no cravo, o limoneno presente no alecrim e na erva de touro e também em cítricos como laranja e limão (BADI et al. 2004; BAKKALI et al. 2008; OCAÑA-FUENTES et al. 2010; MITTAL, CHISTI & BANERJEE, 2013; BAJPAI & KUMARI, 2015). Esses são os compostos majoritários dos óleos essenciais, sendo que cada óleo pode apresentar um ou mais desses compostos em sua composição. As estruturas químicas apresentadas por estes compostos podem ser variadas e alguns exemplos são mostrados na Figura 4.

Figura 4. Estrutura química de compostos majoritários encontrados no tomilho e orégano (timol e carvacrol), alecrim e erva-de-touro (limoneno), palmarosa (geraniol) e cravo (eugenol).



Fonte: O autor, adaptado de Bakkali et al. 2008.

Como esses apresentam muitas vezes atividade antimicrobiana e antioxidante, como citado anteriormente, em um meio reacional reduzem a prata formando nanopartículas nas quais também apresentam atividade antioxidante e antimicrobiana. Dessa forma é sugerido que em conjunto é possível ter ação sinérgica desses dois agentes (óleo essencial e nanopartículas) potencializando a ação biológica, o que justifica as pesquisas nesta direção.

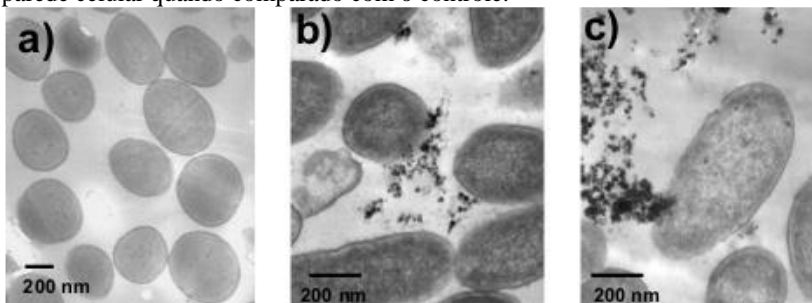
4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE PARTÍCULAS METÁLICAS DE PRATA

Devido à grande incidência de doenças infecciosas e o surgimento de bactérias altamente resistentes a antibióticos, as empresas farmacêuticas e os pesquisadores trabalham constantemente à procura de novos agentes antimicrobianos (RAI, YADAV & GADE, 2009). Recentemente Liu e colaboradores (2015) publicaram na revista científica *The Lancet Infectious Diseases* um estudo que identificou em animais e

pacientes na China, bactérias resistentes à colistina, que é tido como um dos mais potentes antibióticos. Os cientistas chamam atenção para o fato e alertam que esse pode ser o início de uma era “pós-antibióticos” ou ainda chamam de “Apocalipse antibiótico”, pois infecções comuns voltariam a causar mortes.

No cenário atual, materiais em escala nanométrica surgiram como novos agentes antimicrobianos devido à sua elevada área superficial em relação ao volume e às propriedades químicas e físicas únicas (RAI, YADAV & GADE, 2009). Metais nobres como o cobre, o ouro e a prata são aplicados para vários fins, em áreas da biomedicina, indústria farmacêutica e de alimentos e a prata em especial é conhecida por sua toxicidade para microrganismos. Esta toxicidade depende das condições de preparo, tamanho e forma da partícula, pois diferentes propriedades físicas e químicas estão estreitamente relacionadas com estes fatores (KOTAKADI et al. 2015). Os íons metálicos presentes na superfície das nanopartículas de prata reagem com grupos tiol e sulfidril presentes na proteína da membrana celular das bactérias. Essa interação reduz a permeabilidade da membrana celular e causa danos na respiração celular e conseqüentemente, a morte celular. A prata também se liga ao DNA e RNA bacteriano, ocasionando a desnaturação e inibindo a replicação (CASTELLANO et al. 2007; KOTAKADI et al. 2015), a Figura 5 a seguir mostra a ação de nanopartículas em células de

Figura 5. Micrografia de uma amostra de *Pseudomonas aeruginosa* em que; a) é a célula controle (sem nanopartículas de prata); b) e c) amostras que foram previamente tratadas com nanopartículas de prata onde é observado dano na parede celular quando comparado com o controle.



Fonte: Morones et al. 2005.

O tamanho das nanopartículas irá influenciar na área de contato com as células bacterianas, assim, partículas menores apresentam maior interação do que partículas maiores e, conseqüentemente, a ação

antimicrobiana será mais elevada. Outro aspecto importante é a forma da partícula e segundo Pal, Tak e Song (2007) partículas com formato triangular apresentaram inibição quase total do crescimento bacteriano (100 µL de suspensão de *E. coli* 10⁷ UFC/mL), sendo necessário 1 µg para isto, enquanto que para partículas com formato esférico foram necessários 12,5 µg e para partículas com formato de haste e para AgNO₃ foram necessários 50 µg e 100 µg, respectivamente, mostrando que o formato pode influenciar diretamente na sua ação.

Além de atividade antimicrobiana, as AgNPs também apresentam capacidade antioxidante, ou seja, capacidade de sequestrar radicais livres como por exemplo o 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). A atividade antioxidante de nanopartículas de prata é apresentada em diversos estudos. Saravanakumar e colaboradores (2015) relataram porcentagem de inibição do radical DPPH de 51% para uma concentração de 200 µg/mL de AgNP sintetizada com extrato vegetal de *Cassia tora*. Resultado semelhante foi encontrado por Kharat e Mendhulkar (2016) no qual 200 µg/mL de nanopartículas de prata, também sintetizadas com extrato vegetal (*Elephantopus Scaber* L. ou popular língua-de-vaca) foram capazes de inibir 71,23% do radical DPPH.

Vilas, Philip e Mathew (2016) realizaram a síntese verde de nanopartículas de prata utilizando óleo essencial de hortelã (*Coleus aromaticus*), os pesquisadores avaliaram o potencial antioxidante no qual encontraram valores inferiores de EC50% (concentração efetiva para inibir 50% do radical) para as AgNPs quando comparado com um antioxidante padrão, demonstrando maior potencial antioxidante. No caso, quando testado o potencial de inibição contra o radical peróxido de hidrogênio (H₂O₂) as partículas apresentaram valores para EC50% de 12,5 µL e 25,78 µL (amostras com diferentes condições de síntese), contra 44,89 µL para o padrão antioxidante ácido ascórbico. Quando a capacidade de inibir o radical superóxido foi testada, novamente as AgNPs mostraram maior efetividade apresentando valores de 31,39 µL e 36,49 µL para o EC50%, enquanto para o padrão ácido ascórbico o valor foi de 37,20 µL. Estes resultados mostram que as nanopartículas de prata também podem exibir potencial antioxidante, o que pode ser um efeito benéfico em algumas aplicações.

A atividade biológica das nanopartículas de prata é bastante discutida e comprovada entre pesquisadores pelo mundo e novas formas de obtenção utilizando agentes não agressivos ao meio ambiente ganham cada vez mais destaque. Além disso, a resistência a antibióticos desenvolvida pelos microrganismos pode ser superada com o uso de nanopartículas de prata justificando o grande interesse atual para estas

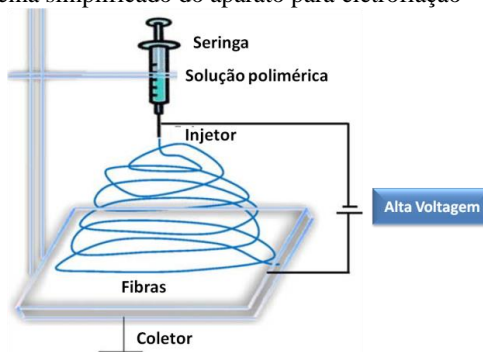
aplicações, pois o dano à membrana celular dos microrganismos exercido pelas nanopartículas, seria um dano, além de químico como já descrito, também físico, pela presença das mesmas na membrana interferindo na permeabilidade da mesma e conseqüentemente, na respiração celular, dificultando ou impossibilitando que estes organismos desenvolvam mecanismos de defesa (RAI et al. 2015).

5. NANOFIBRAS OBTIDAS POR ELETROFIAÇÃO

As nanofibras, assim como o grande campo da nanotecnologia, atualmente despertam grande interesse por apresentarem características como excelente porosidade, grande superfície de contato e processo relativamente simples de obtenção. Além disso, as nanofibras apresentam capacidade de incorporação de fármacos, compostos bioativos e partículas metálicas, desta forma a combinação das nanofibras com estes compostos, por exemplo, nanopartículas de prata, pode viabilizar a aplicação como material com propriedades antimicrobianas (LIU et al. 2015). Um grande número de aplicações é encontrado atualmente e inclui áreas como a biomedicina, farmacêutica, tratamento de água, ambiental, engenharia têxtil, materiais antimicrobianos, antifúngicos entre outros. (RANJBAR-MOHAMMADI & BAHRAMI, 2016; HAMORI et al. 2016; WANJALE et al. 2016; VERAS et al. 2016; CHAÚQUE et al. 2016).

Um dos processos mais comuns de obtenção das nanofibras é por Eletrofiação (*Electrospinning*, do inglês), conhecido por sua relativa simplicidade e facilidade para obter fibras contínuas e com diâmetro em escala nanométrica utilizando polímeros biodegradáveis, biocompatíveis e que podem ser aplicados para sistemas de entrega e liberação controlada, encapsulação, compostos para embalagens ativas e também podem introduzir diferentes texturas e notas sensoriais aos alimentos (OKUTAN, TERZI & ALTAY, 2014; GHORANI & TUCKER, 2015). Basicamente o processo de eletrofiação consiste no preparo de uma solução do polímero no qual pode ser adicionado o composto ativo de interesse, esta solução é injetada com auxílio de uma seringa por um sistema de injeção controlado no qual uma alta tensão é aplicada na ponta da agulha injetora ocasionando a formação de um jato que por sua vez é projetado por influência do campo elétrico até um coletor aterrado. Isto ocorre quando o campo elétrico aplicado atinge um valor crítico e as forças repulsivas elétricas são maiores do que a tensão superficial da solução polimérica (BHARDWAJ & KUNDU, 2010). O esquema simplificado para a eletrofiação pode ser visto na Figura 6.

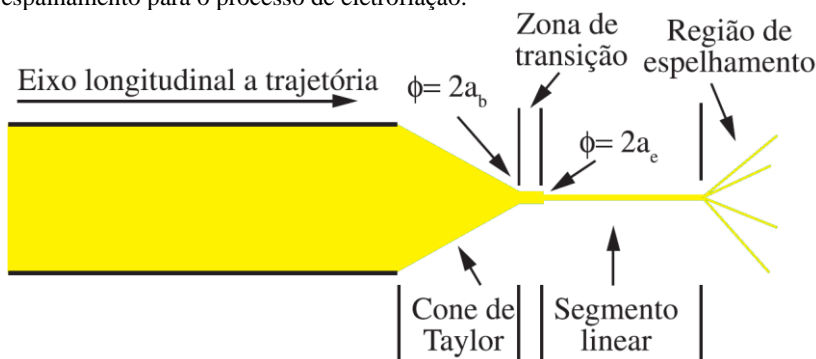
Figura 6. Esquema simplificado do aparato para eletrofiiação



Fonte: Adaptado de Bhardwaj & Kundu, 2010.

Quando a gota da solução polimérica na ponta da agulha é submetida a um aumento do potencial elétrico aplicado ocorre um estiramento da mesma até que subitamente esta assume o formato aproximado de um cone, este então é chamado de cone de Taylor, isto foi observado e descrito primeiramente por Taylor em 1969 (TAYLOR, 1969; COSTA et al. 2012). A partir do cone de Taylor é observada uma zona de transição, uma região linear ou ainda segmento linear e posteriormente a região de espalhamento das fibras como pode ser observado na Figura 7.

Figura 7. Formação do cone de Taylor, região de transição e região de espalhamento para o processo de eletrofiiação.



Fonte: Adaptado de Costa e colaboradores, 2012.

Na Figura 7 observa-se uma região de transição onde o fluido apresenta um jato com diâmetro inicial ($2a_b$) superior ao da região seguinte devido

à baixa tensão de estiramento, no segmento linear o jato se encontra pré-estirado e ocorre a diminuição do seu diâmetro ($2a_e$) devido a um significativo estiramento. A elevada tensão longitudinal na qual a solução polimérica é submetida leva a alterações na geometria do jato gerando assim uma região de instabilidade devida à flexão, esta região é representada na figura acima pela região de espalhamento (FENG, 2002; COSTA et al., 2002).

Muitos fatores podem influenciar no processo de eletrofição e nas características das fibras obtidas e, conseqüentemente, na aplicação das mesmas. Entre esses fatores estão incluídos os parâmetros da solução como, por exemplo, a concentração, viscosidade, condutividade elétrica, a tensão superficial, e propriedades dielétricas, estes fatores estão associados às propriedades físico-químicas do polímero e interação solvente/polímero. Os parâmetros do processo, no qual se enquadram a distância de trabalho, que se refere à distância entre a ponta da agulha e o coletor, velocidade ou fluxo de injeção, voltagem aplicada e também a natureza do coletor. E por fim os parâmetros ambientais que estão relacionados à temperatura e umidade relativa do ar (BHARDWAJ & KUNDU, 2010; COSTA et al. 2012; OKUTAN, TERZI & ALTAY, 2014).

Nos parâmetros da solução a concentração do polímero, que está associada à viscosidade, é de importância fundamental no processo de eletrofição. A concentração será determinante para que a solução seja ou não eletrofiada, ao passo que, uma concentração ótima (máxima) é fundamental para obtenção de fibras regulares, lisas e sem contas (grânulos) enquanto que um mínimo de concentração é necessário para a formação das fibras, de forma geral com o aumento da concentração da solução polimérica também aumenta o diâmetro das fibras (BHARDWAJ & KUNDU, 2010; OKUTAN, TERZI & ALTAY, 2014). Quando a concentração da solução é muito baixa o grau de emaranhamento das fibras também é baixo o que ocasionará formação de *spray* por espalhamento eletrostático, ao invés de eletrofiar. Neste caso gotas esféricas são observadas ou mesmo fibras com grande número de contas (COSTA et al. 2012).

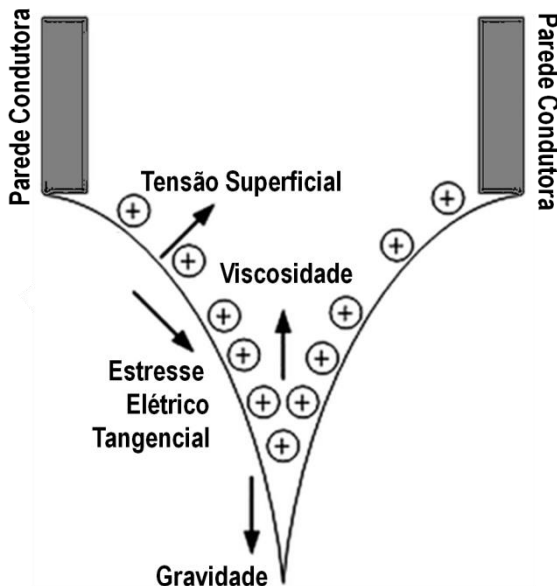
A tensão superficial, por sua vez, está associada à formação do cone de Taylor, pois quando as forças eletrostáticas conseguem ultrapassar a tensão superficial ocorre a formação do mesmo e o processo de eletrofição é iniciado. Assim, as forças de coesão entre as moléculas do líquido são as responsáveis pela tensão superficial, que empurram estas moléculas para dentro do líquido resultando na diminuição da superfície de contato na interface líquido/ar. Esta força geralmente é

medida como força por unidade de comprimento (N/m) (GARG & BOWLIN, 2011). Se as forças de coesão, e conseqüentemente a tensão superficial, forem muito altas, a formação do cone de Taylor será dificultada podendo causar descontinuidade e instabilidade do jato e aumentando a possibilidade de aparecimento de fibras com bolhas e contas. Porém a tensão superficial muito baixa também não é favorável e neste caso pode resultar em aumento do diâmetro da fibra (COSTA et al. 2012; BHARDWAJ & KUNDU, 2010). Em relação à condutividade elétrica da solução, esta deve ser mínima para que o processo de eletrofiação aconteça, pois se a solução não apresentar condutividade o processo de eletrofiação não acontecerá, uma vez que a eletrofiação requer transferência de carga da ponta da agulha metálica para a gota (HAIDER, HAIDER & KANG, 2015). A condutividade elétrica em geral pode ser aumentada com a adição de um sal, o que resulta em maior mobilidade dos íons em solução. Assim, essas cargas são orientadas com aplicação do campo elétrico externo e a gota sofre maior alongamento, reduzindo o diâmetro das fibras. O processo também é favorecido pela adição de nanopartículas metálicas ou nanotubo de carbono à solução produzindo nanofibras sem contas e mais uniformes pelo aumento da condutividade elétrica proporcionada (COSTA et al. 2012).

O controle dos parâmetros do processo também é muito importante para a morfologia e diâmetro desejados. Entre estes parâmetros estão a distância de trabalho, voltagem aplicada, velocidade da injeção da solução e velocidade de rotação do coletor (quando aplicável). A distância de trabalho se refere à distância entre a ponta do eletrodo (agulha) e a superfície do coletor. Esta distância deve ser mínima o suficiente para que ocorra a evaporação do solvente da solução e assim evite que as fibras coalesçam com a presença do solvente líquido. Também é importante que seja uma distância máxima para que o cone de Taylor seja estabilizado pelo campo elétrico aplicado e assim as nanofibras sejam formadas, porém deve ser ideal, pois em distâncias muito grandes existe uma tendência para formar contas nas fibras (COSTA et al. 2012; TRIPATANASUWAN, ZHONG & RENEKER, 2007; BUCHKO et al. 1999). Outro parâmetro crítico do processo de eletrofiação é a voltagem aplicada. Pois a migração das cargas para a superfície do jato afeta a uniformidade e diâmetro das fibras e é promovida pela voltagem que é aplicada. Esta voltagem pode tanto diminuir o diâmetro das fibras como também aumentar o diâmetro das fibras em dadas condições, ou seja, de modo geral, com o aumento da voltagem ocorre diminuição do diâmetro das fibras por favorecer o alongamento da solução, todavia se esta for muito alta desestabiliza o cone de Taylor ocasionando aumento no

diâmetro das fibras e formação de contas, assim a voltagem crítica irá variar de polímero para polímero (HAIDER, HAIDER & KANG, 2015; COSTA et al. 2012; BHARDWAJ & KUNDU, 2010; TRIPATANASUWAN, ZHONG & RENEKER, 2007). A Figura 8 mostra a influência de diversas forças na formação do cone de Taylor.

Figura 8. Influência da tensão superficial, viscosidade, estresse elétrico tangencial e força da gravidade.



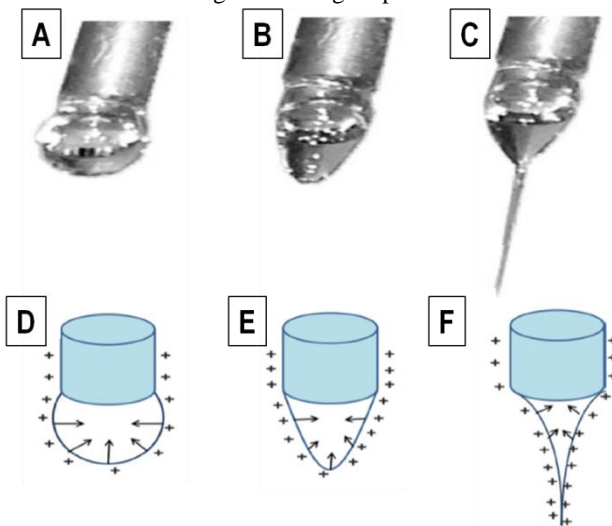
Fonte: Adaptado de Wu, Oleschuk & Cann, 2012.

Os três estágios de deformação de uma gota de polivinilpirrolidona (PVP) sob a influência do aumento do campo elétrico são mostrados na Figura 9.

A quantidade de solução polimérica disponível para a eletrofição é determinada sobre tudo pela velocidade de injeção. E neste caso, com o aumento da velocidade de injeção, há um aumento na quantidade de solução disponível, e consequentemente, formação de fibras de diâmetro maior. Porém, para cada voltagem aplicada, solvente utilizado ou solução polimérica, existe uma velocidade de injeção ideal para manter o cone de Taylor estável e também para a solução não secar na ponta da agulha obstruindo a mesma. Uma velocidade menor também favorece a evaporação do solvente e formação de fibras sem contas e ainda impede

que as mesmas se fundam, uma vez que um volume menor de solução estará disponível em um mesmo espaço de tempo para que a secagem do solvente ocorra (BHARDWAJ & KUNDU, 2010; YUAN et al. 2004).

Figura 9. A, B e C, mostram os três estágios de deformação de uma gota de polivinilpirrolidona (PVP) com o aumento do campo elétrico. D, E e F mostram o mecanismo de efeito das cargas sobre a gota polimérica.



Fonte: Adaptado de Haider, Haider e Kang, 2015.

Os parâmetros ambientais relacionados à umidade e temperatura também são estudados e mostram potencial influência no processo de eletrofiação. A viscosidade e também a tensão superficial estão relacionadas com a temperatura e de forma geral o aumento da temperatura favorece a formação de fibras. Mit-uppatham, Nithitanakul & Supaphol (2004) investigaram a produção de fibras de poliamida-6 em diferentes temperaturas, variando de 25 a 60° C, e verificaram um aumento do rendimento e diminuição do diâmetro das fibras com o aumento da temperatura, fato atribuído à redução da viscosidade da solução em temperaturas mais elevadas. Também com a elevação da temperatura seria mais fácil de evaporar o solvente. Em contrapartida, o aumento da umidade relativa pode dificultar a evaporação do solvente e ocasionar o aparecimento de poros na superfície das fibras ou até mesmo ocorrer a coalescência das mesmas. Por outro lado, a umidade relativa muito baixa pode ocasionar a rápida evaporação do solvente gerando entupimento da agulha por endurecimento do polímero na ponta da

mesma (OKUTAN, TERZI & ALTAY, 2014; BHARDWAJ & KUNDU, 2010; MIT-UPPATHAM, NITHITANAKUL & SUPAPHOL, 2004). Assim muitos fatores são importantes na produção de nanofibras por eletrofiação e devem ser cuidadosamente avaliados.

6. EMBALAGENS PARA ALIMENTOS

A indústria de embalagens esta em constante evolução em resposta ao avanço da tecnologia e também da maior exigência do mercado por parte dos consumidores. As embalagens não só devem garantir condições para um armazenamento e transporte seguro de alimentos e outros produtos, como também devem facilitar a conveniência de uso destes produtos (MIHINDUKULASURIYA & LIM, 2014). Segundo a Resolução RDC nº 91 de 11 de maio de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) embalagem para alimentos é definida como o artigo que está em contato direto com alimentos, destinado a contê-los, desde a sua fabricação até a sua entrega ao consumidor, com a finalidade de protegê-los de agentes externos, de alterações e de contaminações, assim como de adulterações (ANVISA, 2001). Dentro deste contexto as embalagens que apresentam propriedades que vão além das essenciais passam a ter destaque e refletem o termo embalagem ativa.

As tecnologias para as embalagens ativas sobressaem como tecnologias emergentes nas quais o material da embalagem interage com o alimento de forma desejável e deixa de ter um papel passivo na proteção do mesmo. Assim, diferentes conceitos de embalagens ativas são encontrados e incluem eliminadores de oxigênio, absorventes de umidade, barreiras contra a luz e radiação ultravioleta, mecanismos de liberação de compostos antioxidantes, aromatizantes e/ou antimicrobianos (MIHINDUKULASURIYA & LIM, 2014; OTONI et al. 2016).

Embalagens com propriedades antimicrobianas em particular, interagem com o alimento embalado ou nos espaços entre embalagem/alimento (*headspace*) a fim de retardar, reduzir ou até mesmo inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos ou deteriorantes preservando assim o alimento e possibilitando maior vida de prateleira para o produto (OTONI et al. 2016; NERIN et al. 2016; WEN et al. 2016). Esses compostos ativos podem ser utilizados diretamente dispersos na matriz polimérica revestindo a superfície da embalagem ou até mesmo imobilizados em sachês (OTONI et al. 2016). Para tanto, diferentes técnicas são utilizadas para obtenção de embalagens ativas, entre elas a eletrofiação pode ser uma opção, principalmente por suas propriedades

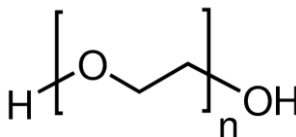
de incorporação de compostos ativo e grande superfície de contato devido ao tamanho reduzido das fibras obtidas, fatores que podem ser favoráveis para este uso (LIU et al. 2015). Entre os compostos que apresentam propriedades que permitem aplicação como compostos ativos podemos listar os óleos essenciais e extratos de plantas, os metais e partículas metálicas, enzimas, bactericidas e compostos químicos (MAURIELLO, 2016).

Diferentes materiais são utilizados para a produção de embalagens para alimentos incluindo materiais sintéticos e naturais. A escolha do material utilizado na embalagem vai depender de fatores que vão desde qual será o alimento embalado, a propriedades físico-químicas, condições de armazenamento e transporte, temperatura, migração dos compostos da embalagem para o alimento, conveniência para o consumidor final, até questões ambientais como a biodegradabilidade desses materiais em aterros ou possibilidade de reciclagem (SIRACUSA, 2016). Atualmente, a busca por materiais biodegradáveis, biocompatíveis e que não agridem a saúde humana e o meio ambiente são o foco de muitas pesquisas nesta área.

6.1 Poli (óxido de etileno) (PEO)

O poli(óxido de etileno) (PEO) é um polímero hidrossolúvel, linear, não iônico, biodegradável e biocompatível muito utilizado em aplicações farmacêuticas e médicas, como matriz de liberação controlada de fármacos. Apresenta-se disponível em várias massas molares que podem chegar até 5.000 kDa. Sua fórmula geral é representada por $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ onde, n representa o número de repetições do monômero óxido etileno. A sua estrutura química é apresentada na Figura 10.

Figura 10. Estrutura química geral do PEO



Fonte: Sigma Aldrich, 2016.

Quanto às suas propriedades físicas o PEO geralmente é um pó branco ou granular com leve odor amoniacal com ponto de fusão entre 62-67 °C e temperatura de autoignição entre 280-330 °C e decomposição térmica entre 423-425 °C. Não são tóxicos ou irritantes e apresentam boa

estabilidade para o trabalho. O PEO é completamente solúvel em água e também em alguns solventes orgânicos (DHAWAN, VARMA & SINHA, 2005). Sua aplicação como polímero modelo em estudos dos parâmetros de eletrofiação é bastante avaliada e vários trabalhos são encontrados utilizando o PEO sozinho ou associado com outros polímeros (DEITZEL, et al. 2001; PAKRAVANA, HEUZEYA & AJJI, 2011; RIEGER & SCHIFFMAN, 2014; CHEN et al. 2016).

6.2 Zeína

A zeína é a proteína que representa cerca de 50% do total de proteínas do grão de milho. É uma prolamina heterogênea que apresenta frações polipeptídicas em sua composição, com massa molar que varia de 19.000 a 25.000 Dalton apresentada em pó de cor amarela. Em relação à solubilidade, a zeína é insolúvel em água e solúvel em etanol. Sua hidrofobicidade, boa biocompatibilidade e biodegradabilidade, excelente capacidade para formar filme e obtenção a partir de fonte natural e renovável, atrai interesses para aplicações como encapsulação de compostos ativos, formação de nanofibras, filmes biodegradáveis, micropartículas e nanopartículas (SGARBIERI, 1996; SHUKLA & CHERYAN, 2001; XU et al. 2008; QUISPE-CONDORI, SALDAÑA & TEMELLI, 2011).

Recentemente aumentou o interesse da zeína para produção de nanofibras por eletrofiação, estes estudos geralmente são relacionados à otimização dos parâmetros da eletrofiação, reticulação das nanofibras de zeína ou mistura de outros polímeros à zeína (KAYACI & UYAR, 2012). Uma vez que a zeína é altamente hidrofóbica devido à sua sequência de aminoácidos, é bastante utilizada na cobertura de alguns alimentos como doces e frutas secas e estas propriedades são de interesse para um material na produção de embalagens. Aliada a outro polímero termoplástico, a zeína pode alterar ou melhorar tais propriedades e que podem atuar como barreira para oxigênio e umidade, por exemplo (TORRES-GINER, GIMENEZ & LAGARON, 2008).

6.3 Uso de nanopartículas de prata em embalagens para alimentos

As nanopartículas de prata estão entre os nanomateriais mais utilizados e suas aplicações estão crescendo na medicina, cosméticos, agricultura e embalagens para alimentos. Dentro do setor de embalagens para alimentos as nanopartículas de prata são utilizadas principalmente

como agentes antimicrobianos e para prolongar a vida de prateleira dos produtos (RAMOS et al. 2016). Alguns exemplos de aplicações são expostos na Tabela 1.

Tabela 1. Exemplos de aplicações de nanopartículas metálicas em sistemas para embalagens testados contra microrganismos *in vitro*

Nanopartícula	Matriz Polimérica	Microrganismos	Referência
Dióxido de Titânio e Óxido de Zinco	Polietileno Tereftalato (PET) e polibutileno succinato	<i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	Threepopnatkul et al. (2014)
Óxido de Zinco	Cloreto de polivinila (PVC)	<i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	Li et al. (2010)
Prata	Quitossana e alginato	Bactérias Gram-negativas e Gram-positivas	Travan et al. (2009)
Prata	Quitossana	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Pinto et al. (2012)
Prata	Ágar-ágar	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Candida albicans</i>	Ghosh et al. (2010)
Prata	Ácido poliacrílico	Bactérias Gram-negativas e Gram-positivas	Bardajee et al. (2012)
Óxido de Zinco	Alginato de cálcio	<i>Escherichia coli</i>	Bajpai et al. (2012)

O interesse por estes compostos inorgânicos como a prata, o cobre, o zinco e o ouro, aumentou com o desenvolvimento da nanotecnologia e trouxe grandes oportunidades para o desenvolvimento de novos materiais para embalagens ativas. Estas nanopartículas vêm sendo utilizadas incorporadas em filmes e matrizes poliméricas para embalagens e testadas contra microrganismos de origem alimentar ou mesmo diretamente utilizados para embalar frutas e legumes, carnes e produtos lácteos (COSTA et al. 2016). Os nanocompósitos mais comuns utilizados para embalagens de produtos alimentares são com base na prata, bem conhecida pela sua alta estabilidade e a sua forte toxicidade para uma

vasta gama de microrganismos (ECHEGOYEN & NERIN, 2013). Diferentes polímeros e biopolímeros foram testados com nanopartículas de prata, tais como amido, quitosana e ágar-ágar tentando beneficiar-se da ação antibacteriana da prata para embalagens ativas para alimentos. A eficiência desta ação antibacteriana depende de vários fatores como o tamanho das partículas, a distribuição do tamanho, o grau de aglomeração, o teor de prata na matriz e a interação da prata com o polímero (COSTA et al. 2016).

Mahdi, Vadood e Nourdahr (2012) testaram a ação antimicrobiana de bandejas revestidas com nanopartículas de prata para armazenar carne fresca à temperatura 3 ± 1 °C. Foi observado que na carne picada em pedaços menores (1 cm de espessura) os resultados foram mais significativos para ação antimicrobiana do que nos pedaços maiores (1,5 cm de espessura). As amostras foram armazenadas e o crescimento de *S. aureus* e *E. coli* foi monitorado em 1, 3, 7, 10 e 14 dias e o tratamento com as nanopartículas de prata aumentou o prazo de validade de 2 dias para 7 dias, em comparação com o controle sem o tratamento. An e colaboradores (2008) testaram aspargos revestidos com filme de polivinilpirrolidona (PVP) e nanopartículas de prata. Os aspargos frescos foram primeiramente higienizados com solução de hipoclorito de sódio e posteriormente revestidos com PVP-AgNP e armazenados em 2 °C ou 10 °C por 25 dias, parâmetros como perda de peso, cor verde, maciez e crescimento microbiano foram avaliados. O crescimento microbiano, neste caso, foi significativamente reduzido pelo revestimento e a vida de prateleira foi aumentada por cerca de 10 dias em relação ao controle sem revestimento. Costa e colaboradores (2012) verificaram a preservação de cenouras revestidas com alginato de cálcio e com alginato de cálcio e AgNp-montmorilonita na qual as amostras revestidas com a mistura, alginato de cálcio e AgNP-montmorilonita, apresentaram melhores características sensoriais e menor crescimento bacteriano prolongando o *shelf life* para mais de dois meses.

O uso da prata como agente antimicrobiano é relativamente novo e por isso ainda pouco elucidado os aspectos relacionados a sua segurança ou risco para o ambiente e saúde humana. Desta forma o tema é diferentemente tratado por diversos órgãos regulamentadores na Europa, Estados Unidos, Japão e Austrália, tornando-se até contraditório em alguns casos. Na área de alimentos o FDA (*Food and Drugs Administration*) regulamenta apenas o nitrato de prata para aplicações em produtos alimentícios, sendo o limite máximo de 0,017mg/kg de produto ou 0,1mg/kg para água potável. No que se diz respeito a nanopartículas de prata, nos Estados Unidos as soluções coloidais são aceitas e

comercializadas como suplementos nutricionais capazes de fortalecer o sistema imunológico e combater patógenos, como por exemplo, o Mesosilver ([w.w.w.mesosilver.com](http://www.mesosilver.com)). A EFSA (*European Food Safety Authority*) aceita a utilização de prata em materiais de contato com alimentos, como embalagens, com um máximo de 5%. A migração é restrita a um máximo de 0,05 mg/kg em alimentos (EFSA, 2006). Apesar das soluções coloidais de prata não estarem incluídas na lista de aditivos alimentares permitidos pela EFSA, "por da falta de informação adequada sobre a biodisponibilidade da prata" (EFSA, 2008), paralelamente na Directiva 94/36/CE da Comunidade Europeia, ainda em vigor, a prata é considerada um agente corante usado em produtos de confeitaria, sem quaisquer limites de restrição (CASTRO-MAYORGA et al. 2016).

No Brasil a legislação prevê limite de migração específica (LME) da prata a partir de embalagens, este limite segundo a RDC 52 de 26 de novembro de 2010, que dispõe sobre corantes em embalagens e equipamentos plásticos destinados a estar em contato com alimentos, é de 0,05 mg/kg de produto. Esta é a única legislação que trata sobre o uso de prata em alimentos no Brasil. Com isto podemos concluir que ainda há muito o quê progredir nas pesquisas a cerca do assunto no Brasil e mesmo no mundo e até então as nanopartículas de prata são um promissor agente antimicrobiano a ser estudado.

CAPÍTULO 2: SELEÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO AGENTES REDUTORES NA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Parte deste capítulo foi publicado no periódico *Open Journal of Applied Sciences*.

MACIEL, M. V. de O. B.; ALMEIDA, A. da R.; MACHADO, M. H.; DE MELO, A. P. Z.; DA ROSA, C. G.; DE FREITAS, D. Z.; NORONHA, C. M.; TEIXEIRA, G. L.; DE ARMAS, R. D.; BARRETO, P. L. M. *Syzygium aromaticum* L. (Clove) Essential Oil as a Reducing Agent for the Green Synthesis of Silver Nanoparticles. **Open Journal of Applied Sciences**, v. 9, p. 45-54, 2019. <https://doi.org/10.4236/ojapps.2019.92005>

RESUMO

Os óleos essenciais são produtos obtidos de plantas com grandes funcionalidades devido principalmente a presença dos seus compostos majoritários, que muitas vezes conferem a estes óleos capacidade antioxidante e antimicrobiana. Estas características, principalmente antioxidante, fazem com que estes sejam candidatos a agentes redutores para a síntese verde de nanopartículas de prata. O presente capítulo teve por objetivo a avaliação da capacidade de síntese de nanopartículas de prata utilizando óleos essenciais, bem como a seleção do melhor óleo essencial entre os testados, para dar continuidade aos estudos de caracterização. Os óleos essenciais de alecrim, orégano, tomilho, cravo e erva de touro foram selecionados. Inicialmente todos os óleos passaram por caracterização química por cromatografia gasosa (CG) para identificar os principais compostos presentes. Entre eles os que se destacaram foram o óleo de cravo, orégano e tomilho, pois apresentaram compostos com potencial redutor como sendo os compostos majoritários. Nos testes para a síntese, os óleos foram diluídos em acetona para que ocorresse a melhor homogeneização na solução de nitrato de prata. A síntese ocorreu à 100 °C por 30 minutos e diferentes condições de pH foram estudadas (pH 7, 8, 9 e 10) onde a formação da cor amarela indicou quando houve a produção de nanopartículas. A formação de nanopartículas foi avaliada por espectrofotometria no UV-Vis e as bandas de SPR características foram utilizadas para isto. Bandas com picos com valores por volta de 450 nm foram encontrados para as amostras e a amostra sintetizada com óleo de cravo em pH 8 foi a que se destacou com maior formação. Na análise de microscopia eletrônica de transmissão, as nanopartículas sintetizadas com cravo apresentaram formas variadas nos diferentes pH e o tamanho médio variou entre 35,5 e 78 nm. As amostras também permaneceram estáveis em solução por 60 dias, demonstrando que além de atuar como agente redutor na síntese, o óleo essencial de cravo também atuou como agente estabilizante.

Palavras-chave: Cravo-da-índia, orégano, tomilho, alecrim, erva-de-touro, síntese verde.

1. INTRODUÇÃO

A síntese de nanopartículas de prata (AgNP) é uma atividade bastante promissora devido à ampla aplicabilidade das AgNPs, principalmente no uso como agentes antimicrobianos alternativos aos tradicionais. Isso se deve principalmente à grande área superficial das nanopartículas, que geralmente apresentam tamanho médio entre 1 e 100 nm, o que resulta em maior interação entre as nanopartículas e as células dos microrganismos, inibindo seu crescimento mesmo em concentrações muito baixas no meio (CASTELLANO et al., 2007; KOTAKADI et al., 2015; PALANISAMY et al., 2017). Por essa razão as nanopartículas podem ser aplicadas como um agente para controlar o crescimento de microrganismos em diferentes matrizes, incluindo alimentos, como queijo, salada de frutas, arroz e embalagens biodegradáveis para alimentos (INCORONATO et al., 2011; COSTA et al., 2011; CARBONE et al., 2016; LI et al., 2017).

Apesar de apresentar muitas características positivas, um dos fatores limitantes na aplicação de AgNPs é o uso de agentes químicos potencialmente tóxicos para a sua síntese, como por exemplo o borohidreto de sódio (EISING et al., 2011). Neste contexto, uma alternativa à síntese convencional é uma abordagem baseada na química verde, que emprega agentes redutores obtidos de matrizes vegetais, como extratos vegetais e óleos essenciais. A utilização dessas para a síntese de AgNPs tem ganhado destaque, principalmente porque evita a utilização de reagentes químicos reduzindo a produção de resíduos, sendo considerada uma síntese ambientalmente correta (MASHWANI et al., 2016; ZHANG et al., 2016). Essas matrizes são ricas em compostos fenólicos, terpenos, flavonóides e outros compostos, que possuem propriedades como a capacidade antioxidante, importante na redução da Ag^+ para Ag^0 , produzindo assim as nanopartículas de prata (AN et al., 2012; VILAS et al., 2014).

Os óleos essenciais constituem uma importante fonte de compostos bioativos. Várias plantas são relatadas por seus extratos e óleos essenciais que exibem propriedades antimicrobianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e antioxidantes, como *Origanum vulgare* (BEDOYA-SERNA et al., 2018), *Myristica fragrans* (VILAS et al., 2014), *Thymus*

vulgaris (DA ROSA et al., 2015), *Gracilaria birdiae* (DE ARAGÃO et al., 2016) *Calliandra haematocephala* (RAJA et al., 2017), *Rosmarinus officinalis* L. (AMARAL et al., 2018), *Syzygium aromaticum* L. (RADÜNZ et al., 2019), *Cestrum nocturnum* (KESHARI et al. 2017), *Lippia alba* (NUNES et al., 2018) e *Poiretia latifolia* (PAIM et al., 2018). No entanto, a insolubilidade destes óleos essenciais em água pode ser um fator limitante para a produção de nanopartículas, uma vez que normalmente a síntese ocorre em meio aquoso, a partir de precursores com o nitrato de prata (HONGFANG et al., 2017). Assim, o estudo da utilização de óleos essenciais na síntese e estabilização de nanopartículas de prata é importante para o conhecimento das principais características para produzir partículas estáveis.

Desta forma, o presente capítulo apresenta uma proposta para a síntese verde de nanopartículas de prata, utilizando diferentes óleos essenciais, com o objetivo de caracterizar os óleos e aplica-los para a síntese verde, avaliando o desempenho dos mesmo através de análises como a Espectroscopia no UV-Vis, Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e verificação da estabilidade destas partículas em solução ao longo do tempo também por DLS, para definição do melhor óleo essencial, entre os estudados, para dar sequência ao trabalho com caracterizações mais aprofundadas e avaliação da atividade antimicrobiana das nanopartículas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Nitrato de prata (AgNO_3), acetona P.A. e todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. Os óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e cravo (*Syzygium aromaticum*) foram adquiridos no comércio local da cidade de Florianópolis/SC. O óleo essencial de erva-de-touro (*Poiretia latifolia*) foi obtido por extração por Clevenger da planta colhida na região de Lages/SC (coordenadas geográficas da localização 27° 55'14.5 "S 50° 41'21.2" W).

2.2 Extração e seleção dos óleos essenciais

Inicialmente foram escolhidos, com base em estudos já realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Reologia e Polímeros Naturais da UFSC, cinco óleos essenciais para a síntese das nanopartículas de prata, doravante chamadas de AgNP. Os cinco óleos essenciais foram os óleos de tomilho, orégano, alecrim, cravo e erva-de-touro, todos com uma vasta variedade de estudos publicados comprovando suas atividades biológicas (KOCIC-TANACKOV et al. 2012; ROTA et al. 2008; TURASAN, SAHIN e SUMNU, 2015; AGUILAR-GONZÁLEZ, PALOU e LÓPEZ-MALO, 2015), com exceção do óleo essencial da erva-de-touro, planta nativa da região serrana do estado de Santa Catarina colhida na zona rural da cidade de Lages. A extração do óleo essencial foi realizada por arraste de vapor de água utilizando as folhas da planta fresca. A massa correspondente de planta foi submetida ao arraste de vapor de água em um aparelho de Clevenger por 3 horas para obtenção do óleo essencial. Todas as amostras foram mantidas armazenadas em temperatura de refrigeração de 8 °C.

2.3 Síntese de nanopartículas de prata utilizando óleo essencial

A síntese das nanopartículas de prata foi realizada de acordo com Vilas, Philip e Mathew (2014). A solução de nitrato de prata (AgNO_3) na concentração de 0,31 mmol.L⁻¹ foi preparada pela dissolução da massa correspondente do sal de prata em água deionizada. A solução foi preparada no momento da sua utilização e quando necessário foi mantida armazenada ao abrigo da luz. Os óleos essenciais de orégano, tomilho, cravo, alecrim e erva-de-touro foram diluídos em acetona P.A numa

proporção de 1 parte de óleo para 170 de acetona (1:170). Para a síntese o pH da solução de AgNO_3 foi ajustado para 7, 8, 9 e 10 com solução de hidróxido de sódio (NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$). Para cada condição testada, 30 mL da solução de AgNO_3 com o respectivo pH corrigido, foi aquecida até 100°C em chapa de aquecimento e com rigorosa agitação magnética. Com a solução na temperatura adequada o óleo diluído foi gotejado respeitando o volume de 1 ou 2 mL, permanecendo em constante agitação e aquecimento por 30 minutos. O surgimento da coloração amarela até marrom, foi indicativa da formação das nanopartículas de prata em solução.

2.4 Caracterização dos óleos essenciais para a síntese de nanopartículas de prata

Os óleos essenciais foram analisados por cromatografia em fase gasosa em um cromatógrafo a gás modelo GC-2010 Shimadzu® (Tokyo, Japão) acoplado com detector de espectrometria de massas (CG/EM) modelo GCMS – QP2010 da Shimadzu® na estação experimental da Epagri em Itajaí SC. Para a corrida cromatográfica foi utilizada uma coluna capilar ZB-5MS, 30 m x 0,25 mm x filme 0,25 μm , a uma temperatura de injeção de 250°C e fluxo do gás de arraste (gás hélio) de $1,0 \text{ mL/min}$. O forno permaneceu em modo isotérmico por 4 minutos a 60°C . Após a rampa de aquecimento ocorreu à uma taxa de 6°C/min até atingir 210°C . Logo em seguida, permaneceu em isoterma por 6 minutos, totalizando 35 minutos de corrida cromatográfica. Para isso, as amostras foram diluídas 200 vezes em hexano de grau cromatográfico para posteriormente serem injetadas no CG/EM. Cada componente foi determinado pela normalização das áreas (%) dos picos no cromatograma de íons totais (TIC, total ions chromatogram), sendo a área total a somatória de todas as áreas dos picos eluídos (100%).

Para a identificação, os espectros de massas obtidos foram comparados com bibliotecas de dados NIST do CG/MS, e também pela comparação dos índices de retenção calculados com os encontrados na literatura (bases de dados – WebNIST, GMD). Os índices de retenção foram calculados de acordo com Van den Dool & Kratz (1963) utilizando padrões de n-alcenos ($\text{C}_7\text{-C}_{30}$). Isso aumenta a confiabilidade dos resultados e contribui para a identificação e caracterização dos componentes da amostra.

2.5 Espectroscopia UV-Vis

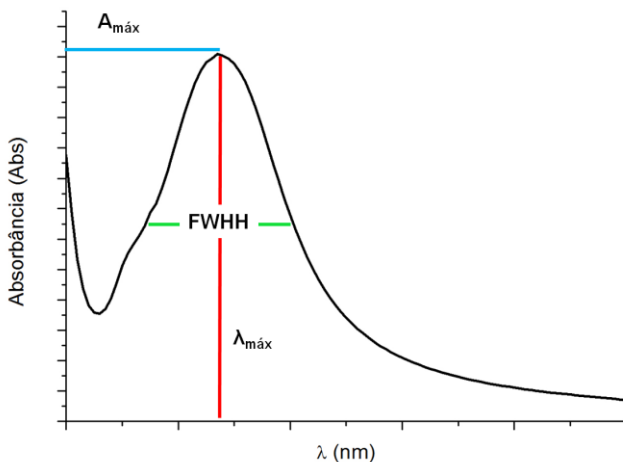
A análise de espectroscopia no UV-Vis foi utilizada para a verificação da formação das nanopartículas de prata através de um aparelho espectrofotômetro HITACHI, U-1800 (Tokyo, Japão) em modo de varredura, num intervalo de comprimento de onda de 300 a 800 nm e uma taxa de 800 nm/minuto. A análise foi realizada no Laboratório de Frutas e Hortaliças do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFSC.

Logo, para a escolha do óleo essencial utilizado na síntese das nanopartículas de prata, foram realizados testes preliminares com cinco óleos essenciais diferentes, sendo eles óleo essencial de orégano, tomilho, alecrim, cravo e de erva-de-touro. Após a síntese (item 2.2) as soluções contendo as nanopartículas foram analisadas em espectrofotômetro UV-Visível para obtenção da banda de ressonância de plasmon de superfície (SPR, do inglês *Surface Plasmon Resonance*), que indica a formação de nanopartículas de prata, como mostra a Equação 1 (EISING et al, 2011; SANTOS et al, 2012).

$$\Psi = \frac{A_{max}}{\lambda_{max}FWHH} \quad (1)$$

Onde, a resposta em função dos parâmetros de formação das AgNPs é representada pela letra grega Ψ (psi). Esta equação possibilita a avaliação da formação de nanopartículas de prata, através da absorbância máxima (A_{max}) e o tamanho da partícula é representado pelo λ_{max} ou comprimento de onda na máxima absorção (λ_{max}), já a distribuição de tamanho das nanopartículas é refletida na largura da banda à meia altura (FWHH do inglês: *full width at half-height*). Todos estes parâmetros são retirados da banda SPR das nanopartículas como mostra a Figura 11. A formação de partículas foi critério de escolha para o óleo essencial utilizado no decorrer do trabalho.

Figura 11. Representação da banda de SPR para uma nanopartícula de prata obtida por espectrofotometria de UV-Vis. Os parâmetros de formação das nanopartículas são representados pelas linhas azul, vermelha e verde, que representam respectivamente, absorbância máxima ($A_{\text{máx}}$), largura da banda à meia altura (FWHH) e comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$).



Fonte: Adaptada de Eising et al. 2011.

2.6 Delineamento experimental

Após a escolha de qual dos cinco óleos essenciais apresentou maior formação de partículas pela banda SPR obtida pela espectrofotometria, o delineamento experimental foi realizado para definir as melhores condições entre as estudadas na síntese das AgNPs. Foi avaliado o volume de óleo essencial diluído, no qual foram testados 1 e 2 mL, o pH do meio reacional e a influência destes fatores nos parâmetros do potencial zeta (ζ), tamanho de partícula (Z-ave), índice de polidispersão (IP) e formação de partícula. Os experimentos foram realizados em triplicata de acordo com o planejamento apresentado na Tabela 2, com a temperatura e tempo de reação fixos em 100 °C por 30 minutos.

Tabela 2. Matriz experimental com as variáveis utilizadas para otimizar os parâmetros de síntese da nanopartículas de prata

Experimento	Óleo essencial	Volume de óleo	pH da solução
1	Cravo	1 mL	7
2	Cravo	2 mL	7
3	Cravo	1 mL	8
4	Cravo	2 mL	8
5	Cravo	1 mL	9
6	Cravo	2 mL	9
7	Cravo	1 mL	10
8	Cravo	2 mL	10

2.7 Determinação do tamanho de partícula (Z-ave), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (ζ)

As análises de tamanho de partícula (Z-ave), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (ζ) das nanopartículas de prata foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), em um equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). As soluções contendo nanopartículas de prata foram colocadas em célula de eletroforese e as leituras foram realizadas em ângulo fixo de 173° e temperatura 25 °C. Estes parâmetros também foram avaliados ao longo do tempo para verificar a estabilidade das nanopartículas em solução.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição dos óleos essenciais

Inicialmente os óleos essenciais foram submetidos à análise de composição por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) (Item 2.3.1). Os resultados para os compostos majoritários encontrados em cada óleo essencial são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Compostos majoritários dos óleos essenciais de cravo, tomilho, orégano, alecrim e erva-de-touro, obtidos por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/MS)

Óleo essencial	Composto	Número CAS	% do composto (m/m)
Cravo	Eugenol	97-53-0	80,15
	Cariofileno	87-44-5	14,03
Tomilho	p-cimeno	99-87-6	23,80
	γ-terpineno	99-85-4	5,10
	Timol	89-83-8	48,89
	Carvacrol	3228-02-2	4,16
Orégano	p-cimeno	99-87-6	12,94
	γ-terpineno	99-85-4	4,47
	Timol	89-83-8	0,53
	Carvacrol	499-75-2	66,85
Alecrim	(-)-α-pineno	7785-26-4	20,67
	Canfeno	79-92-5	9,94
	p-cimeno	527-84-4	3,16
	Eucaliptol	470-82-6	20,02
	Cânfora	76-22-2	22,08
	Bornel	507-70-0	3,63
	α-terpineol	98-55-5	3,33
Erva de Touro	β-pineno	127-91-3	6,74
	β-mirceno	123-35-3	2,50
	D-limoneno	5989-27-5	46,96
	D-diidrocarvona	7764-50-3	24,48
	Carvona	99-49-0	19,32

Estes resultados serviram para verificar se os óleos comerciais utilizados apresentam compostos condizentes com os relatados na literatura. Indicando assim, além dos compostos majoritários, a autenticidade dos mesmos.

Para o óleo essencial de cravo o composto majoritário encontrado foi o eugenol e em menor quantidade o cariofileno. Este resultado é semelhante ao encontrado por Radünz et al. (2019) no qual encontraram os mesmos compostos como principais do óleo de cravo. Hasheminejad, Khodaiyan & Safari (2019) relatam a presença de 77,2% de eugenol, 8,31% de acetato de eugenil e 7,19% de β -cariofileno. Resultados semelhantes também são encontrados por Sebaaly et al. (2015), onde 93,5% da composição do óleo essencial de cravo foi do composto eugenol, seguido por 2,43% de acetato de eugenil e 2,29% de β -cariofileno.

Os óleos essenciais de tomilho e de orégano apresentam similaridades entre si, apresentando os mesmos compostos em suas composições. A principal diferença observada é na concentração do composto timol, mais presente no óleo essencial de tomilho e do carvacrol, mais presente no óleo de orégano. Pavela et al. (2018) relatam concentrações de 53,1% a 62,7% de timol no óleo essencial de tomilho. Gonçalves et al. (2017) encontraram 53,6% de timol e 6,9% de carvacrol. Já os pesquisadores Karami-Osboo, Khodaverdi & Ali-Akbari (2010) encontraram 49,5% de timol e 4,8% de carvacrol. Em relação ao óleo essencial de orégano, Morshedloo et al. (2018) encontraram 46,8% de carvacrol. Dutra et al. (2019) relataram 69,5% de carvacrol. Maiores quantidades foram encontradas por Jan et al. (2018), que avaliaram espécies diferentes de orégano e relataram de 79,9 a 84,5% de carvacrol e para o composto timol, encontraram de 0,04 a 1,53%, resultado que se assemelha ao encontrado no presente trabalho.

Os compostos α -pineno, eucaliptol e cânfora foram os compostos com maior concentração encontrados no óleo essencial de alecrim. O mesmo foi relatado por Mezza et al. (2018) que encontraram 15,8% de α -pineno, 29,2% de eucaliptol (1,8-cineol) e 20,3% de cânfora. Borges et al. (2019) trazem em sua revisão, que os compostos majoritários do alecrim são variáveis, porém, predominam o α -pineno, 1,8-cineol e cânfora, que também definem os quimiotipos de acordo com o composto que apresenta maior concentração na planta, o mesmo é relatado por outros autores (HERNÁNDEZ et al. 2016; RIZZO et al. 2018).

A erva-de-touro, nativa da região sul do Brasil, principalmente do estado de Santa Catarina, apresentou em sua composição como composto majoritário o D-limoneno, seguido da D-diidrocarvona e Carvona. Paim et al. (2018) analisando o óleo essencial da erva-de-touro encontraram 21 compostos, nos quais os principais foram a *trans*-diidrocarvona com 51,2%, carvona com 39,0% e o limoneno com 29,4%. Os mesmos autores destacam que a concentração destes

compostos podem variar bastante a depender da parte da planta, estágio de maturação, entre outros fatores.

De forma geral, os compostos encontrados nos óleos essenciais estudados foram similares aos encontrados por outros autores e a maior parte destes compostos apresentam atividades biológicas, como atividade antimicrobiana e antioxidante (KHODAVERDI & ALI-AKBARI, 2010; SEBAALY et al. 2015; HERNÁNDEZ et al. 2016; GONÇALVES et al. 2017; RADÚNZ et al. 2019; HASHEMINEJAD, KHODAIYAN & SAFARI, 2019; PAVELA et al. 2018; KARAMI-OSBOO, MORSHEDLOO et al. 2018; JAN et al. 2018; MEZZA et al. 2018; BORGES et al. 2019; RIZZO et al. 2018; PAIM et al. 2018). Desta forma, após a verificação da composição de cada óleo essencial, todos foram selecionados para a avaliação do desempenho como agentes redutores para a síntese das AgNPs.

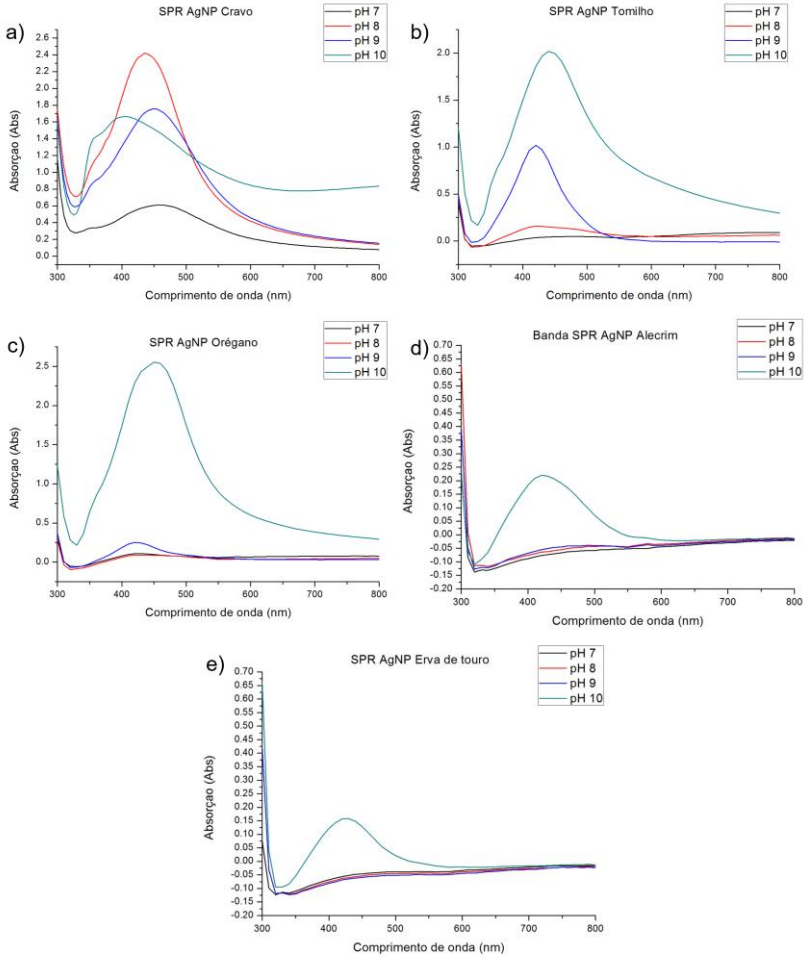
3.2 Síntese das nanopartículas de prata utilizando óleo essencial

Para a realização da síntese das AgNPs foi utilizada a metodologia descrita por Vilas, Philip e Mathew (2014) com pequenas modificações, como descrito no item 2.2. E para avaliar a formação das AgNPs com os diferentes óleos e em diferentes condições de pH do meio reacional, as amostras foram avaliadas por UV-Vis para a obtenção das bandas de SPR características de nanopartículas. Os resultados são expostos na Figura 12.

Com as bandas de SPR obtidas por UV-Vis foi possível verificar a formação das AgNP para os cinco óleos essenciais testados em diferentes condições de pH, mantendo fixos o tempo de reação (30 minutos), temperatura (100 °C) e o volume de óleo diluído (2 mL). É observado de forma geral, uma maior intensidade da banda de SPR para as AgNP obtidas com óleo essencial de cravo. Sendo que, para esta amostra, a maior intensidade foi em pH 8 (Figura 12a), porém, nas demais amostras pode ser notado um aumento da intensidade da banda e, conseqüentemente, de formação de AgNP, com o aumento do pH, o mesmo é encontrado em outros estudos (VILAS, PHILIP E MATHEW, 2014; RAJ et al. 2016). Mesmo com a indicação visual da formação das AgNPs através da banda de SPR e a observação de melhores resultados para a amostra obtida com óleo de cravo, também podemos notar boa

intensidade da banda para as amostras obtidas com óleo de tomilho e orégano em pH 10 (Figuras 12b e 12c).

Figura 12. Representação das Bandas de SPR obtidas para as AgNP sintetizadas com diferentes óleos essenciais. a) Cravo; b) Tomilho; c) Orégano; d) Alecrim; e) Erva de Touro, em diferentes pHs.



Já para as amostras obtidas com óleo de alecrim e de erva-de-touro a formação de partículas foi bastante reduzida em todas as condições de pHs testadas (Figura 12d e 12e) e a coloração da solução praticamente

não alterou. Este fato se dá principalmente pela composição destes óleos, no caso da erva-de-touro e do alecrim que não apresentam compostos fenólicos doadores de hidrogênio como majoritários e por sua vez não apresentam potencial redutor da prata em solução. Desta forma a reação não ocorre e a coloração da solução não é alterada. Já para os demais óleos essenciais testados os compostos majoritários identificados são fenólicos e apresentam potencial redutor e a formação das nanopartículas é mais pronunciada.

Com a análise de espectroscopia no UV-Vis foi possível definir qual dos óleos seria utilizado no desenvolvimento do presente trabalho. E apesar das AgNPs sintetizadas utilizando óleo essencial de orégano terem apresentado um pico de absorção máxima maior do que as sintetizadas com óleo essencial de cravo (2553 u.a e 2420 u.a, respectivamente), indicando maior formação de AgNPs, para o orégano isto ocorreu em pH 10, enquanto que para o cravo este valor foi conseguido em pH 8, o que é mais próximo do pH dos sistemas biológicos (pH 7,4). Além disso, o óleo de cravo mostrou-se mais eficaz em praticamente todas as condições testadas, tendo rápida redução do sal de prata e obtenção de nanopartículas. Desta forma, o óleo essencial de cravo foi o escolhido para a síntese verde das nanopartículas de prata no decorrer do trabalho.

3.3 Otimização das condições da síntese de AgNP utilizando óleo essencial de cravo

Após a definição do óleo essencial a ser utilizado na síntese verde das AgNPs (óleo essencial de cravo), as nanopartículas foram analisadas por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), em um equipamento *Zetasizer Nano Series* (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) para obtenção do tamanho de partícula (*Z-ave*), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (ζ), que foram analisados para verificar a influência do pH (7, 8, 9 e 10) e do volume de óleo diluído (1 e 2 mL). Para isso as amostras foram produzidas seguindo a Tabela 2 e as médias dos resultados das leituras de três repetições foram analisadas pela análise de variância ANOVA e por teste de comparação de média (Teste de Tukey) utilizando o *Software* Estatística 7.0 com nível de confiança de 95 %. Os resultados para o teste de Tukey são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados do teste de comparação de médias (Teste de Tukey) para a AgNP Cravo. Letras iguais na mesma coluna indica que não existe diferença significativa ao nível de confiança de 95%.

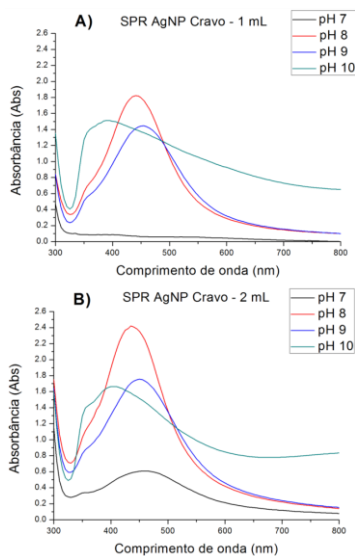
Óleo essencial	pH	Volume de óleo diluído (mL)	Tamanho (nm)	Índice de polidispersão (IP)	Potencial Zeta (mV)
Óleo de Cravo	7	1	64,32±10,6 ^b	0,44±0,15 ^{ab}	32,9±3,7 ^b
	7	2	71,94±14,5 ^b	0,27±0,04 ^{bc}	31,9±8,5 ^b
	8	1	58,65±11,3 ^b	0,33±0,09 ^{bc}	25,1±3,8 ^b
	8	2	55,41±4,1 ^b	0,40±0,03 ^{abc}	34,8±3,6 ^b
	9	1	69,16±3,3 ^b	0,24±0,01 ^c	29,5±1,6 ^b
	9	2	74,82±2,5 ^b	0,23±0,01 ^c	30,1±0,7 ^b
	10	1	29,00±2,6 ^a	0,58±0,06 ^a	57,3±11,4 ^a
	10	2	31,43±5,8 ^a	0,54±0,00 ^a	50,8±0,8 ^a

Cada uma das respostas (tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta) foi analisada individualmente para todas as condições testadas. O volume de óleo diluído não apresentou diferença significativa para o mesmo valor de pH, em todas as amostras. Já o pH mostrou maior influência, porém, para o tamanho médio da AgNP a diferença significativa ocorreu apenas para as amostras sintetizadas em pH 10, não havendo diferença significativa entre as outras amostras ($p > 0,05$). Segundo Gorup (2010), as espécies reativas de fitoquímicos e suas concentrações são influenciadas pelo pH do meio reacional, sendo assim, isso pode influenciar diretamente na formação das nanopartículas de prata, uma vez que, o poder redutor destes fitoquímicos sobre a prata pode ser maior ou menor em diferentes condições de pH.

Para o potencial zeta, novamente, somente em pH 10 as amostras apresentaram diferença significativa em relação as outras. Por outro lado, o índice de polidispersão (IP) das amostras sintetizadas em pH 10, obtiveram valores mais elevados (0,58 e 0,54) indicando maior heterogeneidade dos tamanhos. Assim, combinando os resultados da análise no UV-Vis e por DLS, podemos afirmar que a melhor condição entre as estudadas para síntese verde das nanopartículas de prata é em pH 8 com 2 mL de óleo de cravo diluído. Pois mesmo que apenas as amostras sintetizadas em pH 10 tenham apresentado diferença significativa, o que poderia indicar ser a melhor condição, estas mesmas amostras não apresentaram boa formação de partículas e a banda de SPR apresentou largura superior à das outras e deslocamento do pico de

absorção o que reflete grande diversidade de tamanho de partículas, sendo assim, uma amostra polidispersa. Fato este, que pode ser confirmado pelos maiores valores do índice de polidispersão encontrados que sugerem maior dispersão dos tamanhos das partículas em solução. Pois, IP menor que 0,4 indicam populações com distribuição de tamanho mais estreita (JADHAV et al. 2016). Como não houve diferença significativa nos parâmetros avaliados por DLS, quando testamos a variação do volume de óleo diluído, as bandas de SPR também foram verificadas a fim de identificar alguma possível diferença na formação de partículas. Para isso, a síntese foi realizada em todos os pHs testados (pH 7, 8, 9 e 10) utilizando 1 e 2 mL de óleo diluído (Figura 13).

Figura 13. Representação da Banda de SPR obtida por UV-Vis para as AgNP sintetizadas com 1 mL (A) e 2 mL (B) de óleo essencial de cravo diluído (1:170) em acetona.



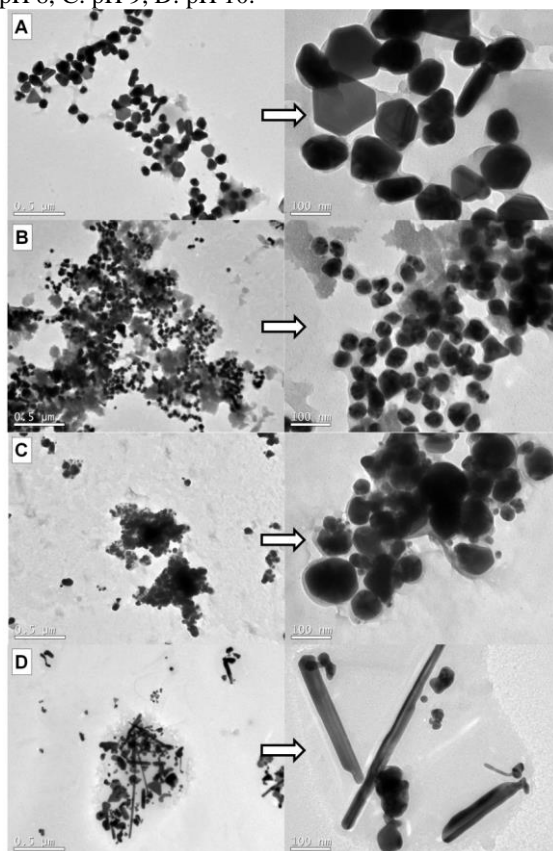
O pico de absorção máxima encontrado foi de 1821 u.a e 2420 u.a para 1 e 2 mL, respectivamente, em pH 8. Desta forma, podemos afirmar que houve maior formação de partículas nesta condição (pH 8 e 2 mL), sendo assim a condição de pH 8 e 2 mL foi adotada para dar sequência aos estudos. É possível observar a banda de SPR (Figura 13) mais definida para a amostra sintetizada com cravo em pH 8 e utilizando 2 mL do óleo diluído. As amostras também foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão.

3.4 Microscopia Eletrônica de transmissão (MET)

A morfologia das AgNPs sintetizadas com óleo essencial de cravo em diferentes pHs foi analisada pelas imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. Com isso também foi possível obter o tamanho médio das partículas e distribuição de tamanho. Partículas densas e de formatos variados foram observadas para cada condição testada. Foi possível visualizar uma camada orgânica envolvendo as partículas. Esta camada possivelmente está associada à ligação dos fitoquímicos do óleo com a prata coloidal. Estes compostos incluem terpenos, fenóis e moléculas tensoativas (JADHAV et al. 2016; VIDYA, SWAMY & SCHELL, 2015; RAGHUNANDAN et al. 2011; GORUP, 2010). Na síntese verde proposta no presente trabalho, o óleo essencial e os compostos fitoquímicos presentes em sua composição, são responsáveis pela redução e da Ag^+ e também pela estabilização destas partículas. As diferentes formas de partículas encontradas podem ser atribuídas à influência do meio reacional em diferentes pHs sobre a redução e estabilização destas partículas (XU et al., 2016; SONG et al. 2011).

Foi observado nas nanopartículas sintetizadas em pH 7 uma tendência à formatos triangulares, quadrangulares, hexágonos e algumas esféricas (Figura 14A). Já para as AgNPs em pH 8 os formatos de pentágono, hexágono e, na sua maioria, esferas, foram os observados (Figura 14B), com pouco aparecimento de formatos triangulares. Em pH 9 o formato esférico predominou (Figura 14C), porém, é notável a maior aglomeração para as partículas desta amostra, o que neste caso, pode colaborar para a coalescência das mesmas em solução. A maior variedade de formatos foi observada na amostra sintetizada em pH 10 (Figura 14D) a qual apresentou formatos de hexágono, quadrados, esféricos e de bastão ou agulha.

Figura 14. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) para as AgNP sintetizadas com óleo essencial de cravo em diferentes condições de pH. A: pH 7, B: pH 8, C: pH 9, D: pH 10.



Também, na leitura da amostra de AgNP em pH 10 no MET, a localização de regiões com presença de nanopartículas nos grids foi mais difícil, refletindo a menor formação de partículas observada para esta amostra na banda SPR. Para as demais partículas (pH 7, 8 e 9) foram encontrados formatos semelhantes com prevalência maior de esferas e envolvimento por uma camada orgânica indicando um pequeno distanciamento entre as partículas devido o impedimento estérico. Resultados semelhantes a estes foram observados por outros autores (VILAS, PHILIP & MATHEW, 2014; ČAKIĆ et al. 2016; XU et al. 2016).

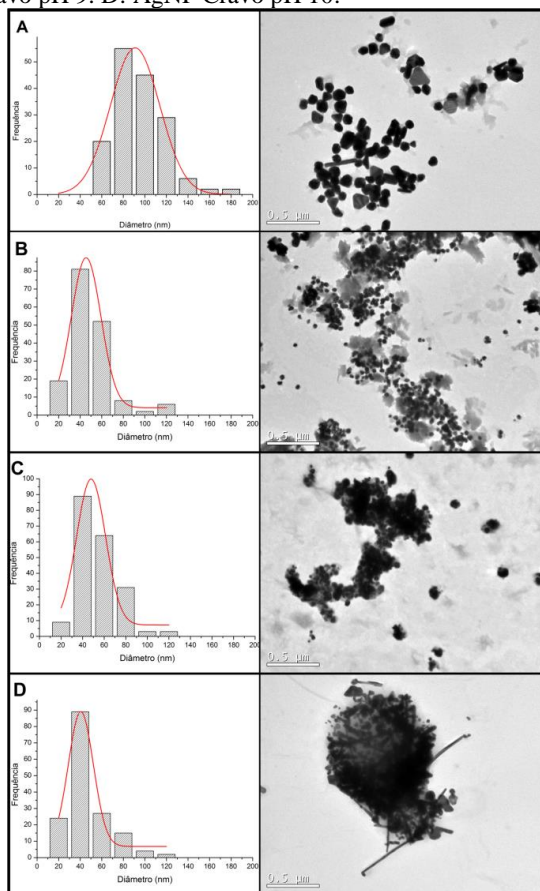
As micrografias do MET foram analisadas com auxílio do *software Quantikov Image Analyser e ImageJ* e as medidas dos diâmetros das partículas foram utilizadas para a construção dos histogramas de distribuição de tamanho para cada uma das amostras. Quando o tamanho das partículas foi analisado pelas imagens do MET o diâmetro encontrado foi diferente do encontrado na análise de DLS para todas as amostras, este fato pode ser explicado uma vez que a medida de tamanho hidrodinâmico encontrada pelo zeta (análise por DLS) não corresponde ao tamanho real da partícula, mas sim a soma do diâmetro real da partícula mais a camada orgânica que reveste as partículas, assim o diâmetro efetivo é obtido por MET (JADHAV et al. 2016). Outro fator é o grau de aglomeração encontrado em algumas amostras que quando analisadas por DLS pode influenciar na obtenção de um maior tamanho. Os valores para as médias obtidas pela medida das partículas por TEM são expostos na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados para o tamanho médio de partícula obtido por análise das imagens do MET e por DLS

Amostra	Tamanho médio \pm desvio padrão	
	MET	DLS
AgNP Cravo pH 7	78,0 \pm 16,3 nm	71,9 \pm 14,5 nm
AgNP Cravo pH 8	35,5 \pm 8,5 nm	55,4 \pm 4,1 nm
AgNP Cravo pH 9	44,0 \pm 18,9 nm	74,8 \pm 2,5 nm
AgNP Cravo pH 10	37,9 \pm 18,7 nm	31,4 \pm 5,8 nm

A amostra AgNP Cravo pH 7 foi a que apresentou maior tamanho médio de partícula entre todas as amostras quando observada por MET. Já a amostra AgNP Cravo pH 10 apresentou tamanho médio reduzido nas duas análises. Porém, é notável a grande variedade de formas encontradas para esta amostra e o pequeno volume de partículas formado, o que as imagens do MET e bandas SPR confirmam. Para a amostra AgNP Cravo pH 8 foi encontrado o menor tamanho médio de partícula quando analisado por MET. Para a AgNP Cravo pH 9 os valores obtidos por análise das imagens do MET apresentaram valores menores do que os obtido por DLS, fato que pode ser pela grande aglomeração das partículas nesta amostra, o que pode mascarar o resultado por DLS, como explicado anteriormente. Assim, os histogramas de distribuição de tamanho foram contruídos e são apresentados na Figura 15.

Figura 15. Histogramas para distribuição de tamanho das AgNP sintetizadas em diferentes pH e imagens do MET. A: AgNP Cravo pH 7. B: AgNP Cravo pH 8. C: AgNP Cravo pH 9. D: AgNP Cravo pH 10.



Observando a Figura 15 podemos notar que, exceto para a amostra em pH 7, todas tiveram maior concentração de frequência na ordem de tamanho entre 20 e 40 nm, porém, claramente conseguimos notar a diferença entre estas amostras pelas figuras do MET. Sendo uma maior aglomeração para as partículas em pH 9 e aglomeração com grande variedade de formatos para a amostra em pH 10, sendo os resultados para a amostra em pH 8 mais favorável quanto ao tamanho e apresentando menos aglomerados de partículas.

3.5 Estudo da estabilidade das AgNP

Como citado anteriormente, o óleo essencial de cravo utilizado na síntese das AgNPs, atua como agente redutor da Ag^+ e também como estabilizante. Acreditamos que o mecanismo de estabilização das nanopartículas seja por passivação ou estabilização estérica, que consiste na coordenação de moléculas no átomo de superfície por ligações covalente (SONG, et al. 2011). Neste tipo de estabilização, as moléculas estão fortemente aderidas na superfície das partículas de prata cessando o crescimento controlado pela difusão, a maturação de Ostwald (PIWONSKI et al. 2016; SONG et al. 2011). A estabilidade das AgNPs ao longo do tempo foi verificada através dos parâmetros de tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta. Para isso as amostras foram armazenadas em frasco âmbar em geladeira ($\pm 8^\circ C$) por até 60 dias e os resultados destas leituras são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores do tamanho médio (Z-ave), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (ζ) das AgNP sintetizadas com óleo essencial de cravo, para verificar a estabilidade ao longo do tempo. Leituras em 0, 30 e 60 dias.

Parâmetro	pH	0 dias	30 dias	60 dias
Tamanho (nm)	7	71,9 \pm 14,5 ^{aA}	109,8 \pm 43,2 ^{aA}	142,6 \pm 33,2 ^{aA}
	8	55,4 \pm 4,1 ^{aA}	61,5 \pm 5,1 ^{aAB}	63,6 \pm 8,4 ^{aAB}
	9	74,8 \pm 2,5 ^{aA}	81,6 \pm 7,3 ^{aAB}	80,6 \pm 3,2 ^{aAB}
	10	31,4 \pm 5,8 ^{aB}	30,2 \pm 5,3 ^{aB}	30,8 \pm 6,3 ^{aB}
Índice de Polidispersão	7	0,269 \pm 0,04 ^{aC}	0,221 \pm 0,069 ^{aB}	0,166 \pm 0,092 ^{aB}
	8	0,400 \pm 0,03 ^{aB}	0,289 \pm 0,015 ^{bb}	0,291 \pm 0,010 ^{bb}
	9	0,232 \pm 0,01 ^{aC}	0,233 \pm 0,031 ^{aB}	0,193 \pm 0,027 ^{aB}
	10	0,543 \pm 0,00 ^{aA}	0,500 \pm 0,00 ^{aA}	0,547 \pm 0,042 ^{aA}
Zeta (mV)	7	-31,9 \pm 8,5 ^{aB}	-23,5 \pm 3,0 ^{aB}	-18,2 \pm 3,0 ^{aB}
	8	-34,8 \pm 3,6 ^{aB}	-28,5 \pm 4,7 ^{aAB}	-26,3 \pm 3,9 ^{aB}
	9	-30,1 \pm 0,7 ^{aB}	-26,3 \pm 2,2 ^{abB}	-23,4 \pm 1,8 ^{bb}
	10	-50,8 \pm 0,8 ^{aA}	-35,1 \pm 0,4 ^{bA}	-34,1 \pm 2,8 ^{bA}

Para valores seguidos de letras minúsculas iguais, na mesma linha, indicam que não há diferença significativa ao nível de 95% de confiança.

Para valores seguidos de letras maiúsculas iguais, na mesma coluna, indicam que não há diferença significativa ao nível de 95% de confiança.

Os valores apresentados na Tabela 6 indicam que apesar de ocorrer uma pequena alteração nos valores das leituras do tamanho médio da partícula, nos tempos de armazenamento de 30 e 60 dias, esta diferença não é significativa ao nível de 95% de confiança. Porém, observando os valores obtidos para a amostra em pH 7 notamos um aumento de 71,9 nm para 142,6 nm de zero para 60 dias, respectivamente. Esta grande diferença não foi significativa no teste de Tukey provavelmente pelo alto valor de desvio padrão desta amostra. Já para o índice de polidispersão a amostra em pH 8 apresentou um decréscimo de tempo zero para a leitura após 30 dias, permanecendo estável em 60 dias. Esta diminuição do índice de polidispersão pode ser resultado da absorção de partículas muito pequenas pelas partículas maiores, ou aglomeração destas partículas resultando em maior uniformidade de tamanhos. Nas leituras do potencial zeta nota-se uma pequena mudança nos valores para as amostras em pH 9 e 10. Estes valores indicam uma possível perda de estabilidade, já que uma boa estabilidade é considerada para valores acima de 30 mV em módulo. As demais partículas permaneceram estáveis. Dessa forma podemos afirmar que as AgNPs permaneceram estáveis durante o tempo de armazenamento de 60 dias à temperatura de ~ 8 °C em geladeira. O aumento no tamanho e diminuição do índice de polidispersão, apesar de não significativo ao nível de 95% de confiança, pode indicar o início da maturação de Ostwald, onde o crescimento ocorre por difusão das partículas menores pelas maiores, resultando em maior homogeneidade dos tamanhos e conseqüentemente, na redução do IP (AN et al. 2012; ANDERSON et al. 2014; LEE & OH, 2015; PIWONSKI et al. 2016).

4. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, pudemos confirmar que a síntese verde de nanopartículas de prata utilizando óleo essencial é possível e viável. Estes resultados também nos mostraram melhor desempenho do óleo essencial de cravo, rico em eugenol, composto fenólico e majoritário presente neste óleo e que é o principal agente redutor e estabilizante das nanopartículas de prata obtidas pela síntese verde. Pela avaliação das bandas SPR foi possível verificar a formação de partículas, utilizando o óleo essencial de cravo, em diferentes condições de pH e também volume de óleo empregado. As nanopartículas de prata obtidas se mostraram estáveis em solução em temperatura de refrigeração pelo período estudado, além de apresentarem formatos variados quando observadas por microscopia eletrônica de transmissão. Os formatos esféricos, triangulares, quadrangulares e hexagonais foram os formatos predominantes para as partículas sintetizada, o que pode contribuir para a ação antimicrobiana. Outro fator evidenciado foi a presença de uma camada envolvendo as nanopartículas e que pode possivelmente ser atribuída à presença de fitoquímicos do óleo responsáveis pela estabilização das partículas em solução. Partículas com tamanho médio entre 35,5 nm e 78,0 nm foram obtidas, sendo o menor tamanho encontrado nas partículas sintetizadas em pH 8. Dessa forma a condição escolhida para a sequência do trabalho foi em pH 8, com 2 mL de óleo diluído e o óleo essencial de cravo foi o escolhido.

**CAPITULO 3: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOPARTICULAS DE PRATA UTILIZANDO ÓLEO ESSENCIAL
DE CRAVO E EUGENOL COMO AGENTES REDUTORES E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Parte deste capítulo foi publicado no periódico *Open Journal of Applied Sciences*.

MACIEL, M. V. de O. B.; ALMEIDA, A. da R.; MACHADO, M. H.; DE MELO, A. P. Z.; DA ROSA, C. G.; DE FREITAS, D. Z.; NORONHA, C. M.; TEIXEIRA, G. L.; DE ARMAS, R. D.; BARRETO, P. L. M. *Syzygium aromaticum* L. (Clove) Essential Oil as a Reducing Agent for the Green Synthesis of Silver Nanoparticles. **Open Journal of Applied Sciences**, v. 9, p. 45-54, 2019. <https://doi.org/10.4236/ojapps.2019.92005>

RESUMO

A presente investigação detalha uma síntese verde de nanopartículas de prata (AgNP) utilizando o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* L. (cravo) como agente redutor, que é uma matriz que apresentou 80% de eugenol na sua composição quando estudado por cromatografia gasosa e é um composto importante para a ação redutora do nitrato de prata. Este estudo destaca a viabilidade do óleo essencial de cravo como alternativa para a síntese de nanopartículas de prata por um método simples e ecologicamente correto. Na avaliação da síntese tanto o óleo essencial de cravo como o seu composto eugenol, apresentaram boa formação de partículas e a microscopia revelou formatos predominantemente esféricos, o que foi confirmado com a técnica de espalhamento de raio X à baixo ângulo (SAXS) que também revelou tamanho médio de 18,6 nm (AgNP-cravo) e 22,4 nm (AgNP-eugenol). Verificou-se também a ação antimicrobiana das AgNPs contra *Staphylococcus aureus* em diferentes concentrações (40-100 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de AgNP), apresentando também Concentração Inibitória Mínima de 40 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, sendo considerado um agente bactericida. Este estudo revelou que o AgNP-Cravo apresenta características similares ao AgNP-Eugenol, revelando o primeiro como uma matriz alternativa mais barata e confiável para a obtenção de nanopartículas de prata. Além disso, as AgNPs também mostraram-se estáveis em solução por 12 semanas nos testes de DLS e UV-Vis, o que pode ser importante para a facilidade de aplicação do meio líquido.

Palavras-chave: *Syzygium aromaticum*, Eugenol, nanopartículas de prata, atividade antimicrobiana.

1. INTRODUÇÃO

Diferentes métodos são aplicados para obter nanopartículas metálicas, sejam elas físicas, químicas ou biológicas. Os métodos biológicos são aqueles que usam microrganismos ou plantas para a biossíntese de nanopartículas (PASUPULETI et al., 2013; RAJ et al., 2016; EISING et al., 2011). O uso de plantas ou derivados de plantas para a síntese de nanopartículas é amplamente utilizado hoje em dia e estes compostos muitas vezes possuem importantes funcionalidades biológicas que podem atuar sinergicamente com as nanopartículas para diversas aplicações nas mais variadas áreas da indústria alimentícia, indústria farmacêutica e área médica. A preocupação com a não degradação do meio ambiente é hoje evidente, o que ressalta a importância de métodos capazes de propor alternativas para a redução de resíduos químicos nocivos (VILAS, PHILIP & MATHEW, 2014; HONGFANG, HUI & CHUANG, 2017; RAJA, RAMESH & THIVAHARAN, 2017).

Dentro deste contexto, as nanopartículas de prata (AgNP) são proeminentes na aplicação como agentes antimicrobianos capazes de controlar e inibir o crescimento de microrganismos pela interação com as células destes, impedindo a respiração celular e, assim, impedindo sua replicação (KESHARI et al., 2018). Normalmente as nanopartículas não são consideradas tóxicas para as células eucarióticas, especialmente nas concentrações normalmente utilizadas. No entanto, a síntese usando produtos químicos conhecidamente tóxicos pode limitar a sua aplicação em algumas áreas. Dessa forma, a busca por agentes capazes de reduzir os sais de prata para a formação de nanopartículas, sem causar riscos à saúde ou ao meio ambiente, é um importante papel da ciência (ALIZADEH, GHOSHAL & COMEAU, 2019).

O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) é uma planta cultivada em diversos países, incluindo o Brasil, e o seu óleo essencial é amplamente utilizado por sua ação antimicrobiana, antifúngica e antioxidante, além dos efeitos anestésicos e analgésicos. Essas características são fortemente atribuídas ao seu principal composto, o eugenol, presente no óleo em concentrações que podem chegar a 90% (HONGFANG, HUI & CHUANG, 2017; RADÜNZ et al., 2019). Esta característica faz com que o óleo essencial de cravo seja, teoricamente,

um excelente agente redutor de prata para a síntese de nanopartículas, utilizando baixas concentrações de óleo. O provável mecanismo de redução é dado pela doação de prótons da estrutura do eugenol, reduzindo o Ag^+ para Ag^0 e, assim, formando as nanopartículas. Além disso, os fitoquímicos presentes no óleo também podem interagir na superfície das nanopartículas, promovendo proteção e estabilização (VIJAYARAGHAVAN et al., 2012; MASHWANI et al., 2016).

Desta forma, o principal objetivo do presente capítulo foi a síntese de nanopartículas de prata utilizando o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* L. (cravo), bem como do seu composto majoritário eugenol, como agente redutor e estabilizante. Assim como, a caracterização dessas partículas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espectrofotometria no UV-Visível, Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (*Small-angle X-ray scattering* - SAXS), avaliação da capacidade antioxidante do óleo e do eugenol, além da avaliação a atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata sintetizadas em condições pré definidas no capítulo 2.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Para os experimento do presente capítulo foram utilizados nitrato de prata (AgNO_3), acetona P.A e eugenol, obtidos da Sigma Aldrich. Além do óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum* L.) adquirido no comércio local de Florianópolis/SC. Todos os demais reagentes por hora utilizados eram de grau analítico.

2.2 Atividade Antioxidante

Para avaliar a possível associação do potencial antioxidante e, conseqüentemente, da capacidade redutora do óleo essencial de cravo e do seu composto majoritário eugenol, importante para um bom desempenho na síntese das nanopartículas, foram realizados os ensaios de inibição dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila e ácido 2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico pelas metodologias descritas a seguir.

2.2.1 Ensaios de Inibição do Radical DPPH

A atividade antioxidante pelo método de inibição do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) foi realizada conforme descrito por Afoulous e colaboradores (2013). Foram preparadas diluições seriadas das amostras em metanol, nas concentrações de 1,5 a 25,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o óleo essencial de cravo e para o eugenol. Logo após, uma alíquota de 1,5 mL da amostra é transferida para tubos de ensaio, seguida da adição de 1,5 mL do reagente DPPH na concentração de 0,2 mmol.L^{-1} . Para cada ensaio foi preparado um branco, empregando água destilada no lugar da amostra. As amostras foram incubadas ao abrigo da luz por 30 minutos e em seguida foram determinadas as absorbâncias a 520 nm em um aparelho espectrofotômetro HITACHI, U-1800 (Tokyo, Japão). O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados obtidos pelo cálculo da média e desvio padrão. A porcentagem de atividade antioxidante (AA%) foi calculada seguindo a Equação 1.

$$AA\% = 100 - \left[\frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}} \right] \quad (1)$$

Onde AA(%) representa atividade antioxidante, $Abs_{amostra}$, absorvância da amostra, Abs_{branco} , absorvância do controle em branco e $Abs_{controle}$, absorvância do controle negativo. Os resultados são expressos como valores de EC_{50} (concentração efetiva para inibir 50% do radical), calculados por regressão linear, onde o eixo X representa as concentrações dos óleos testados e o eixo Y representa a percentagem de atividade antioxidante.

2.2.2 Ensaio de inibição do radical ABTS^{•+}

Para os ensaios de inibição do radical ácido 2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS^{•+}) a metodologia utilizada foi a descrita segundo Thaipong e colaboradores (2006). Para tal, a solução do radical ABTS^{•+} foi preparada pela reação das soluções de ABTS^{•+} na concentração de 7,4 mmol.L⁻¹ e persulfato de potássio na concentração de 2,6 mmol.L⁻¹, ambas em água destilada. A mistura das soluções na proporção de 1:1 foi incubada ao abrigo da luz em temperatura ambiente, por 12 a 16 horas. Após o tempo de incubação a solução foi diluída pela mistura de 1 mL da solução de ABTS^{•+} com 60 mL de metanol, para obter uma absorvância de 1,1 em 734 nm. A partir das amostras de óleo essencial e eugenol, foram preparadas as diluições entre 15 e 70 µg.mL⁻¹ em triplicata. Em ambiente escuro, um volume de 2,85 mL da solução do radical ABTS^{•+} foi acrescentado a 150 µL de cada diluição das amostras. E após 1 hora incubadas ao abrigo da luz, as absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro à 734 nm. Para o controle negativo foi utilizada água destilada no lugar da amostra. As absorvâncias foram convertidas em percentagem de atividade antioxidante (%AA) utilizando a mesma equação dos ensaios de inibição do radical DPPH (Equação 2). E os valores também foram expressos pelo cálculo do EC_{50} .

2.3 Síntese de AgNP utilizando óleo essencial de cravo e eugenol

A síntese de AgNPs foi realizada de acordo com Vilas, Philip e Mathew (2014), seguindo os parâmetros já definidos no capítulo 2. Uma solução aquosa de nitrato de prata (AgNO₃) na concentração de 0,31 mmol.L⁻¹ foi preparada no momento da síntese em ambiente escuro. O óleo essencial de cravo, bem como o eugenol, foram diluídos em acetona

P.A numa proporção de 1 parte de óleo, ou eugenol, para 170 de acetona (1:170).

Na sequência a solução de AgNO_3 teve o seu pH ajustado para 8 utilizando NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. 30 mL da solução de AgNO_3 com pH 8 foi aquecida até 100°C em chapa de aquecimento com rigorosa agitação magnética. Após atingir a temperatura de síntese, 2 mL do óleo ou do eugenol, foram gotejados na solução de AgNO_3 permanecendo em constante agitação e aquecimento por 30 minutos. Durante este período foi observado o surgimento da coloração amarela, indicativa da formação das nanopartículas de prata em solução.

2.4 Formação de AgNP e estabilidade

Para avaliar a formação de AgNPs sintetizadas utilizando óleo essencial de cravo e eugenol foi utilizada a análise por espectroscopia no UV-Vis também utilizando um espectrofotômetro HITACHI, U-1800 (Tokyo, Japão) em modo de varredura, num intervalo de comprimento de onda de 300 a 800 nm e uma taxa de 800 nm/minuto, no qual as amostras foram acondicionadas diretamente em uma cubeta de quartzo e a leitura foi realizada diretamente no aparelho. Neste caso, as AgNP também foram monitoradas ao longo do tempo para verificar a estabilidade destas em solução, pelos mesmo parâmetros obtidos com as leituras da absorbância no espectrofotômetro com a metodologia supracitada (EISING et al, 2011; SANTOS et al, 2012). As amostras foram monitoradas por 12 semanas e com os resultados das leituras foram contruídas as bandas SPR para cada amostra em cada tempo, afim de verificar possíveis alterações na intensidade das bandas, resultantes de agregação e coalescência das partículas.

2.5 Análise de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

O método de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) foi utilizado para a verificação do tamanho médio de partícula (Z-ave) pelo raio hidrodinâmico, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (ζ) das nanopartículas de prata. Esta análise foi realizada no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina em um equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Para a análise as soluções de AgNPs foram colocadas em célula de eletroforese e as leituras foram realizadas em ângulo fixo de 173° e temperatura 25°C .

Os resultados foram obtidos por meio do cálculo da média e desvio padrão das leituras.

2.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

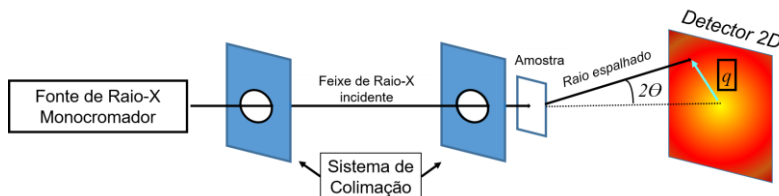
Para conhecer a morfologia das AgNPs a técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi utilizada. A análise foi realizada por deposição das amostras em *grids* de cobre recobertas com carbono (*mesh* 200) e após a secagem foram observadas no microscópio JEOL modelo JEM -1011 (Tóquio, Japão) operando a uma tensão de fluxo de 80 kV em diferentes magnificações, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME-UFSC). Após a observação, as imagens foram analisadas no *software Quantikov Image Analyser* para a contagem e medida das partículas. Para isto, pelo menos 150 partículas forma contadas e os histogramas de distribuição de tamanho foram construídos no *software Origin 8*.

2.7 Espalhamento de Raio-X a Baixo Ângulo (SAXS)

O experimento de Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS) foi realizado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS - Campinas, SP) usando a linha de luz SAXS1, onde cada solução de AgNP obtida foi acondicionada em uma célula sob vácuo e temperatura controlada, composta por duas janelas de mica separadas por 1 mm, normais ao feixe (ELIAS et al. 2014). No experimento, o feixe de raios X colimado ($1,55 \text{ \AA}$) passa sobre a amostra e é espalhado em um detector bidimensional Pilatus 300K (DECTRIS). O tempo de exposição foi de 120 segundos e os padrões de espalhamento 2D foram coletados após esse período. Para cobrir o intervalo q desejado (de $0,15$ a $3,5 \text{ nm}^{-1}$), onde n é cerca de 1 para raios X, a distância entre a amostra e o detector foi estabelecida em 500 e 3000 mm. Em todos os casos, as imagens 2D foram isotrópicas e normalizadas por transmissão de amostras usando o software FIT2D desenvolvido pela Hammersley. As curvas de dispersão resultantes $I(q)$ vs. (q) foram corrigidas por subtração da dispersão do solvente puro e depois colocadas numa escala absoluta utilizando água como padrão. O perfil de espalhamento $I(q)$ vs. (q) das AgNPs foi ajustado usando o fator de formação de esferas. Os procedimentos de

ajuste e outras análises foram realizados utilizando o ajuste de mínimos quadrados pelo *software* livre SASfit (ELIAS et al. 2014). O esquema simplificado é mostrado na Figura 16.

Figura 16. Esquema simplificado para a análise de SAXS



Fonte: O autor.

2.8 Ensaios de determinação da atividade antimicrobiana

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados através dos testes de microdiluição em caldo para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), segundo a metodologia M7-A9 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (NCCLS, 2012). A microdiluição foi realizada em placa de plástico estéril com 96 poços, específica para a microdiluição. Inicialmente, as amostras de AgNPs foram diluídas em água destilada para concentrações de 40, 60 e 80 % (v/v). O nitrato de prata utilizado para a síntese também foi testado. Em cada um dos poços deveria conter 100 μL . Assim, foi adicionado em cada poço 90 μL de caldo Muller-Hinton e 10 μL de AgNPs nas diferentes concentrações, em triplicata. Dessa forma, a concentração final de AgNP nos poços foi de 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, respectivamente para soluções iniciais de 40, 60, 80 e 100 % (AgNP pura). Para os microrganismos testados, os inóculos foram preparados em concentração de 10^7 UFC. mL^{-1} utilizando a escala de McFarland para comparação da turbidez. Foi adicionado na placa 5 μL do inóculo, chegando a uma concentração final no poço de 10^5 UFC. mL^{-1} . Os microrganismos testados foram *Escherichia coli* (ATCC 8739) (gram negativa), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (gram positiva) e *Bacillus cereus* (ATCC 10987) (gram positiva e esporulante). Essas bactérias foram selecionadas por serem importantes e comuns em processos de deterioração de alimentos. Foram preparados poços de

controle negativo (somente o caldo, sem inóculo) e de controle positivo (caldo e inóculo, sem AgNP) para comparação da turbidez formada pelo crescimento do microrganismo. Após, as placas foram incubadas em estufa de crescimento por 16 a 20 horas a 35 °C. As leituras da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram realizadas a olho nu através da turbidez em comparação com o controle negativo. A menor concentração na qual não houve crescimento bacteriano foi determinada como a CIM.

Após a leitura das amostras, os meios contidos nos poços em que não foi observada turbidez característica de crescimento bacteriano, foram repicados para placas contendo ágar nutriente, pela técnica de esgotamento. As placas foram incubadas à 37 °C por 24 horas e o crescimento bacteriano foi observado. Quando não houve crescimento na placa a concentração testada foi considerada bactericida. Ao passo que, se houve crescimento bacteriano na placa, a concentração testada foi considerada bacteriostática.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaios de inibição dos radicais DPPH e ABTS^{•+}

Os resultados obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) para o óleo essencial de cravo (Capítulo 2), revelaram que o óleo de cravo apresentou dois compostos principais somando 94,18 % do óleo essencial de cravo (OEC). Estes compostos foram o cariofileno (14,03 % m/v) e o eugenol (80,15 % m/v), o que condiz com a literatura disponível (SEBAALY et al., 2017; CHEN et al., 2017). A partir desses resultados, o óleo de cravo e o seu composto majoritário foram selecionados para a continuidade do trabalho. E a primeira etapa foi a verificação da atividade antioxidante do OEC e do eugenol, uma vez que esta é uma propriedade importante para a redução de Ag⁺ e obtenção de nanopartículas.

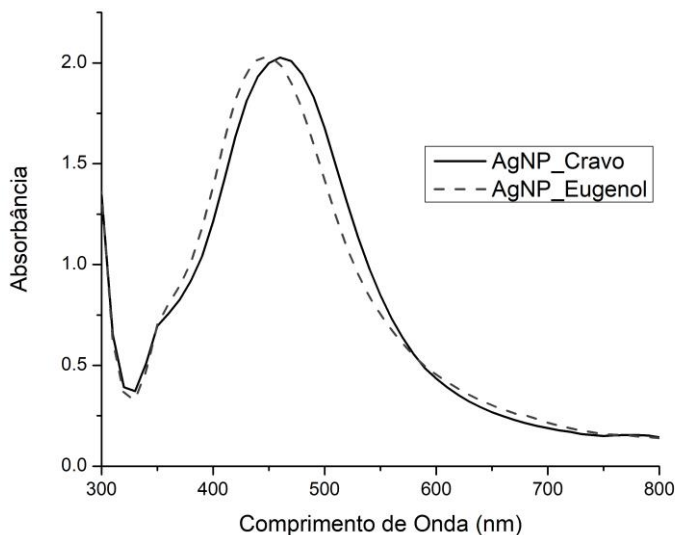
Os valores de EC₅₀ obtidos pelo método de inibição do radical ABTS foram de $32,7 \pm 1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $29,8 \pm 0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para OEC e para o eugenol, respectivamente. Já nos ensaio de inibição do DPPH, os resultados foram de $6,5 \pm 0,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $13,3 \pm 0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, para o OEC e o eugenol. Estes valores são semelhantes aos encontrados por Scherer et al. (2009), que relataram valores de EC₅₀ de $7,8 \pm 0,65 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o OEC o que foi próximo aos obtidos pelos mesmos autores para o BHA, considerado um padrão antioxidante e que obteve valores de EC₅₀ de $8,2 \pm 0,41 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

A amostra do OEC apresentou maior atividade antioxidante quando comparada ao eugenol, pelo método de DPPH. No entanto, o oposto ocorreu para o teste inibição do radical ABTS. Isso pode estar relacionado aos diferentes compostos presentes no OEC além do eugenol. Estes resultados também destacam a capacidade antioxidante do óleo essencial de cravo e do eugenol. Gülçin et al. (2012) avaliaram a atividade antioxidante do óleo essencial de cravo-da-índia e observaram a inibição efetiva dos radicais DPPH e ABTS, além da eliminação de radicais aniônicos, como superóxido e da depuração de peróxido de hidrogênio. Além disso, quando comparados ao BHA, BHT, α -tocoferol e Trolox como compostos antioxidantes de referência, o OEC mostrou um desempenho semelhante em relação à eliminação de radicais livres. Logo, os resultados encontrados são condizentes com a literatura e reforçam o potencial do OEC e do eugenol como agente redutor para a síntese de AgNP.

3.2 Síntese de AgNP utilizando óleo essencial de cravo e eugenol

A formação das AgNPs foi avaliada por espectroscopia UV-Vis na faixa de 300 a 800 nm e as bandas de Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR) são apresentadas na Figura 17.

Figura 17. Bandas de SPR obtidas por espectrometria no UV-Vis



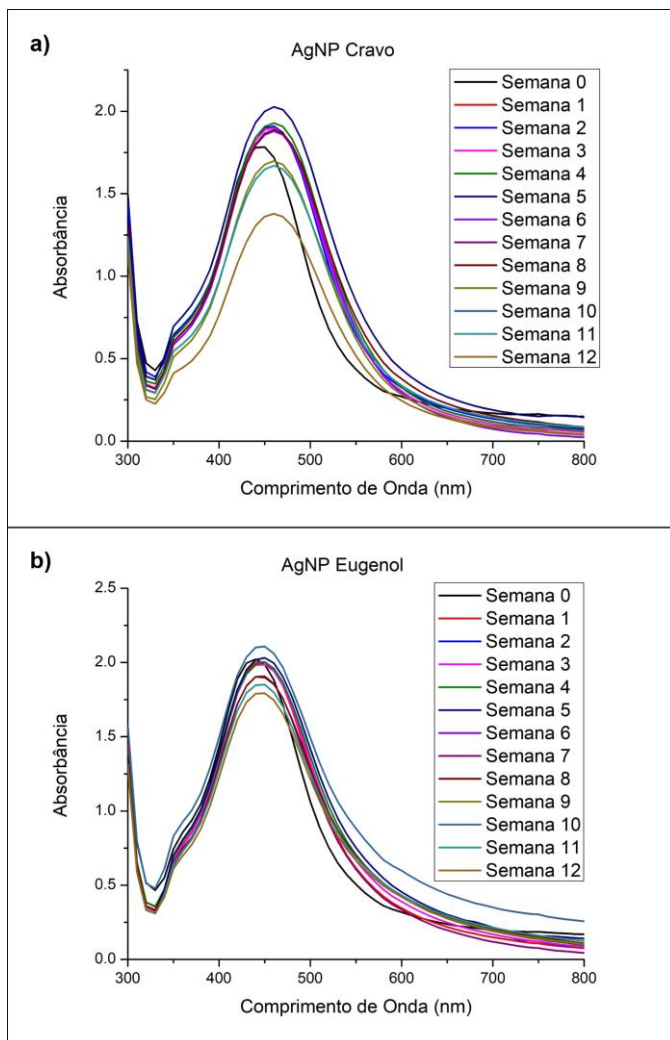
Na comparação das bandas de SPR para as AgNPs obtidas com cravo e com eugenol, as duas apresentam perfis bastante semelhantes, com a intensidade de absorção máxima para o AgNP-Cravo de 460 nm e para AgNP-Eugenol de 450 nm. O que indica uma boa formação de partículas para os dois agentes redutores. Isso mostra a relação da formação de partículas com a alta concentração de eugenol no OEC. Mostrando-se suficiente para a máxima eficiência na síntese, pois o resultado é muito semelhante ao obtido com o composto puro, eugenol. Como mencionado anteriormente, este composto apresenta estruturas hidroxiladas, que são essenciais para a redução da prata e formação das nanopartículas. Os resultados observados nos ensaios demonstraram que

o óleo essencial de cravo foi eficaz nas condições testadas, com rápida redução do sal de prata e obtenção das nanopartículas.

O perfil da banda de SPR depende das propriedades da prata coloidal, como a forma e o tamanho das nanopartículas metálicas, a concentração de íons metálicos e a quantidade de extrato e o tipo de compostos orgânicos presentes na matriz vegetal. Geralmente, as nanopartículas esféricas de prata exibem um pico de SPR a cerca de 436 nm (DONG et al. 2017). Os mesmos autores relatam absorvância ao redor de 425 nm para AgNP com tamanho médio de 5 a 40 nm e formatos esféricos. Já Khamhaengpol & Siri, 2017 encontraram picos de SPR por volta de 428 nm para AgNP com tamanho médio de 67,4 nm. Raja et al. 2017, em sua síntese de AgNPs utilizando extrato de *Calliandra haematocephala* obteve bandas SPR com picos em 414 nm. Estes resultados reforçam a evidência de formação de AgNPs utilizando OEC e eugenol.

Utilizando a mesma técnica de absorção no UV-Vis as amostras foram avaliadas ao longo de 12 semanas. A amostra de AgNP-Eugenol (Figura 18b) apresentou pouca variação na faixa de SPR durante as 12 semanas de avaliação, representando boa estabilidade frente à aglomeração das partículas sem deslocamento do pico de máxima absorção. Para a AgNP-Cravo (Figura 18a) apesar de ainda apresentar a banda SPR definida, a amostra mostrou um declínio na intensidade da banda, notável principalmente na 12^a semana, possivelmente uma indicação de aglomeração e coalescência das partículas. Porém, da mesma forma que a AgNP-Eugenol, não ocorreu deslocamento do pico de máxima absorvância. O mecanismo de estabilização assumido para as nanopartículas é por passivação ou estabilização estérica, que segundo Song et al. 2011, ocorre pela coordenação de moléculas na superfície da nanopartículas por ligações covalentes. Com estes resultados pode-se afirmar que ambas as amostras permaneceram estáveis nas 12 semanas do estudo, apesar do decréscimo na intensidade da banda observada para a amostra AgNP-Cravo.

Figura 18. Avaliação da estabilidade em solução das AgNP obtidas com cravo (a) e com eugenol (b) ao longo de 12 semanas



3.3 Análise de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

A caracterização do raio hidrodinâmico para as AgNPs foi obtida pela técnica de espalhamento luz dinâmico (DLS) e apresentou tamanho

médio de $55,4 \pm 4,1$ nm para AgNP-Cravo e $57,4 \pm 0,2$ nm para AgNP-Eugenol. Já para o índice de polidispersão (IP) os valores encontrados foram $0,4 \pm 0,034$ para AgNP-Cravo e de $0,366 \pm 0,040$. Segundo Jadhav et al. 2016, valores de IP menores do que 0,4 correspondem a populações de partículas com tendência a monodispersividade, ou seja, distribuição de tamanho mais estreita. Enquanto que para o potencial zeta, os valores encontrados foram de $-34,8 \pm 3,6$ e $-14,3 \pm 1,0$, respectivamente para AgNP-Cravo e AgNP-Eugenol. Neste caso, valores mais elevados (em módulo) são indicativos de maior estabilidade por impedimento eletrostático, devido a repulsão das cargas superficiais das AgNP. Porém, a ligação de fitoquímicos do óleo na superfície das nanopartículas também poderá promover a estabilização estérica, e assim, somando a ligação dos fitoquímicos com a carga observada no zeta, pode-se prever estabilização por impedimento eletrostérico (ROUCOUX, SCHILZ & PATIN, 2002; HIERREZUELO et al. 2010; DE ARAGÃO, 2016). As amostras foram paralelamente acompanhadas ao longo do tempo pelas leituras dos parâmetros de DLS. A Tabela 7 traz os resultados para o tamanho médio, IP e potencial zeta obtido por DLS com leituras em 1, 6 e 12 semanas, o mesmo tempo de monitoramento por UV-Vis.

Tabela 7. Resultados da análise de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) ao longo de 12 semanas para AgNP-Cravo e AgNP-Eugenol

Semana	AgNP-Cravo		
	Tamanho (nm)	Índice de Polidispersão	Zeta (mV)
1	$55,4 \pm 4,1^a$	$0,400 \pm 0,034^b$	$-34,8 \pm 3,6^a$
6	$61,5 \pm 5,1^a$	$0,289 \pm 0,015^a$	$-28,5 \pm 4,7^a$
12	$63,6 \pm 8,4^a$	$0,291 \pm 0,010^a$	$-26,3 \pm 3,9^a$
Semana	AgNP-Eugenol		
	Tamanho (nm)	Índice de Polidispersão	Zeta (mV)
1	$57,4 \pm 0,2^a$	$0,366 \pm 0,040^b$	$-14,3 \pm 1,0^a$
6	$59,2 \pm 3,5^a$	$0,234 \pm 0,026^a$	$-11,6 \pm 1,2^a$
12	$61,4 \pm 4,8^a$	$0,231 \pm 0,023^a$	$-11,7 \pm 1,4^a$

Letras minúsculas iguais na mesma coluna, indicam que não houve diferença significativa ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Para os valores do potencial zeta, é possível observar uma diminuição principalmente da 1ª para a 6ª semana para a AgNP-Cravo e a estabilização deste parâmetro para AgNP-Eugenol da 6ª para a 12ª semana. Apesar do decréscimo do valor de potencial zeta, estes ainda apresentaram valores que não diferem significativamente para ambas as

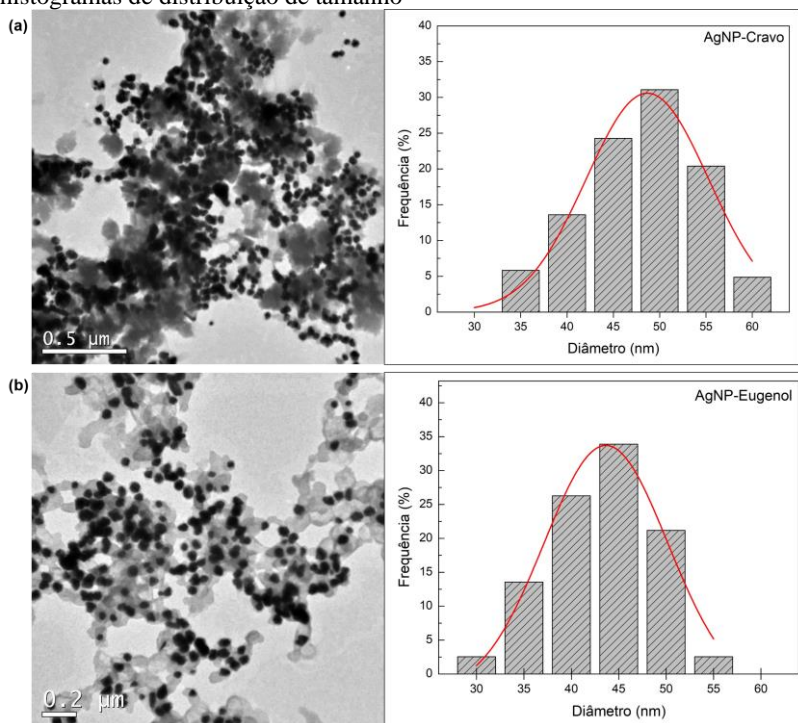
amostras. O mesmo pode ser observado para a leitura do tamanho, que não apresentou diferença significativa ao longo das 12 semanas. A única diferença significativa encontrada para as amostras dentro dos parâmetros monitorados, foi o IP, que diminuiu da 1ª para a 6ª semana e depois permaneceu estável na leitura de 12 semanas. Isto pode ser atribuído pelo possível processo de difusão das partículas menores pelas maiores, deixando a distribuição de tamanho relativamente menor. Estes resultados reforçam o que foi observado por UV-Vis e demonstram a estabilidade das AgNPs ao longo do período estudado.

3.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A forma e distribuição de tamanho das AgNPs foi determinada pela técnica de MET com o auxílio do *software Quantikov Image Analyzer*. Nos valores obtidos para o diâmetro médio determinado por MET pode-se notar uma similaridade entre as duas amostras. Sendo estes, valores médios para o tamanho das AgNPs de $45,6 \pm 6,1$ nm e $40,4 \pm 5,3$ nm para a amostra de AgNP-Cravo (a) e AgNP-Eugenol (b), respectivamente. Em geral, a forma das AgNPs produzidas foi esférica, confirmando os valores obtidos no Capítulo 2.

Em ambas as amostras foi observada alguma dispersividade de tamanhos e uma camada menos densa ao redor das nanopartículas. Esta camada possivelmente se refere à ligação de compostos fitoquímicos na superfície das nanopartículas, o que pode contribuir para a estabilização da solução coloidal de NPs em água. Sendo condizente com o relatado anteriormente. Estes compostos podem ser representados na camada orgânica observada na superfície das partículas. Isto pode contribuir para cessar ou retardar o crescimento controlado pela difusão, a chamada maturação de Ostwald (SONG et al. 2011; PIWONSKI et al., 2016). As imagens das micrografias obtidas por MET, bem como os histogramas de distribuição de tamanho das AgNPs são apresentados na Figura 19.

Figura 19. Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão e os histogramas de distribuição de tamanho

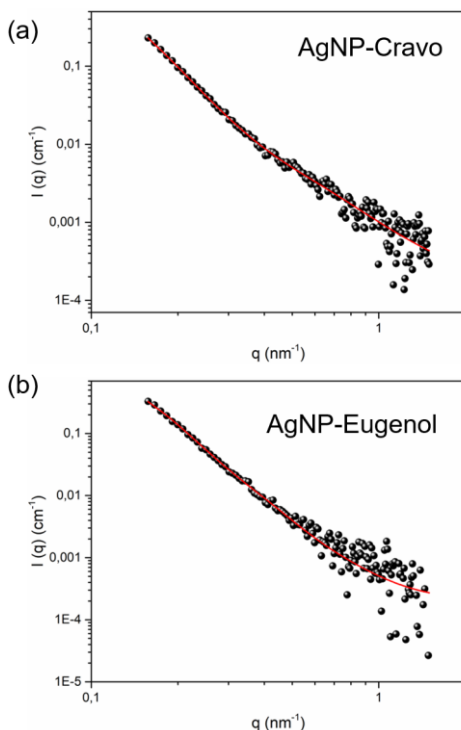


3.5 Espalhamento de Raio-X a Baixo Ângulo (SAXS)

A caracterização por SAXS fornece informações sobre o diâmetro (D) das AgNPs e σ (relacionado à dispersão das nanopartículas) levando a valores de $D = 18,6$ nm e $\sigma = 0,46$ para AgNP-Cravo e $D = 22,4$ nm e $\sigma = 0,33$ para AgNP-Eugenol (Figura 20). Esses valores diferem daqueles obtidos por MET, e neste caso, a etapa de secagem da amostra para a observação no MET pode causar a aglomeração das partículas e alterações físicas durante a preparação dos *grids*. Já para o DLS, como já mencionado, a medida é do raio hidrodinâmico, que por sua vez, tende ser maior do que o valor real da partícula. Dessa forma, como a análise de SAXS é realizada em uma condição real das partículas em solução, as características das AgNPs são preservadas e assim, ela fornece um resultado mais confiável do formato e do tamanho médio das mesmas,

sendo considerada uma técnica superior quando comparada ao MET e DLS (GOERTZ et al., 2009; LI, SENESI & LEE, 2016). Porém, ambas as técnicas são complementares umas às outras, reforçando e confirmando os seus resultados e observações.

Figura 20. Dados obtidos por SAXS (esferas) e curva de ajustes correspondentes (linha) para AgNP-Cravo (a) e AgNP-Eugenol (b)



Apesar das vantagens apresentadas para a análise por SAXS, esta também pode apresentar algumas limitações quanto ao estudo do formato das partículas, uma vez que os valores são ajustados para o modelo de esferas. Desta forma, os diferentes formatos observados nas micrografias obtidas por MET, podem não ser detectados pelo SAXS, uma vez que são ajustados a um modelo específico. Também ocorre o limite de detecção da técnica, que é de 2 nm, o que impede a identificação de partículas menores, quando estas são relatadas.

3.6 Ensaios de determinação da atividade antimicrobiana

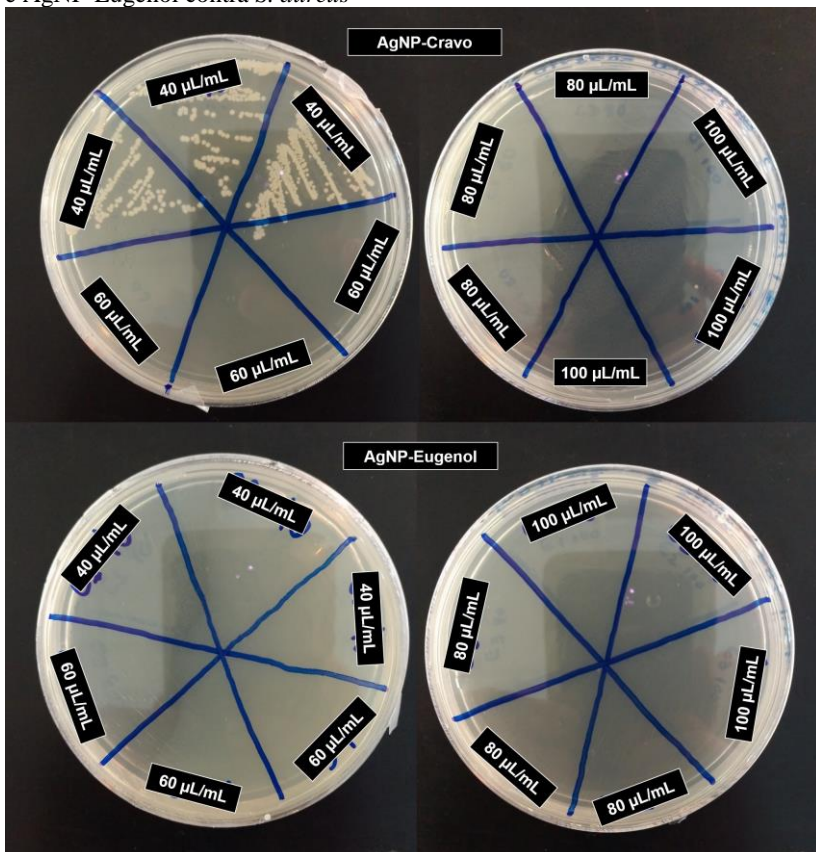
Tanto o AgNP-Cravo quanto o AgNP-Eugenol foram efetivos no controle do *S. aureus* apresentando uma CIM de $40 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ contra essa bactéria gram-positiva, revelando que apresentam atividade inibitória mesmo na concentração mínima testada. Para a *E. coli* e *B. cereus* nenhuma das concentrações foi capaz de inibir o crescimento. Assim, sugere-se que maiores concentrações deste AgNP podem ser estudadas.

Embora o AgNP-Cravo na concentração de $40 \mu\text{L} / \text{mL}$ apresente ação bacteriostática, todas as demais concentrações ($60\text{-}100 \mu\text{L} / \text{mL}$) para AgNP-Cravo e AgNP-Eugenol foram bactericidas, uma vez que inibiram o crescimento da bactéria. Estes resultados mostram uma excelente eficiência no controle do crescimento de *S. aureus* (bactéria gram-positiva).

A ação antibacteriana das AgNPs pode ser atribuída aos íons metálicos presentes em sua superfície e que reagem com grupos tiol e sulfidril presentes na proteína da membrana celular bacteriana. Essa interação reduz a permeabilidade da membrana celular e causa danos à respiração celular e, conseqüentemente, a morte celular. A prata também pode se ligar ao DNA e ao RNA bacteriano, causando desnaturação e inibindo a replicação (CASTELLANO et al. 2007; KOTAKADI et al. 2015).

O tamanho nanométrico das partículas aumenta a área de contato com as células bacterianas. Então, partículas menores têm maior interação do que as maiores, e a ação antimicrobiana é conseqüentemente alta. Além disso, a forma da partícula desempenha um papel importante nesse processo. Segundo Pal et al. (2007), partículas com formato triangular apresentam maior efetividade na inibição do crescimento bacteriano em relação ao formato esférico. Assim, esta pode ser uma das razões para os resultados negativos em relação a ação antimicrobiana contra alguns microrganismos aqui estudados, uma vez que as AgNPs avaliadas possuem uma forma predominantemente esférica. As concentrações que mostraram inibição foram testadas quanto a sua ação bactericida ou bacteriostática e os resultados são apresentados na Figura 21.

Figura 21. Ensaio de atividade bactericida e bacteriostática para AgNP-Cravo e AgNP-Eugenol contra *S. aureus*



4. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados no presente capítulo demonstraram uma síntese verde viável de nanopartículas de prata utilizando o óleo essencial de cravo e o seu composto majoritário eugenol. Os testes experimentais, juntamente com a composição química do óleo essencial, mostraram que a concentração dos principais compostos, bem como a estrutura desses compostos, têm influência significativa na eficiência da síntese e explicam o bom desempenho do óleo essencial de cravo (OEC). Além disso, o alto teor de eugenol presente no OEC pode desempenhar o papel de redução do nitrato de prata para formar AgNP. As nanopartículas obtidas com OEC apresentaram resultados semelhantes quando comparadas às obtidas com eugenol, revelando o primeiro como uma matriz alternativa, mais barata ao composto puro para obtenção de nanopartículas de prata. Os resultados também mostraram que as duas nanopartículas desenvolvidas apresentaram atividade antimicrobiana, sendo efetivas contra *S. aureus*, mostrando também estabilidade em solução durante um período de 12 semanas. A forma predominantemente encontrada, foi de esferas e o tamanho médio, obtido por diferentes técnicas, apresenta-se na escala nanométrica chegando a 18,6 nm e 22,4 nm quando a técnica experimental de SAXS foi aplicada, respectivamente para a AgNP-Cravo e AgNP-Eugenol. A análise po SAXS também apresentou resultados mais precisos quanto ao tamanho e forma das AgNPs, obtendo os valores a partir das soluções coloidais, ou seja, no seu estado nativo. Isso também justifica os resultados encontrados pela análise de MET e DLS, bem como a análise de espectroscopia no UV-Vis onde houve a evidencia da formação de nanopartículas em consonância com outros estudos encontrados na literatura. Assim, a síntese e caracterização das AgNP foi essencial para o conhecimento desta matriz como agente redutor, bem como para conhecer as características das partículas obtidas, importante para a continuidade dos estudos nesta área.

**CAPITULO 4: PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS IMPREGNADAS COM
NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

RESUMO

No presente capítulo as nanopartículas de prata obtidas utilizando óleo de cravo como agente redutor foram adicionadas às soluções poliméricas no intento de obter nanofibras pelo processo de eletrofiação. Inicialmente foram preparadas soluções poliméricas utilizando poli (óxido de etileno) (PEO) e zeína em diferentes concentrações. As AgNPs foram adicionadas às soluções na concentração de 2% (m/m). Os parâmetros das soluções foram avaliados e mostraram que um aumento da massa molar do polímero fez elevar o valor do índice de consistência e que todas as soluções apresentaram comportamento de fluido pseudoplástico. Além disso, a presença de AgNP e principalmente de zeína, conferiu maior condutividade elétrica para as soluções. Os parâmetros do equipamento foram ajustados para realizar a eletrofiação com cada solução. Para o processo foram aplicadas voltagens de 7,33 a 9,5 kV, onde, de forma geral, menores voltagens foram necessárias para eletrofiar as soluções contendo PEO de massa molar 1000 kDa. As nanofibras obtidas apresentaram aspecto uniforme, lisas, quando obtidas somente com PEO ou PEO e AgNP, e para essas nanofibras os diâmetros médios, obtidos por análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), variaram de $335,9 \pm 1,7$ a $843,1 \pm 6,1$ nm e formato cilíndrico. Na presença da zeína as nanofibras obtidas apresentaram-se mais irregulares e em nenhum dos casos foi possível notar alguma interferência da presença das AgNPs. Para confirmar a presença das AgNPs nas nanofibras, bem como observar a sua distribuição ao longo das nanofibras, foi realizada a análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET), onde foi possível observar que apesar da homogeneização das soluções poliméricas com as AgNPs por 24 horas, as AgNPs apresentaram-se aglomerada, concentradas em algumas partes ao longo das fibras. Com os resultados obtidos foi possível verificar a produção de nanofibras impregnadas com AgNPs, com grande área superficial e potencial de aplicabilidade como material de composição de embalagens ativas, pela ação antimicrobiana das nanopartículas.

Palavras-chave: Poli (óxido de etileno), zeína, nanofibras, eletrofiação, nanopartículas, prata.

1. INTRODUÇÃO

A técnica de eletrofição é o processo pelo qual obtém-se fibras em escala micro ou nanométricas pelo emprego de soluções poliméricas. Para este processo diversos polímeros são utilizados, entre os quais poli (óxido de etileno) (PEO), álcool polivinílico (PVA), zeína, caseína, policaprolactona (PCL) e goma arábica, entre outros (KAYACI & UYAR, 2012; KYSELICA et al., 2018; ACEVEDO et al., 2018; AADIL, MUSSATTO & JHA, 2018; LIN et al., 2018). Estes polímeros são solubilizados em variados solventes, como dimetilformamida, dimetilacetamida, etanol, acetona, tolueno, acetonitrila, clorofórmio, etc. E para o processo geralmente são aplicadas voltagens entre 10 e 25 kV. Esta voltagem deve ser suficiente para romper a tensão superficial e outras forças contrárias a formação das fibras. Estas fibras normalmente possuem propriedades únicas, como grande área superficial e elevada porosidade, além de apresentar diâmetros controláveis, ampliando o seu espectro de aplicações (AADIL, MUSSATTO & JHA, 2018).

Devido às propriedades já mencionadas das fibras obtidas por eletrofição, muitos pesquisadores demonstram interesse na pesquisa desses materiais para as mais diversas aplicações, como na agricultura e na indústria de alimentos, principalmente pela facilidade de incorporar compostos ativos às fibras, que incluem fungicidas, antimicrobianos, antioxidantes, entre outros, que podem auxiliar na preservação de alimentos (ASMATULU & KHAN, 2019).

O acondicionamento de alimentos cada vez mais precisa ser prolongado, aumentando a disponibilidade e conveniência dos mesmos. Dessa forma, um maior prazo de validade é importante, porém, deve estar aliado à qualidade e segurança deste produto em todas as etapas do processo, desde a fabricação, transporte, armazenamento e consumo. E uma das alternativas, ou ferramentas para auxiliar neste aspecto são as embalagens ativas, nas quais as nanofibras podem ser parte deste material, ajudando na manutenção de propriedades de alimentos e bebidas, incluindo sabor, cor, textura, consistência, bem como propriedades de barreira, mecânicas e antimicrobianas, durante o transporte e armazenamento. Assim, novos estudos concentraram-se nessas funcionalidades das nanofibras para aplicação em embalagens ativas

(BABITHA et al., 2017; ASMATULU & KHAN, 2019). Neste aspecto, as embalagens ativas contendo agentes antimicrobianos, como as nanopartículas de prata e o eugenol, entre outros agentes, combinados com as nanofibras, podem ser uma opção viável e eficiente para o controle de microrganismos, aumentando a conveniência e segurança para o consumidor (BABITHA et al., 2017; AADIL, MUSSATTO & JHA, 2018; ASMATULU & KHAN, 2019).

Neste contexto, o intento do presente trabalho é produzir nanofibras de PEO e zeína pelo processo de eletrofiação, bem como utiliza-las como suporte para nanopartículas de prata na intenção de apresentar uma possível alternativa de material de embalagem ativa.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Para o presente capítulo os seguintes reagentes foram utilizados, nitrato de prata (AgNO_3), acetona P.A, zeína, Poli (óxido de etileno) (PEO) de 100, 1000 e 5000 kDa, e o composto eugenol, obtidos da Sigma Aldrich. Além do óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*) que foi adquirido em farmácia de manipulação do comércio local de Florianópolis/SC. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2 Preparo das soluções poliméricas

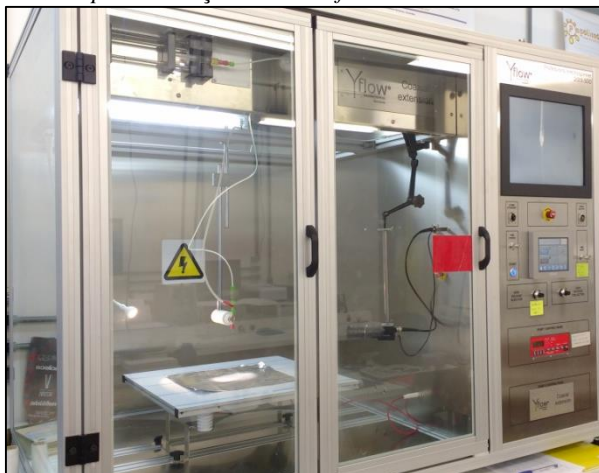
Com a metodologia de síntese das nanopartículas definida (Capítulos 2 e 3), foram iniciados os testes para a produção das nanofibras poliméricas adicionadas de AgNPs. Para tanto, primeiramente foram definidos os polímeros utilizados e as concentrações das soluções poliméricas, bem como a proporção da mistura das soluções (quando aplicável). Os polímeros utilizados foram o poli (óxido de etileno) (PEO) com massa molar de 1000 kDa e de 5000 kDa e a proteína zeína, uma prolamina extraída do milho. Com base na literatura e também em testes de tentativa e erro, foram selecionadas algumas concentrações para as soluções poliméricas, bem como, para a mistura das soluções que posteriormente foram submetidas à adição das nanopartículas de prata. O solvente utilizado para ambas as soluções poliméricas foi o etanol 85 % (v/v), no qual ambos os polímeros são solúveis.

2.3 Preparo das nanofibras por eletrofição

Para a eletrofição das soluções poliméricas com e sem adição de AgNPs, foi utilizado o equipamento *Professional Electrospinner* da Yflow® *Nanotechnology Solutions* (Málaga, Espanha) modelo 2.0S-500, com sistema de injeção por seringa plástica com diâmetro interno de 11,99 mm, localizado no Laboratório de Polímeros e Surfactantes em Solução (Polissol) da Universidade Federal de Santa Catarina. O aparelho é equipado com uma câmera CCD (*charge-coupled device*) com sensor de imagem 1/3" *color sharp high sensitivity CCD* - 0,1 Lux, equipada com lente de 40 mm e de 20 mm. Com a imagem gerada pela câmera é

possível visualizar o cone de Taylor formado na ponta do injetor. A Figura 22 mostra a imagem do equipamento utilizado no presente estudo.

Figura 22. Imagem do *Professional Electrospinner* da Yflow® *Nanotechnology Solutions* utilizado para obtenção das nanofibras



Fonte: O autor.

A voltagem aplicada para o processo é controlada e o equipamento permite variação de 0 a 30 kV no injetor e de 0 à -30 kV no coletor. A vazão da bomba também é ajustável e é controlada automaticamente de acordo com o fluxo desejado. Já a regulagem da distância entre a ponta da agulha e o coletor é regulada manualmente, pela regulagem da posição da agulha em relação ao coletor.

A deposição das fibras foi feita sobre uma folha de papel alumínio colocada sobre a placa coletora para possibilitar a retirada das fibras e acondicionamento no próprio alumínio, evitando a possível danificação das nanofibras. De acordo com as características de cada solução ou mistura de soluções poliméricas, todos os parâmetros necessários foram ajustados no equipamento afim de conseguir a eletrospinação. Dessa forma, cada solução precisou de um ajuste específico.

2.4 Caracterização das soluções poliméricas

2.4.1 Parâmetros reológicos

As soluções foram caracterizadas quanto a sua viscosidade, tensão superficial e condutividade elétrica. As soluções de PEO e PEO/Zéina, adicionadas ou não com AgNP foram submetidas à análise em um Reômetro da marca *Brookfield*, modelo RVDV-IIICP, modelo de spindle do tipo SSA, SC4-27, acoplado à um banho termoestatizado para controle da temperatura. Todos os dados obtidos foram analisados com o *Software Rheocalc 32*. As leituras foram realizadas em temperatura fixa de 25 °C. As amostras inicialmente foram mantidas em repouso por 10 minutos no porta-amostras para equilibrar a temperatura de trabalho. O fluxo em estado estacionário foi medido para cada amostra por um período de 20 minutos. Com as leituras os parâmetros reológicos como índice de consistência e índice de fluxo foram obtidos a partir do *software Rheocalc 32*.

2.4.2 Tensão superficial

As leituras da tensão superficial foram realizadas pela metodologia de gota pendente utilizando um equipamento Goniômetro modelo OCA 15EC (Filderstadt, Alemanha), acoplado à um sistema processador de imagem de alta resolução *Data Physics Instruments*. As amostras foram colocadas em uma seringa de 1 mL e acopladas ao equipamento. Através de sistema automatizado, a solução é dispensada até que o limite para o desprendimento da gota na ponta da agulha seja alcançado. A imagem é registrada e a medida da área e volume da gota pendente na ponta da agulha é utilizada pelo *software* para determinar a tensão superficial. Pois, uma maior tensão superficial resultará em um maior volume de líquido suportado, consequentemente, o volume decresce com a diminuição da tensão superficial. O equipamento é calibrado inicialmente com água destilada e as leituras feitas em 10 gotas e os resultados são expressos em média e desvio padrão para cada uma das soluções.

2.4.3 Condutividade elétrica das soluções poliméricas

A condutividade elétrica das soluções poliméricas foi medida diretamente nas amostras, utilizando um condutivímetro de bancada

modelo TEC-4MP (Tecnal, Piracicaba-SP), usando uma célula de vidro de $K=1,0$ na temperatura de 25 °C.

2.5 Caracterização das nanofibras

2.5.1 Morfologia e distribuição de tamanho das nanofibras

Para avaliar a morfologia das fibras obtidas e a distribuição de tamanho das mesmas, foi realizada a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em um microscópio eletrônico JEOL modelo JSM-6390LV (Tóquio, Japão) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina. As fibras foram fixadas em um suporte metálico de cobre (*stub*) com auxílio de uma fita dupla-face de carbono. Para isto a fita dupla-face foi fixada no *stub* que em seguida foi pressionado levemente sobre as fibras que após fixadas foram recobertas com uma fina camada de ouro em uma recobridora a vácuo Leica EM SCD500 (Leica, EUA).

Os aumentos para a visualização no MEV variaram de 500 a 8000 vezes, com uma voltagem de excitação de 10 kV. As imagens obtidas por MEV também foram utilizadas para verificar a distribuição de tamanho das fibras e para isto o *software Quantikov Image Analyser* foi utilizado para a medida e contagem das fibras e logo após, com os dados obtidos, foi possível obter a distribuição de frequência do tamanho.

2.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A análise de MET foi utilizada para a verificação da presença das AgNPs nas nanofibras obtidas por eletrofição. Para tal, as nanofibras impregnadas com as nanopartículas foram fixadas em *grids* de cobre (*mesh* 200) e observadas em um microscópio JEOL modelo JEM -1011 (Tóquio, Japão) operando a uma tensão de fluxo de 80 kV em diferentes magnificações. As análises de microscopia foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME-UFSC).

2.5.3 Análises estatísticas

Todos os resultados são expressos em médias e desvio padrão de pelo menos três repetições. Quando aplicável, o teste de análise de variância ANOVA e teste de comparação de médias de Tukey são realizados através do *software STATISTICA 7.0*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Testes preliminares para produção das nanofibras

Na produção das nanofibras poliméricas obtidas por eletrofiação e carregadas com as AgNPs, os primeiros testes para adequação das metodologias foram desenvolvidos no Laboratório de Polímeros e Surfactantes em Solução (Polissol) do Departamento de Química da UFSC. Primeiramente foram testados os polímeros a serem utilizados, sem adição das nanopartículas. Os polímeros foram a zeína de milho e o poli (óxido de etileno) (PEO).

3.1.1 Preparo das soluções poliméricas

Algumas concentrações das soluções poliméricas foram testadas para avaliar o desempenho na eletrofiação. A concentração da solução é determinante para o sucesso da eletrofiação e está associada à viscosidade, que são fundamentais na obtenção de fibras lisas e sem contos. O solvente escolhido foi o etanol 85 % (v/v), solvente no qual o PEO e a zeína apresentam boa solubilidade e dessa forma foi utilizado para ambos os polímeros. Assim, com base na literatura e também em testes preliminares, foram definidas algumas concentrações a partir da zeína e do PEO, este último com diferentes massas molares (100 kDa, 1000 kDa e 5000 kDa). As concentrações testadas são descritas na Tabela 8.

Tabela 8. Concentrações testadas para as soluções poliméricas no processo de eletrofiação utilizando solvente etanol 85 % (v/v)

Polímero	Concentração (m/m)
PEO 100 kDa	10%
PEO 1000 kDa	4%
PEO 5000 kDa	2%
Zeína	10%
Zeína	20%
Zeína	30%

Para a preparação das soluções as massas correspondentes dos polímeros foram pesadas e adicionadas ao solvente sendo então mantidas em agitação magnética por 24 horas.

3.1.2 Parâmetros das soluções poliméricas

As soluções poliméricas foram avaliadas quanto aos parâmetros reológicos, índice de consistência (k) e índice de comportamento de fluxo (n), além disso, foram analisadas a tensão superficial e condutividade elétrica das mesmas. Os resultados destas análises constam na Tabela 9, a seguir.

Tabela 9. Índice de Consistência, índice de comportamento, tensão superficial e condutividade elétrica das diferentes soluções poliméricas formadoras de fibras

Solução	k (mPa.s ⁿ)	n	Tensão superficial (mN/m)	Condutividade elétrica (μ S.cm ⁻¹)
PEO1000	18235±82 ^f	0,55±0,00 ^c	46,8±8,9 ^d	10,59
PEO1000/AgNP	20455±535 ^d	0,53±0,01 ^c	29,6±5,2 ^{bc}	21,45
PEO5000	28328±89 ^c	0,28±0,01 ^a	32,4±5,8 ^c	9,64
PEO5000/AgNP	29486,5±11,5 ^c	0,27±0,01 ^a	21,2±3,4 ^a	19,06
PEO1000/Z	4751,5±103,5 ^a	0,67±0,01 ^d	25,5±4,9 ^{abc}	151,7
PEO1000/Z/AgNP	4968,5±3,5 ^a	0,66±0,00 ^d	31,7±3,8 ^c	188,3
PEO5000/Z	11286,5±441,5 ^b	0,35±0,02 ^b	23,3±5,8 ^{ab}	198,6
PEO5000/Z/AgNP	10975±161 ^b	0,34±0,01 ^b	22,7±4,7 ^{ab}	256,4

Valores apresentados como a média \pm desvio padrão. n : índice de comportamento de fluxo; k : índice de consistência. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisadas pelo teste de Tukey.

Para o índice de consistência (k) foi possível observar menores valores para a solução de PEO 1000 em relação à solução de PEO 5000, mostrando uma relação do aumento da massa molar do PEO e aumento do k . Tanto para as soluções de PEO 1000, quanto para as soluções de PEO 5000, a presença da zeína fez o valor de k diminuir, indicando menor consistência. O que também foi observado em algumas amostras quando estas foram adicionadas de AgNP, porém, neste caso, não houve diferença significativas entre elas.

O índice de comportamento de fluxo (n) mostrou uma relação da massa molar do PEO, ou seja, um aumento da massa molar resultou na diminuição do n . O contrário foi observado, quando comparadas as soluções com PEO de mesma massa molar com a adição de zeína. Ou seja, quando a zeína estava presente ocorreu um aumento do índice de

comportamento de fluxo. Ainda, todas as soluções apresentaram valores de n menores do que 1, isto é característico de fluído não newtoniano, pseudoplástico, em que ocorre a diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento (CUI et al, 2015).

Para a tensão superficial uma diferença significativa ocorreu entre as soluções de PEO 1000 e PEO 5000 puras, sendo este parâmetro maior para a solução de PEO 1000. Também observou-se que, de modo geral, a presença de zeína e AgNP, fizeram reduzir a tensão superficial, mostrando diferença significativa entre o polímero puro e o adicionado de zeína, AgNP ou ambos, para uma solução de PEO com a mesma massa molar. A tensão superficial é um importante parâmetro a ser levado em consideração para a formação do cone de Taylor, sendo que, menores valores de tensão superficial indicam menor força de coesão entre as moléculas da solução. Assim, teoricamente, é necessária menor força eletrostática para romper a força de coesão e formar o cone de Taylor para iniciar a eletrofiação (GARG & BOWLIN, 2011). Assim, se a tensão superficial da solução for muito elevada ocorre dificuldade para a formação do cone de Taylor, o que poderá resultar em descontinuidade do jato e obtenção de fibras irregulares, ou até mesmo, partículas ao invés de fibras. E ao passo que, se a tensão superficial for muito baixa ocorre o escoamento mais fácil da solução através da ponta da agulha, resultando em fibras de diâmetros maiores (COSTA et al. 2012; BHARDWAJ & KUNDU, 2010).

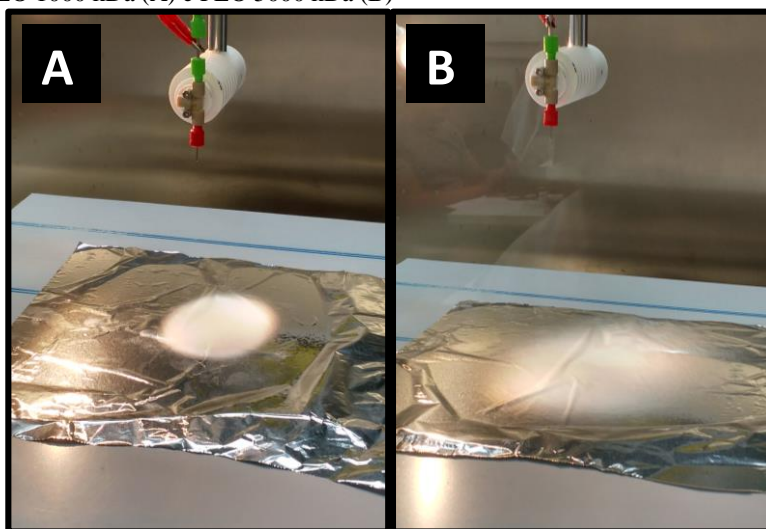
Os resultados das leituras da condutividade elétrica das soluções revelaram que, a presença das AgNPs proporcionaram um aumento na condutividade, o que já era esperado, dada a condutividade do metal. Porém, maiores valores foram observados com a adição de zeína, sendo estes valores cerca de 10 vezes maiores do que os apresentados para as soluções sem zeína. Isto mostra que a presença de cargas na zeína influencia positivamente neste parâmetro, sendo mais significativo do que o efeito da presença das AgNPs. Rad, Mokhtari e Abbasi (2018) relataram o aumento da condutividade elétrica de soluções poliméricas para a produção de nanofibras com o aumento da concentração de zeína e goma arábica. Os autores atribuem esse fato a presença, em maior quantidade, de grupos como $-NH_2$, $-OH$ e $-COOH$ presentes nestes compostos, no

caso do presente trabalho, proveniente da zeína. Estes grupos em solução apresentam-se ionizados, contribuindo como aumento de carga.

3.1.3 Eletrofiação

Os testes de eletrofiação foram iniciados com as soluções preparadas para avaliar o desempenho das mesmas no processo. Assim, cada uma das soluções foi testada alterando os parâmetros de fluxo de alimentação, voltagem aplicada e distância entre o eletrodo e o coletor no equipamento, a resposta foi observacional em relação à formação de fibras e não *spray*, uniformidade da deposição das nanofibras no coletor e aspecto úmido das mesmas. Num primeiro momento não foi possível obter fibras a partir das soluções de zeína em nenhuma das concentrações testadas. Foi observada para as soluções de zeína a formação de *spray* e, conseqüentemente, de partículas e não fibras. Este fato pode ser atribuído à baixa viscosidade da solução nas concentrações testadas. O mesmo é relatado por outros autores quando testadas soluções de zeína entre 5 e 12 % (m/m) de concentração (TORRES-GINER, GIMENEZ & LAGARON, 2008) e também em concentrações de 40 % (m/m) (KAYACI & UYAR, 2012) e é atribuído a baixa viscosidade das soluções em função da concentração. Para a solução de PEO 100 kDa o mesmo ocorreu e não foi possível obter fibras. Já para as soluções de PEO 1000 kDa e 5000 kDa foi possível obter nanofibras. E neste caso a distância entre o eletrodo e o coletor para a solução de PEO 1000 kDa foi regulada para 12 cm com um fluxo de alimentação de 1 mL/hora e voltagem de 6,27 kV, condições estas que possibilitaram a obtenção das nanofibras com deposição regular por 30 minutos (Figura 23a). Estes parâmetros foram resultados de testes de tentativa e erro, no qual também foram aplicados para a solução de PEO 5000 kDa. Porém, neste caso, quando a distância aplicada foi de 12 cm a deposição não foi homogênea, formando um “disco” com área central sem deposição. Isto ocorreu mesmo com a variação de voltagem (6,0; 7,0; 7,5 e 8,0 kV) e também com alterações no fluxo (0,5; 0,7; 0,9; 1,0 e 1,2 mL/h). Quando a distância foi aumentada para 16 cm em voltagens menores (7 – 9 kV) o mesmo foi observado, com deposição irregular formando espaço central sem a presença de fibras, porém, com o aumento para 9,5 kV na distância de 16 cm a deposição passou a ser homogênea sem a presença de espaços vazios na área de deposição da manta (Figura 23b).

Figura 23. Deposição das nanofibras em papel alumínio a partir da solução de PEO 1000 kDa (A) e PEO 5000 kDa (B)



Após os primeiros testes, novas soluções foram preparadas utilizando PEO 1000 e 5000 kDa nas concentrações de 4 e 2 % (m/m), respectivamente, e a mistura destas soluções com solução de zeína na concentração de 10 % (m/m). A proporção de solução de PEO para solução de zeína foi fixada em 2:1. Também foi testada a adição das AgNP nas soluções e para isso também foi fixada a porcentagem de nanopartículas em 2 % (m/m) para todas as soluções testadas. Assim, oito soluções foram preparadas para os experimentos subsequentes e são apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10. Soluções poliméricas testadas para a eletrofiação

Solução	Código	PEO (kDa)	Zeína 10% (1:2)	AgNP 2%
1	PEO1	1000	Não	Não
2	PEO1/AgNP	1000	Não	Sim
3	PEO1/Z	1000	Sim	Não
4	PEO1/Z/AgNP	1000	Sim	Sim
5	PEO5	5000	Não	Não
6	PEO5/AgNP	5000	Não	Sim
7	PEO5/Z	5000	Sim	Não
8	PEO5/Z/AgNP	5000	Sim	Sim

Com as soluções preparadas os testes prosseguiram. Para a solução 1, foi aplicado um fluxo de 1 mL/h e neste caso, quando aplicamos fluxo menor (0,7 mL/h) não havia constância e o tempo de vôo era elevado gerando instabilidade na deposição, a distância foi de 12 cm e a voltagem aplicada foi 7,33 kV. O fluxo de alimentação precisou ser aumentado para 1,3 mL/h para a solução 2 pois, com o fluxo em 1 mL/h ocorria o secamento da solução e entupimento da agulha, não formando fibras. Para ambas as soluções (1 e 2) a voltagem foi de 7,33 kV e a distância de 12 cm. Para a Solução 3, quando aplicado um fluxo de 1 mL/h e uma voltagem de 7,33 kV e distância de 12 cm, as fibras foram formadas, mas uma tendência de aglomeração no centro da área de deposição foi observada. Estes grumos formados ocorreram provavelmente pela ineficiência da secagem do solvente que pode ser influenciada tanto pela distância quanto pelo fluxo de alimentação e pela voltagem. Assim, primeiramente o fluxo de alimentação foi reduzido de 1 para 0,7 mL/h novamente, e o problema foi corrigido, sendo que a voltagem de 7,33 kV foi suficiente para obter fibras aparentemente uniformes e finas. Quanto a Solução 4, a presença das AgNPs não interferiu nas condições de obtenção e visualmente não houve alteração do aspecto das fibras quando comparados com as da solução 3. Assim, os parâmetros foram mantidos iguais. Para as soluções 5 e 6 a distância precisou ser aumentada para 14 cm e a voltagem aplicada foi de 8,52 kV pois quando aplicada uma voltagem menor, o tempo de vôo era alto e as fibras tendiam a se espalhar. O fluxo para estas duas soluções foi de 1 mL/h. Para a Solução 7 o fluxo de alimentação mantido em 1 mL/h, pois quando em 0,7 mL/h ocorria o entupimento da agulha devido a secagem da solução. A distância foi alterada novamente para 12 cm, porém foi necessária uma voltagem de 9,5 kV para obter as fibras. Na Solução 8 foi necessário alterar a distância de 12 para 14 cm mantendo o fluxo 1 mL/h e uma voltagem de 7,33 kV, neste caso a presença das AgNPs interferiu no processo, sendo necessária algumas alterações para obter as fibras. Assim os parâmetros obtidos para cada uma das soluções são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11. Resultados dos testes para os parâmetros aplicados na eletrofição das diferentes soluções

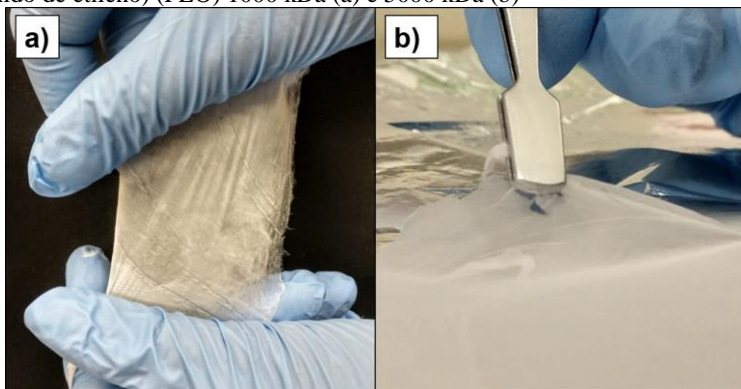
Solução	Código	Voltagem (kV)	Fluxo (mL/h)	Distância (cm)
1	PEO1	7,33	1	12
2	PEO1/AgNP	7,33	1,3	12
3	PEO1/Z	7,33	0,7	12
4	PEO1/Z/AgNP	7,33	0,7	12
5	PEO5	8,52	1	14
6	PEO5/AgNP	8,52	1	14
7	PEO5/Z	9,5	1	12
8	PEO5/Z/AgNP	7,33	1	14

Em geral foi observado que a voltagem aplicada para as soluções de PEO 5000 kDa precisaram ser um pouco maiores e que o mesmo ocorreu para a distância e fluxo. A presença das nanopartículas em alguns casos influenciou e em outros não, não mostrando uma conclusão sobre a influência deste fator na obtenção das nanofibras por eletrofição. Assim, os resultados não são conclusivos, mas servem para nortear próximos estudos, e revelam grande influência de fatores diversos, o que dificulta a padronização dos parâmetros de obtenção de nanofibras sem um controle apurado de fatores como temperatura ambiente e umidade relativa, para minimizar as interferências destes no processo.

3.1.4 Morfologia das nanofibras

A Figura 24 mostra a membrana de nanofibras obtida. A aparência macroscópica de ambas as amostras obtidas, não apresentaram diferenças à olho nu, porém, as nanofibras obtidas com PEO 5000 foram mais “quebradiças,” dificultando o manuseio das mesmas, característica essa que não foi observada nas nanofibras obtidas a partir de PEO 1000, tanto na presença quanto ausência da zeína e das AgNP.

Figura 24. Membrana de nanofibra obtida por eletrofiação de soluções de Poli (óxido de etileno) (PEO) 1000 kDa (a) e 5000 kDa (b)



Fonte: O autor, 2019.

As nanofibras obtidas foram analisadas quanto a sua morfologia e distribuição de tamanho. Para tanto, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada. Alguns autores atribuem a incidência de contas à umidade relativa do ar alta. Tripatanasuwan, Zhong & Reneker (2007) mostraram o aumento da formação de contas com o aumento da umidade relativa do ar, no trabalho os autores avaliaram umidades relativas entre 5,1 e 63,5 % e o maior número de contas foi observado acima de 57 % de umidade relativa. Os autores descrevem que com o excesso de solvente, referente à alta umidade, o polímero tende a se acumular ocasionando as contas. Para o presente trabalho o equipamento *electrospinner*, que foi utilizado, está em um ambiente com desumidificador de ar que mantém a umidade relativa em 50 ± 5 %. As fibras obtidas somente com PEO (1000 ou 5000 kDa) com ou sem adição de AgNP, apresentaram morfologia cilíndrica e aspecto liso sem incidência de fusão e contas (Figura 25).

Figura 25. Imagens das nanofibras por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para as amostras utilizando PEO 1000 kDa e zeína com ou sem adição de AgNP. Soluções 1, 2, 3 e 4

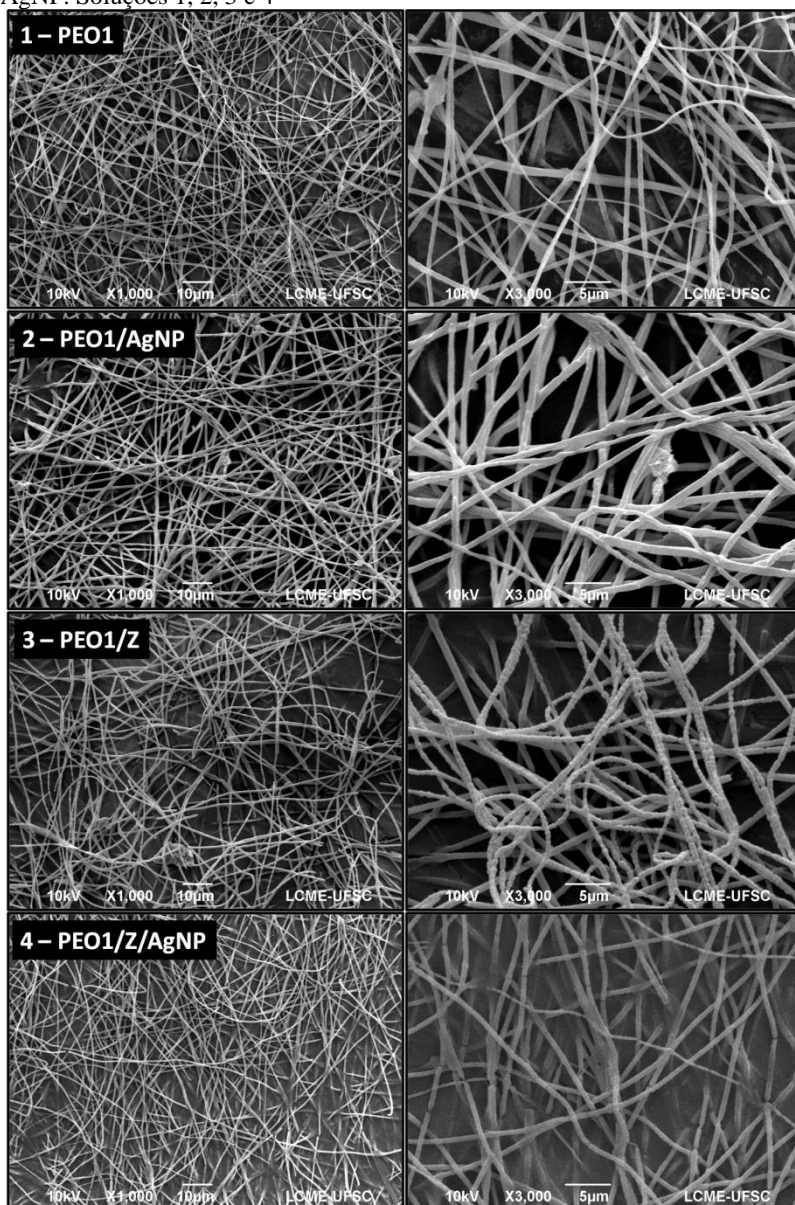
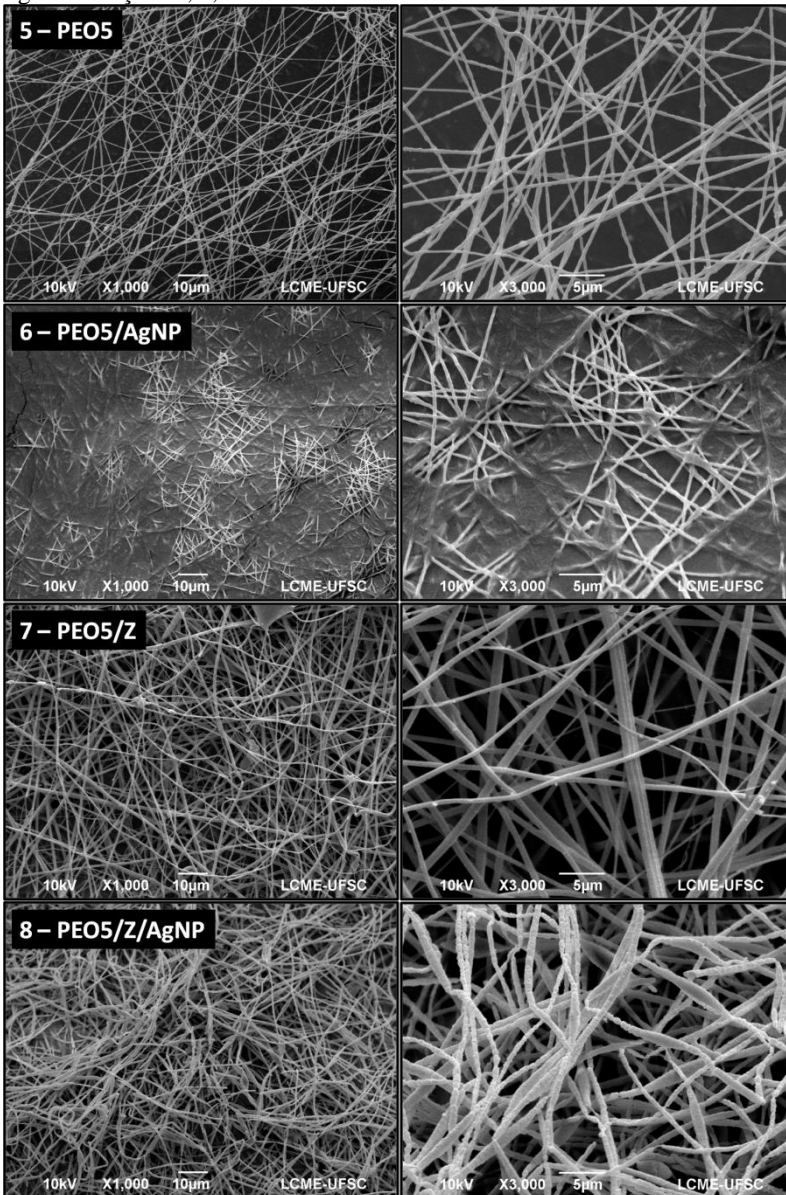


Figura 26. Imagens das nanofibras por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para as amostras utilizando PEO 5000 kDa e zeína com ou sem adição de AgNP. Soluções 5, 6, 7 e 8



Visualmente não é perceptível nenhuma alteração na aparência entre a amostra obtida a partir da solução 1 (PEO 1000 kDa à 4 %) e a amostra obtida a partir da solução 2 (PEO 1000 kDa à 4 % com adição de AgNP), o que mostra que para estas amostras a adição das AgNPs na concentração de 2 % não influenciou no processo (Figura 25). Quanto à presença da zeína a 10 % (m/m) foi observado formação de irregularidades ao longo da extensão das fibras. Estes pequenos “grumos” formados apresentam pequeno ou nenhum espaçamento entre si e não interferem na aparência macroscópica das fibras. Porém, quando foi adicionado AgNP à mistura, este aspecto não foi observado (Figura 25 (1) e (2)). Acredita-se que a presença das AgNPs auxilia no alongamento das fibras permitindo a boa evaporação do solvente e obtenção de aspecto liso. Entretanto, a situação inversa foi observada quando utilizado PEO 5000 kDa e zeína. Neste caso, quando as AgNPs não estavam presente o aspecto liso foi obtido (Figura 26 (7 e 8)). Kayaci & Uyar (2012) encontraram fibras uniformes de zeína em dimetilformamida (DMF) quando eletrofiaram soluções com concentrações acima de 50% e relataram a presença de contas e formação de spray em concentrações mais baixas. Porém, a incorporação de ciclodextrinas auxiliou na obtenção de nanofibras mais uniformes em concentrações menores de zeína. No nosso caso, a mistura da zeína e do PEO possibilitou obter fibras mais uniformes utilizando concentrações de 10 % de zeína.

3.1.5 Distribuição de tamanho das nanofibras

Para o estudo da distribuição de tamanho das nanofibras foram utilizadas as imagens do MEV e o *software ImageJ* por meio do *plugin DiameterJ*. Para isto as imagens do MEV foram submetidas à análise no *software* e os diâmetros foram medidos sem levar em consideração o comprimento das fibras. A Tabela 12 mostra os resultados obtidos para os diâmetros médios \pm desvio padrão.

Tabela 12. Resultados para os diâmetros médios das nanofibras e seus parâmetros de eletrofiiação

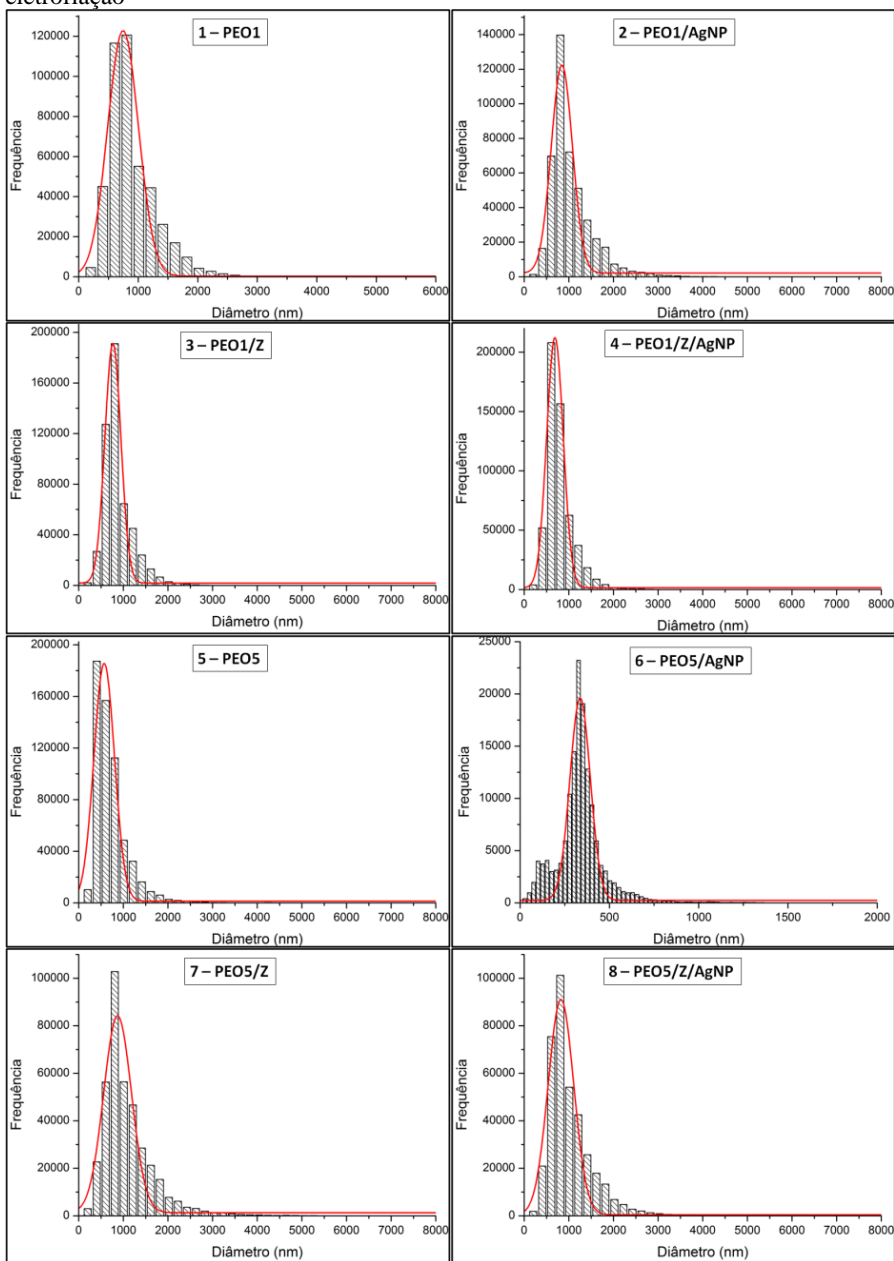
Amostra	Diâmetro±desv Padrão (nm)	Voltagem (kV)	Fluxo (mL/h)	Distância (cm)
1 PEO1	745,4±6,4	7,33	1,0	12
2 PEO1/AgNP	843,1±6,1	7,33	1,3	12
3 PEO1/Z	765,5±7,6	7,33	0,7	12
4 PEO1/Z/AgNP	688,1±7,1	7,33	0,7	12
5 PEO5	570,8±14,5	8,52	1,0	14
6 PEO5/AgNP	335,9±1,7	8,52	1,0	14
7 PEO5/Z	870,7±19,2	9,50	1,0	12
8 PEO5/Z/AgNP	822,8±9,6	7,33	1,0	14

As fibras apresentaram diâmetros que variaram de 335,9 nm a 870,7 nm e desta forma podem ser classificadas como nanofibras, pois pelo menos uma das suas dimensões está em escala nanométrica. A distribuição de tamanho foi obtida e os histogramas foram contruídos para cada uma das amostras (Figura 27).

Foi possível observar que a distribuição de tamanho para todas as amostras testadas apresentou comportamento unimodal, ou seja, a grande maioria das nanofibras está concentrada em uma estreita faixa de tamanho. Porém, apesar de pouca variação de tamanho para nanofibras de uma mesma amostra, foi possível identificar variação entre as diferentes amostras, o que já era esperado pelas diferenças de concentração e massa molar do polímero, além das diferentes condições do processo.

Não foi possível estabelecer uma relação clara da influência da adição das AgNPs na morfologia das nanofibras. Dessa forma, foi realizada a análise por microscopia eletrônica de transmissão, afim de verificar a presença das nanopartículas de prata.

Figura 27. Histogramas de distribuição de tamanho das nanofibras obtidas por eletrofição



3.1.6 Avaliação da presença das AgNP nas nanofibras

Para verificar a presença das nanopartículas nas nanofibras, as mesmas foram observadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Em ambas as amostras foi possível observar a presença das nanopartículas. É possível notar as nanopartículas muitas vezes aglomeradas nas fibras, o que é bastante semelhante ao encontrado por Selvaraj, Thangam & Fathima (2018) em nanofibras de PEO e caseína obtidas por eletrofiação e impregnadas com nanopartículas de prata. Este fato pode ter sido ocasionado pela etapa de homogeneização, que no caso foi realizada por agitação magnética por 24 horas. O que pode não ter sido suficiente para a total distribuição das nanopartículas pelas soluções poliméricas. As imagens obtidas por MET para cada uma das amostras de nanofibras impregnadas com AgNP são mostradas a seguir.

Figura 28. Imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão para nanofibras obtidas com PEO 1000 kDa e impregnadas com AgNP 2%

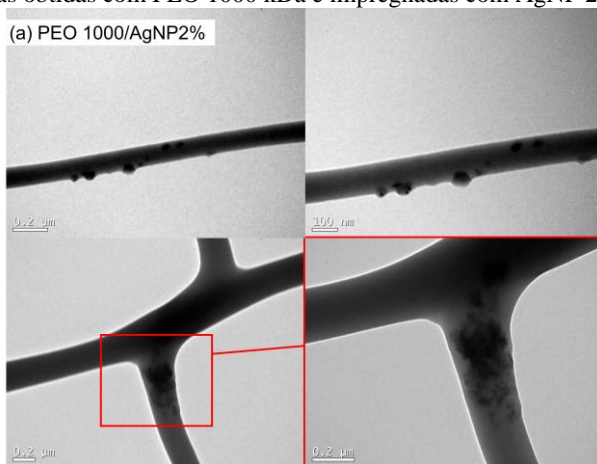


Figura 29. Imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão para nanofibras obtidas com PEO 1000 kDa, zeína 10% e impregnadas com AgNP 2%

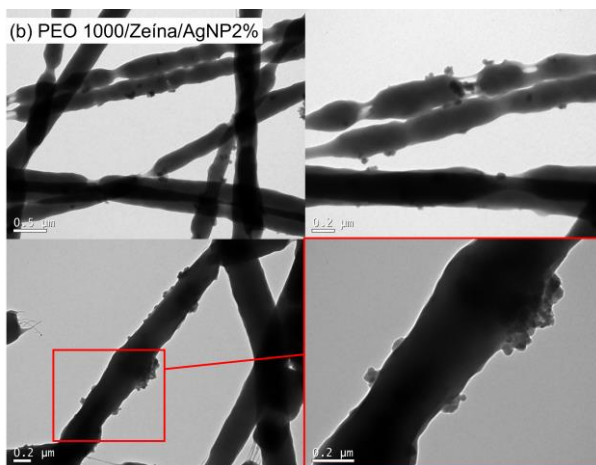


Figura 30. Imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão para nanofibras obtidas com PEO 5000 kDa e impregnadas com AgNP 2%

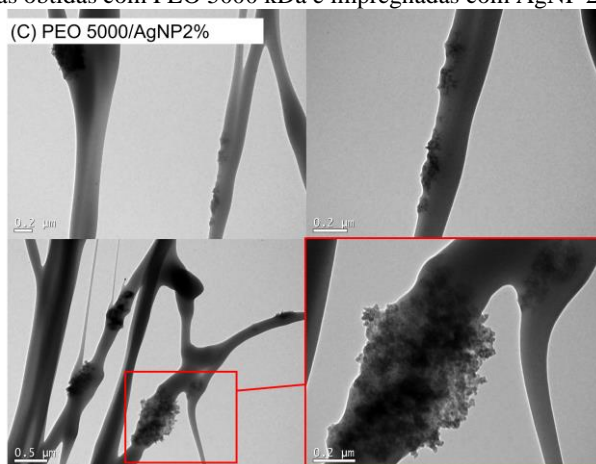
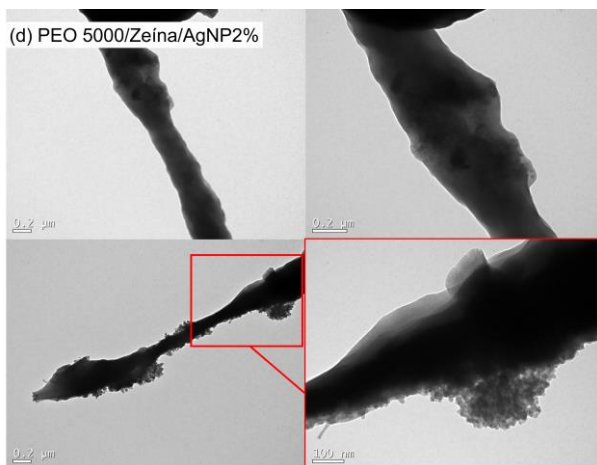


Figura 31. Imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão para nanofibras obtidas com PEO 5000 kDa, zeína 10% e impregnadas com AgNP 2%



4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na produção das nanofibras de PEO, PEO e zeína e ambas adicionadas de nanopartículas de prata pelo processo de eletrofição, mostraram que tal intento é viável e atingiu os objetivos inicialmente propostos. O estudo do processo de eletrofição mostrou que todas as variáveis envolvidas são importantes para a padronização do processo e repetição dos resultados. O controle de parâmetros como umidade relativa do ar, temperatura, concentração dos polímeros, solvente a ser aplicado e as características de condutividade, viscosidade, tensão superficial e entre outros, são de extrema importância para a obtenção de fibras uniformes, sem a presença de contos e com estreita distribuição de tamanho. A homogeneidade de distribuição das nanopartículas pela extensão das nanofibras também é um fator a ser estudado, pois as nanopartículas apresentaram-se aglomeradas nas fibras, o que pode prejudicar a sua ação em uma possível aplicação como material de composição de embalagem antimicrobiana. Ao passo que este, também é um aspecto importante a ser estudado, uma vez que a grande área superficial das nanofibras, aliada à uma boa homogeneidade das AgNPs em sua estrutura, poderá potencializar a ação antimicrobiana, possibilitando a utilização como um material alternativo para embalagem ativa.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou que os óleos essenciais podem ser bons agentes redutores para a síntese de nanopartículas de prata, apresentando altas concentrações de compostos capazes de reduzir a prata para a formação das nanopartículas. Também foi possível verificar uma relação direta com a concentração e a formação de partículas, em especial quando estes compostos eram doadores de hidrogênio como o eugenol, timol e o carvacrol.

Também foi possível verificar a viabilidade da síntese utilizando o óleo essencial de cravo, rico no composto eugenol. E os testes de comparação mostraram boa semelhança entre o óleo essencial e o composto puro na síntese das AgNPs, mesmo em concentrações baixas, demonstrando boa capacidade redutora nos testes da atividade antioxidante, fator determinante para um bom agente mediador da síntese de AgNPs.

As nanopartículas apresentaram formato geralmente esférico, o que foi comprovado por TEM e por SAXS. O tamanho médio obtido por todas as técnicas revelou partículas nanométricas e com estreita distribuição de tamanho. Estas partículas permaneceram estáveis em solução por 12 semanas, o que pôde ser comprovado tanto por espectrofotometria no UV-Vis quanto pela análise de DLS.

Ao verificar a atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata obtidas com o óleo essencial de cravo e com o eugenol, foi possível revelar a capacidade inibitória das nanopartículas frente *Staphylococcus aureus*, apresentando atividade bactericida em concentrações de 40 e 60 $\mu\text{L.mL}^{-1}$.

Para a produção das nanofibras foi possível a eletrofiação de soluções poliméricas de PEO e de zeína e obtenção de nanofibras cilíndricas com grande área superficial. A adição das nanopartículas de prata às soluções poliméricas possibilitou a obtenção de nanofibras impregnadas com AgNP e isto foi evidenciado pela análise de MET. Este fato comprova que é possível a produção de nanofibras poliméricas com AgNPs para aplicação como possível material de embalagem ativa, aliando a grande área superficial deste material à atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata.

REFERÊNCIAS

AADIL, K. R.; MUSSATTO, S. I.; JHA, H. Synthesis and characterization of silver nanoparticles loaded poly(vinyl alcohol)-lignin electrospun nanofibers and their antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.120, p.763-767. 2018.

ACEVEDO, F.; HERMOSILLA, J.; SANHUEZA, C.; MORA-LAGOS, B.; FUENTES, I.; RUBILAR, M.; CONCHEIRO, A.; ALVAREZ-LORENZO, C. Gallic acid loaded PEO-core/zein-shell nanofibers for chemopreventive action on gallbladder cancer cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.119, p.49–61. 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 91 de maio de 2001, Brasil, 2001, 5 p.

AGRAWAL, S.; RATHORE, P. Nanotechnology Pros and Cons to Agriculture: A Review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, nº3, p. 43-55, 2014.

AGUILAR-GONZÁLEZ, A. E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against gray mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 32, p. 181–185, 2015.

AIKEN III, J. D.; FINKE, R. G. A review of modern transition-metal nanoclusters: their synthesis, characterization, and applications in catalysis. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 145, p. 1–44, 1999.

ALIZADEH, S.; GHOSHAL, S.; COMEAU, Y. Fate and inhibitory effect of silver nanoparticles in high rate moving bed biofilm reactors. **Science of The Total Environment**, v. 647, p.1199–1210. 2019.

AMARAL, G. P.; MIZDAL, C. R.; STEFANELLO, S. T.; MENDEZ, A. S. L.; PUNTEL, R. L.; DE CAMPOS, M. M. A.; SOARES, F. A. A.; FACHINETTO, R. Antibacterial and antioxidant effects of *Rosmarinus*

officinalis L. extract and its fractions. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**. Article in press. 1-10. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.10.006>

AN, J.; ZHANG, M.; WANG, S.; TANG, J. Physical, chemical and microbiological changes in stored green asparagus spears as affected by coating of silver nanoparticles-PVP. **LWT**, v. 41, p. 1100–1107, 2008.

AN, K.; 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.

ANDERSON, R.; BUSCALL, R.; ELDRIDGE, R.; MULVANEY, P.; SCALES, P. J. Ostwald ripening of comb polymer stabilised Ag salt nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 459, p. 58–64, 2014.

ANKAMWAR, B.; KAMBLE, V.; SUR, U. K.; SANTRA, C. Spectrophotometric evaluation of surface morphology dependent catalytic activity of biosynthesized silver and gold nanoparticles using UV–vis spectra: A comparative kinetic study. **Applied Surface Science**, v. 366, p. 275–283, 2016.

ARAÚJO, E. A.; ANDRADE, N. J.; SILVA, L. H. M.; BERNARDES, P. C.; TEIXEIRA, A. V. N. C.; JÚNIOR, J. F. Q. F.; SÁ, J. P. N.; FERNANDES, P. E. Modification of stainless steel surface hydrophobicity by silver nanoparticles: strategies to prevent bacterial adhesion in the food processing. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v. 27, nº 24, p. 2686-2695, 2013.

ASMATULU, R.; KHAN, W. S. Electrospun nanofibers for agriculture and food industries. *Synthesis and Applications of Electrospun Nanofibers*, p.89–109. 2019. doi:10.1016/b978-0-12-813914-1.00005-5

ASTM D4762-04. **Standard Guide for Testing Polymer Matrix Composite Materials**. ASTM International, Philadelphia, United States, 2011.

BABITHA, S.; RACHITA, L.; KARTHIKEYAN, K.; SHOBA, E.; JANANI, I.; POORNIMA, B.; PURNA SAI, K. Electrospun protein

nanofibers in healthcare: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v.523(1), p.52–90. 2017.

BADI, H. N.; YAZDANI, D.; ALI, S. M.; NAZARI, F. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. **Industrial Crops and Products**, v. 19, p. 231–236, 2004.

BAJPAI, S. K.; CHAND, N.; CHAURASIA, V. Nano Zinc Oxide-Loaded Calcium Alginate Films with Potential Antibacterial Properties. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 1871–1881, 2012.

BAJPAI, S. K.; KUMARI, M. A green approach to prepare silver nanoparticles loaded gumacacia/poly(acrylate) hydrogels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 177–188, 2015.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.446–475, 2008.

BARDAJEE, G. R.; HOOSHYAR, Z.; REZANEZHAD, H. A novel and green biomaterial based silver nanocomposite hydrogel: Synthesis, characterization and antibacterial effect. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 117, p. 367–373, 2012.

BEDOYA-SERNAA, C. M.; DACANAL, G. C.; FERNANDES, A. M.; PINHO, S. C. Antifungal activity of nanoemulsions encapsulating oregano (*Origanum vulgare*) essential oil: in vitro study and application in Minas Padrão cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.49, p.929–935. 2018.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 325–347, 2010.

BORGES, R. S.; ORTIZ, B. L. S.; PEREIRA, A. C. M.; KEITA, H.; CARVALHO, J. C. T. Rosmarinus officinalis Essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. **Journal of Ethnopharmacology**, v.229, p29–45. 2019.

BRUST, M.; WALKER, M.; BETHELL, D.; SCHIFFRIN, D. J.; WHYMAN, R. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, v.7, p. 801-802, 1994.

BUCHKO, C. J.; CHEN, L. C.; SHEN, Y.; MARTIN, D. C. Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. **Polymer**, v. 40, p. 7397–7407, 1999.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223– 253, 2004.

CAKIĆ, M.; GLIŠIĆ, S.; NIKOLIĆ, G.; NIKOLIĆ, G. M.; CAKIĆ, K.; CVETINOV, M. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran sulphate stabilized silver nanoparticles. **Journal of Molecular Structure**, v. 1110, p. 156-161, 2016.

CARBONE, M.; DONIA, D. T.; SABBATELLA, G.; ANTIOCHIA, R. Silver nanoparticles in polymeric matrices for fresh food packaging. **Journal of King Saud University – Science**, v.28 (4), p.273–279. 2016.

CASTELLANO, J. J.; SHAFII, S. M.; KO, F.; DONATE, G.; WRIGHT, T. E.; MANNARI, R. J.; PAYNE, W. G.; SMITH, D. J.; ROBSON, M. C. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. **International Wound Journal**, v. 4, p. 114–122, 2007.

CASTRO-MAYORGA, J. L.; MARTÍNEZ-ABAD, A.; FABRA, M. F.; LAGARÓN, J. M.; OCIO, M. J.; SÁNCHEZ, G. Silver-Based Antibacterial and Virucide Biopolymers: Usage and Potential in Antimicrobial Packaging. In: Barros-Velázquez, J. (Ed.). *Antimicrobial Food Packaging*. Elsevier Ltd. 2016, p. 407-416.

CHAÚQUEA, E. F. C.; DLAMINI, L. N.; ADELODUN, A. A.; GREYLING, C. J.; NGILA, J. C. Modification of electrospun polyacrylonitrile nanofibers with EDTA for the removal of Cd and Cr ions from water effluents. **Applied Surface Science**, v. 369, p. 19–28, 2016.

CHELLARAM, C.; MURUGABOOPATHI, G.; JOHN, A. A.; SIVAKUMAR, R.; GANESAN, S.; KRITHIKA, S.; PRIYA, G. Significance of Nanotechnology in Food Industry. **APCBEE Procedia**, v. 8, p. 109 – 113, 2014.

CHEN, G.; GUO, J.; NIE, J.; MA, G. Preparation, characterization, and application of PEO/HA core Shell nanofibers based on electric field induced phase separation during electrospinning. **Polymer**, v. 83, p. 12-19, 2016.

CHEN, X.; REN, L.; LI, M.; QIAN, J.; FAN, J.; DU, B. Effects of clove essential oil and eugenol on quality and browning control of fresh-cut lettuce. **Food Chemistry**, v.214, p.432–439. 2017.

CORREA, A. G.; ZUIN, V. G. Princípios Fundamentais da Química Verde. In: CORREA, A. G.; ZUIN, V. G. (Org.). Química Verde: Fundamentos e Aplicações. 1 ed. São Carlos: EDUFSCar, 2009, v. 1, p. 9-22.

COSTA, C.; CONTE, A.; ALESSANDRO, M.; NOBILE, D. Use of Metal Nanoparticles for Active Packaging Applications. In: Barros-Velázquez, J. (Ed.). *Antimicrobial Food Packaging*. Elsevier Ltd. 2016, p. 399-404.

COSTA, C.; CONTE, A.; BUONOCORE, G. G.; DEL NOBILE, M. A. Antimicrobial silver-montmorillonite nanoparticles to prolong the shelf life of fresh fruit salad. **International Journal of Food Microbiology**, v.148, p.164-167. 2011.

COSTA, C.; CONTE, A.; BUONOCORE, G. G.; LAVORGNA, M.; DEL NOBILE, M. A. Calcium-alginate coating loaded with silver-montmorillonite nanoparticles to prolong the shelf-life of fresh-cut carrots. **Food Research International**, v. 48, p. 164–169, 2012.

COSTA, R. G. F.; OLIVEIRA, J. E.; PAULA, G. F.; PICCIANI, P. H. S.; MEDEIROS, E. S.; RIBEIRO, C.; MATTOSO, L. H. C. Eletrofiação de Polímeros em Solução. Parte I: Fundamentação Teórica. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 170-177, 2012.

CUI, J.; QIU, L.; QIU, Y.; WANG, Q.; WEI, Q. Co-electrospun nanofibers of PVA-SbQ and Zein for wound healing. **Journal of Applied Polymer Science**, v 132 (39). 2015.

DA ROSA, C. G.; MACIEL, M. V. O. B.; CARVALHO, S. M.; MELO, A. P. Z.; JUMMES, B.; SILVA, T.; MARTELLI, S. M.; VILLETTI, M. A.; BERTOLDI, F. C.; BARRETO, P. L. M. Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 481, p. 337–344, 2015.

DASGUPTA, N.; RANJAN, S.; MUNDEKKAD, D.; RAMALINGAM, C.; SHANKER, R.; KUMAR, A. Nanotechnology in agro-food: From field to plate. **Food Research International**, v. 69, p. 381–400, 2015.

DAVID, L.; MOLDOVAN, B.; VULCU, A.; OLENIC, L.; PERDESCHREPLER, M.; FISCHER-FODOR, E.; FLOREA, A.; CRISAN, M.; CHIOREAN, I.; CLICHICI, S.; FILIP, G. A. Green synthesis, characterization and anti-inflammatory activity of silver nanoparticles using European black elderberry fruits extract. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 122, p. 767–777, 2014.

DE ARAGÃO, A. P.; DE OLIVEIRA, T. M.; QUELEMES, P. V.; PERFEITO, M. L. G.; ARAÚJO, M. C.; SANTIAGO, J. DE A. S.; CARDOSO, V. S.; QUARESMA, P.; LEITE, J. R. DE S. A.; DA SILVA, D. A. Green synthesis of silver nanoparticles using the seaweed *Gracilaria birdiae* and their antibacterial activity. **Arabian Journal of Chemistry**. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.04.014>

DEITZEL, J. M.; KLEINMEYER, J.; HARRIS, D.; TAN, N. C. B. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. **Polymer**, v. 42, p. 261–272, 2001.

DHAWAN, S.; VARMA, M.; SINHA, V. R. High Molecular Weight Poly(ethylene oxide)–Based Drug Delivery Systems. Part I: Hydrogels and Hydrophilic Matrix Systems. **Pharmaceutical Technology**, p. 73–81, 2005.

DONG, C.; CAO, C.; ZHANG, X.; ZHAN, Y.; WANG, X.; YANG, X.; ZHOU, K.; XIAO, X.; YUAN, B. Wolfberry fruit (*Lycium barbarum*) extract mediated novel route for the green synthesis of silver nanoparticles. **Optik**, v.130, p.162–170, 2017.

ECHEGOYEN, Y.; NERÍN, C. Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 16–22, 2013.

EFSA. European Food Safety Authority. Inability to assess the safety of a silver hydrosol added for nutritional purposes as a source of silver in food supplements and the bioavailability of silver from this source based on the supporting dossier. Scientific statement of the panel on food additives and nutrient sources added to food (ANS): question No EFSA-Q-2005–169. **European Food Safety Authority Journal**, v. 884, p. 1–3, 2008.

EFSA. European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request related to a 12th list of substances for food contact materials. **European Food Safety Authority Journal**, p. 395–401, 2006.

EISING, R.; SIGNORI, A. M.; FORT, S.; DOMINGOS, J. B. Development of Catalytically Active Silver Colloid Nanoparticles Stabilized by Dextran. **Langmuir**, v. 27, p. 11860–11866, 2011.

ELIAS, W. C.; EISING, R.; SILVA, T. R.; ALBUQUERQUE, B. L.; MARTENDAL, E.; MEIER, L.; DOMINGOS, J. B. Screening the Formation of Silver Nanoparticles Using a New Reaction Kinetics Multivariate Analysis and Assessing Their Catalytic Activity in the Reduction of Nitroaromatic Compounds. **The Journal of Physical Chemistry C**, v.118(24), p.12962–12971. 2014.

FENG, J. J. The stretching of an electrified non-Newtonian jet: A model for electrospinning. **Physics of Fluids**, v. 14, n. 11, p. 3912–3926, 2002.

FOULOUS, S.; FERHOUT, H.; RAOELISON, E. G.; VALENTIN, A.; MOUKARZEL, B.; COUDERC, F.; BOUJILA, J. Chemical

composition and anticancer, antiinflammatory, antioxidant and antimarial activities of leaves essential oil of *Cedrelopsis grevei*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 56, p. 352–362, 2013.

GALLOCCCHIO, F.; BELLUCO, S.; RICCI, A. Nanotechnology and food: brief overview of the current scenario. **Procedia Food Science**, v. 5, p. 85 – 88, 2015.

GARG, K.; BOWLIN, G. L. Electrospinning jets and nanofibrous structures. **Biomicrofluidics**, v.5, 013403, p. 1-19, 2011.

GHORANI, B.; TUCKER, N. Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 227-240, 2015.

GHOSH, S.; KAUSHIK, R.; NAGALAKSHMI, K.; HOTI, S. L.; MENEZES, G. A.; HARISH, B. N.; VASAN, H. N. Antimicrobial activity of highly stable silver nanoparticles embedded in agar–agar matrix as a thin film. **Carbohydrate Research**, v. 345 p. 2220–2227, 2010.

GOERTZ, V.; DINGENOUTS, N.; NIRSCHE, H. Comparison of Nanometric Particle Size Distributions as Determined by SAXS, TEM and Analytical Ultracentrifuge. **Particle & Particle Systems Characterization**, v.26 (1-2), p.17–24. 2009.

GOIA, D. V.; MATIJEVIĆ, E. Preparation of monodispersed metal particles. **New journal of chemistry**, v. 22, p. 1203-1215, 1998.

GÓMEZ H. C.; SERPA, A.; VELÁSQUEZ-COCK, J.; GAÑÁN, P.; CASTRO, C.; VÉLEZ, L.; ZULUAGA, R. Vegetable nanocellulose in food science: A review. **Food Hydrocolloids**, v.57, p. 178-186, 2016.

GONÇALVES, N. D.; PENA, F. DE L.; SARTORATTO, A.; DERLAMELINA, C.; DUARTE, M. C. T.; ANTUNES, A. E. C.; PRATA, A. S. Encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil used as a natural preservative in bakery product. **Food Research International**, v.96, p.154–160. 2017.

GORUP, L. F. **Nanopartículas coloidais de ouro e prata e sua funcionalização com dibutil-dicalcogenetos**. 2010. 127 f.. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos/SP.

GÜLÇİN, I.; ELMASTAS, M.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Antioxidant activity of clove oil: A powerful antioxidant source. **Arabian Journal of Chemistry**, v.5, p.489-499. 2012.

HAIDER, A.; HAIDER, S.; KANG, I-K. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. **Arabian Journal of Chemistry**, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.015>

HAMORI, M.; NAGANO, K.; KAKIMOTO, S.; NARUHASHI, K.; KIRIYAMA, A.; NISHIMURA, A.; SHIBATA, N. Preparation and pharmaceutical evaluation of acetaminophen nano-fiber tablets: Application of a solvent-based electrospinning method for tableting. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 78, p. 14–22, 2016.

HANDFORD, C. E.; DEAN, M.; HENCHION, M.; SPENCE, M.; ELLIOTT, C. T.; CAMPBELL, K. Implications of nanotechnology for the agri-food industry: Opportunities, benefits and risks. **Trends in Food Science & Technology**, v. 40, p. 226-241, 2014.

HANDFORD, C. E.; DEAN, M.; SPENCE, M.; HENCHION, M.; ELLIOTT, C. T.; CAMPBELL, K. Awareness and attitudes towards the emerging use of nanotechnology in the agri-food sector. **Food Control**, v. 57, p. 24-34, 2015.

HANG, J.; SHI, L.; FENG, X.; XIAO, L. *Electrostatic and electrosteric stabilization of aqueous suspensions of barite nanoparticles*. **Powder Technology**, v. 192, n. 2, p. 166-170, 2009.

HASHEMINEJAD, N.; KHODAIYAN, F.; SAFARI, M. Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles. **Food Chemistry**, v.275, p.113-122. 2019.

HERNÁNDEZ, M. D.; SOTOMAYOR, J. A.; HERNÁNDEZ, A.; JORDÁN, M. J. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Oils. **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**, p.677–688. 2016.

HIERREZUELO, J.; SADEGHPOUR, A.; SZILAGYI, I.; VACCARO, A.; BORKOVEC, M. *Electrostatic Stabilization of Charged Colloidal Particles with Adsorbed Polyelectrolytes of Opposite Charge*. **Langmuir**, v. 26, n. 19, p. 15109-15111, 2010.

HONGFANG, G.; HUI, Y.; CHUANG, W. Controllable preparation and mechanism of nano-silver mediated by the microemulsion system of the clove oil. **Results in Physics**, v.7, p.3130–3136. 2017.

HU, S.; HSIEH, Y-L. Silver nanoparticle synthesis using lignin as reducing and capping agents: A kinetic and mechanistic study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 856–862, 2016.

INCORONATO, A. L.; CONTE, A.; BUONOCORE, G. G.; DEL NOBILE, M. A. Agar hydrogel with silver nanoparticles to prolong the shelf life of Fior di Latte cheese. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.1697–1704. 2011.

JADHAV, K.; DHAMECHA, D.; BHATTACHARYA, D.; PATIL, M. Green and ecofriendly synthesis of silver nanoparticles: Characterization, biocompatibility studies and gel formulation for treatment of infections in Burns. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 155, p. 109–115, 2016.

JAN, S.; MIR, J. I.; SHAFI, W.; FAKTOO, S. Z.; SINGH, D. B.; WIJAYA, L.; ALYEMENI, M. N.; AHMAD, P. Divergence in tissue-specific expression patterns of genes associated with the terpenoid biosynthesis in two oregano species *Origanum vulgare* L., and *Origanum majorana*. **Industrial Crops and Products**, v.123, p.546–555. 2018.

KARAMI-OSBOO R.; KHODAVERDI M.; ALI-AKBARI F. Antibacterial Effect of Effective Compounds of *Satureja hortensis* and

Thymus vulgaris Essential Oils against *Erwinia amylovora*. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v.12 (1), p.35-45. 2010.

KAYACI, F.; UYAR, T. Electrospun zein nanofibers incorporating cyclodextrins. **Carbohydrate Polymers**, v.90(1), p.558–568. 2012.

KAYACI, F.; UYAR, T. Electrospun zein nanofibers incorporating cyclodextrins. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 558–568, 2012.

KELLY, K. L.; CORONADO, E.; ZHAO, L. L.; SCHATZ, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, p. 668-677, 2003.

KESHARI, A. K.; SRIVASTAVA, R.; SINGH, P.; YADAV, V. B.; NATH, G. Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cestrum nocturnum*. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**. 2018. doi:10.1016/j.jaim.2017.11.003

KHAMHAENGPOL, A.; SIRI, S. Green synthesis of silver nanoparticles using tissue extract of weaver ant larvae. **Materials Letters**, v.192, p.72–75, 2017.

KHAN, A. U.; WEI, Y.; AHMAD, A.; KHAN, Z. U. H.; TAHIR, K.; KHAN, S. U.; MUHAMMAD, N.; KHAN, F. U.; YUAN, Q. Enzymatic browning reduction in white cabbage, potent antibacterial and antioxidant activities of biogenic silver nanoparticles. **Journal of Molecular Liquids**, v. 215, p. 39–46, 2016.

KHARAT, S. N.; MENDHULKAR, V. D. Synthesis, Characterization and studies on Antioxidant activity of Silver Nanoparticles using *Elephantopus scaber* leaf extract. **Materials Science & Engineering C**, 2016. IN PRESS.

KOCIC-TANACKOV, S.; DIMIC, G.; TANACKOV, I.; PEJIN, D.; MOJOVIC, L.; PEJIN, J. The inhibitory effect of oregano extract on the growth of *Aspergillus* spp. and on sterigmatocystin biosynthesis. **LWT - Food Science and Technology**, v.49, p. 14-20, 2012.

KOTAKADI, V. S.; GADDAM, S. A.; VENKATA, S. K.; GOPAL, D. V. R. S. New generation of bactericidal silver nanoparticles against different antibiotic resistant *Escherichia coli* strains. **Applied Nanoscience**, v. 5, n°7, p. 847-855, 2015.

KRIVOROTOVA, T.; CIRKOVAS, A.; MACIULYTE, S.; STANEVICIENE, R.; BUDRIENE, S.; SERVIENE, E.; SEREIKAITE, J. Nisin-loaded pectin nanoparticles for food preservation. **Food Hydrocolloids**, v. 54, p. 49-56, 2016.

KYSELICA, R.; ENIKOV, E. T.; POLYVAS, P.; ANTON, R. Electrostatic focusing of electrospun Polymer(PEO) nanofibers. **Journal of Electrostatics**, v.94, p.21–29. 2018.

LEE, Y.; OH, S-G. Ostwald ripening and control of Ag ion reduction degree by ammonium hydroxide in alcohol reduction process. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, p. 768–771, 2015.

LI, L.; ZHAO, C.; ZHANG, Y.; YAO, J.; YANG, W.; HU, Q.; WANG, C.; CAO, C. 2017. Effect of stable antimicrobial nanosilver packaging on inhibiting mildew and in storage of rice. **Food Chemistry**, v.215, p.477–482. 2017.

LI, T.; SENESI, A. J.; LEE, B. Small Angle X-ray Scattering for Nanoparticle Research. **Chemical Reviews**, v.116(18), p.11128–11180. 2016.

LI, X. H.; XING, Y. G.; LI, W. L.; JIANG, Y. H.; DING, Y. L. Antibacterial and Physical Properties of Poly(vinyl chloride)-based Film Coated with ZnO Nanoparticles. **Food Science and Technology International**, v. 16, p. 225-232, 2010.

LIN, L., ZHU, Y., LI, C., LIU, L., SURENDRIRAN, D., CUI, H. Antibacterial activity of PEO nanofibers incorporating polysaccharide from dandelion and its derivative. **Carbohydrate Polymers**, v.198, p.225–232. 2018.

LINK, S.; EL-SAYED, M. A. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, p. 4212-4217, 1999.

LIU, Y.; LIU, Y.; LIAO, N.; CUI, F.; PARK, M.; KIM, H-Y. Fabrication and durable antibacterial properties of electrospun chitosan nanofibers with silver nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 638-643, 2015.

LIU, Y-Y.; WANG, Y.; WALSH, T. R.; YI, L-X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X.; YU, L-F.; GU, D.; REN, H.; CHEN, X.; LV, L.; HE, D.; ZHOU, H.; LIANG, Z.; LIU, J-H; SHEN, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 16, n° 2, p. 161-168, 2015.

LODEIRO, P.; ACHTERBERG, E. P.; PAMPÍN, J.; AFFATATI, A.; EL-SHAHAWI, M. S. Silver nanoparticles coated with natural polysaccharides as models to study AgNP aggregation kinetics using UV-Visible spectrophotometry upon discharge in complex environments. **Science of the Total Environment**, v. 539, p. 7-16, 2016.

LU, L.; AN, X. Silver nanoparticles synthesis using H₂ as reducing agent in toluene-supercritical CO₂ microemulsion. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 99, p. 29-37, 2015.

MAGNUSON, A.; JONAITIS, T. S.; CARD, J. W. A Brief Review of the Occurrence, Use, and Safety of Food-Related Nanomaterials Bernadene. **Journal of Food Science**, v. 76, N° 6, p. 126-133, 2011.

MAHDI, S. S.; VADOOD, R.; NOURDAHR, R. Study on the Antimicrobial Effect of Nanosilver Tray Packaging of Minced Beef at Refrigerator Temperature. **Global Veterinaria**, v. 9, p. 284-289, 2012.

MASHWANI, Z.; KHAN, M. A.; KHAN, T.; NADHMAN, A. Applications of plant terpenoids in the synthesis of colloidal silver nanoparticles. **Advances in Colloid Interface Science**, v.234, p.132-141. 2016.

MAURIELLO, G. Control of Microbial Activity Using Antimicrobial Packaging. In: Barros-Velázquez, J. (Ed.). *Antimicrobial Food Packaging*. Elsevier Ltd. 2016, p. 141-152.

MEZZA, G. N.; BORGARELLO, A. V.; GROSSO, N. R.; FERNANDEZ, H.; PRAMPARO, M. C.; GAYOL, M. F. Antioxidant activity of rosemary essential oil fractions obtained by molecular distillation and their effect on oxidative stability of sunflower oil. **Food Chemistry**, v.242, p.9–15. 2018.

MIHINDUKULASURIYA, S.D.F.; LIM, L.-T. Nanotechnology development in food packaging: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 40, p. 149-167, 2014.

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

MIT-UPPATHAM, C.; NITHITANAKUL, M.; SUPAPHOL, P. Ultrafine Electrospun Polyamide-6 Fibers: Effect of Solution Conditions on Morphology and Average Fiber Diameter Chidchanok. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 205, p. 2327–2338, 2004.

MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMÍREZ, J. T.; YACAMAN, M. J. The bactericidal effect of silver Nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, p. 2346–2353, 2005.

MORSHEDLOO, M. R.; SALAMI, S. A.; NAZERI, V.; MAGGI, F.; CRAKER, L. Essential oil profile of oregano (*Origanum vulgare* L.) populations grown under similar soil and climate conditions. **Industrial Crops and Products**, v.119, p.183–190. 2018.

MUNIYAPPAN, N.; NAGARAJAN, N. S. Green synthesis of gold nanoparticles using *Curcuma pseudomontana* essential oil, its biological activity and cytotoxicity against human ductal breast carcinoma cells T47D. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, p. 2037–2044, 2014.

NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 2012. NCCLS document M7-A9. Approved Standard - Seventh Edition, which describes standard broth dilution (macrodilution and microdilution) and agar dilution techniques for measuring the in vitro susceptibility of bacteria to antimicrobial agents.

NERIN, C.; SILVA, F.; MANSO, S.; BECERRIL, R. The Downside of Antimicrobial Packaging: Migration of Packaging Elements into Food. In: Barros-Velázquez, J. (Ed.). *Antimicrobial Food Packaging*. Elsevier Ltd. 2016, p. 81-93.

NUNES, M. R.; DE SOUZA, M. C. M.; DE LIMA, V. A. P.; DA ROSA, C. G.; NORONHA, C. M.; MACIEL, M. V. O. B.; BARRETO, P. M. Antioxidant and antimicrobial methylcellulose films containing *Lippia alba* extract and silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymer*, v.192, p.37-43. 2018.

OCAÑA-FUENTES, A.; ARRANZ-GUTIÉRREZ, E.; SEÑORANS, F. J.; REGLERO, G. Supercritical fluid extraction of oregano (*Origanum vulgare*) essential oils: Anti-inflammatory properties based on cytokine response on THP-1 macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1568-1575, 2010.

OKUTAN, N.; TERZI, P.; ALTAY, F. Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 19-26, 2014.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, p. 301-307, 2008.

OTONI, C. G.; ESPITIA, P. J. P.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; MCHUGH, T. H. Trends in antimicrobial food packaging systems: Emitting sachets and absorbent pads. **Food Research International**, v. 83, p. 60-73, 2016.

PADALIA, H.; MOTERIYA, P.; CHANDA, S. Green synthesis of silver nanoparticles from marigold flower and its synergistic antimicrobial potential. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, p. 732–741, 2015.

PAIM, L. F. N. A.; LANA, D. F. D.; GIARETTA, M.; DANIELLI, L. J.; FUENTEFRIA, A. M.; APEL, M. A.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C. 2018. *Poiretia latifolia* essential oil as a promising antifungal and anti-inflammatory agent: Chemical composition, biological screening, and development of a nanoemulsion formulation. **Industrial Crops and Products**, v.126, v.280–286. 2018.

PAKRAVANA, M.; HEUZEYA, M-C.; AJJIA, A. A fundamental study of chitosan/PEO electrospinning. **Polymer**, v. 52, p. 4813-4824, 2011.

PALANISAMY, S.; RAJASEKAR, P.; VIJAYAPRASATH, G.; RAVI, G.; MANIKANDAN, R.; MARIMUTHU PRABHU, N. A green route to synthesis silver nanoparticles using *Sargassum polycystum* and its antioxidant and cytotoxic effects: An in vitro analysis. **Materials Letters**, v.189, p.196–200. 2017.

PATRA, S.; MUKHERJEE, S.; BARUI, A. K.; GANGULYA, A.; SREEDHAR, B.; PATRA, C. R. Green synthesis, characterization of gold and silver nanoparticles and their potential application for cancer therapeutics. **Materials Science and Engineering C**, v. 53, p. 298–309, 2015.

PAVELA, R., ŽABKA, M., VRCHOTOVÁ, N., & TRÍSKA, J. Effect of foliar nutrition on the essential oil yield of Thyme (*Thymus vulgaris* L.). **Industrial Crops and Products**, v.112, p.762–765. 2018.

PEDRAM RAD, Z.; MOKHTARI, J.; ABBASI, M. Fabrication and characterization of PCL/zein/gum arabic electrospun nanocomposite scaffold for skin tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 93, p. 356–366. 2018.

PEREIRA, A. E. S.; GRILLO, R.; MELLO, N. F. S.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Application of poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to

control weeds and reduce damage to the environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 268, p. 207–215, 2014.

PINTO, R. J. B.; FERNANDES, S. C. M.; FREIRE, C. S. R.; SADOCCO, P.; CAUSIO, J.; NETO, C. P.; TRINDADE, T. Antibacterial activity of optically transparent nanocomposite films based on chitosan or its derivatives and silver nanoparticles. **Carbohydrate Research**, v. 348, p. 77–83, 2012.

PIWONSKI, I.; SPILAREWICZ-STANEK, K.; KISIELEWSKA, A.; KADZIOŁA, K.; CICHOMSKI, M.; GINTER, J. Examination of Ostwald ripening in the photocatalytic growth of silver nanoparticles on titanium dioxide coatings. **Applied Surface Science**, v. 373, p. 38–44, 2016.

QUISPE-CONDORI, S.; SALDAÑA, M.D.A.; TEMELLI, F. Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 1880 – 1887, 2011.

RADÜNZ, M.; DA TRINDADE, M. L. M.; CAMARGO, T. M.; RADÜNZ, A. L.; BORGES, C. D.; GANDRA, E. A.; HELBIG, E. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. **Food Chemistry**, v. 276, p. 180–186, 2019.

RAGHUNANDAN, D.; MAHESH, B. D.; BASAVARAJA, S.; BALAJI, S. D.; MANJUNATH, S. Y.; VENKATARAMAN, A. Microwave-assisted rapid extracellular synthesis of stable bio-functionalized silver nanoparticles from guava (*Psidium guajava*) leaf extract. **Journal Nanoparticles Research**, v. 13, p. 2021–2028, 2011.

RAI, M.; INGLE, A. P.; GADE, A. K.; DUARTE, M. C. T.; DURAN, N. Three *Phoma* spp. synthesised novel silver nanoparticles that possess excellent antimicrobial efficacy. **IET Nanobiotechnology**, v. 9, p. 280–287, 2015.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 76–83, 2009.

RAJ, D. R.; PRASANTH, S.; VINEESHKUMAR, T. V.; SUDARSANAKUMAR, C. Surface plasmon resonance based fiber optic dopamine sensor using green synthesized silver nanoparticles. **Sensors and Actuators B**, v. 224, p. 600–606, 2016.

RAJA, S.; RAMESH, V.; THIVAHARAN, V. Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Calliandra haematocephala* leaf extract, their antibacterial activity and hydrogen peroxide sensing capability. **Arabian Journal of Chemistry**, v.10 (2), p.253–261. 2017.

RAMOS, K.; GÓMEZ-GÓMEZ, M. M.; CÁMARA, C.; RAMOS, L. Silver speciation and characterization of nanoparticles released from plastic food containers by single particle ICPMS. **Talanta**, v. 151, p. 83–90, 2016.

RANJBAR-MOHAMMADI, M.; BAHRAMI, S. H. Electrospun curcumin loaded poly(ϵ -caprolactone)/gum tragacanth nanofibers for biomedical application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 84, p. 448–456, 2016.

RIEGER, K. A.; SCHIFFMAN, J. D. Electrospinning an essential oil: Cinnamaldehyde enhances the antimicrobial efficacy of chitosan/poly(ethylene oxide) nanofibers. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 561–568, 2014.

RIKILT; JRC. Inventory of Nanotechnology applications in the agricultural, feed and food sector. EFSA supporting publication 2014: EN-621, 125 p. 2014.

RIZZO, V., AMOROSO, L., LICCIARDELLO, F., MAZZAGLIA, A., MURATORE, G., RESTUCCIA, C., LOMBARDO, S., PANDINO, G., STRANO, M. G., MAUROMICALE, G. The effect of sous vide packaging with rosemary essential oil on storage quality of fresh-cut potato. **LWT**, v.94, p.111–118. 2018.

ROSSI, M.; CUBADDA, F.; DINI, L.; TERRANOVA, M. L.; AURELI, F.; SORBO, A.; PASSERI, D. Scientific basis of nanotechnology, implications for the food sector and future trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 40, p. 127-148, 2014.

ROTA, M. C.; HERRERA, A.; MARTÍNEZ, R. M.; SOTOMAYOR, J. A.; JORDÁN, M. J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, v.19, p. 681–687, 2008.

ROUCOUX, A.; SCHULZ, J.; PATIN, H. Reduced Transition Metal Colloids: A Novel Family of Reusable Catalysts? **Chemical Reviews**, v. 102, n° 10, p. 3757–3778, 2002.

SAHARAN, V.; SHARMA, G.; YADAV, M.; CHOUDHARY, M. K.; SHARMA, S.S.; PAL, A.; RALIYA, R.; BISWAS, P. Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu–chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 346–353, 2015.

SANTOS, K. O.; ELIAS, W. C.; SIGNORI, A. M.; GIACOMELLI, F. C.; YANG, H.; DOMINGOS, J. B. Synthesis and Catalytic Properties of Silver Nanoparticle–Linear Polyethylene Imine Colloidal Systems. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, p. 4594–4604, 2012.

SARAVANAKUMAR, A.; GANESH, M.; JAYAPRAKASH, J.; JANG, H. T. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Cassia tora* leaf extract and its antioxidant and antibacterial activities. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 28, p. 277–281, 2015.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M.C.T.; GODOY, H.T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.4, p.442-449, 2009.

SEBAALY, C.; JRAIJ, A.; FESSI, H.; CHARCOSSET, C.; GREIGERGES, H. Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. **Food Chemistry**, v.178, p.52–62. 2015.

SELVARAJ, S., THANGAM, R., & FATHIMA, N. N. Electrospinning of casein nanofibers with silver nanoparticles for potential biomedical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.120, p.1674-1681. 2018.

SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações, modificações. São Paulo – SP. Varela, 1996. P. 187 - 203.

SHERVANI, Z.; YAMAMOTO, Y. Carbohydrate-directed synthesis of silver and gold nanoparticles: effect of the structure of carbohydrates and reducing agents on the size and morphology of the composites. **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 651–658, 2011.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**, v.13 p.171–192, 2001.

SIGMA-ALDRICH. Disponível em:
<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/polyethyleneoxide123452532268311?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em 28 de abril de 2016.

SINGH, A K.; TALAT, M.; SINGH, D. P.; SRIVASTAVA, O. N. Biosynthesis of gold and silver nanoparticles by natural precursor clove and their functionalization with amine group. **Journal Of Nanoparticle Research**, v. 12, p. 1667–1675, 2010.

SIRACUSA, V. Packaging Material in the Food Industry. In: Barros-Velázquez, J. (Ed.). *Antimicrobial Food Packaging*. Elsevier Ltd. 2016, p. 95-106.

SONG, Y.; LI, R.; SUN, Q.; JIN, P. Controlled growth of Cu nanoparticles by a tubular microfluidic reactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 168, p. 477–484, 2011.

SÖNNICHSEN, C.; FRANZL, T.; WILK, T.; VON PLESSSEN, G.; FELDMANN, J. Plasmon resonances in large noble-metal clusters. **New Journal of Physics**, v.4, p. 93.1–93.8, 2002.

TAYLOR, G. Electrically Driven Jets. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 313, p. 453-475, 1969.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROSZEVALLOS, L.; BYRNE, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.19, p.669-675, 2006.

THAKORE, S.; RATHORE, P. S.; JADEJA, R. N.; THOUNAOJAM, M.; DEVKAR, R. V. Sunflower oil mediated biomimetic synthesis and cytotoxicity of monodisperse hexagonal silver nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 44, p. 209–215, 2014.

THREEPOP NATKUL, P.; WONGNARAT, C.; INTOLO, W.; SUATO, S.; KULSETTHANCHALEE, C. Effect of TiO₂ and ZnO on Thin Film Properties of PET/PBS Blend for Food Packaging Applications. **Energy Procedia**, v. 56, p. 102–111, 2014.

TORRES-GINER, S.; GIMENEZ, E.; LAGARON, J. M. Characterization of the morphology and thermal properties of Zein Prolamine nanostructures obtained by electrospinning. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 601–614, 2008.

TRAVAN, A.; PELILLO, C.; DONATI, I.; MARSICH, E.; BENINCASA, M.; SCARPA, T.; SEMERARO, S.; TURCO, G.; GENNARO, R.; PAOLETTI, S. Non-cytotoxic Silver Nanoparticle-Polysaccharide Nanocomposites with Antimicrobial Activity. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 1429–1435, 2009.

TRIPATANASUWAN, S.; ZHONG, Z.; RENEKER, D. H. Effect of evaporation and solidification of the charged jet in electrospinning of poly(ethylene oxide) aqueous solution. **Polymer**, v. 48, p. 5742–5746, 2007.

TURASAN, H.; SAHIN, S.; SUMNU, G. Encapsulation of Rosemary essential oil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, p. 112–119, 2015.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, 11, 463–471. 1963.

VERAS, F. F.; ROGGIA, I.; PRANKE, P.; PEREIRA, C. N.; BRANDELLI, A. Inhibition of filamentous fungi by ketoconazole-functionalized electrospun nanofibers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 84, p. 70–76, 2016.

VIDYA, H.; SWAMY, B. E. K.; SCHELL, M. One step facile synthesis of silver nanoparticles for the simultaneous electrochemical determination of dopamine and ascorbic acid. *Journal of Molecular Liquids*, 2015. IN PRESS.

VIJAYARAGHAVAN, K.; NALINI, S. P. K.; PRAKASH, N. U.; MADHANKUMAR, D. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of *Syzygium aromaticum*. **Materials Letters**, v. 75, p. 33–35, 2012.

VILAS, V.; PHILIP, D.; MATHEW, J. Essential oil mediated synthesis of silver nanocrystals for environmental, anti-microbial and antioxidant applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 61, p. 429–436, 2016.

VILAS, V.; PHILIP, D.; MATHEW, J. Catalytically and biologically active silver nanoparticles synthesized using essential oil. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.132, p. 743–750, 2014.

WANJALE, S.; BIRAJDAR, M.; JOG, J.; NEPPALLI, R.; CAUSIN, V.; KARGER-KOCSIS, J.; LEE, J.; PANZADE, P. Surface tailored PS/TiO₂ composite nanofiber membrane for copper removal from water. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 469, p. 31–37, 2016.

WEN, P.; ZHU, D-H.; WU, H.; ZONG, M-H.; JING, Y-R.; HAN, S-Y. Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofibrous film for active food packaging. **Food Control**, v. 59, p. 366-376, 2016.

WU, X.; OLESCHUK, R. D.; CANN, N. M. Characterization of microstructured fibre emitters: in pursuit of improved nano electro spray ionization performance. **Analyst**, v. 137, p. 4150–4161, 2012.

XU, L.; PENG, J.; YAN, M.; ZHANG, D.; SHEN, A. Q. Droplet synthesis of silver nanoparticles by a microfluidic device. **Chemical Engineering and Processing**, v. 102, p. 186-193, 2016.

XU, W.; KARST, D.; YANG, W.; YANG, Y. Novel zein-based electrospun fibers with the water stability and strength necessary for various applications. **Polymer International**, v.57 p. 1110 – 1117, 2008.

YUAN, X.; ZHANG, Y.; DONG, C.; SHENG, J. Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning. **Polymer International**, v. 53, p. 1704-1710, 2004.

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

ZHANG, X.-F., LIU, Z.-G., SHEN, W., GURUNATHAN, S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17 (9), p.1534. 2016.