



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
COORDENADORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIAS DOS
MATERIAIS

CAMILA SULIANI RAOTA

**SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA A PARTIR DO EXTRATO DO
BAGAÇO DE *Vitis labrusca* (CULTIVAR *Ives*), CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO
NA DESINFECÇÃO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Giovanela
Coorientador: Prof. Dr. Thiago Barcellos da Silva

Caxias do Sul
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

R215s Raota, Camila Suliani

Síntese verde de nanopartículas de prata a partir do extrato do bagaço de *Vitis labrusca* (Cultivar Ives), caracterização e aplicação na desinfecção de efluentes industriais / Camila Suliani Raota. – 2018. 80 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, 2018.

Orientação: Marcelo Giovanela.

Coorientação: Thiago Barcellos da Silva.

1. Nanopartículas. 2. Prata. 3. *Vitis labrusca*. 4. Águas residuais - Purificação. 5. Resíduos industriais. I. Giovanela, Marcelo, orient. II. Silva, Thiago Barcellos da, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 620.3

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Paula Fernanda Fedatto Leal - CRB 10/2291

Camila Suliani Raota

Síntese Verde de Nanopartículas de Prata a partir do Extrato do Bagaço de *Vitis labrusca* (Cultivar *Ives*), Caracterização e Aplicação na Desinfecção de Efluentes Industriais

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais”, com a orientação do Prof. Dr. Marcelo Giovanela e coorientação do Prof. Dr. Thiago Barcellos da Silva.

Caxias do Sul, 2018.

“Síntese Verde de Nanopartículas de Prata a partir do Extrato do Bagaço de Vitis labrusca (Cultivar Ives), Caracterização e Desinfecção de Efluentes Industriais”

Camila Suliani Raota

Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Materiais da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais, Área de Concentração: Processamento e Simulação de Materiais.

Caxias do Sul, 19 de dezembro de 2018.

Banca Examinadora:

Marcelo Giovanela

Orientador

Thiago Barcellos da Silva

Coorientador

Prof. Dr. Marcos Antonio Villeti

Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva

Universidade de Caxias do Sul

Prof. Dr. Cezar Aguzzoli

Universidade de Caxias do Sul

DEDICATÓRIA

A minha família, e ao meu marido Vinicius, pelo incentivo, compreensão e carinho, não somente na realização deste trabalho, mas por todo o tempo, até a conclusão do mestrado.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Marcelo Giovanela pelo incentivo, orientação e acompanhamento indispensável na realização deste trabalho.

Ao Prof. Thiago Barcellos pela atenção e orientação.

Ao Sr. Fernando Milani, proprietário da Vinícola Waldemar Milani, pela doação do bagaço de uva.

Ao Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade de Caxias do Sul, especialmente à Prof^a. Ana Paula Delamare e ao Prof. Sergio Echeverrigaray pelo auxílio com os ensaios de microbiologia.

Ao Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidante da Universidade de Caxias do Sul, especialmente à Prof^a. Mirian Salvador e à mestrandas Aline Cerbaro pelo auxílio com os ensaios de DPPH e ABTS.

Ao Instituto de Materiais Cerâmicos de Caxias do Sul, especialmente ao Prof. Robinson Carlos Dudley Cruz e ao técnico Ângelo Pradella Titton pelo auxílio com os ensaios de espectroscopia Raman.

Aos meus colegas mestrando Marina Bandeira e Mário César Vebber pelo incentivo e companheirismo ao longo do curso, além das preciosas sugestões no projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pela taxa PROSUC.

EPIGRAFE

Todas as vitórias ocultam uma abdicação.

(Simone de Beauvoir)

RESUMO

As metodologias tradicionais para a síntese de nanopartículas metálicas compreendem a utilização de reagentes tóxicos que podem causar impactos negativos, tanto ao meio ambiente como à saúde humana. Assim, uma alternativa mais segura para a produção desses nanomateriais baseia-se nos conceitos da Química Verde, onde são utilizados reagentes menos nocivos e de fontes renováveis. Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo a síntese verde de nanopartículas de prata (AgNPs), a partir do extrato do bagaço de *Vitis labrusca* (cultivar *Ives*), sua caracterização, bem como a posterior aplicação no tratamento terciário de efluentes industriais. Para tanto, os parâmetros de extração dos compostos bioativos do bagaço de uva foram previamente otimizados, e o sistema com o melhor desempenho, em termos da atividade antioxidante, foi a extração com uma solução hidroalcoólica a 50% (v/v) assistida por um misturador do tipo hélice. Os parâmetros da síntese verde (concentração do extrato, concentração do nitrato de prata e pH do meio) foram igualmente aprimorados, e as AgNPs sintetizadas foram analisadas quanto à estabilidade e à morfologia por meio das técnicas de potencial zeta (PZ), espectroscopia de absorção molecular na região do UV-Vis, microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG), espectroscopia por dispersão de energia (EDS) e espectroscopia Raman. Os resultados mostraram que, nas condições otimizadas (solução de AgNO_3 em $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$, extrato na concentração de $50,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e pH 10,0), as AgNPs apresentaram um diâmetro médio de 2,9 nm e uma densidade de carga negativa sobre as nanopartículas superior a - 40,0 mV. A partir das informações obtidas pelas diferentes técnicas de caracterização utilizadas, um mecanismo para a síntese verde das AgNPs foi proposto com base no ácido gálico, por este ser o composto fenólico majoritário do extrato hidroalcoólico. A atividade bactericida das AgNPs foi comprovada pela determinação da atividade mínima inibitória e pela

formação dos halos de inibição no ensaio de crescimento bacteriano por difusão de superfície, frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Por fim, os resultados obtidos na etapa de desinfecção revelaram que os *pellets* de quitosana-AgNPs são eficazes na remoção de bactérias, sendo que, após 1 h de contato, foram capazes promover uma redução na contagem das bactérias *E. coli*, possibilitando a sua aplicação no tratamento terciário de efluentes industriais. Desta forma, esse trabalho demonstrou que é possível realizar a síntese verde de AgNPs utilizando o extrato de bagaço de *Vitis labrusca* (cultivar *Ives*), e empregá-las como auxiliares na desinfecção de um efluente industrial.

Palavras-chave: síntese verde, bagaço de *Vitis labrusca*, nanopartículas de prata, tratamento terciário, efluentes industriais.

ABSTRACT

Traditional methodologies for the synthesis of metallic nanoparticles include the use of toxic chemicals that can have negative impacts on the environment and human health. Thus, a safer alternative to the production of these nanomaterials is based on the concepts of Green Chemistry, which uses less harmful reagents and from renewable sources. In this context, the goals of the present work were the green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using the extract of *Vitis labrusca* (cultivars *Ives*) pomace, their characterization, and its subsequent application in the tertiary industrial wastewater treatment. The extraction conditions of bioactive compounds of grape pomace were previously optimized and, considering antioxidant activity, the system which achieved the best performance was extraction with a hydroalcoholic solution at 50% (v/v), assisted by a propeller. The main green synthesis parameters (i.e., extract concentration, silver nitrate concentration, and medium pH) were equally refined and the synthesized AgNPs were analyzed on the basis of their stability and morphology by means of several techniques including zeta potential (ZP), molecular absorption spectroscopy in the range of UV-Vis, transmission electronic microscopy (TEM), scanning electron microscopy with a field emission gun (SEM-FEG), energy dispersive spectroscopy (EDS), and Raman spectroscopy. The optimized conditions (AgNO_3 solution at 2.5 mmol L^{-1} , extract solution at 50.0 mg mL^{-1} , and $\text{pH} = 10.0$) showed that the AgNPs had an average diameter of 2.9 nm and a charge density on nanoparticles higher than -40.0 mV . From the information obtained by several characterization techniques, a mechanism for the green synthesis of AgNPs is proposed based on the gallic acid, which is the major phenolic compound of the hydroalcoholic extract. Bacterial activity of AgNPs was verified by determination of inhibitory minimum activity and by the formation of an inhibition halo in the bacteria grown by superficial diffusion assay,

against Gram-positive and Gram-negative bacteria. In conclusion, results obtained at the disinfection step revealed that chitosan-AgNPs pellets were effective in bacterial removal. After 1 h of contact, they promoted a reduction in the bacterial count of *E. coli* bacteria, thus enabling their application in tertiary industrial wastewater treatment. Finally, this work showed that is possible to perform an eco-friendly process for AgNPs synthesis using the extract of *Vitis labrusca* (cultivars *Ives*) pomace and utilize them as auxiliaries in wastewater disinfection.

Keywords: green synthesis, *Vitis labrusca* pomace, silver nanoparticles, tertiary treatment, industrial wastewaters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do cátion flavílio e das antocianinas presentes na uva.	30
Figura 2 – Unidade básica dos flavan-3-ols e exemplos de compostos encontrados na uva. .	30
Figura 3 – Unidade básica de um flavonol e estruturas químicas da quercitina e da miricitina.	31
Figura 4 – Unidade básica dos estilbenos e estrutura química do resveratrol.....	31
Figura 5 – Estruturas químicas dos principais dos ácidos fenólicos encontrados em uvas.....	32
Figura 6 – Espectro UV-Vis característico de AgNPs esféricas.	38
Figura 7 – Fases do processo de formação de nanopartículas.....	40
Figura 8 – Aplicações usuais das AgNPs.	42
Figura 9 – Ilustração simplificada do processo de síntese verde das AgNPs mediada por extratos vegetais.	44
Figura 10 – Fluxograma da metodologia utilizada no desenvolvimento desse trabalho.....	45
Figura 11 – Bagaço de <i>Vitis labrusca</i> (cultivar <i>Ives</i>).	46
Figura 12 – Reação de um composto fenólico (nesse caso, ácido gálico) com o íon Mo^{6+}	50
Figura 13 – Reação entre o ABTS e um composto antioxidante.	51
Figura 14 – Reação entre o DPPH e um composto antioxidante (R^*).	51
Figura 15 – Estrutura do ensaio de determinação CIM das AgNPs em uma placa de ELISA.	56
Figura 16 – Placas de Petri do ensaio de inibição do crescimento bacteriano.	58
Figura 17 – Tratamento terciário do efluente industrial com os <i>pellets</i> de quitosana-AgNPs.	59
Figura 18 – Resultados do ensaio de quantificação de compostos fenólicos para a avaliação da influência da composição da solução extratora na obtenção do extrato do bagaço de <i>Vitis labrusca</i> (cultivar <i>Ives</i>).	61
Figura 19 – Resultados do ensaio de quantificação de compostos fenólicos para a avaliação da influência do sistema de agitação para a extração sólido-líquido.	62
Figura 20 – Resultados do ensaio de quantificação de compostos fenólicos para a avaliação da influência do pré-tratamento do bagaço de <i>Vitis labrusca</i> (cultivar <i>Ives</i>).	63
Figura 21 – Gráfico da concentração de EAG em função do pH da solução extratora.....	64
Figura 22 – Reações de equilíbrio do cátion flavílio das antocianinas em função do pH do meio.	65

Figura 23 – Estrutura química dos principais flavonoides encontrados no extrato de bagaço de <i>Vitis labrusca</i> (cultiva <i>Ives</i>).....	69
Figura 24 – Espectros UV-Vis das AgNPs sintetizadas em função da variação da concentração do extrato.	71
Figura 25 – Espectros UV-Vis das AgNPs sintetizadas em função da variação da concentração de AgNO ₃	73
Figura 26 – Extrato do bagaço de <i>Vitis labrusca</i> (cultivar <i>Ives</i>) em pH de 2,6 (à esquerda) a 12,7 (à direita).....	74
Figura 27 – Soluções de AgNPs sintetizadas em função da variação do pH do extrato (de pH 2,6 a 12,7).	74
Figura 28 – Espectros UV-Vis das AgNPs obtidas em função do pH do extrato.	75
Figura 29 – Imagens de MET das AgNPs em função do pH do meio: (a) 7,0; (b) 8,0; (c) 9,0; (d) 10,0; (e) 11,0; (f) 12,0.....	77
Figura 30 – Potencial zeta das AgNPs em função da variação do pH de síntese.....	79
Figura 31 – Espectros UV-Vis das AgNPs sintetizadas em diferentes condições de pH: (a) 7,0 R, (b) 8,0 R, (c) 9,0 TA, (d) 10,0 TA, (e) 11,0 TA e (f) 12,0 TA (R = armazenadas sob refrigeração; TA = armazenadas à temperatura ambiente).....	80
Figura 32 – Espectros UV-Vis das AgNPs sintetizadas em pH = 10,0 (armazenada sob refrigeração e à temperatura ambiente).	81
Figura 33 – Resultado do ensaio de determinação CIM das AgNPs frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	83
Figura 34 – Imagens de MEV-FEG das AgNPs sintetizadas em pH = 12,7.....	84
Figura 35 – Espectro de EDS das AgNPs sintetizadas em pH = 12,7.....	85
Figura 36 – Espectro Raman das AgNPs sintetizadas em pH = 12,7 (detalhe do material analisado com aumento de 5 ×).	86
Figura 37 – Representação da proposta de mecanismo de redução de íons Ag ⁺ a Ag ⁰ mediada por ácido gálico.	88
Figura 38 – <i>Pellets</i> de quitosana-AgNPs.....	89
Figura 39 – Halos de inibição formados pelos <i>pellets</i> de quitosana-AgNPs nas placas inoculadas com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.	90
Figura 40 – Petrifilm do ensaio de contagem de <i>E. coli</i> do efluente bruto (antes do tratamento) com os <i>pellets</i> de quitosana-AgNPs. As colônias azuis correspondem à bactéria <i>E. coli</i>	92

Figura 41 – Contagem de *E. coli* em função do tempo de tratamento do efluente industrial com os *pellets* de quitosana-AgNPs. 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Compostos fenólicos identificados no extrato de bagaço de <i>Vitis labrusca</i> (cultivar <i>Ives</i>)	70
Tabela 2 – Fatores de resposta calculados para as diferentes concentrações de extrato.	72
Tabela 3 – Fatores de resposta calculados para as diferentes concentrações de nitrato de prata.	72
Tabela 4 – Diâmetro médio das AgNPs em função do pH do meio.....	78
Tabela 5 – Resultados de inibição em função da fonte de prata e do tipo de bactéria.	82
Tabela 6 – Diâmetro médio dos halos de inibição formados pelos <i>pellets</i> de quitosana-AgNPs.	91

SIGLAS, TERMOS E ABREVIACÕES

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6- sulfônico)
AgNPs	Nanopartículas de prata
A _{max}	Absorvância máxima
AOAC	Associação Oficial de Químicos Analíticos (do inglês, <i>Association of Official Analytical Chemists</i>)
BHI	Infusão de cérebro e coração (do inglês, <i>brain heart infusion</i>)
<i>Bottom-up</i>	De baixo para cima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAG	Equivalentes de ácido gálico
<i>Eco-Friendly</i>	Ambientalmente correto
EDS	Espectroscopia por dispersão de energia (do inglês, <i>energy dispersive spectroscopy</i>)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FEG	Feixe por emissão de campo (do inglês, <i>field emission gun</i>)
FWHM	Largura à meia altura (do inglês, <i>full width half maximum</i>)
HAT	Transferência de átomo de hidrogênio (do inglês, <i>hydrogen atom transfer</i>)
IBRAVIN	Instituto Brasileiro do Vinho
IC ₅₀	Concentração da Inibição de 50%
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mV	milivolts

PEF	Campo elétrico pulsado (do inglês <i>pulsed electric field</i>)
PZ	Potencial Zeta
SDD	Detector de desvio de silício (do inglês, <i>silicon drift detector</i>)
SET	Transferência simples de elétron (do inglês, <i>single electron transfer</i>)
SPR	Ressonância de superfície plasmônica (do inglês, <i>surface plasmon resonance</i>)
<i>Top-down</i>	De cima para baixo
UFC	Unidades formadoras de colônias
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta e visível
λ_{\max}	Comprimento de onda de máxima absorvância

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 OBJETIVOS	23
1.1.1 Objetivo geral.....	23
1.1.2 Objetivos específicos.....	23
2 REFERENCIAL TEÓRICO	25
2.1 DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL E QUÍMICA VERDE	25
2.2 O BAGAÇO DE UVA	28
2.2.1 Compostos bioativos do bagaço de <i>Vitis labrusca</i> (cultivar <i>Ives</i>)	29
2.2.2 Mecanismos de ação dos antioxidantes.....	32
2.2.3 Extração dos compostos bioativos do bagaço de <i>Vitis labrusca</i> (cultivar <i>Ives</i>)	33
2.4 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	36
2.4.1 Ressonância plasmônica de superfície	37
2.4.2 Síntese química, biológica e verde das nanopartículas metálicas	38
2.4.1 Processo de formação de nanopartículas.....	40
2.5 NANOPARTÍCULAS DE PRATA	41
2.5.1 Síntese verde de AgNPs.....	43
3 METODOLOGIA	45
3.1 MATERIAIS	46
3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO DO BAGAÇO DE <i>Vitis labrusca</i> (CULTIVAR <i>Ives</i>)	47
3.2.1 Avaliação da concentração de etanol na solução extratora	47
3.2.2 Avaliação do processo físico de extração	48
3.2.3 Avaliação do pré-tratamento do bagaço de <i>Vitis labrusca</i> (cultivar <i>Ives</i>)	48
3.2.4 Avaliação do pH da solução extratora.....	48
3.3 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO	49
3.3.1 Quantificação de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu.....	49
3.3.2 Atividade antioxidante total pelos radicais ABTS e DPPH	50
3.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (CLAE- UV)	51
3.4 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	52
3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	53

3.5.1 Microscopia eletrônica de transmissão.....	54
3.5.2 Estabilidade das soluções de AgNPs	54
3.5.3 Determinação da concentração inibitória mínima das AgNPs.....	55
3.5.4 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo	56
3.5.5 Espectroscopia por dispersão de energia	57
3.5.6 Espectroscopia Raman	57
3.6 SÍNTESE DOS <i>PELLETS</i> DE QUITOSANA-AgNPs E TRATAMENTO TERCIÁRIO DO EFLUENTE INDUSTRIAL.....	57
3.6.1 Inibição do crescimento bacteriano por difusão em superfície	58
3.6.2 Tratamento terciário do efluente industrial.....	59
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO DO BAGAÇO DE <i>Vitis labrusca</i> (CULTIVAR <i>Ives</i>)	60
4.1.1 Avaliação da composição da solução extratora	60
4.1.2 Avaliação do sistema de agitação da extração sólido-líquido.....	62
4.1.3 Avaliação do pré-tratamento do bagaço.....	63
4.1.4 Avaliação do pH da solução extratora.....	64
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DO BAGAÇO DE <i>Vitis labrusca</i> (CULTIVAR <i>Ives</i>).....	66
4.2.1 Quantificação de fenólicos totais	66
4.2.2 Atividade antioxidante pela varredura dos radicais DPPH e ABTS	67
4.2.3 Identificação dos compostos majoritários por CLAE-UV	68
4.3 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	70
4.3.1 Avaliação da influência da concentração do extrato.....	71
4.3.2 Avaliação influência da concentração de nitrato de prata	72
4.3.3 Avaliação influência do pH do extrato	73
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	76
4.4.1 Microscopia eletrônica de transmissão.....	76
4.4.2 Potencial zeta.....	78
4.4.3 Avaliação da estabilidade por espectroscopia de absorção molecular na região do UV-Vis	79
4.4.4 Determinação da concentração inibitória mínima das AgNPs.....	82
4.4.5 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo.....	84

4.4.6 Espectroscopia por dispersão de energia	85
4.4.7 Espectroscopia Raman	86
4.5 PROPOSTA DO MECANISMO DA SÍNTESE.....	87
4.6 SÍNTESE DOS <i>PELLETS</i> DE QUITOSANA-AgNPs E TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS	89
4.6.1 Inibição do crescimento bacteriano por difusão em superfície	90
4.6.2 Avaliação da atividade bactericida dos <i>pellets</i> de quitosana-AgNPs no tratamento terciário de efluentes industriais.....	92
5 CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS	96

1 INTRODUÇÃO

As nanopartículas de prata (AgNPs) ganharam popularidade nas últimas décadas, em função de suas propriedades antissépticas únicas. Devido a essa característica, essas nanopartículas têm sido frequentemente utilizadas em produtos têxteis, em embalagens de produtos alimentícios, na produção de tintas, no tratamento de águas e efluentes, em produtos hospitalares, entre outros.

A síntese das AgNPs é geralmente realizada em meio aquoso, utilizando um precursor metálico (geralmente o AgNO_3 , devido à sua alta solubilidade nesse meio), na presença de agentes redutores como o boroidreto de sódio e a hidrazina, e de estabilizadores como o citrato de sódio, além de surfactantes como polivinilpirrolidona (PVP). Tais substâncias são tóxicas, e podem causar diversos impactos à saúde humana e ao meio ambiente.

No entanto, esses reagentes redutores e estabilizadores podem ser substituídos por substâncias de origem natural, tais como flavonoides, antocianinas, taninos e ácidos hidroxibenzoicos. Nesse caso em particular, o processo é chamado de “síntese verde”, visto que são utilizadas substâncias de origem biológica como auxiliares na redução e estabilização das nanopartículas. Além de ser mais segura e menos nociva que os métodos tradicionais, a síntese verde tem a vantagem de ser um processo ambientalmente correto e de baixo custo.

Esses biocompostos são encontrados com frequência no reino vegetal, especialmente em espécies frutíferas como a uva, o mirtilo, o morango, entre outras. Mesmo depois de serem beneficiadas, essas frutas ainda podem ser utilizadas em outros processos químicos. Um exemplo disso é o bagaço de uva, que é um resíduo do processo de fabricação de vinhos e sucos, gerado em grandes quantidades no estado do Rio Grande do Sul. Segundo a IBRAVIN, somente no ano de 2018, cerca de 663 milhões de quilogramas de uvas foram processados nesse estado,

sendo que mais da metade da produção foi destinada à elaboração de vinhos comuns, gerando cerca de 15 milhões de quilogramas de bagaço de uva.

Esse bagaço possui ainda altas concentrações de compostos bioativos em sua composição, substâncias essas que poderiam ser utilizadas na síntese verde de nanopartículas metálicas. Desta forma, o tratamento correto desses resíduos, assim como a sua utilização para outros fins, pode representar um avanço significativo na manutenção do equilíbrio do meio ambiente e na sua sustentabilidade, visto que tais resíduos representam sérios problemas de armazenagem, transformação e eliminação, tanto em termos ecológicos como econômicos.

Nesse contexto, esse trabalho teve por objetivo avaliar a possibilidade de utilização de compostos bioativos do bagaço de *Vitis labrusca* (cultivar *Ives*) na produção de AgNPs, com a perspectiva de uma melhor utilização dos mesmos, em termos tecnológicos, desses resíduos provenientes da indústria vinícola. Aliado a esse propósito, as AgNPs sintetizadas foram suportadas em uma matriz polimérica biodegradável de quitosana, visando sua posterior aplicação na desinfecção de um efluente industrial.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver um processo ambientalmente correto (do inglês, *eco-friendly*) para a síntese de AgNPs, utilizando o extrato de bagaço de *Vitis labrusca* (cultivar *Ives*).

1.1.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente trabalho são:

- a) avaliar a influência de parâmetros experimentais no processo de obtenção do extrato de bagaço de *Vitis labrusca* (cultivar *Ives*), tais como sistema de extração, composição e pH da solução extratora, através do ensaio de quantificação de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu;
- b) caracterizar o melhor extrato quanto à atividade antioxidante total pelos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), além de identificar os compostos fenólicos majoritários por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por ultravioleta (UV);
- c) avaliar a influência da concentração do extrato obtido, bem como da concentração da solução de AgNO₃ e do pH do meio, na síntese das AgNPs por meio da técnica de espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (UV-Vis);
- d) avaliar a estabilidade das AgNPs por meio da análise de potencial zeta (PZ) e pelo monitoramento da banda plasmônica por espectroscopia de absorção molecular na região do UV-Vis;

- e) avaliar a atividade mínima inibitória das AgNPs frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas;
- f) caracterizar as AgNPs obtidas quanto à distribuição de tamanho, formato e estado de agregação, por meio da técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG);
- g) realizar a análise química elementar das AgNPs por meio da técnica de espectroscopia por dispersão de energia (EDS);
- h) propor um mecanismo para a síntese verde das AgNPs utilizando o extrato do bagaço de *Vitis labrusca* (cultivar *Ives*);
- i) incorporar as AgNPs sintetizadas em uma matriz polimérica biodegradável de quitosana, e aplicá-las no tratamento terciário de efluentes industriais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL E QUÍMICA VERDE

A sustentabilidade é a capacidade de sustentação ou conservação de um processo ou sistema, sendo um tema emergente. Na prática, se refere às ações realizadas para satisfazer as necessidades humanas sem, no entanto, comprometer as demandas futuras (TORRESI; PARDINI; FERREIRA, 2010). O desenvolvimento sustentável só é possível se houver a integração de três princípios: o social, o econômico e o ambiental.

O primeiro se relaciona às condições de vida das pessoas, abordando as temáticas de educação, saúde, lazer e bem estar. Os princípios econômicos, por sua vez, referem-se às sistemáticas de produção, distribuição e consumo de bens e serviços, ponderando, sempre que possível, as questões sociais e ambientais. Os princípios ambientais, sendo os conceitos mais comumente atribuídos à sustentabilidade, abordam as questões inerentes aos recursos naturais, como a sua utilização e preservação (BURSZTYN, 2011). Com o objetivo de garantir o progresso científico sustentável, criou-se o conceito de Química Verde, ou seja, um conjunto de estratégias que tem por objetivo para garantir o atendimento aos princípios ambientais previstos no contexto da sustentabilidade.

A Química Verde visa, mais precisamente, ao desenvolvimento de metodologias e/ou processos que usem e gerem a menor quantidade possível de materiais tóxicos e/ou inflamáveis (ANASTAS; EGHBALI, 2010). Neste caso, os riscos seriam minimizados e, uma vez que o processo fosse implementado, os gastos com tratamento de resíduos seriam reduzidos.

As primeiras menções à Química Verde foram feitas em meados da década de 1990 nos Estados Unidos, na Inglaterra e na Itália, com o intuito de fomentar novos conceitos e valores na área da Química. Com o passar dos anos, a União Internacional de Química Pura e

Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*) estabeleceu diretrizes para o desenvolvimento dessa área em nível mundial (CGEE, 2010).

A partir de então, a preocupação com a preservação do meio ambiente passou a ter uma maior importância e, em 1992, com a realização da Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e o Desenvolvimento Sustentável (a ECO-92), no Rio de Janeiro, foi elaborado um documento, conhecido como “Agenda 21”, no qual os países participantes se comprometiam em prezar pelo desenvolvimento sustentável (SILVA; LACERDA; JONES JUNIOR, 2005).

Mais tarde, em 1998, Paul Anastas e John Warner publicaram uma relação com doze princípios que devem ser levados em consideração para que se desenvolvam processos industriais sustentáveis (ANASTAS; EGHBALI, 2010). São eles:

- a) é melhor prevenir que tratar os resíduos provenientes de processos químicos;
- b) os métodos sintéticos devem ser projetados para maximizar a incorporação de toda a massa dos reagentes no produto;
- c) sempre que forem viáveis, as rotas sintéticas devem utilizar e gerar substâncias com a menor toxicidade possível à vida humana e ao meio ambiente;
- d) os produtos químicos devem ser projetados de forma a ter a maior eficiência no cumprimento de seus objetivos, com menor toxicidade;
- e) o uso substâncias auxiliares do processo (como solventes, agentes de separação, etc.) deve, sempre que possível, ser desnecessário ou inofensivo;
- f) as exigências energéticas devem ser reconhecidas por seus impactos ambientais e econômicos, e precisam ser minimizadas. As rotas sintéticas devem, sempre que possível, ser conduzidas à temperatura e pressão ambientes;
- g) a matéria-prima deve ser proveniente de fontes renováveis;

- h) deve-se planejar a metodologia de modo a não precisar de reações de derivatização como grupos de proteção;
- i) catalisadores são sempre superiores a reagentes convencionais;
- j) os produtos químicos devem ser projetados de maneira tal que, depois de terem sido utilizados, eles não persistam no meio ambiente e que seus produtos de degradação sejam inócuos;
- k) os métodos analíticos devem ser desenvolvidos para monitorar o processo em tempo real controlando, *a priori*, a formação de substâncias perigosas;
- l) as substâncias e a forma como são usadas no processo químico devem minimizar o potencial de acidentes.

Nesse contexto, percebe-se uma intensificação nas pesquisas voltadas à temática da sustentabilidade e Química Verde. Sousa-Aguiar et al. (2014) realizaram um levantamento das publicações relacionadas à Química Verde, no período de 1990 e 2013, e observaram um crescimento expressivo de artigos ligados ao tema. Entretanto, a produção científica brasileira está muito aquém da de países como os Estados Unidos e Inglaterra, que lideram o *ranking* de publicações.

Desta forma, os trabalhos abordando a Química Verde e o desenvolvimento sustentável possuem uma importância fundamental para os pesquisadores de todo o mundo. Uma importante linha de pesquisas nessa área está relacionada ao beneficiamento, à incorporação e ao reaproveitamento de resíduos, visando um destino mais nobre e apropriado desses materiais que são gerados nos mais diversos processos produtivos. O polo vitivinícola do Rio Grande do Sul, por exemplo, gera uma quantidade expressiva de bagaço de uva, um resíduo agroindustrial que apresenta um grande potencial para ser reutilizado em outros processos.

2.2 O BAGAÇO DE UVA

O Rio Grande do Sul é responsável por cerca de 80% da produção de uvas no Brasil, com aproximadamente 83,7 mil hectares cultivados (COSTA, 2018). O processamento de uvas no estado superou a marca de 663 milhões de quilogramas no ano de 2018, segundo a IBRAVIN (2018). A elaboração de vinhos comuns compreendeu mais da metade da produção das vinícolas do Rio Grande do Sul no ano de 2017, correspondendo à fabricação de aproximadamente 254 milhões de litros do produto (IBRAVIN, 2017). Em contrapartida, no mesmo ano, cerca de 54 milhões de quilogramas de bagaço de uva foram produzidos.

Esse resíduo que é constituído basicamente por cascas, sementes e engaço, nas proporções de 55%, 40% e 5%, respectivamente. Além disso, é considerado um resíduo de baixo valor agregado, e se torna um passivo ambiental, devido às quantidades geradas no processo produtivo (BASTOS, 2014).

Os destinos mais comuns para o bagaço de uva proveniente dos processos de vinificação são a alimentação animal, a incorporação em adubos, a produção de etanol ou simplesmente o descarte no meio ambiente (STRAPASSON, 2016; POSTINGHER et al., 2016). O bagaço de uva possui pH naturalmente ácido (entre 3,0 e 4,0), e a sua disposição no solo reduz a fertilidade por diminuir a oferta de nutrientes (RIBEIRO, 2016; FERRARI, 2010). Devido à alta concentração de compostos fitotóxicos e antibacterianos, o bagaço de uva pode comprometer o solo, impossibilitando a germinação das plantas (POSTINGHER et al., 2016).

O bagaço de uva é rico em compostos bioativos, especialmente antioxidantes como os compostos fenólicos. Frente a essa característica e sua disponibilidade, diversos estudos têm sido realizados visando um destino mais nobre para esse resíduo, como a utilização na indústria de alimentos (STRAPASSON, 2016), na indústria farmacêutica (TOALDO et al., 2015; ANTONIOLLI et al., 2015), e como fonte de compostos antioxidantes nos mais diversos

processos (PING et al., 2018). Nesse último contexto, a utilização dos compostos bioativos do bagaço de uva como agentes redutores na síntese verde de nanopartículas metálicas tem sido objeto de diversas pesquisas.

2.2.1 Compostos bioativos do bagaço de *Vitis labrusca* (cultivar *Ives*)

O processo de fabricação do vinho retira grande parte dos compostos bioativos da uva; entretanto, o bagaço conserva ainda uma quantidade expressiva de substâncias que podem ser incorporadas em outros processos industriais. Segundo Georgiev, Ananga e Tsoleva (2014), cerca de 70% dos compostos fenólicos da uva permanecem no bagaço, mesmo após o processo de vinificação.

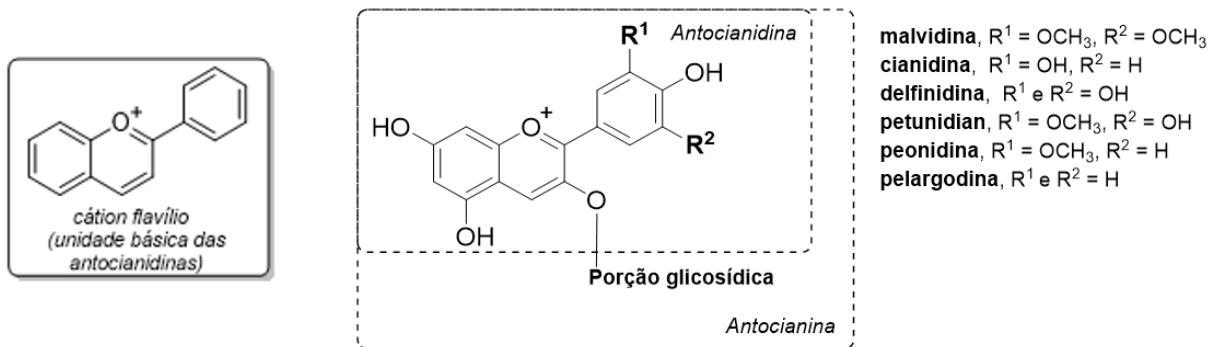
O bagaço de uva é rico em antocianinas, flavan-3-ols, flavonols, estilbenoides e ácidos fenólicos (GOULA; THYMIATIS; KADERIDES, 2016), que são classes de compostos conhecidos pela sua atividade antioxidante. Quando isolados, facilmente sofrem degradação pela luz, oxigênio e calor (RIBEIRO, 2016); entretanto, nas espécies vegetais, esses compostos encontram-se ligados a proteínas e açúcares, aumentando sua estabilidade (STRAPASSON, 2016).

As antocianinas são pigmentos de origem vegetal que, por conta de sua característica antioxidante, são responsáveis pelos mecanismos de defesa da planta, como proteção contra a ação da luz, além de funções biológicas (LOPES et al., 2007). As antocianinas são estruturas derivadas do cátion flavílio (**Figura 1**), cujos substituintes são grupos hidroxilas ou metoxilas, e que possuem uma porção glicolítica ligada à posição 3 do cátion flavílio (RIBEIRO, 2016). Quando estão isoladas dos grupos glicosados, são chamadas de antocianidinas.

Uma grande diversidade de antocianinas é observada na natureza, e a variação estrutural ocorre principalmente nas posições R¹ e R². Nas uvas, as principais antocianinas são

a malvidina, a cianidina, a delphinidina, a petunidina, a peonidina e a perlagonidina (TOALDO et al., 2015).

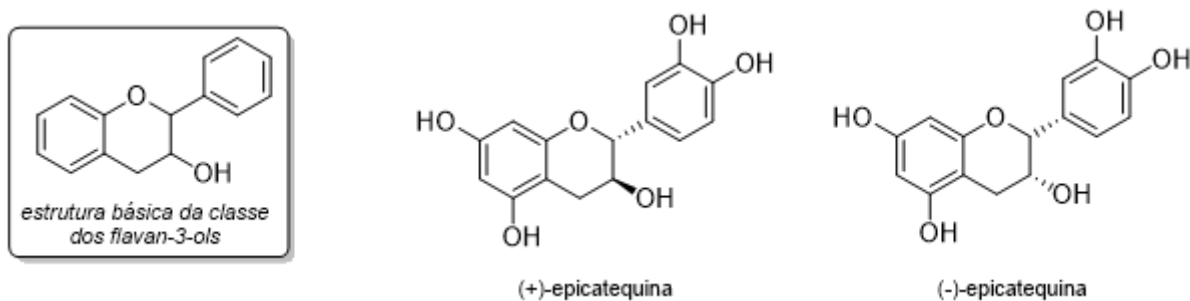
Figura 1 – Estrutura do cátion flavílio e das antocianinas presentes na uva.



Fonte: adaptado de Toaldo et al. (2015).

Os flavan-3-ols são substâncias derivadas da unidade básica flavano, em que o grupo hidroxila presente na posição 3 é o substituinte que caracteriza a classe (**Figura 2**). Biologicamente, atuam em vegetais na defesa contra bactérias, fungos, insetos e animais herbívoros (ALBUQUERQUE et al., 2017), além de atuarem como atrativos para insetos polinizadores, pelo fato de serem responsáveis pelas características organolépticas das plantas (TEIXEIRA et al., 2014). Os flavan-3-ols mais encontrados nas uvas são as (+)-catequinas, as (-)-epicatequinas e as proantocianidinas (GEORGIEV; ANANGA; TSOLOVA, 2014).

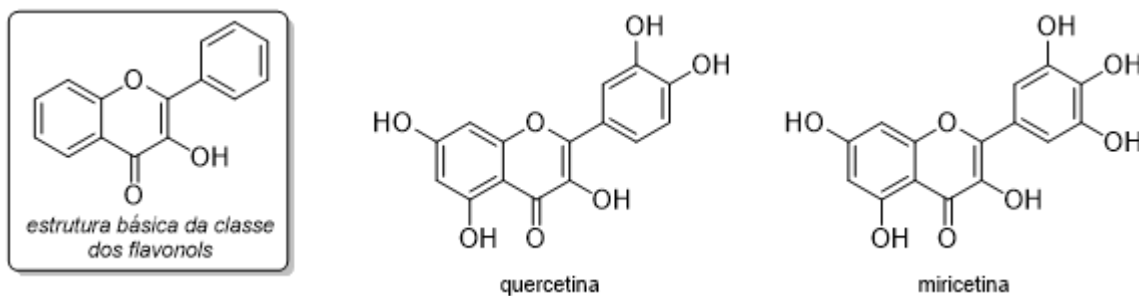
Figura 2 – Unidade básica dos flavan-3-ols e exemplos de compostos encontrados na uva.



Fonte: adaptado de Albuquerque et al. (2017).

Os flavonols (**Figura 3**) possuem propriedades semelhantes às antocianinas e aos flavan-3-ols, no que diz respeito à proteção nas espécies vegetais. Os principais flavonols encontrados em uvas são a quercetina, a miricetina, a rutina, o campferol e a isorhamnetina (TOALDO et al., 2015).

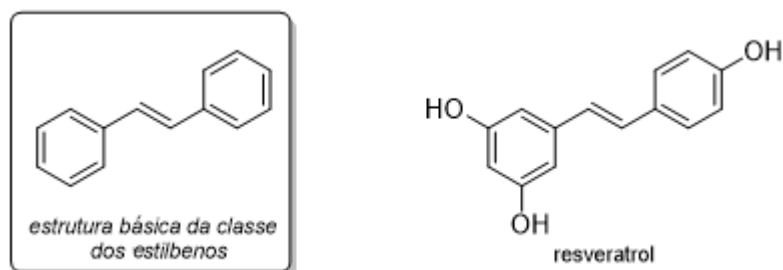
Figura 3 – Unidade básica de um flavonol e estruturas químicas da quercetina e da miricetina.



Fonte: adaptado de Huber, Hoffmann-ribani e Rodriguez-amaya (2009) .

Os estilbenoides são derivados hidroxilados dos estilbenos, e são caracterizados pela presença de dois anéis aromáticos ligados por uma ponte de etileno (**Figura 4**) (TEIXEIRA et al., 2014). Seu representante mais importante em uvas é o resveratrol, composto extensivamente estudado pelas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticarcinogênicas (TOALDO et al., 2015). Nas espécies vegetais, atuam na proteção contra infecções e toxinas (AKINWUMI; BORDUN; ANDERSON, 2018).

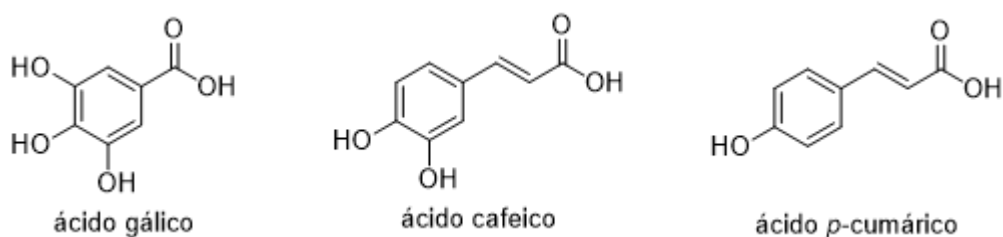
Figura 4 – Unidade básica dos estilbenos e estrutura química do resveratrol.



Fonte: adaptado de Akinwumi, Bordun e Anderson (2018).

Os ácidos fenólicos estão relacionados ao aroma e sabor das uvas, sendo atribuídos ao aparecimento de fenóis voláteis, alterando as características sensoriais. Os principais ácidos fenólicos encontrados em uvas são o cafeico, o gálico e o *p*-cumárico (**Figura 5**) (TOALDO et al., 2015; ROBBINS, 2003). Os ácidos fenólicos são comumente encontrados em sua forma conjugada, como derivados glicosilados (TEIXEIRA et al., 2014).

Figura 5 – Estruturas químicas dos principais dos ácidos fenólicos encontrados em uvas.



Fonte: adaptado de Robbins (2003).

2.2.2 Mecanismos de ação dos antioxidantes

A ação dos compostos antioxidantes está relacionada à sua estrutura, em especial à posição e à quantidade de grupos hidroxila substituídos, além dos outros substituintes do anel aromático (RIBEIRO, 2016).

A atividade antioxidante nos compostos fenólicos ocorre basicamente por dois mecanismos: pela transferência de um elétron ou pela transferência de átomo de hidrogênio. O primeiro, conhecido por SET (do inglês, *single electron transfer*), ocorre pela transferência de um simples elétron de um nucleófilo para um substrato, produzindo um radical intermediário (ASHBY, 1988). Já o segundo, conhecido como HAT (do inglês, *hydrogen atom transfer*), é uma transformação química no qual ocorre o movimento simultâneo de duas partículas elementares, um próton e um elétron, entre dois substratos em uma única etapa cinética (CAPALDO; RAVELLI, 2017).

Devido à diversidade de compostos presentes em um extrato de matriz biológica, o mecanismo de ação antioxidante é complexo, sendo muitas vezes produto de reações paralelas e combinadas (RIBEIRO, 2016).

2.2.3 Extração dos compostos bioativos do bagaço de *Vitis labrusca* (cultivar *Ives*)

Os compostos antioxidantes normalmente são removidos do bagaço de uva pelo método de extração sólido-líquido, assistido por micro-ondas, por ultrassom, com o uso de fluidos supercríticos, ou por um campo elétrico pulsado (PEF, do inglês *pulsed electric field*) (TEIXEIRA et al, 2014; STRAPASSON, 2016; GOULA; THYMIATIS; KADERIDES, 2016).

O método convencional, baseado na extração sólido-líquido, ocorre pela transferência de massa do material sólido para o meio líquido, sendo normalmente associado com a agitação do sistema. Diversos fatores influenciam na eficiência da extração, como o tipo de solvente utilizado, a relação entre as quantidades de solvente e amostra, o tamanho de partícula, os analitos a serem extraídos, a agitação, a temperatura e o tempo de extração. Os solventes mais utilizados são o metanol, o etanol, o acetato de etila, a acetona e a água, sendo combinados em diferentes proporções para atingir as melhores condições de extração. A temperatura aumenta a eficiência de extração dos compostos fenólicos, especialmente quando combinada a tempos maiores de agitação (TEIXEIRA et al., 2014). O solvente mais utilizado para a extração de compostos fenólicos de bagaço de uvas proveniente do processo de vinificação é solução hidroalcoólica a 50% (v/v), utilizando agitação com rotor de pás ou agitação magnética, variando as condições de agitação, temperatura e tempo de extração (BONFIGLI et al., 2017; ANTONIOLLI et al., 2015; AMENDOLA; FAVERI; SPIGNO, 2010; ROCKENBACH et al., 2008).

As micro-ondas oscilam em frequências entre 0,3 e 300 GHz, aumentando as taxas de remoção dos compostos fenólicos por provocarem o aquecimento dos solventes polares. Possuem a vantagem de reduzir o tempo de extração, com eficiência superior aos métodos convencionais, utilizando solventes menos tóxicos como água e etanol (TEIXEIRA et al., 2014; ÁLVAREZ et al., 2017; DROSOU et al., 2015; GHASSEMPOUR et al., 2008).

O ultrassom é caracterizado pela presença de ondas com frequências entre 18 e 40 kHz, cuja alta energia rompe as paredes celulares do bagaço da uva, incrementando a transferência de massa pela maior facilidade de acesso dos solventes. Além disso, a redução do tamanho de partícula proporciona uma maior superfície de contato entre solutos e solventes. Diversos autores citam o aumento da eficiência da extração de compostos fenólicos, combinada à redução do tempo de processamento, utilizando reatores acoplados com sondas de ultrassom (BONFIGLI et al., 2017; GOULA; THYMIATIS; KADERIDES, 2016; DROSOU et al., 2015; MELO et al., 2015; CARRERA et al., 2012).

A extração com fluidos supercríticos baseia-se nas propriedades únicas de determinados gases, em condições específicas de temperatura e pressão. O fluido mais utilizado é o dióxido de carbono (CO₂), pelo fato de possuir temperatura e pressão críticas moderadas (31,3 °C e 72,9 atm, respectivamente), além do fato de ser facilmente retirado do extrato (ANDREO; JORGE, 2006). O CO₂ no estado supercrítico apresenta baixa viscosidade e elevada difusividade, fazendo com que em apenas alguns minutos seja extraída a mesma quantidade de compostos fenólicos em relação a uma extração convencional, que exigiria horas ou até mesmo dias para a execução. Devido à sua elevada eficiência e produção de extratos de elevada pureza, é um método com grande potencial para a extração de compostos fenólicos (ANDREO; JORGE, 2006; OTERO-PAREJA et al., 2015).

A extração assistida por PEF consiste na aplicação de pulsos elétricos de alta intensidade por microssegundos, causando a ruptura das membranas celulares. Assim como o ultrassom, promove uma rápida e eficiente extração dos compostos fenólicos, porém com a vantagem de não causar o aumento da temperatura do sistema (BOUSSETTA et al., 2011; CORRALES et al., 2008).

Uma extração eficiente deve remover a maior quantidade possível de compostos, com o menor volume de solventes. Porém, para ser considerada ambientalmente correta, o objetivo principal deve ser a utilização de solventes menos poluentes, o baixo consumo energético e a geração reduzida de subprodutos (GOULA; THYMIATIS; KADERIDES, 2016). Dessa forma, a escolha do método de extração deve ponderar diversos fatores, a fim de encontrar um equilíbrio entre todas as características desejadas do processo. Além disso, o extrato influenciará nas propriedades que o nanomaterial apresentará após a síntese, determinando sua aplicação na área da Nanotecnologia.

2.3 NANOTECNOLOGIA

A Nanotecnologia engloba as atividades tecnológicas relacionadas à manipulação, à caracterização e à aplicação de materiais com escala nanométrica, ou seja, na faixa de 10^{-9} m (MARCONE, 2015). Seu primeiro relato data de 1959, no qual Richard P. Feynman afirmou que “existe muito espaço lá embaixo”, se referindo ao fato de que ainda existia muito a ser estudado além do universo observável (KHAN; SAEED; KHAN, 2017).

As nanopartículas podem ser naturais ou sintéticas. Elas são naturalmente geradas por meio do intemperismo, de erupções vulcânicas, de incêndios e de processos microbiológicos, tendo como principais representantes os hidróxidos de ferro, aluminossilicatos e metais (HEILIGTAG; NIEDERBERGER, 2013). Atualmente, entretanto, o foco das

pesquisas está centrado nas nanopartículas sintetizadas em laboratório, tais como as nanopartículas metálicas, cerâmicas, semicondutoras, poliméricas, de carbono (como fulerenos e nanotubos) e de base lipídica (KHAN; SAEED; KHAN, 2017).

As pesquisas na área da Nanotecnologia exploram as propriedades singulares que os materiais apresentam nessa escala, diferenciando-se pelas características físico-químicas, como ótica, eletrônica e magnética (SOCAS-RODRÍGUEZ et al., 2017), além das propriedades mecânicas, térmicas, catalíticas e de absorção (VIJAYARAGHAVAN; ASHOKKUMAR, 2017).

No Brasil, as pesquisas em Nanotecnologia foram incentivadas pela criação dos projetos Nanobiotec, Nanomat, Renami e Nanosemimat pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) no ano 2000 (MARCONE, 2015). Desde então, outras iniciativas públicas e privadas têm fortalecido as pesquisas nacionais em Nanotecnologia.

2.4 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

As nanopartículas metálicas têm despertado a atenção de vários pesquisadores, devido às suas propriedades elétricas, magnéticas e ópticas singulares, decorrentes do fenômeno de ressonância plasmônica de superfície (BARBOSA, 2018). Essas características estão relacionadas ao tamanho, ao formato, à concentração e ao estado de agregação das partículas, sendo ajustadas através dos parâmetros de síntese (KHAN; SAEED; KHAN, 2017). As propriedades existem por conta de dois fatores fundamentais que estão presentes nas nanopartículas metálicas: a grande razão superfície/volume, e o confinamento quântico (CAVALCANTE, 2014). A primeira se refere à combinação do baixo volume com a elevada área superficial presente nas nanopartículas, que proporciona uma elevada área de contato

aliada a uma quantidade mássica reduzida. Já a segunda, ocorre por conta dos fenômenos quânticos associados aos materiais quando se encontram em escala nanométrica (MANSUR, 2010).

As aplicações das nanopartículas metálicas incluem sistemas de diagnósticos na Medicina (biossensores), na indústria alimentícia (conservantes naturais e embalagens protetoras), na indústria têxtil (tecidos antimicrobianos), em aplicações de energia (painéis solares), na indústria farmacêutica (sistemas de liberação controlada de fármacos) (ALBERNAZ, 2014), além do uso direto pela sua atividade antimicrobiana, antifúngica, antiplasmodial, anti-inflamatória, anticâncer, antiviral, antidiabética e antioxidante (KUPPUSAMY et al., 2016).

2.4.1 Ressonância plasmônica de superfície

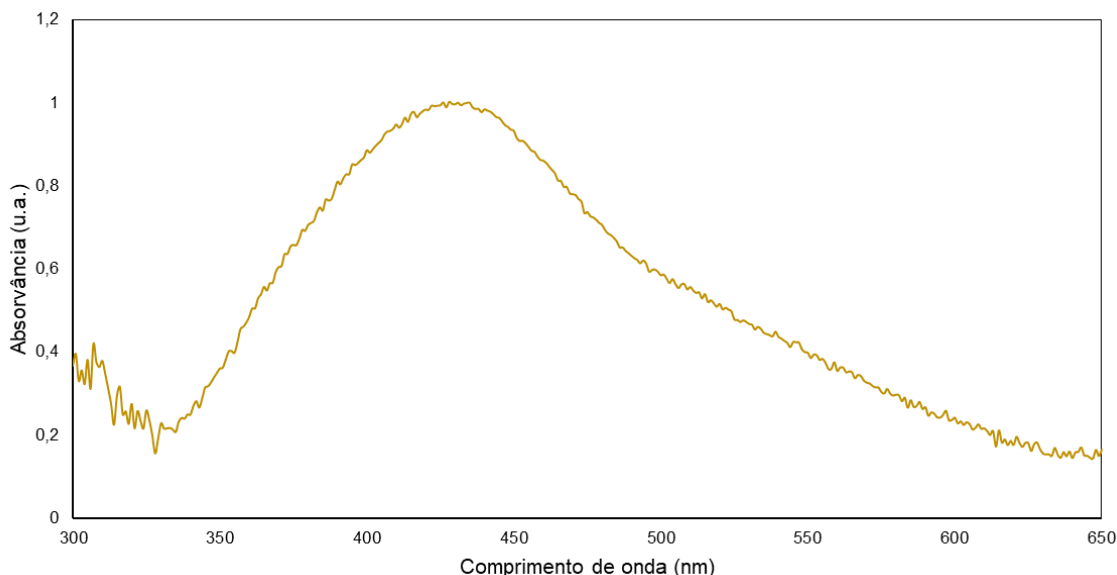
As nanopartículas metálicas usualmente são encontradas na forma de soluções coloidais, apresentando fenômenos de superfície característicos, como a ressonância plasmônica de superfície (SPR, do inglês *surface plasmon resonance*).

A SPR é um fenômeno associado à absorção nas regiões do ultravioleta e visível do espectro eletromagnético, que ocorre pela oscilação coletiva de elétrons de superfície do metal em fase com a radiação eletromagnética incidente. A interação varia com o metal analisado, o solvente do meio, o tamanho e a distribuição das partículas (BARBOSA, 2018).

A condição para que os materiais apresentem SPR é a presença de elétrons livres para a condução. Desta forma, diversos metais apresentam essa característica; entretanto, o ouro, a prata, a platina e o cobre se destacam por exibirem uma banda de SPR intensa, sendo os compostos alvo da maior parte dos estudos dessa área da Nanotecnologia (CAVALCANTE, 2014). As AgNPs esféricas, por exemplo, apresentam um comprimento de onda de máxima

absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) entre 420 e 460 nm (**Figura 6**), dependendo da morfologia apresentada pelas nanopartículas.

Figura 6 – Espectro UV-Vis característico de AgNPs esféricas.



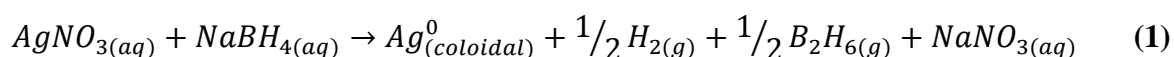
Fonte: a própria autora (2018).

2.4.2 Síntese química, biológica e verde das nanopartículas metálicas

A síntese de nanopartículas metálicas pode ser realizada pelas abordagens “*bottom-up*” e “*top-down*”. A primeira se refere à agregação átomo por átomo, no qual as dimensões da partícula aumentam gradualmente, proporcionando as características de uniformidade combinada ao menor número de defeitos. Essa técnica, também chamada de “abordagem construtiva”, é a mais utilizada quando se faz necessário um material de alta homogeneidade (KHAN; SAEED; KHAN, 2017). Já a segunda é uma abordagem “destrutiva” que ocorre pela redução de grandes porções de matéria em pequenas partículas, utilizando diversas técnicas, como moagem, pulverização, *laser*, e eletro-explosão (BARBOSA, 2018; KHAN; SAEED; KHAN, 2017).

As rotas mais utilizadas para a síntese de nanopartículas metálicas, empregando a abordagem “*bottom-up*”, são as vias química, biológica e a síntese verde (BARBOSA, 2018).

A via química é a mais utilizada atualmente, sendo inclusive aplicada aos métodos industriais de produção de nanopartículas por conta de sua simplicidade, reprodutibilidade, baixo custo e alto rendimento (BANACH; PULIT-PROCIAK, 2016). O processo tem base na redução de íons metálicos ao estado de oxidação zero, utilizando um precursor metálico e agentes redutores, além de surfactantes para interromper a reação e estabilizar as nanopartículas em suspensão coloidal (PRADO, 2014). A síntese das AgNPs, por exemplo, utiliza o sal de nitrato de prata, o agente redutor boroidreto de sódio e o agente estabilizante PVP (**Equação 1**) (MAVANI, SHAH, 2013). Embora os produtos da reação sejam inócuos (o diborano, C₆H₆, é rapidamente decomposto em ácido bórico), é comum que o excesso de reagentes permaneçam no meio reacional, compostos estes que são considerados tóxicos, irritantes e perigosos (BANACH; PULIT-PROCIAK, 2016), limitando a sua aplicação nas áreas farmacêuticas e clínicas (ALBERNAZ, 2014).



A síntese biológica utiliza fungos, leveduras, bactérias, enzimas e algas para formar as nanopartículas em meio extra ou intracelular (BANACH; PULIT-PROCIAK, 2016). A quinona extracelular e a enzima redutase presentes nos organismos são os possíveis responsáveis pela síntese, ou seja, apenas os micro-organismos que possuem essas substâncias são capazes de sintetizar as nanopartículas (PRADO, 2014). O processo é vantajoso por consumir baixa quantidade de energia e reagentes, além de ser ambientalmente correto (KUPPUSAMY et al., 2016). Nessa abordagem, a adição de agentes estabilizantes não é

necessária, visto que as proteínas produzidas pelo micro-organismo atuam na manutenção da suspensão na forma coloidal (PRADO, 2014).

Diversos pesquisadores têm voltado a sua atenção para a síntese verde em função da facilidade e da versatilidade, utilizando os mais diversos extratos vegetais como fonte de compostos redutores. Podem ser utilizados desde raízes até folhas, mesmo após processamento industrial (BARBOSA, 2018). O único pré-requisito é a presença de compostos com atividade redutora, tais como flavonoides, terpenoides, taninos, compostos fenólicos, antocianinas e ácidos orgânicos (ALBERNAZ, 2014). Devido à composição única de cada extrato, é possível variar as condições de síntese para ajustar o processo de formação das partículas, visando à obtenção de diferentes características das nanopartículas.

2.4.1 Processo de formação de nanopartículas

O processo de formação de nanopartículas pelo método “*bottom-up*” (**Figura 7**) ocorre em três fases principais: a nucleação, o crescimento e a estabilização.

Figura 7 – Fases do processo de formação de nanopartículas.



Fonte: adaptado de Thanh, Maclean e Mahiddine (2014).

A nucleação ocorre pela aglomeração oligomérica de partículas metálicas recém-formadas, constituindo um núcleo organizado de forma definida e periódica (EL-NOUR et al., 2010). Simultaneamente, ocorre o seu crescimento pela deposição de mais partículas

sobre os núcleos já existentes, até o momento que ocorre a sua estabilização (CRUZ, 2010). A elevada relação entre a área e o volume é responsável pela estabilidade das nanopartículas (CAMARGO et al., 2015).

Com o objetivo de impedir a agregação das nanopartículas e garantir a estabilidade, utilizam-se duas abordagens de estabilização: a eletrostática e a estérica. A primeira se baseia na repulsão elétrica causada por cargas de mesmo sinal que circundam as partículas, enquanto a segunda consiste no uso de moléculas aderidas à superfície para impedir a agregação com nanopartículas vizinhas (CAMARGO et al., 2015).

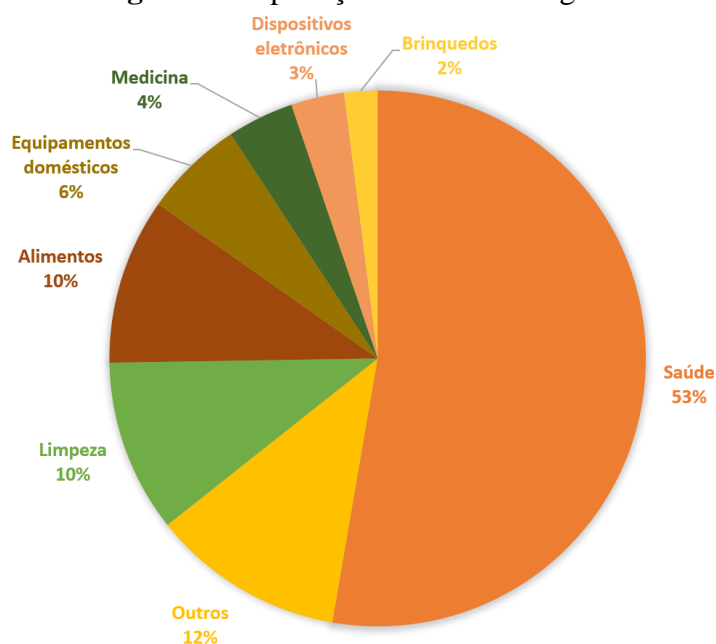
Os extratos de origem vegetal são uma opção interessante para a síntese de nanopartículas metálicas, pois desempenham a função de agentes redutores e estabilizantes, além de apresentarem a vantagem de proporcionarem uma síntese nos moldes da Química Verde.

2.5 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Dentro do universo das nanopartículas metálicas, as AgNPs têm sido objeto de intensa pesquisa devido às suas características particulares, como o alto potencial bactericida (KUMAR et al., 2017), elevada atividade fotoelétrica e catalítica, alta condutividade elétrica e poder de redução superior (PING et al., 2018). De acordo com Banach e Pulit-Prociak (2016), cerca de 53% das aplicações são voltadas para a saúde (**Figura 8**), como no tratamento de câncer e de diabetes, na cicatrização de feridas e úlceras, na liberação controlada de drogas e na odontologia (VIJAYARAGHAVAN; ASHOKKUMAR, 2017). A fácil incorporação em polímeros permite o uso em tecidos, tintas e até mesmo produtos hospitalares, como em cateteres (BANACH e PULIT-PROCIAK, 2016).

As AgNPs podem ser utilizadas também na área ambiental, como no tratamento de efluentes, através de sua incorporação em lodos ativados (SHENG et al., 2018). Já na agricultura, estudos apontam que a aplicação de soluções de AgNPs resulta no crescimento mais rápido de diversas espécies vegetais, como nas culturas de algumas frutas e cereais. Além disso, no caso do cultivo de tubérculos, as AgNPs inibem o desenvolvimento de doenças e promovem o crescimento acentuado das raízes (BANACH e PULIT-PROCIAK, 2016).

Figura 8 – Aplicações usuais das AgNPs.



Fonte: adaptado de Banach e Pulit-Prociak (2016).

Na área alimentícia, as AgNPs podem ser incorporadas em filtros para a desinfecção do ar utilizado no processo de embalagem de alimentos (BANACH e PULIT-PROCIAK, 2016), além de serem constituintes dos invólucros de produtos, garantindo a sua preservação por mais tempo (VIJAYARAGHAVAN; ASHOKKUMAR, 2017).

A elevada relação entre área superficial e volume torna as AgNPs atrativas em aplicações catalíticas, especialmente na redução de corantes orgânicos, como metilorange, azul de metileno e eosina Y (VIJAYARAGHAVAN; ASHOKKUMAR, 2017). Ping et al. (2017)

utilizaram AgNPs sintetizadas com um extrato de sementes de uva na remoção catalítica do corante *Direct Orange 26*, na presença de NaBH₄. Em apenas 18 min de reação, as nanopartículas foram capazes de eliminar totalmente o corante, que inicialmente estava na concentração de 50 mg L⁻¹.

Socas-rodríguez et al. (2017) fizeram um levantamento das aplicações das AgNPs na área da segurança alimentar no período de 2013 a 2017, abrangendo os estudos para a detecção de pesticidas, micotoxinas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, bifenilpoliclorados e fármacos. Nesses casos, as nanopartículas são utilizadas como sensores eletroquímicos e óticos ou como sorventes de alta especificidade para os analitos citados.

A possibilidade de realizar a síntese de acordo os preceitos da Química Verde as tornam ainda mais atrativas, ampliando as possibilidades de aplicação.

2.5.1 Síntese verde de AgNPs

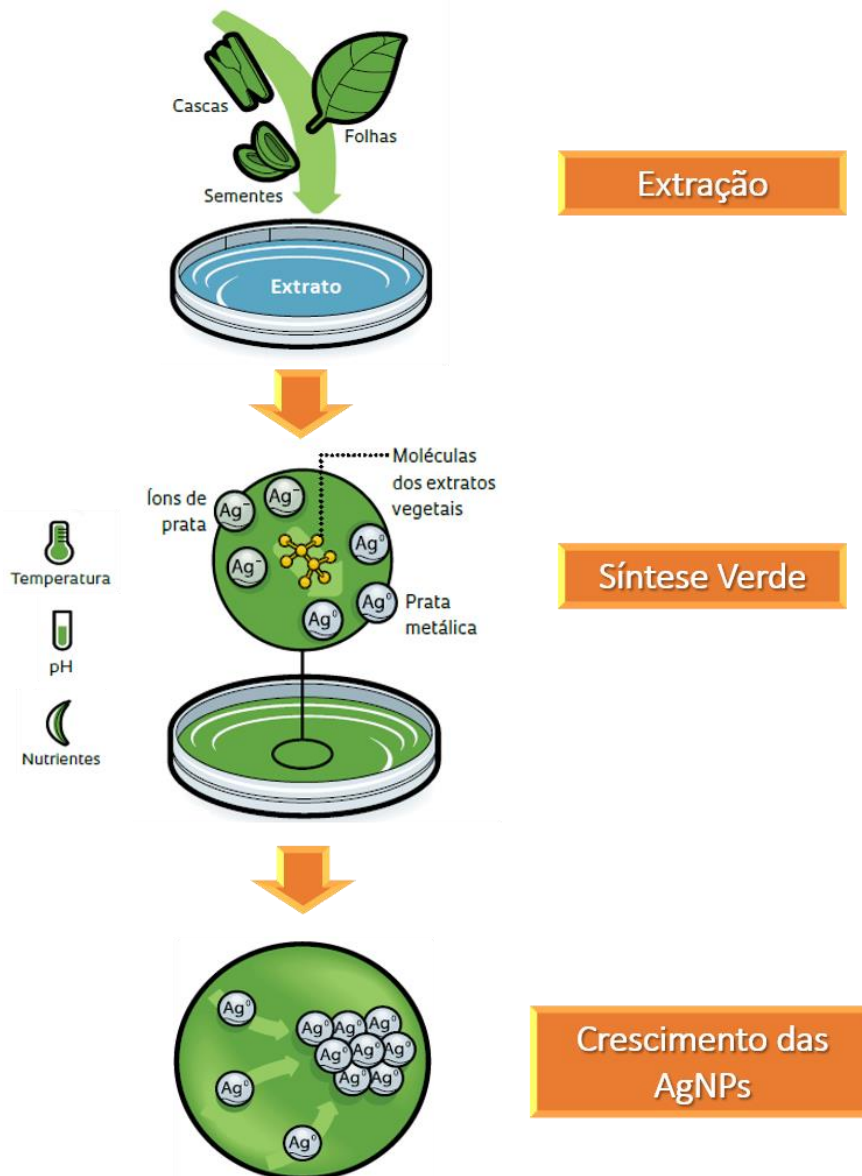
A síntese de AgNPs, empregando extratos vegetais como agentes redutores e estabilizantes, é um dos métodos mais estudados atualmente para a produção dessas nanopartículas (PING et al., 2018). Várias pesquisas já foram realizadas, utilizando os mais diversos tipos de extratos, tais como os de physalis (*Physalis angulata*) (KUMAR et al., 2017), sementes de uva (PING et al., 2018), folhas de feno-grego (*Trigonella foenum-graecum*) (SENTHIL et al., 2017), algas (*Parachlorella kessleri*) (VELGOSOVÁ; MRAŽÍKOVÁ; MARCINČÁKOVÁ, 2016), camomila (*Matricaria recutita*) (PARLINSKA-WOJTAN et al., 2016), erva-mate (*Ilex paraguariensis*) (MELO, 2015), amoreira-do-campo (*Brosimum gaudichaudii*) (ALBERNAZ, 2014) e mangaba (*Hancornia speciosa*) (SILVA, 2014).

A síntese verde das AgNPs (**Figura 9**) consiste na redução de íons Ag⁺ para Ag⁰, utilizando os compostos bioativos previamente extraídos dos vegetais. Após a nucleação, ocorre

o crescimento das nanopartículas, que são posteriormente estabilizadas por substâncias presentes no próprio extrato (ERENO, 2014). A solução contendo as nanopartículas pode ser então utilizada nas mais diversas aplicações.

A utilização do bagaço de uva como fonte de compostos bioativos para a síntese de AgNPs em meio aquoso pode ser uma alternativa viável, de modo a agregar valor ao resíduo e impulsionar a sua reutilização.

Figura 9 – Ilustração simplificada do processo de síntese verde das AgNPs mediada por extratos vegetais.

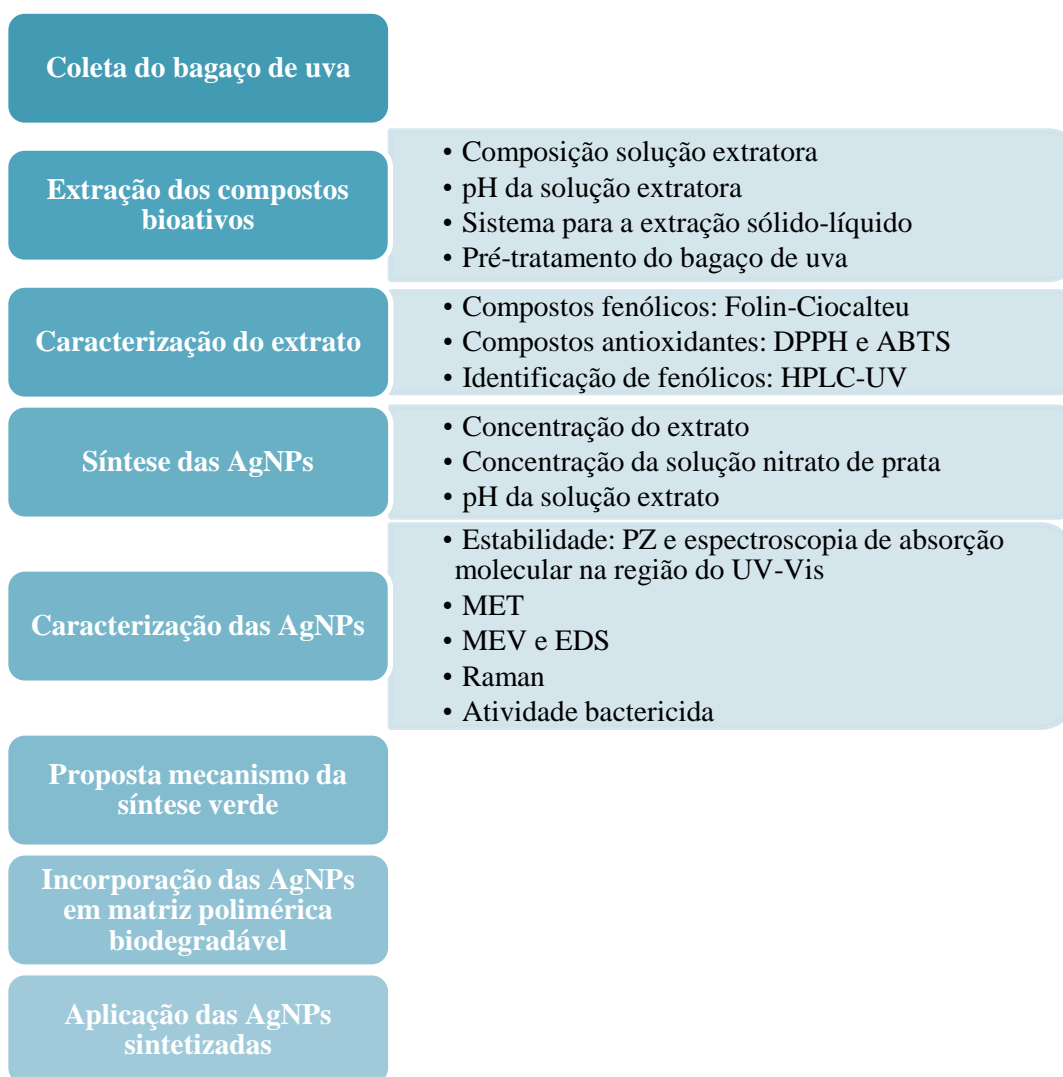


Fonte: adaptado de Ereno (2014).

3 METODOLOGIA

A metodologia utilizada para o desenvolvimento desse trabalho encontra-se no fluxograma da **Figura 10**, onde estão especificadas as atividades de cada uma das etapas, e que serão detalhadas posteriormente.

Figura 10 – Fluxograma da metodologia utilizada no desenvolvimento desse trabalho.



Fonte: a própria autora (2018).

3.1 MATERIAIS

O nitrato de prata (AgNO_3) ($\geq 99,0\%$), o glutaraldeído (50% v/v em água), o ácido acético grau PA, o ácido clorídrico 37% grau PA e o hidróxido de sódio PA em lentilhas foram obtidos da Merck. O etanol 95% e a quitosana de alta massa molar, por sua vez, foram adquiridos da Vetec Química Fina Ltda e da Sigma Aldrich, respectivamente. As soluções de AgNO_3 , as soluções extratoras, e demais soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura tipo I (resistividade mínima de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$), obtida a partir de um equipamento Millipore, modelo Direct-Q 3 UV.

O bagaço de *Vitis labrusca* (cultivar *Ives*) (**Figura 11**) foi coletado no dia 13 de fevereiro de 2017 na Vinícola Waldemar Milani Ltda, localizada no município de Caxias do Sul, RS. O material foi acondicionado em sacos plásticos, em alíquotas de aproximadamente 200 g, sendo que em 1,0 kg foi realizada a separação manual das sementes. Os sacos plásticos, contendo o bagaço, foram então armazenados em um freezer a -20°C até o momento das análises.

Figura 11 – Bagaço de *Vitis labrusca* (cultivar *Ives*).



Fonte: a própria autora (2018).

O efluente industrial foi coletado no dia 5 de maio de 2018 na estação de tratamento de efluentes de uma empresa fabricante de artigos de cutelaria em aço inoxidável, localizada no município de Farroupilha, RS. O efluente foi acondicionado em uma bombona plástica com capacidade de 5,0 L, previamente lavada com Extran neutro 20% e diversos enxagues com água ultrapura tipo I.

3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO DO BAGAÇO DE *Vitis labrusca* (CULTIVAR *Ives*)

A extração dos componentes bioativos do bagaço de uva foi realizada com uma solução hidroalcoólica, no qual avaliou-se a influência do processo físico de extração sólido-líquido, bem como a concentração de etanol e o pH da solução extratora, além do pré-tratamento do bagaço. Após a extração, a mistura foi centrifugada em uma centrífuga modelo NT820 marca Novatecnica, durante 5 min a 5000 rpm. O sobrenadante foi então filtrado por gravidade em papel Whatman (GF/F, 0,7 µm), a fim de retirar qualquer material particulado remanescente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Os testes foram avaliados com base na determinação de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu, utilizando o teor de fenólicos como critério de seleção para a definição do sistema de extração.

3.2.1 Avaliação da concentração de etanol na solução extratora

A influência da concentração de etanol na solução extratora foi avaliada nas proporções de 50, 30 e 20% (v/v), utilizando a extração por agitação manual. Foram pesados 5,0 g de bagaço sem pré-tratamento em um tubo Falcon de 50 mL, e após a adição de 25,0 mL da solução extratora, o frasco foi vigorosamente agitado por 2 min.

3.2.2 Avaliação do processo físico de extração

A avaliação do melhor processo físico de extração foi realizada de diferentes formas, na qual foram utilizadas: **(a)** extração assistida por sonda de ultrassom (Sonics, modelo Vibra-cell VCX500), com uma amplitude de 30%, potência de 500 W, frequência de 20 kHz (10 min em modo intermitente), em banho de gelo para evitar o aumento da temperatura, e com agitação magnética para garantir a homogeneidade do sistema (BURIN et al., 2014); **(b)** agitação magnética simples (30 min, 200 rpm, equipamento Ika, modelo HS 7); **(c)** agitação manual (vigorosa, durante 2 min) e **(d)** agitação com misturador tipo hélice (5 min, 300 rpm, equipamento Fisatom, modelo 713D).

Para a realização dessa etapa, utilizou-se a solução hidroalcoólica a 50% (v/v), mantendo-se a proporção de uma parte de bagaço sem pré-tratamento para cinco partes de solução extratora (1:5, m/v).

3.2.3 Avaliação do pré-tratamento do bagaço de *Vitis labrusca* (cultivar *Ives*)

O pré-tratamento do bagaço de uva também foi avaliado, comparando-se a quantidade de fenólicos totais extraída da “massa úmida”, do bagaço bruto com sementes, e do bagaço bruto sem sementes. Para isso, foi utilizada uma solução hidroalcoólica a 50% (v/v), e agitação manual vigorosa por um período de 2 min. A “massa úmida” foi obtida pela trituração do bagaço de uvas sem sementes com água, na proporção de 2:5.

3.2.4 Avaliação do pH da solução extratora

O pH da solução extratora foi igualmente avaliado, variando-se o intervalo de 2,5 ao 12,0. O ajuste de pH da solução extratora foi realizado com a adição de soluções aquosas de

HCl 1,0 mol L⁻¹ e NaOH 1,0 mol L⁻¹. As extrações foram realizadas com a solução hidroalcoólica a 50% (v/v), utilizando agitação manual vigorosa por um período de 2 min.

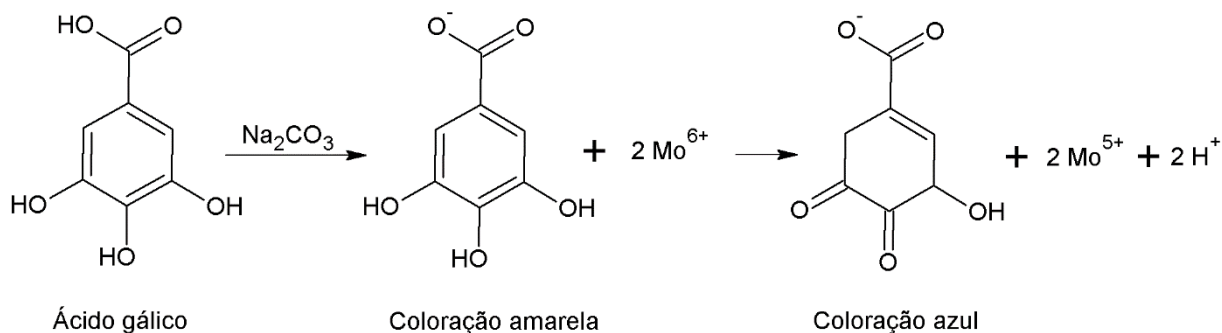
3.3 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO

O extrato obtido na Seção 3.2 e que apresentou o melhor desempenho foi avaliado em função da concentração de compostos fenólicos e pelo ensaio de atividade antioxidante total. Para os ensaios de Folin-Ciocalteu, DPPH e ABTS, foi utilizado um espectrofotômetro Thermo Scientific, modelo Evolution 60, e para a análise cromatográfica um cromatógrafo líquido marca HP Agilent, modelo 1100.

3.3.1 Quantificação de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu

A curva de calibração com ácido gálico foi construída no intervalo de concentração de 1,5 a 100,0 µg mL⁻¹, e as amostras foram diluídas em água ultrapura do tipo I na proporção de 1:50 para a realização do ensaio. Aliquotaram-se 150,0 µL de amostra ou padrão em um tubo de 2,0 mL, e adicionaram-se 750,0 µL do reagente de Folin-Ciocalteu 10% (v/v) e 600,0 µL de carbonato de sódio 7,5% (m/v) (MOURA et al., 2011). Os tubos de ensaio foram aquecidos a 55 °C por 5 min em estufa, e na sequência as amostras foram lidas em um espectrofotômetro a 760 nm, visto que os complexos de molibdênio e tungstênio absorvem luz visível nesse comprimento de onda (ROESLER et al., 2007). A reação de um composto fenólico com o íon Mo⁶⁺ é mostrada na **Figura 12**.

Figura 12 – Reação de um composto fenólico (nesse caso, ácido gálico) com o íon Mo^{6+} .



Fonte: adaptado de Pereira (2012).

Foi realizado o ajuste linear com as absorvâncias dos níveis da curva de calibração ($R^2 \geq 0,9900$), obtendo-se uma equação linear para que os fenólicos totais pudessem ser quantificados.

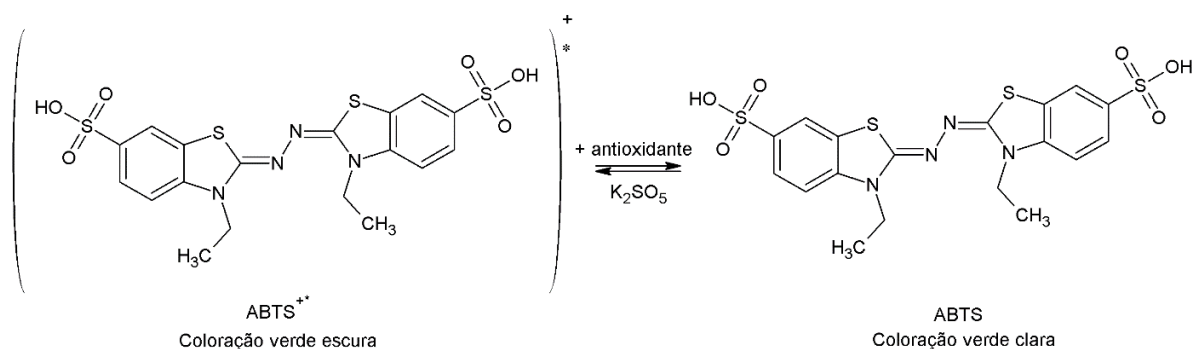
3.3.2 Atividade antioxidante total pelos radicais ABTS e DPPH

A atividade antioxidante total do extrato foi avaliada pela varredura dos radicais DPPH (RUFINO et al., 2007a) e ABTS (RUFINO et al., 2007b) pelos compostos redutores do extrato, através de ensaio espectrofotométrico.

A determinação da concentração que inibe 50% dos radicais (IC_{50}) foi realizada com sucessivas diluições do extrato de bagaço de uva, iniciando em $200,0 \text{ mg mL}^{-1}$ (extrato puro) até $20,0 \text{ mg mL}^{-1}$.

O ensaio do radical ABTS foi realizado, adicionaram-se $30,0 \mu\text{L}$ da amostra em $3,0 \text{ mL}$ da solução do radical ABTS ($7,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em água ultrapura tipo I, previamente corrigida à absorvância de 0,700). Após 6 min de reação ao abrigo da luz (**Figura 13**), as amostras foram lidas em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 734 nm .

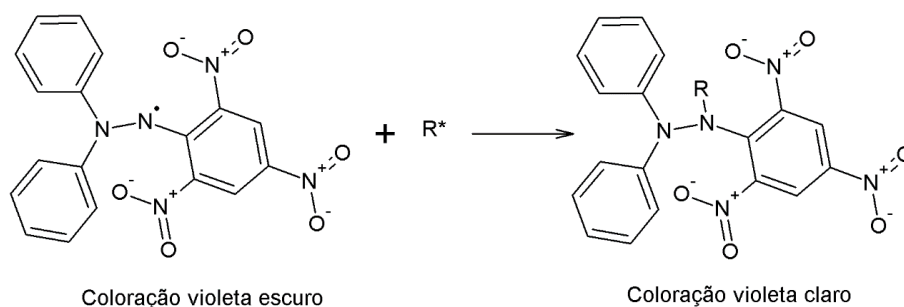
Figura 13 – Reação entre o ABTS e um composto antioxidante.



Fonte: adaptado de Rufino et al., 2007b.

O ensaio do radical DPPH foi realizado adicionando-se inicialmente 100,0 μL de amostra a 400,0 μL de tampão Tris-HCl (100,0 mmol L^{-1} , pH 7,0), e na sequência 500,0 μL da solução de DPPH (500,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em etanol). Após 20 min de reação (**Figura 14**) ao abrigo da luz, as amostras foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm.

Figura 14 – Reação entre o DPPH e um composto antioxidante (R^*).



Fonte: adaptado de Santos et al., 2011.

Com os dados de absorvância das diluições do extrato foram realizados os ajustes lineares ($R^2 \geq 0,9900$), e obtida a concentração do extrato que varre 50% do radical.

3.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (CLAE-UV)

As amostras foram previamente filtradas em membranas de *nylon* de 0,45 μm de diâmetro de poro. O extrato foi então avaliado quanto aos compostos fenólicos por CLAE com detecção por UV. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna Lichrospher RP18

(5,0 μm , Merck). A análise em fase reversa foi constituída de: solvente A – água ultrapura tipo I com 1% (v/v) de ácido fosfórico, e solvente B – acetonitrila. O sistema de bombeamento da fase móvel foi em modo gradiente, com 90% do solvente A de 0 a 5 min, 60% de A de 5 a 40 min e 90% de A de 45 a 50 min, sob fluxo de 0,5 mL min^{-1} . A detecção ocorreu com um detector UV no comprimento de onda de 210 nm (AGOSTINI et al., 2017).

Os compostos fenólicos foram identificados por comparação de seu tempo de retenção com aqueles de seus padrões puros. A quantificação foi realizada pelo método de padronização externa, através da correlação da área do pico do composto à curva padrão, realizada com cada padrão avaliado: ácido gálico, catequina, epicatequina, epigallocatequina, epigallocatequina galato, rutina, ácido ferúlico, naringina, hesperidina, miricetina, resveratrol, quercetina, apigenina e vitexina.

3.4 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A síntese das AgNPs foi realizada, à temperatura ambiente, combinando-se volumes iguais da solução aquosa de AgNO_3 e do extrato de bagaço de uva. A reação é evidenciada pela alteração de cor da solução para tons de amarelo e marrom.

A influência da concentração do extrato do bagaço de uva foi avaliada nas concentrações de 200,0 mg mL^{-1} (extrato puro) a 1,0 mg mL^{-1} , através de sucessivas diluições do extrato em água ultrapura tipo I. O pH do extrato e da água utilizada foram previamente ajustados em 8,0, uma vez que nesta condição é favorecida a formação de AgNPs com uniformidade de tamanhos (VELGOSOVÁ; MRAŽÍKOVÁ; MARCINČÁKOVÁ, 2016). A concentração da solução de AgNO_3 foi mantida fixa em 1,0 mmol L^{-1} .

A concentração de AgNO₃ foi variada de 10,0 a 0,1 mmol L⁻¹, através de sucessivas diluições em água ultrapura tipo I. A concentração do extrato foi igualmente mantida fixa em 50 mg mL⁻¹, em pH 8,0.

O pH do extrato foi avaliado de 2,6 a 12,7, sendo ajustado com HCl 0,1 mol L⁻¹ e NaOH 0,1 mol L⁻¹. A concentração de extrato foi mantida fixa em 50 mg mL⁻¹ e a de AgNO₃ em 2,5 mmol L⁻¹.

As melhores condições de síntese foram definidas com base na avaliação da influência da concentração de AgNO₃, da concentração do extrato e de seu pH. As AgNPs foram analisadas por espectroscopia de absorção molecular na região do UV-Vis, no intervalo de 300 a 650 nm, com 1,0 nm de intervalo de leitura. Os resultados foram avaliados com base na relação entre a altura da banda e a largura a meio pico, de acordo com a **Equação 2** (ELIAS et al., 2014):

$$\Psi = \frac{A_{max}}{\lambda_{max} \times FWHM} \quad (2)$$

onde Ψ é o fator de resposta, A_{max} é a absorvância máxima das AgNPs, λ_{max} é o comprimento de onda de máxima absorvância e FWHM (do inglês *full width half maximum*) é a largura da banda máxima à meia altura.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

As soluções obtidas pelo sistema considerado mais eficiente na etapa de otimização da síntese das AgNPs foram caracterizadas quanto à distribuição de tamanho, formato e estado de agregação, por meio da análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET). A estabilidade das soluções de AgNPs foi igualmente avaliada por meio de ensaios de potencial

zeta (PZ) e monitoramento da banda de ressonância plasmônica por espectroscopia de absorção molecular na região do UV-Vis.

O precipitado formado nas soluções utilizadas para o estudo de estabilidade a longo prazo foi analisado por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG), juntamente com a análise química elementar por espectroscopia por dispersão de energia (EDS) e por espectroscopia Raman.

3.5.1 Microscopia eletrônica de transmissão

As imagens foram obtidas em um microscópio eletrônico de transmissão da marca JEM, modelo 1200 EXII, com tensão de trabalho de 80 kV. As AgNPs foram previamente diluídas em água destilada (1:10, v/v), e uma gota dessa nova solução foi então depositada sobre um *grid* de cobre de 400 mesh. O excesso da solução foi retirado com o auxílio de um papel filtro, e os *grids* permaneceram em um dessecador durante uma noite para a eliminação de umidade. O tamanho das AgNPs foi medido com o software ImageJ, utilizando as imagens de MET.

3.5.2 Estabilidade das soluções de AgNPs

A estabilidade das soluções contendo as AgNPs foi avaliada por meio da análise de potencial zeta (PZ), que determina a carga sobre as partículas em suspensão. O ensaio foi realizado em um equipamento da marca Stabino, modelo Particle Metrix, com tempo de leitura de 100 s por amostra, com um intervalo de medição de 5 s. O resultado obtido foi calculado pela média das leituras, e expresso em milivolts (mV).

Também foi avaliada a estabilidade da solução durante dois meses, à temperatura ambiente e sob refrigeração (entre 4,0 e 8,0 °C), ambas ao abrigo da luz, pelo monitoramento da banda plasmônica por espectrofotometria na faixa de 300 a 650 nm.

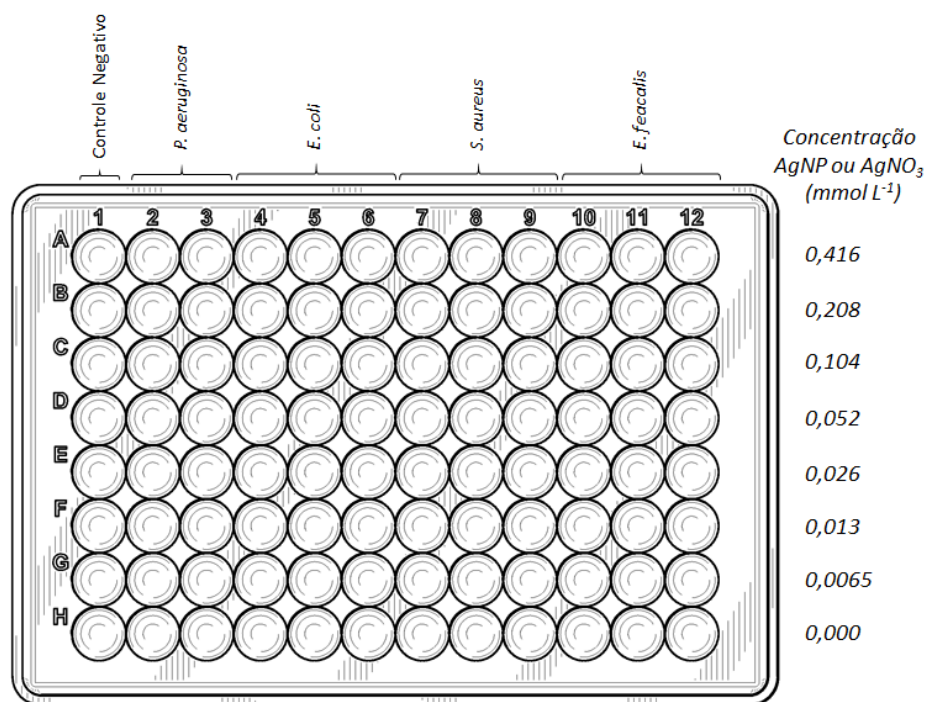
3.5.3 Determinação da concentração inibitória mínima das AgNPs

A ação bactericida das AgNPs foi realizada pelo ensaio de determinação da concentração inibitória mínima (CIM), que determina a mínima quantidade de AgNPs necessária para inibir o crescimento de bactérias.

As bactérias Gram-positivas avaliadas foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 14028) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), e as Gram-negativas foram *Escherichia coli* (ATCC25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1). As soluções de bactérias foram previamente ajustadas à concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC por mL (unidades formadoras de colônias por mililitro de solução), a partir das leituras espectrofotométricas no comprimento de onda de 620 nm, através da conversão pela escala de McFarland.

O ensaio foi realizado através de sucessivas diluições da solução das AgNPs e de AgNO_3 no meio de cultura BHI ágar (do inglês, *brain heart infusion*), variando a concentração de 0,416 a 0,0065 mmol L⁻¹ em uma placa do tipo ELISA de 96 poços (**Figura 15**). A concentração mais alta foi escolhida de modo a proporcionar uma quantidade mínima de meio de cultura às bactérias, a fim de viabilizar o seu crescimento. O controle do ensaio foi realizado pela análise de poços positivos e negativos das bactérias.

Figura 15 – Estrutura do ensaio de determinação CIM das AgNPs em uma placa de ELISA.



Fonte: a própria autora (2018).

As placas foram seladas e mantidas a 37°C sob agitação por 24 h, e posteriormente foram lidas em espectrofotômetro do tipo ELISA no comprimento de onda de 595 nm.

3.5.4 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo

A análise de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) foi realizada em um microscópio modelo MIRA3 da marca Tescan com emissão de elétrons por FEG (do inglês, *field emission gun*), apenas com o material que precipitou em pH = 12,7. O precipitado foi disposto sobre um *stub* com uma fita de carbono, e foi analisado sem a necessidade de pré-tratamento. A tensão de aceleração utilizada foi de 20,0 kV, com magnificações entre 25 e 300 mil vezes, utilizando-se o detector de elétrons secundários.

3.5.5 Espectroscopia por dispersão de energia

A análise química elementar foi realizada juntamente à análise por MEV-FEG, utilizando o mesmo equipamento e as condições de análise descritas na Seção 3.5.4. Utilizou-se o detector de espectroscopia por dispersão de energia (EDS, do inglês *energy dispersive spectroscopy*) do tipo SDD (do inglês, *silicon drift detector*), da marca Tescan.

3.5.6 Espectroscopia Raman

A análise por espectroscopia Raman foi realizada em um espectrômetro micro-Raman, marca Horiba Jobin Yvon, modelo LabRAM Evolution HR 800, utilizando o comprimento de onda de 750 nm, na faixa de 50 a 1200 cm^{-1} , com atenuação de feixe em 0,01% e utilizando uma objetiva com aumento de 100 × (MARTINA et al., 2012), apenas com o material que precipitou em pH = 12,7.

3.6 SÍNTESE DOS *PELLETS* DE QUITOSANA-*AgNPs* E TRATAMENTO TERCIÁRIO DO EFLUENTE INDUSTRIAL

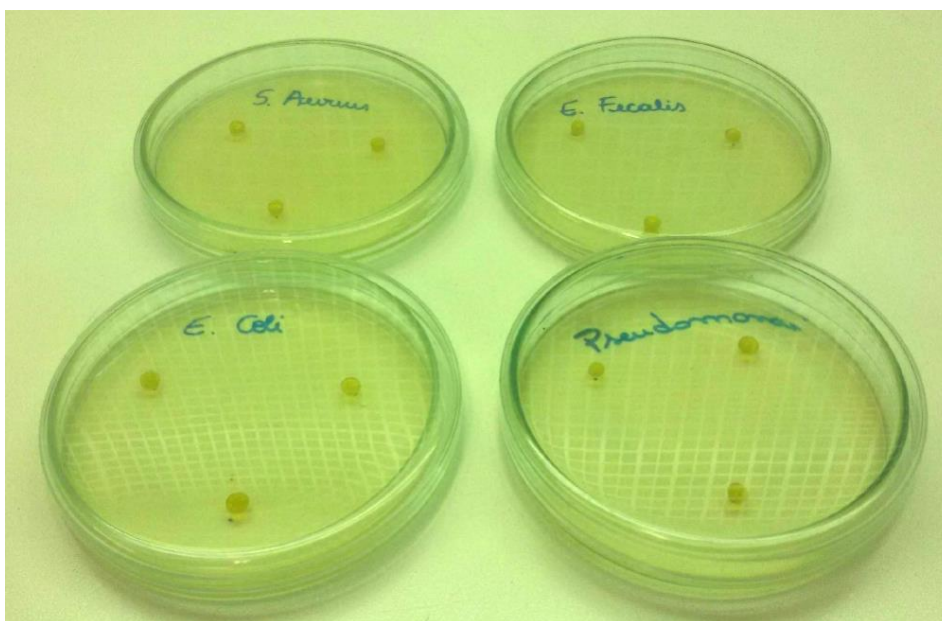
A síntese dos *pellets* de quitosana-*AgNPs* foi adaptada da metodologia proposta por Lovatel et al. (2015). No dia anterior à síntese dos *pellets*, foi realizada a dispersão da quitosana em uma solução 0,2 mol L^{-1} de ácido acético, a fim de obter uma suspensão de concentração igual a 1,5% (m/v), que permaneceu em repouso durante a noite. Para a síntese, foram misturados 2,0 mL da solução de *AgNPs* com 8,0 g da solução de quitosana, adicionando-se 90 μL de uma solução de glutaraldeído (25% v/v, em água). A mistura foi homogeneizada por cerca de 30 s, e os *pellets* precipitaram em formato esférico ao serem gotejados em uma solução

de NaOH 1,5 mol L⁻¹. Os *pellets* foram deixados nessa solução por cerca de 30 min, e depois lavados com água ultrapura tipo I.

3.6.1 Inibição do crescimento bacteriano por difusão em superfície

O teste de inibição do crescimento bacteriano por difusão em superfície foi realizado em placas de Petri com meio de cultura BHI ágar, onde foram inoculadas com um *swab* de algodão as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, e as Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (**Figura 16**). As soluções de bactérias foram previamente ajustadas à concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC por mL, através da conversão pela escala de McFarland. Após a secagem, colocou-se em cada placa três *pellets* de quitosana-AgNPs, e estas foram incubadas a 37°C por 24 h. A avaliação foi realizada com base no diâmetro do halo de inibição formado, medido por um paquímetro digital modelo PD150, marca TMX.

Figura 16 – Placas de Petri do ensaio de inibição do crescimento bacteriano.

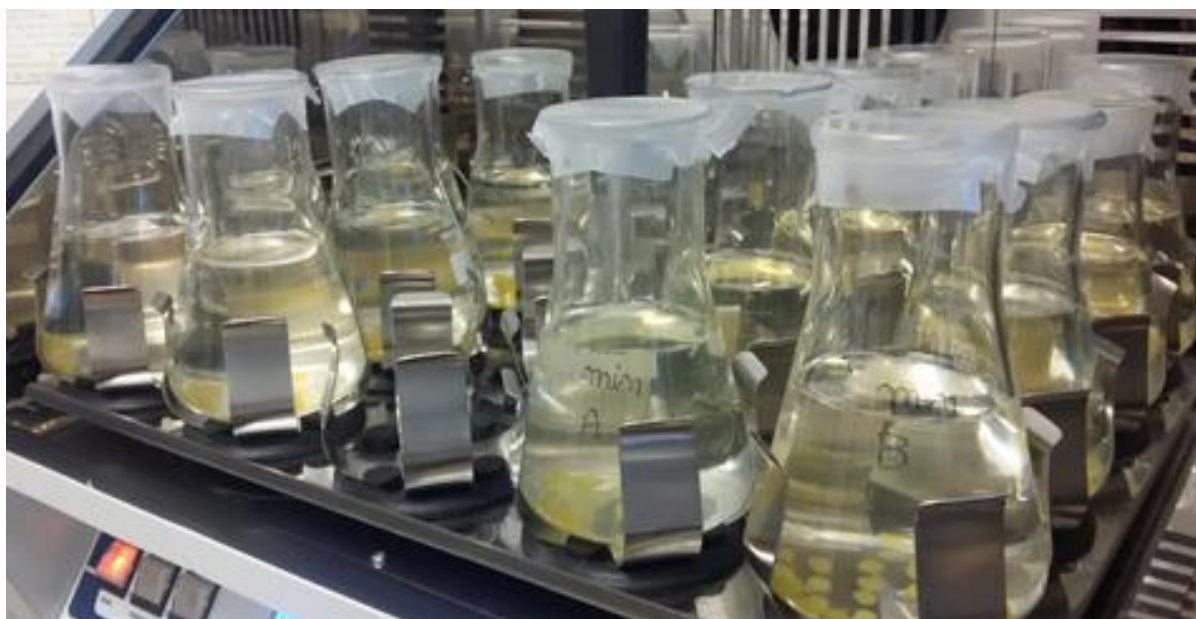


Fonte: a própria autora (2018).

3.6.2 Tratamento terciário do efluente industrial

O tratamento terciário do efluente industrial foi realizado, adicionando-se 25 *pellets* de quitosana-AgNPs em 250,0 mL da amostra (**Figura 17**), sendo o sistema homogeneizado a 150 rpm em uma incubadora *shaker*, marca Novatecnica, modelo 715D. Os tempos de agitação variaram de 30 a 120 min.

Figura 17 – Tratamento terciário do efluente industrial com os *pellets* de quitosana-AgNPs.



Fonte: a própria autora (2018).

A determinação quantitativa de coliformes totais, antes (efluente bruto) e depois do tratamento, foi realizada por meio da técnica de contagem em profundidade, utilizando placas Petrifilm da 3M.

O ensaio foi realizado segundo o método 991.14 da AOAC, 20^a edição (AOAC, 2016). Foram depositados 1,0 mL do efluente no centro da placa Petrifilm, e esta foi gentilmente agitada para que o líquido se espalhasse. As placas foram incubadas por 24 h a 35 °C, e as colônias azuis com bolhas de gás foram então contadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO DO BAGAÇO DE *Vitis labrusca* (CULTIVAR *Ives*)

A avaliação dos ensaios de extração dos compostos bioativos do extrato do bagaço de uva foi realizada por meio da quantificação de compostos fenólicos, utilizando o método de Folin-Ciocalteu. Esse método foi escolhido pois a maioria dos compostos bioativos das uvas são compostos fenólicos, como antocianinas, taninos, flavonols, estilbenos e ácidos fenólicos (RIBEIRO, 2016).

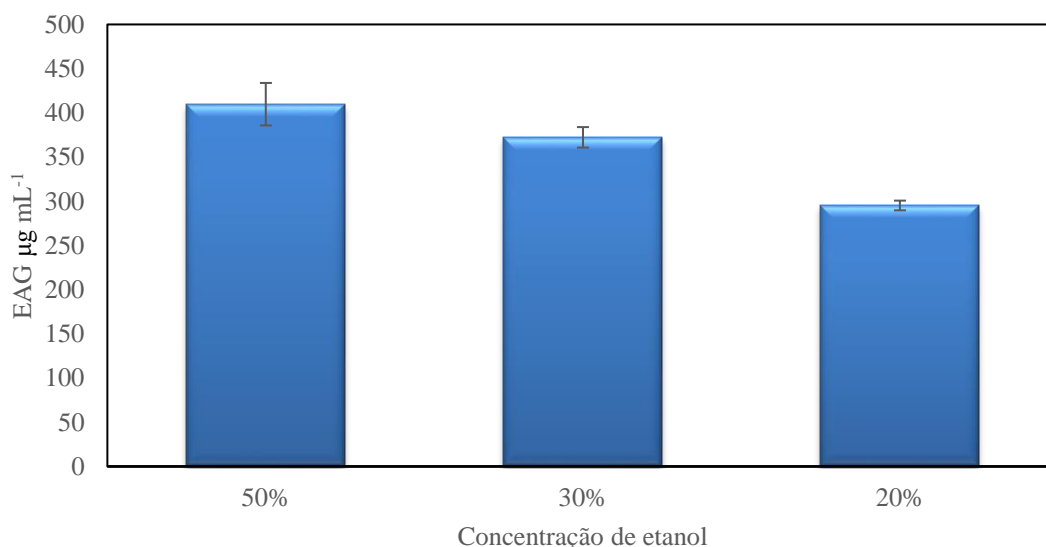
4.1.1 Avaliação da composição da solução extratora

A composição da solução extratora foi avaliada apenas para soluções hidroalcoólicas porque, dentre os solventes possíveis de serem utilizados, o etanol é considerado o menos poluente, mantendo o processo proposto no âmbito de ambientalmente correto. Além disso, diversos autores afirmam que é possível realizar a extração de compostos com atividade redutora e estabilizadora apenas com a utilização de água e etanol, evitando desta forma o uso de solventes mais tóxicos como, por exemplo, o metanol (ÁLVAREZ et al., 2017; BONFIGLI et al., 2017; GOULA, 2016).

A extração dos compostos fenólicos está diretamente relacionada à composição da solução extratora, sendo que concentrações mais altas de etanol extraíram quantidades maiores de compostos fenólicos, conforme indica a **Figura 18**.

A maior quantificação de fenólicos totais foi obtida com a solução hidroalcoólica a 50% (v/v). Isso demonstra que os compostos fenólicos presentes no bagaço de uva possuem características físico-químicas semelhantes à solução extratora com este percentual de etanol (ROCKENBACH et al., 2008).

Figura 18 – Resultados do ensaio de quantificação de compostos fenólicos para a avaliação da influência da composição da solução extratora na obtenção do extrato do bagaço de *Vitis labrusca* (cultivar *Ives*).



Fonte: a própria autora (2018).

A maior eficiência com a solução hidroalcoólica a 50% (v/v) também foi observada por Rockenbach et al. (2008), que avaliaram uvas das variedades *Vitis vinifera* (Ancelota e Tannat), por Yilmaz et al. (2006) nas variedades *Vitis vinifera* (Merlot e Chardonnay) e *Vitis rotundifolia* (Muscadínea) e por Otero-Pareja et al. (2015) em bagaços de diversas variedades.

Os autores ainda observaram que concentrações superiores de etanol (acima de 60%, v/v) reduzem a eficiência de extração. Segundo Librán et al. (2013), a adição de etanol na água reduz a constante dielétrica da solução¹, tornando possível o ajuste da polaridade, de tal modo a atingir a máxima solubilidade dos compostos bioativos do bagaço de uva. Porém, as altas concentrações de etanol diminuem demasiadamente a polaridade da solução, reduzindo a sua capacidade extratora.

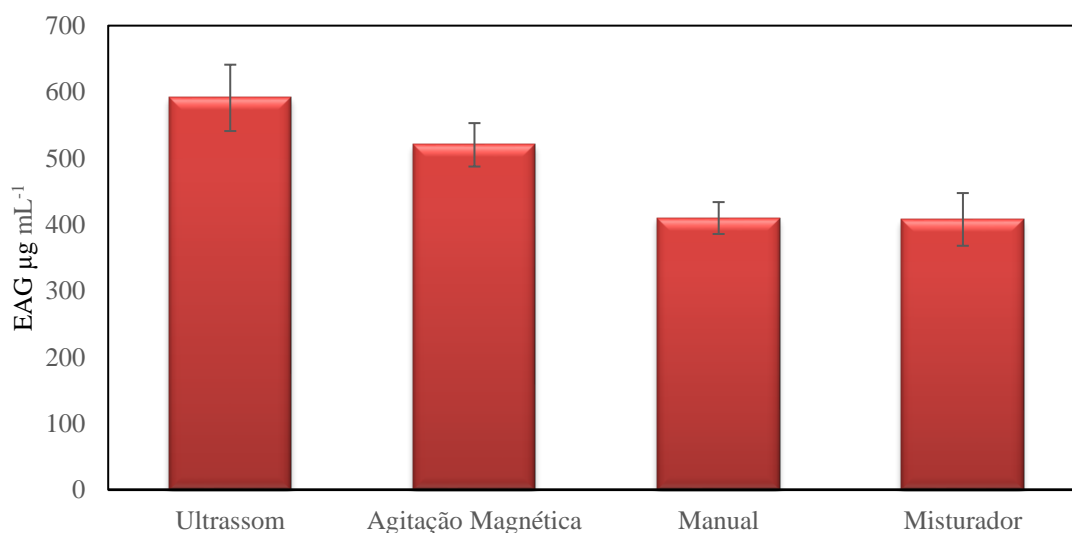
¹ Constante dielétrica (ϵ) é a capacidade do solvente de reduzir a intensidade do campo elétrico existente em torno de uma partícula carregada que esteja imersa nele, refletindo a sua capacidade de separar as cargas, isto é, de evitar a formação de pares entre íons de cargas opostas. A redução da constante dielétrica leva a uma maior atração eletrostática entre íons de carga oposta e, portanto, à formação mais efetiva de pares iônicos. Desta forma, combinando-se solventes de diferentes constantes dielétricas, é possível ajustar a polaridade de uma mistura (NETZ, ORTEGA, 2014).

Desta forma, os ensaios subsequentes foram realizados utilizando a solução hidroalcoólica a 50% (v/v) como solução extratora.

4.1.2 Avaliação do sistema de agitação da extração sólido-líquido

A extração assistida por ultrassom apresentou os melhores resultados, em termos de fenólicos totais, conforme pode ser observado na **Figura 19**.

Figura 19 – Resultados do ensaio de quantificação de compostos fenólicos para a avaliação da influência do sistema de agitação para a extração sólido-líquido.



Fonte: a própria autora (2018).

As ondas de ultrassom promovem a cavitação do fluido através de variações localizadas de pressão, rompendo as estruturas do bagaço e possibilitando uma maior transferência dos compostos fenólicos para a solução hidroalcoólica (BURIN et al., 2014).

Nos demais sistemas, a mistura é agitada vigorosamente, fazendo com que ocorra uma maior exposição do extrato com o ar e a luz, que podem causar a oxidação parcial dos compostos fenólicos, o que justificaria a sua menor concentração (ANDREO; JORGE, 2006).

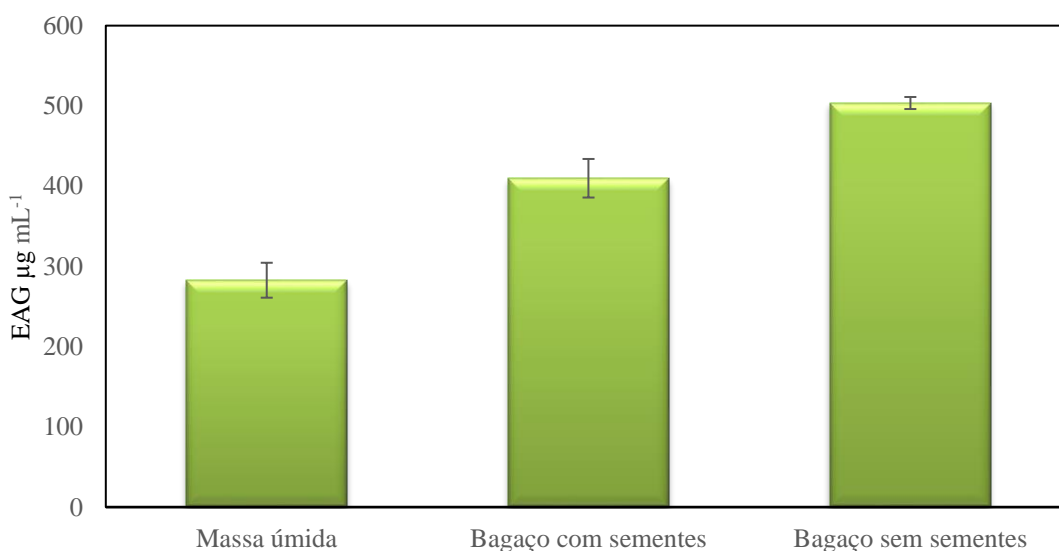
Entretanto, visando um processo simples, rápido, de fácil operação e com oportunidade de escalonamento, a extração assistida pelo misturador tipo hélice foi utilizada

para a realização dos demais ensaios, visto que mesmo não apresentando o melhor desempenho, ainda extraiu quantidades significativas de compostos fenólicos.

4.1.3 Avaliação do pré-tratamento do bagaço

Os resultados da influência do pré-tratamento do bagaço de uva na extração dos compostos fenólicos encontram-se na **Figura 20**.

Figura 20 – Resultados do ensaio de quantificação de compostos fenólicos para a avaliação da influência do pré-tratamento do bagaço de *Vitis labrusca* (cultivar *Ives*).



Fonte: a própria autora (2018).

Nota: a massa úmida foi obtida pela moagem prévia do bagaço bruto sem sementes com água destilada.

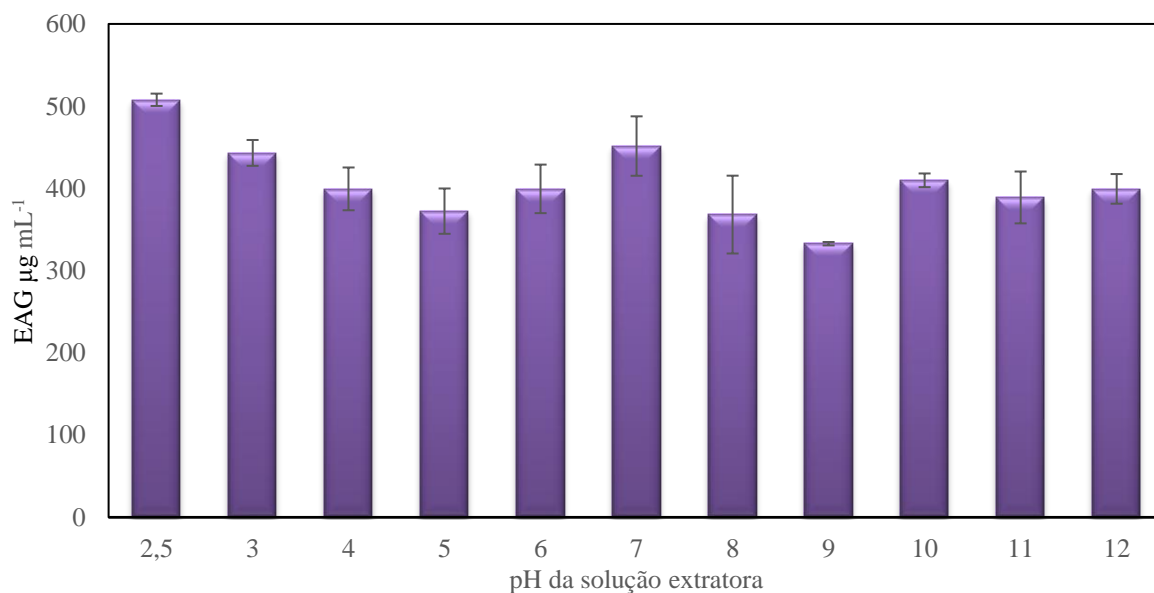
A partir dos resultados, pode-se observar que os bagaços brutos apresentaram melhores resultados em comparação à massa úmida, quanto à quantificação de fenólicos totais. Isto se deve à moagem prévia com água, que reduz a concentração de fenólicos totais por diluir o bagaço. A presença de sementes no bagaço bruto reduz em cerca de 24% a concentração de fenólicos, o que era esperado uma vez que as sementes correspondem a aproximadamente 22% em peso do bagaço de uva (MELLO; SILVA, 2014).

Embora o bagaço bruto sem sementes tenha apresentado o melhor resultado, escolheu-se o bagaço bruto com sementes para os próximos testes porque, desta forma, o resíduo industrial pode ser utilizado assim como ele é gerado nas vinícolas, sem a necessidade de beneficiamento.

4.1.4 Avaliação do pH da solução extratora

Os resultados da avaliação do pH da solução extratora são apresentados na **Figura 21**. O perfil de concentração de fenólicos totais em função do pH da solução extratora assemelha-se ao encontrado por Bordignon Junior et al. (2009), no qual os valores de pH ácido apresentaram uma maior eficiência de extração em relação aos de pH básico, com uma discreta acentuação em pH neutro.

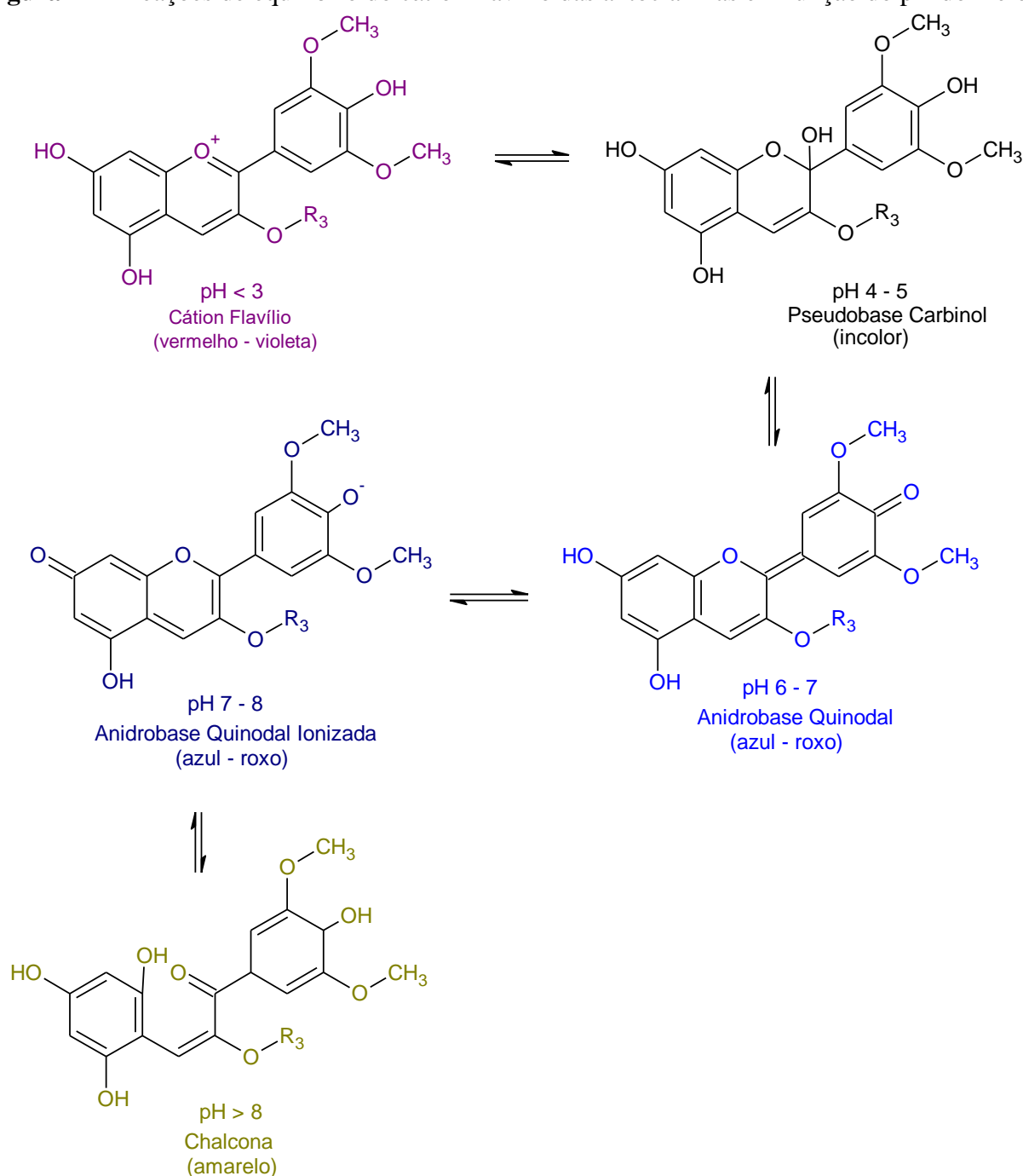
Figura 21 – Gráfico da concentração de EAG em função do pH da solução extratora.



Fonte: a própria autora (2018).

Segundo Lopes et al. (2007), esse comportamento é explicado pelas reações de equilíbrio que ocorrem com o cátion flavílio das antocianinas (**Figura 22**).

Figura 22 – Reações de equilíbrio do cátion flavílio das antocianinas em função do pH do meio.



Fonte: adaptado de Miguel (2011).

Em pH ácido, as antocianinas encontram-se na forma catiônica (coloração avermelhada) e, sendo esta a sua configuração mais solúvel, são mais facilmente extraídas. À medida que o pH do meio aumenta, ocorre uma rápida desprotonação que resulta na forma quinoidal (coloração azulada), reduzindo a solubilidade. Para valores de pH maiores que 7,0, a

coloração muda gradualmente para o amarelo, passando pelo verde, como resultado da formação de chalcona. Resultados semelhantes foram encontrados por Librán et al. (2013), que avaliaram a variedade Tempranillo em pH 2,0; 3,5 (pH natural) e 12,0.

Pelo fato do bagaço de uva apresentar um pH em torno de 3,0, optou-se por realizar a extração sem alteração desse parâmetro experimental, visando à simplificação do processo e economia de reagentes. É importante ressaltar que o objetivo desse trabalho era encontrar um método de extração que fosse ambientalmente amigável, simples e de baixo custo, e não necessariamente o processo que extraísse a maior quantidade de compostos antioxidantes.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DO BAGAÇO DE *Vitis labrusca* (CULTIVAR *Ives*)

O sistema de agitação escolhido para a realização dos demais testes foi a extração utilizando o misturador do tipo hélice, com uma solução hidroalcoólica a 50% (v/v) sem ajuste de pH, ou seja, utilizando o pH natural do bagaço (em torno de 3,0). Os testes de caracterização (fenólicos totais e atividade antioxidante) foram realizados com o extrato obtido no dia do ensaio, e todos os métodos apresentaram resultado satisfatório com base no critério de aceitação ($R^2 \geq 0,9900$).

4.2.1 Quantificação de fenólicos totais

O teor de fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, por padronização externa com ácido gálico. Através da regressão linear, obteve-se a **Equação 3** com $R^2 = 0,9994$.

$$EAG\left[\frac{\mu g}{mL}\right] = 0,0124 \times (absorv\grave{a}ncia) + 0,0138 \quad (3)$$

A concentração de fenólicos totais foi de 327,35 µg equivalentes de ácido gálico por mililitro de extrato, ou 17,89 mg EAG por grama de bagaço bruto. Na literatura, os resultados encontrados dependem da variedade de uva, da safra e do método de extração. Rockenbach et al. (2008) encontraram, por exemplo, 32,62 mg de EAG por grama de bagaço seco da variedade Isabel, enquanto Ribeiro (2016) obteve 41,24 mg de EAG por grama de bagaço seco de variedades mistas, e Souza et al. (2014) encontraram valores entre 19 e 51 mg de EAG por grama de bagaço da variedade Bordô.

4.2.2 Atividade antioxidante pela varredura dos radicais DPPH e ABTS

A equação da reta obtida através da regressão linear dos dados gerados pela leitura das sucessivas diluições do extrato no ensaio de DPPH é mostrada na **Equação 4**, com $R^2 = 0,9955$.

$$\% \text{ de inibição} = 0,839 \times (\text{concentração do extrato}) \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] - 3,17 \quad (4)$$

A concentração que corresponde à varredura de 50% do radical DPPH foi de 63,36 mg de bagaço de uva por mililitro de solução, enquanto o extrato puro varreu 86,23% do radical. Assim como no ensaio de determinação de fenólicos totais, os valores de IC_{50} variam conforme a variedade de uva, a safra e o método de extração. Drosou et al. (2015) encontraram 20,95 mg mL⁻¹ como IC_{50} para o bagaço da variedade *Agiorgitico*, correspondendo a um potencial aproximadamente três vezes maior de varredura. Já o bagaço das uvas *Vitis viníferas* analisado por Kabir, Sultana e Kurnianta (2015) varreu apenas 63,21% do radical DPPH.

A equação da reta obtida através da regressão linear dos dados gerados pela leitura das sucessivas diluições do extrato no ensaio de ABTS é mostrada na **Equação 5**, com $R^2 = 0,9956$.

$$\% \text{ de inibição} = 0,3396 \times (\text{concentração do extrato}) \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] + 14,538 \quad (5)$$

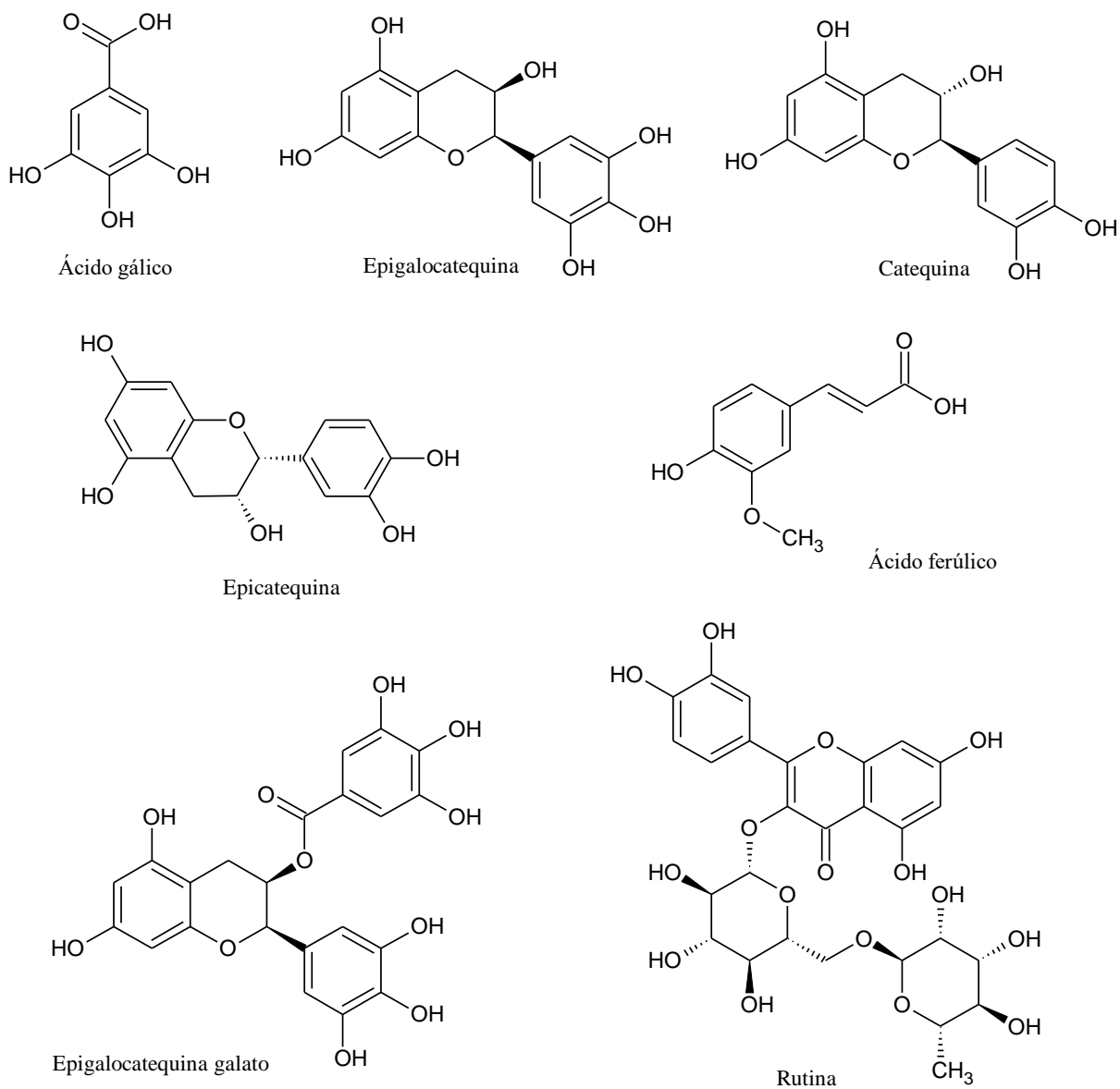
A concentração de 104,42 mg de bagaço de uva por mililitro de solução corresponde à varredura de 50% do radical ABTS, enquanto o extrato puro varreu 81,69% do radical. Postinger et al. (2016) obtiveram um IC₅₀ de 0,73 mg mL⁻¹, analisando o bagaço de uva Bordô proveniente da produção de suco de uvas. O resultado obtido por esse autor foi muito superior ao do presente trabalho (foi necessária uma quantidade menor de solução para varrer uma mesma quantidade de radical), pois o mesmo realizou a extração por decocção, resultando na maior eficiência de extração dos compostos antioxidantes que varrem o radical ABTS. Embora tenha apresentado desempenho inferior ao reportado pela literatura no que se refere à varredura do radical ABTS, o extrato obtido possui atividade redutora suficiente para promover a síntese das AgNPs, conforme será discutido na Seção 4.3 (Síntese das Nanopartículas de Prata).

Os resultados obtidos nos ensaios de quantificação de fenólicos totais e atividade antioxidante pela varredura dos radicais ABTS e DPPH comprovam a atividade antioxidante do extrato obtido do bagaço de *Vitis labrusca* (cultivar *Ives*).

4.2.3 Identificação dos compostos majoritários por CLAE-UV

Os resultados obtidos em relação à identificação e à quantificação dos compostos fenólicos majoritários no extrato de bagaço de uva por CLAE-UV encontram-se, respectivamente, na **Figura 23** e na **Tabela 1**.

Figura 23 – Estrutura química dos principais flavonoides encontrados no extrato de bagaço de *Vitis labrusca* (cultiva *Ives*).



Fonte: a própria autora (2018).

Tabela 1 – Compostos fenólicos identificados no extrato de bagaço de *Vitis labrusca* (cultivar *Ives*)

Compostos fenólicos	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Limite de detecção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Limite de quantificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Ácido gálico	33,70	0,03	0,10
Epigalocatequina	1,88	0,09	0,30
Catequina	5,01	0,02	0,06
Epicatequina	4,10	0,04	0,09
Epigalocatequina galato	4,80	1,68	5,09
Rutina	69,03	0,04	0,12
Ácido ferúlico	29,24	0,03	0,11

Fonte: a própria autora (2018) e Agostini et al. (2017).

Os compostos majoritários identificados no extrato foram a rutina (flavona), o ácido gálico (ácido hidroxibenzoico), e o ácido ferúlico (ácido hidroxicinâmico). As catequinas (flavanols), por sua vez, estão presentes em menor quantidade. De acordo com Ribeiro (2016), os bagaços de uva Bordô apresentam grandes quantidades de ácido gálico, catequinas e rutina. Esse autor associa também os compostos encontrados com as partes do bagaço de uva: as sementes são fontes de ácido gálico, a polpa residual é rica em ácidos hidroxibenzoicos, e a casca contém diversos antioxidantes, especialmente flavonols, antocianinas e estilbenos. Toaldo et al. (2015) também encontraram catequinas, rutina, e principalmente os ácidos gálico e ferúlico como compostos majoritários em uvas da variedade Bordô.

Desta forma, a atividade redutora do extrato hidroalcoólico do bagaço de uva é justificada pela presença dos compostos fenólicos encontrados na análise de CLAE-UV.

4.3 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

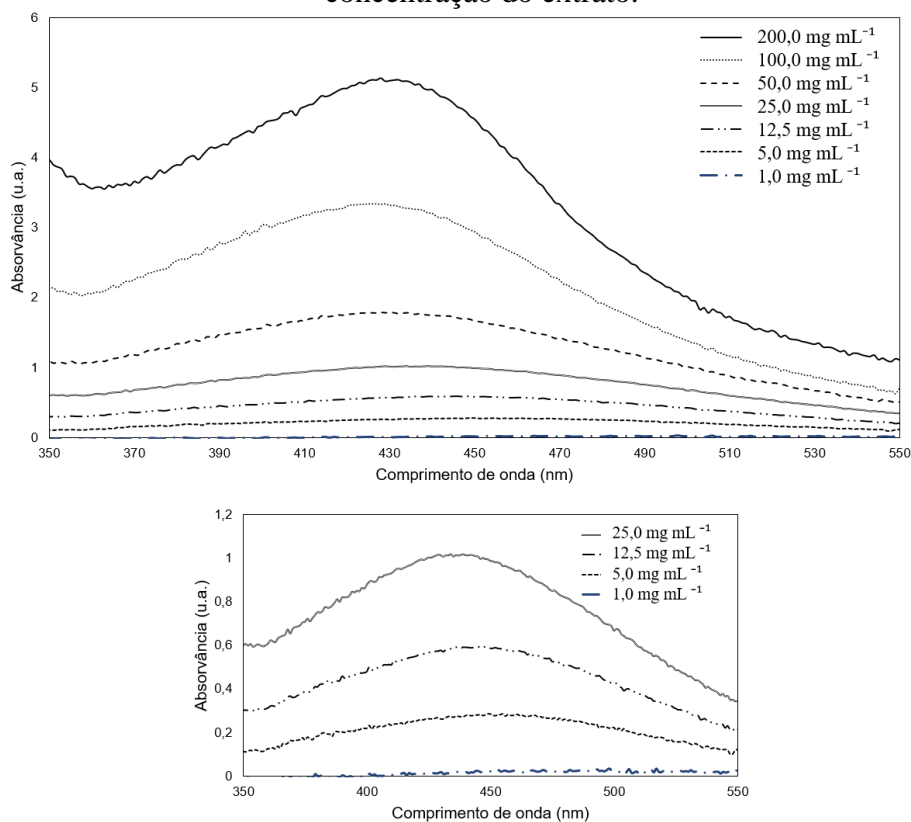
A influência dos parâmetros de síntese foi avaliada pela análise da banda plasmônica observada nos espectros de absorção molecular na região do UV-Vis, através do fator de resposta médio (**Equação 2**) mencionado na Seção 3.4. O melhor fator é obtido quando a absorvância é elevada ($A_{\text{máx}}$), o que indica uma grande concentração de nanopartículas; o $\lambda_{\text{máx}}$

é baixo, correspondendo a AgNPs de diâmetro pequeno; e a largura a meia altura (FWHM) é reduzida, devido a uma baixa dispersão de diâmetro de partículas (ELIAS et al., 2014).

4.3.1 Avaliação da influência da concentração do extrato

A influência do teor do extrato na síntese das AgNPs foi avaliada em sete concentrações, de $200,0 \text{ mg mL}^{-1}$ (extrato puro) a $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$, e os resultados são mostrados na **Figura 24**.

Figura 24 – Espectros UV-Vis das AgNPs sintetizadas em função da variação da concentração do extrato.



Fonte: a própria autora (2018).

Nota: no gráfico inferior são mostrados os espectros UV-Vis das AgNPs sintetizadas nas concentrações de $25,0$ a $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ com uma escala que permite a sua melhor visualização.

A avaliação desses espectros também foi realizada com base na **Equação 2**, e os resultados são sumarizados na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Fatores de resposta calculados para as diferentes concentrações de extrato.

Concentração do extrato (mg mL ⁻¹)	$\lambda_{\text{máx}}$ médio (nm)	Absorvância média no $\lambda_{\text{máx}}$	Fator de resposta médio $\psi \times 10^3$	Erro padrão
200,0	433	5,12	3,27	0,154
100,0	426	3,31	2,84	0,104
50,0	428	1,82	2,49	0,038
25,0	435	1,02	2,22	0,058
12,5	444	0,62	2,00	0,113
5,0	449	0,27	1,94	0,058
1,0	490	0,03	1,21	0,058

Fonte: a própria autora (2018).

Embora o melhor fator de resposta médio obtido se refira à concentração de 200 mg mL⁻¹, optou-se pela concentração de 50 mg mL⁻¹ para os demais ensaios. A escolha dessa concentração teve por objetivo reduzir o teor de etanol no extrato, garantido que a atividade bactericida da solução final fosse atribuída apenas à presença das AgNPs, reduzindo, desta forma, a influência do solvente nessa propriedade.

4.3.2 Avaliação influência da concentração de nitrato de prata

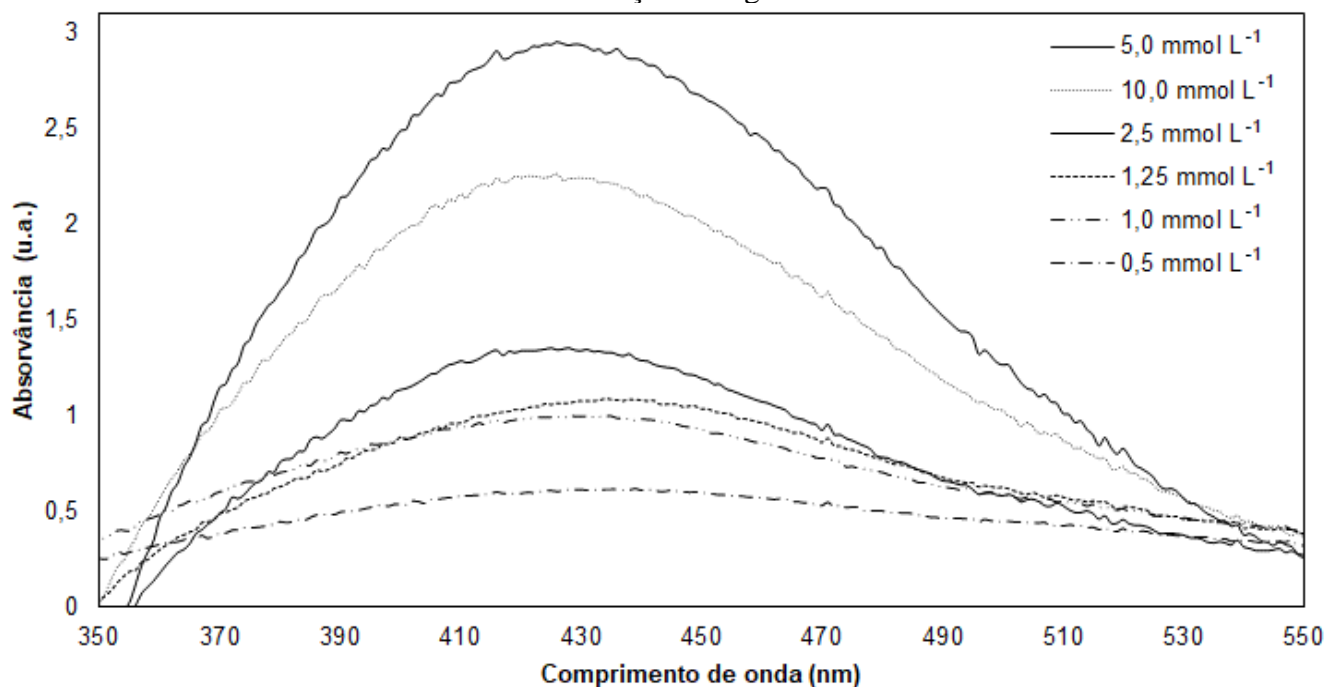
A influência da concentração de nitrato de prata foi avaliada em sete concentrações, de 10,0 mmol L⁻¹ a 0,1 mmol L⁻¹. Os resultados são mostrados na **Figura 25** e são sumarizados na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Fatores de resposta calculados para as diferentes concentrações de nitrato de prata.

Concentração de AgNO ₃ (mmol L ⁻¹)	$\lambda_{\text{máx}}$ médio (nm)	Absorvância média no $\lambda_{\text{máx}}$	Fator de resposta médio $\psi \times 10^3$	Erro padrão
10,0	427	2,97	2,54	0,039
5,0	424	2,38	2,40	0,191
2,5	428	1,36	2,74	0,014
1,25	434	0,99	2,41	0,218
1,0	430	1,02	2,60	0,106
0,5	441	0,67	2,02	0,238
0,1	444	0,15	1,54	0,079

Fonte: a própria autora (2018).

Figura 25 – Espectros UV-Vis das AgNPs sintetizadas em função da variação da concentração de AgNO₃.



Fonte: a própria autora (2018).

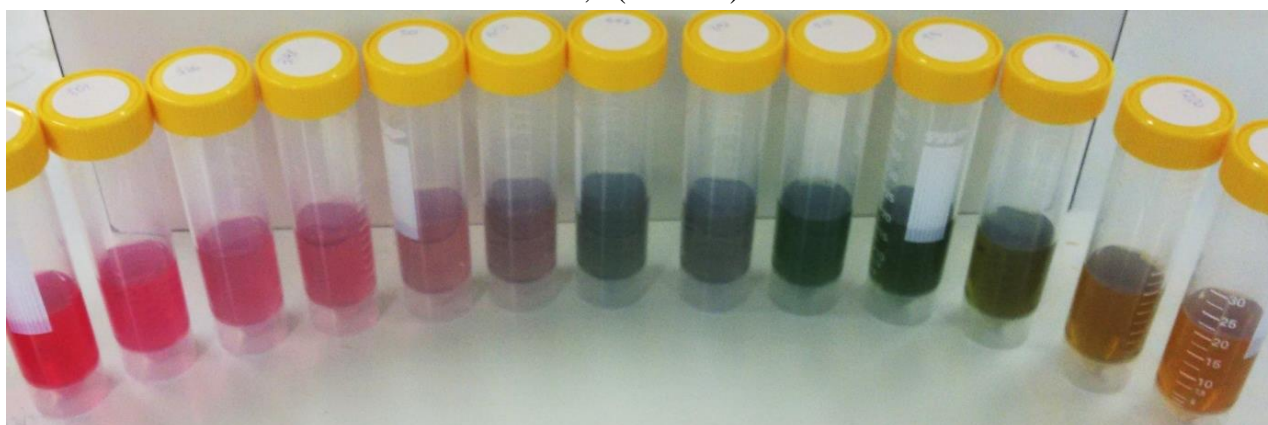
De acordo com os fatores de resposta médios mostrados da **Tabela 3**, a concentração de 2,5 mmol L⁻¹ apresentou desempenho superior em relação aos demais sistemas avaliados. Embora as concentrações de 10,0 e 5,0 mmol L⁻¹ disponibilizassem uma maior quantidade de íons Ag⁺ na solução, a dispersão de tamanhos de partícula foi superior, correspondendo a fatores de resposta médios inferiores. Segundo Rao e Tang (2017), o aumento da concentração de AgNO₃ aumenta a intensidade da banda plasmônica até um determinado valor, onde há uma tendência à formação de nanopartículas com grande dispersão de tamanho, aumentando a largura da banda plasmônica, e reduzindo assim o fator de resposta calculado.

4.3.3 Avaliação influência do pH do extrato

O pH do extrato do bagaço de uva utilizado na síntese das AgNPs foi avaliado de 2,6 a 12,7 (**Figura 26**). Conforme já foi discutido anteriormente (Seção 4.1.4), a variação da cor do

extrato ocorre em função das reações de equilíbrio das antocianinas (**Figura 22**). Em pH ácido, as antocianinas assumem coloração avermelhada e, à medida que o pH aumenta, passam para a coloração azulada. Em $\text{pH} \geq 7,0$, a coloração muda gradualmente para o amarelo, passando pelo verde.

Figura 26 – Extrato do bagaço de *Vitis labrusca* (cultivar *Ives*) em pH de 2,6 (à esquerda) a 12,7 (à direita).

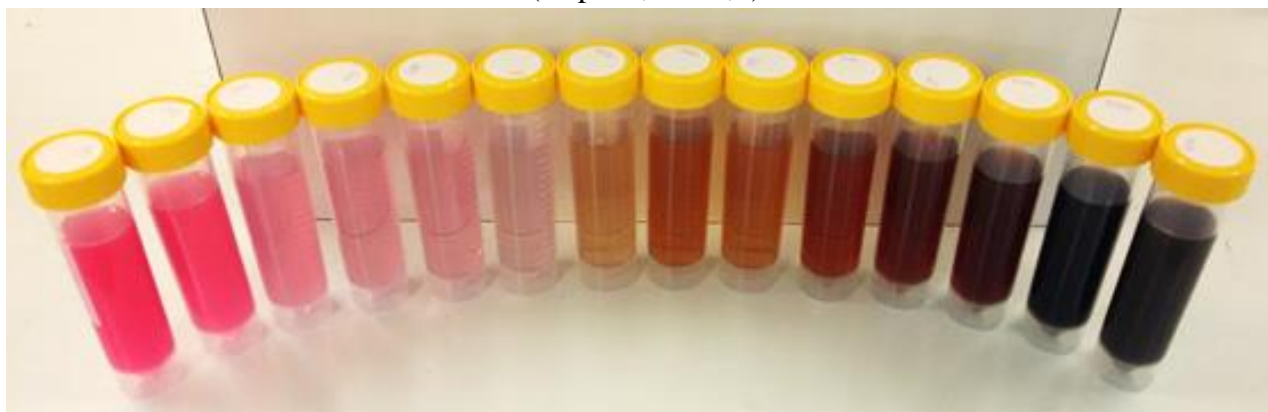


Nota: a solução extrato possui pH natural igual a 3,7.

Fonte: a própria autora (2018).

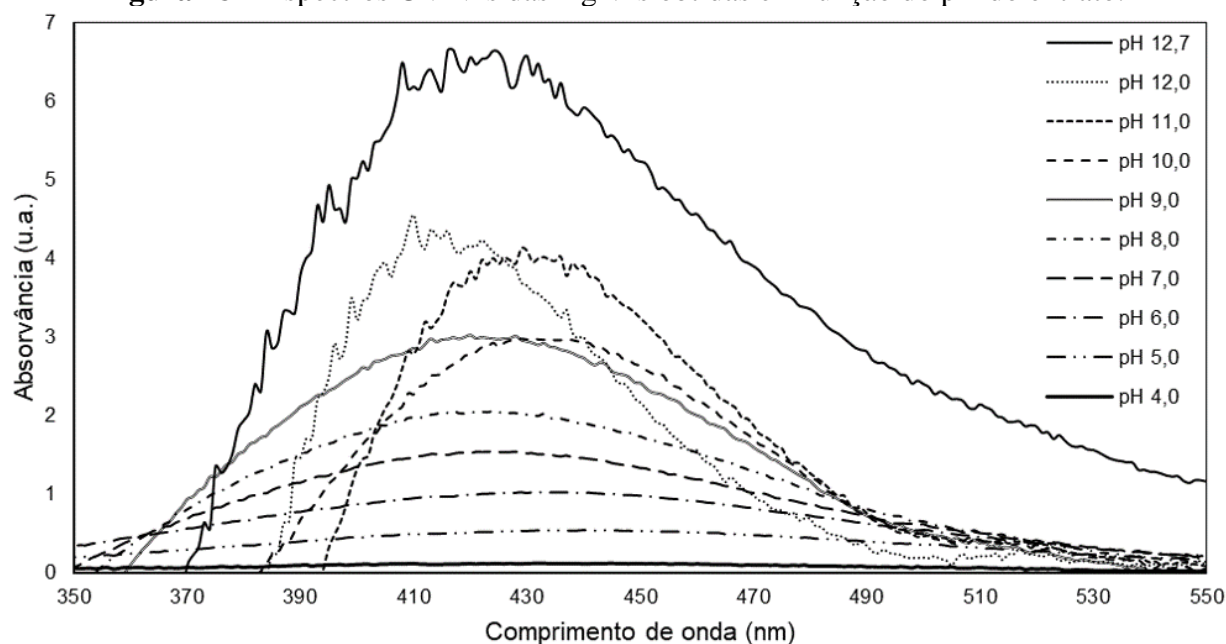
A síntese das AgNPs ocorreu imediatamente após a adição da solução de AgNO_3 ao extrato, caracterizada pela alteração da cor da solução para tons de amarelo e marrom (**Figura 27**). Ao término da síntese, as nanopartículas foram caracterizadas por espectroscopia de absorção molecular na região do UV-Vis. Os espectros obtidos encontram-se na **Figura 28**.

Figura 27 – Soluções de AgNPs sintetizadas em função da variação do pH do extrato (de pH 2,6 a 12,7).



Fonte: a própria autora (2018).

Figura 28 – Espectros UV-Vis das AgNPs obtidas em função do pH do extrato.



Fonte: a própria autora (2018).

Como pode ser constatado, o aumento do pH provoca um estreitamento gradual da banda plasmônica das AgNPs, com aumento de sua intensidade. Segundo Velgosová, Mražíková e Marcinčáková (2016), o alargamento e perda de simetria da banda plasmônica indica aumento de tamanho, perda de uniformidade e/ou perda de distribuição homogênea das partículas, levando à agregação e precipitação das partículas. Essas informações são corroboradas pela análise de MET, que será discutida posteriormente na Seção 4.4.1.

Todos os espectros possuem um $\lambda_{\text{máx}}$ entre 400 e 450 nm, característico das AgNPs. Entretanto, em pH 12,0 e 12,7 ocorreu um deslocamento da banda para comprimentos de onda menores, indicando uma redução no tamanho de partícula, além do aumento da polidispersão evidenciado pelo aumento da largura a meia altura da banda (KUMAR et al., 2017; VELGOSOVÁ; MRAŽÍKOVÁ; MARCINČÁKOVÁ, 2016). Já as soluções dos extratos em pH 2,6 e 3,0 não apresentaram banda característica na região de 400-450 nm, indicando que nessas condições não houve formação de AgNPs.

De acordo com Mesquita (2016), os grupos hidroxila presentes nos compostos orgânicos da solução extrato são responsáveis pela redução dos íons Ag^+ a Ag^0 , e a sua disponibilidade é diretamente afetada pelas alterações de pH do meio reacional.

A escolha do pH de síntese mais adequado foi realizada após a caracterização por MET das AgNPs obtidas nos diferentes valores de pH para que pudesse ser avaliado o tamanho, a forma e o estado de agregação das nanopartículas.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

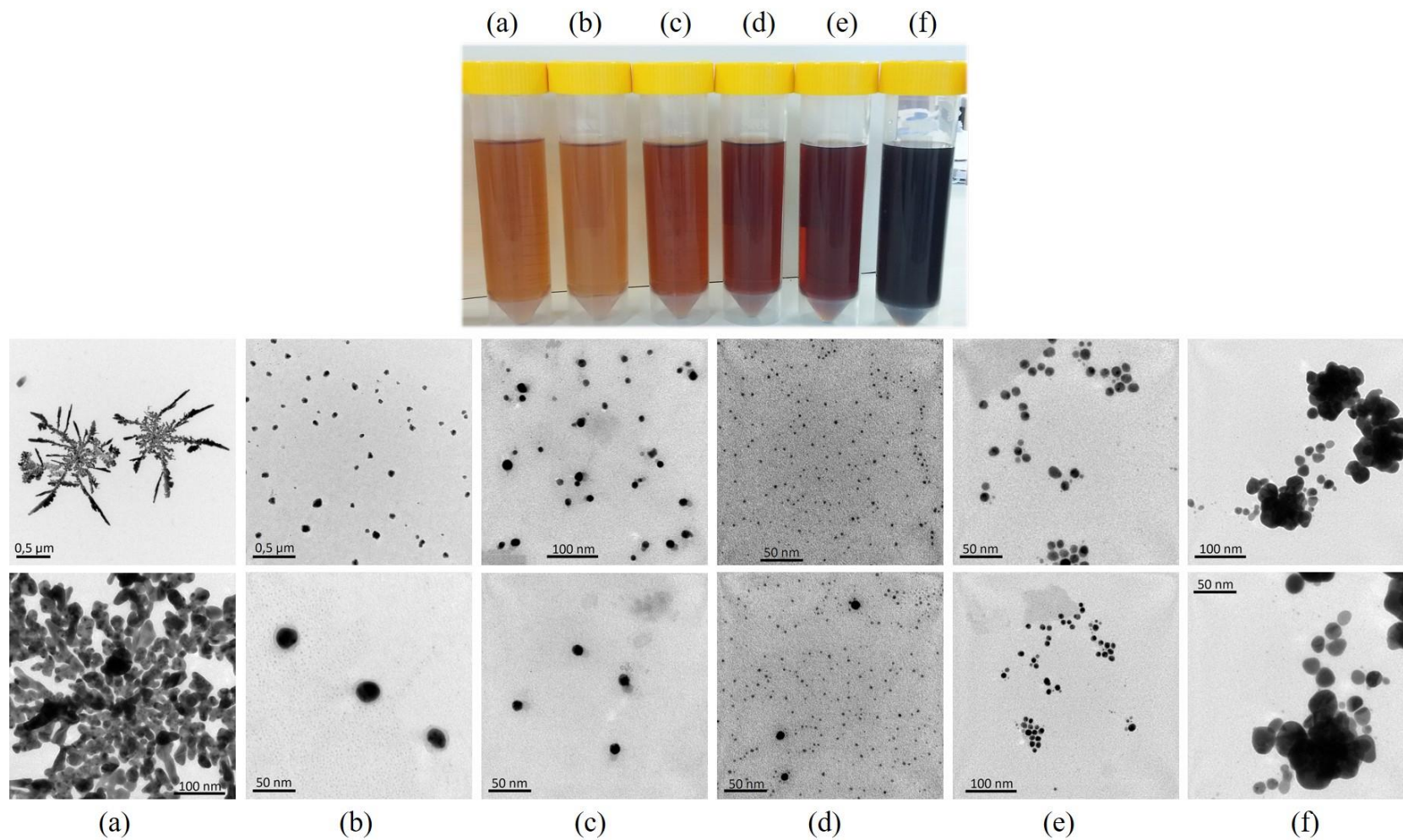
A caracterização das AgNPs sintetizadas foi realizada por MET, PZ, espectroscopia de absorção molecular na região do UV-Vis, e atividade mínima inibitória frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As AgNPs que precipitaram em pH 12,7 foram igualmente avaliadas por MEV-FEG, EDS e Raman.

4.4.1 Microscopia eletrônica de transmissão

Foram analisadas as AgNPs sintetizadas de pH 7,0 a 12,0, por serem as condições que propiciaram a maior formação de nanopartículas. As AgNPs das amostras apresentaram comportamentos distintos, conforme ilustra a **Figura 29**.

As nanopartículas obtidas possuem formato circular e poliédrico, apresentando-se agregadas em pH 7,0 e 12,0, enquanto as demais estão dispersas. A forma com que as nanopartículas se agregaram em pH 7,0 remete ao crescimento dendrítico de cristais. Segundo Melo (2015), o pH ácido favorece a agregação das nanopartículas, enquanto os pH básicos favorecem a nucleação, o que poderia explicar a agregação das AgNPs no formato encontrado em pH 7,0, e a redução do diâmetro médio em pH alcalinos.

Figura 29 – Imagens de MET das AgNPs em função do pH do meio: (a) 7,0; (b) 8,0; (c) 9,0; (d) 10,0; (e) 11,0; (f) 12,0.



Fonte: a própria autora (2018).

Os diâmetros médios das AgNPs encontram-se na **Tabela 4**, e variaram de 2,9 a 55,3 nm.

Tabela 4 – Diâmetro médio das AgNPs em função do pH do meio.

pH	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
Diâmetro médio (nm)	17,0	55,3	13,0	2,9	10,0	16,5
Desvio padrão (nm)	3,4	14,6	3,4	0,7	1,8	4,4

Fonte: a própria autora (2018).

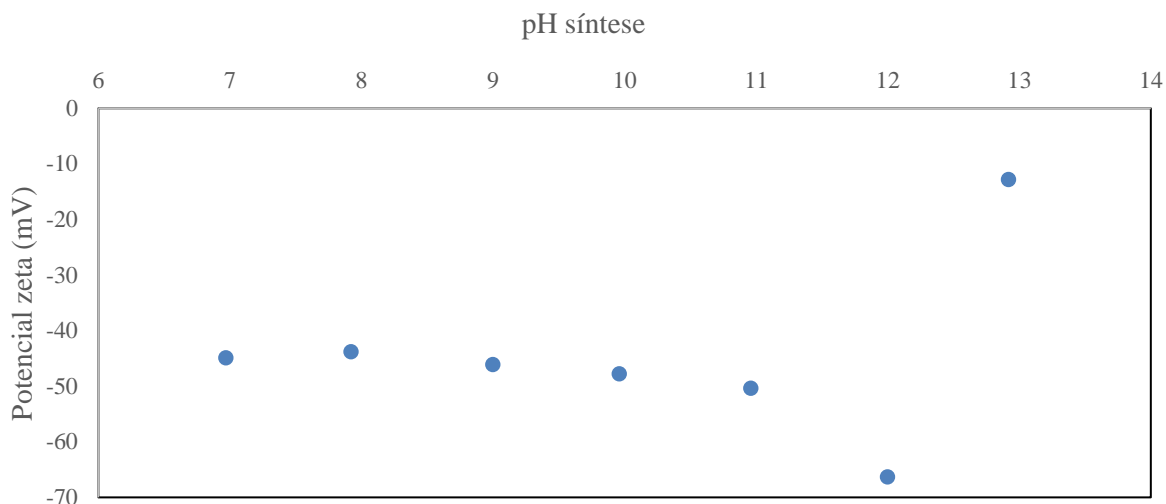
A ação bactericida das AgNPs é potencializada com o aumento da área superficial causada pela redução do diâmetro, e com a dispersão das partículas (MOSELHY et al., 2015). A síntese em pH 10,0 apresentou nanopartículas com os menores diâmetros e, visando a posterior utilização dessas partículas como agentes bactericidas no tratamento terciário de efluentes industriais, pode-se concluir que essas condições são as mais adequadas para atender ao objetivo em termos de aplicação.

4.4.2 Potencial zeta

Os resultados da análise de potencial zeta encontram-se na **Figura 30**. Em valores superiores a $\pm 30,0$ mV, as forças de repulsão superam as de agregação, mantendo a estabilidade da suspensão coloidal (CASANOVA, 2010). Observa-se que todas as AgNPs, com exceção daquelas que foram sintetizadas em pH 12,7, são estáveis em solução, ou seja, a carga sobre as partículas promove a repulsão entre elas, impedindo a sua agregação e precipitação.

De acordo com Ping et al. (2018), os compostos orgânicos provenientes do extrato envolvem as AgNPs, mantendo a sua estabilidade por muitos meses. Segundo Křížová e Wiener (2013), os taninos e carboidratos presentes em extratos de derivados de uvas apresentam alto potencial de estabilização de nanopartículas de prata coloidal.

Figura 30 – Potencial zeta das AgNPs em função da variação do pH de síntese.



Fonte: a própria autora (2018).

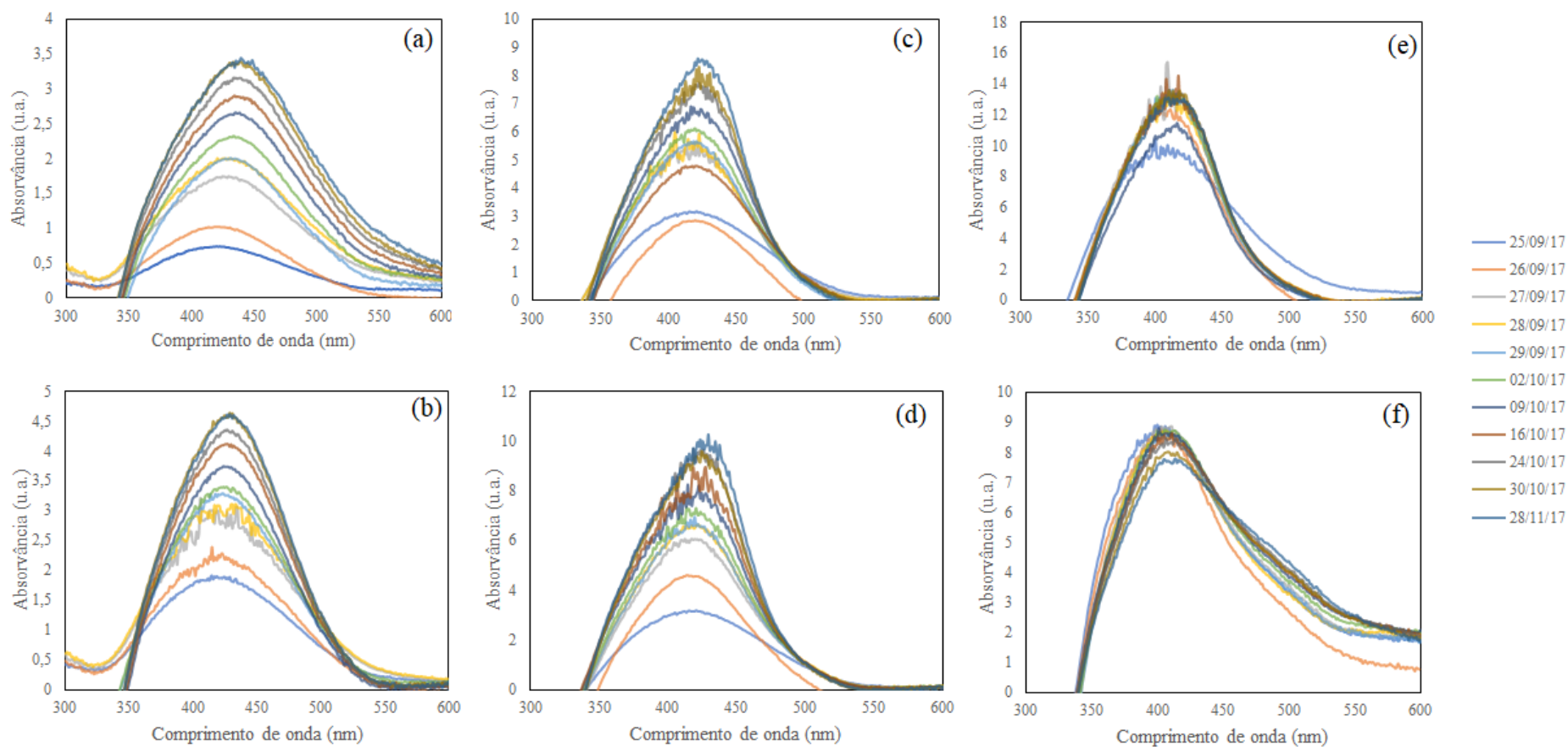
Desta forma, pode-se concluir que o extrato do bagaço de *Vitis labrusca* (cultivar *Ives*) possui não só uma elevada atividade antioxidante, como também estabiliza as nanopartículas (VELGOSOVÁ; MRAŽÍKOVÁ; MARCINČÁKOVÁ, 2016).

4.4.3 Avaliação da estabilidade por espectroscopia de absorção molecular na região do UV-Vis

Na avaliação da estabilidade das nanopartículas ao longo do tempo, as AgNPs sintetizadas em pH 7,0 e 8,0 apresentaram comportamento semelhante, aumentando a intensidade da banda e deslocando-a levemente para maiores comprimentos de onda com o decorrer dos dias (**Figura 31 (a) e (b)**).

As soluções em pH 9,0, 10,0 e 11,0 também tiveram sua intensidade aumentada, porém sem deslocamento aparente (**Figura 31 (c), (d) e (e)**), sendo que a solução de pH 11,0 foi a que apresentou o menor acréscimo de intensidade das três. A solução em pH 12,0 manteve-se estável, sem alteração de intensidade e da posição do $\lambda_{\text{máx}}$ (**Figura 31 (f)**).

Figura 31 – Espectros UV-Vis das AgNPs sintetizadas em diferentes condições de pH: **(a)** 7,0 R, **(b)** 8,0 R, **(c)** 9,0 TA, **(d)** 10,0 TA, **(e)** 11,0 TA e **(f)** 12,0 TA (R = armazenadas sob refrigeração; TA = armazenadas à temperatura ambiente)



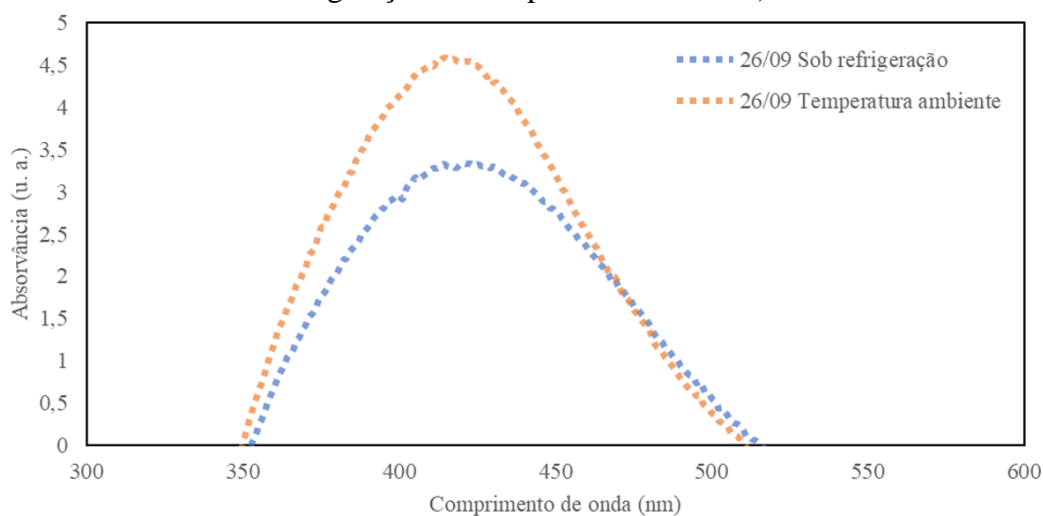
Fonte: a própria autora (2018).

De acordo com o que foi discutido na Seção 4.3, o aumento na intensidade da banda plasmônica se deve à formação de novas nanopartículas com o decorrer do tempo, sugerindo uma cinética lenta de reação entre os íons Ag^+ e os agentes antioxidantes presentes no extrato. O deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$ para região de menores comprimentos de onda indica a redução do tamanho das nanopartículas, causado por agregação das partículas previamente formadas (VELGOSOVÁ; MRAŽÍKOVÁ; MARCINČÁKOVÁ, 2016).

Observa-se ainda que todas as soluções de AgNPs sofreram modificações com o passar dos dias; entretanto, o pH foi determinante sobre a magnitude do efeito do tempo na cinética da reação da síntese. Esse comportamento pode ser explicado, mais uma vez, pelas reações de equilíbrio do cátion flavílio (**Figura 22**), que atuam na síntese verde das AgNPs.

Todas as soluções armazenadas à temperatura ambiente – com exceção da solução em pH 12,0, que se manteve estável em todas as condições – apresentaram um aumento de intensidade muito superior em relação às armazenadas sob refrigeração (**Figura 32**). Isto demonstra que a temperatura influencia diretamente na formação das AgNPs, sendo que em ambientes com temperaturas baixas a cinética da reação é desfavorecida (ALBERNAZ, 2014).

Figura 32 – Espectros UV-Vis das AgNPs sintetizadas em pH = 10,0 (armazenada sob refrigeração e à temperatura ambiente).



Fonte: a própria autora (2018).

Ping et al. (2018) observaram que o aumento da temperatura favorece a nucleação e o crescimento das nanopartículas, sendo evidenciado pelo aumento da intensidade da banda plasmônica, e deslocamento para comprimentos de onda inferiores.

Dessa forma, observa-se que a cinética de formação das nanopartículas é lenta, sendo que a reação continuou por mais de um mês. As alterações nos valores de absorvância foram mais sutis nas amostras armazenadas em geladeira, em relação às soluções armazenadas à temperatura ambiente.

4.4.4 Determinação da concentração inibitória mínima das AgNPs

A escolha das bactérias utilizadas neste ensaio foi realizada com base na aplicação das AgNPs no tratamento terciário de um efluente industrial. Desta forma, foram avaliadas as bactérias comumente encontradas em efluentes dessa origem.

Após o ensaio, foi possível verificar visualmente a concentração onde ocorreu a inibição do crescimento bacteriano (**Figura 33**). Os resultados da inibição, em função da fonte de prata e do tipo de bactéria, são apresentados na **Tabela 5**.

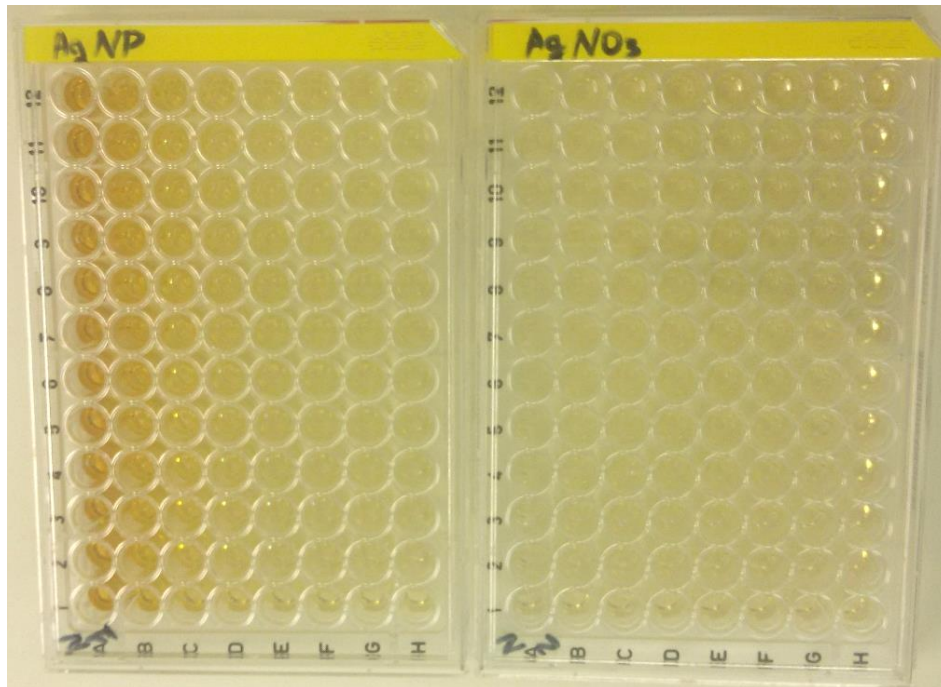
Tabela 5 – Resultados de inibição em função da fonte de prata e do tipo de bactéria.

	Bactéria	Concentração de inibição (mmol L ⁻¹)	
		AgNPs	AgNO ₃
Gram-negativas	<i>P. aeruginosa</i>	0,416	0,208
	<i>E. coli</i>	0,416	0,208
Gram-positivas	<i>S. aureus</i>	IP	0,416
	<i>E. faecalis</i>	IP	0,416

Nota: IP = inibição parcial na concentração de 0,416 mmol L⁻¹.

Fonte: a própria autora (2018).

Figura 33 – Resultado do ensaio de determinação CIM das AgNPs frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.



Fonte: a própria autora (2018).

Como pode ser observado, as AgNPs promoveram a inibição total das bactérias Gram-negativas na concentração mais alta avaliada ($0,416 \text{ mmol L}^{-1}$), enquanto nas Gram-positivas a inibição de crescimento foi parcial. Em relação ao controle positivo, a inibição destas correspondeu à cerca de 75,3% para *S. aureus* e 15,2% para *E. fecalis*, com erros padrão de 6,3% e 4,2%, respectivamente.

Senthil et al. (2017) também observaram comportamento semelhante com AgNPs sintetizadas com extrato de *Trigonella foenum-graecum*, cujas CIMs encontradas foram de $0,115 \text{ mmol L}^{-1}$ para *S. aureus* e de $0,058 \text{ mmol L}^{-1}$ para *E. coli*. Os autores também avaliaram o mecanismo de ação da prata, observando o dano celular causado no decorrer do tempo de ação das AgNPs, pela análise de MEV.

O mecanismo de ação da prata sobre as bactérias ainda não está totalmente esclarecido, mas acredita-se que a parede celular bacteriana atraia os íons Ag^+ , pelo fato de ser negativamente carregada. A prata possivelmente causa a ruptura da membrana celular, por meio

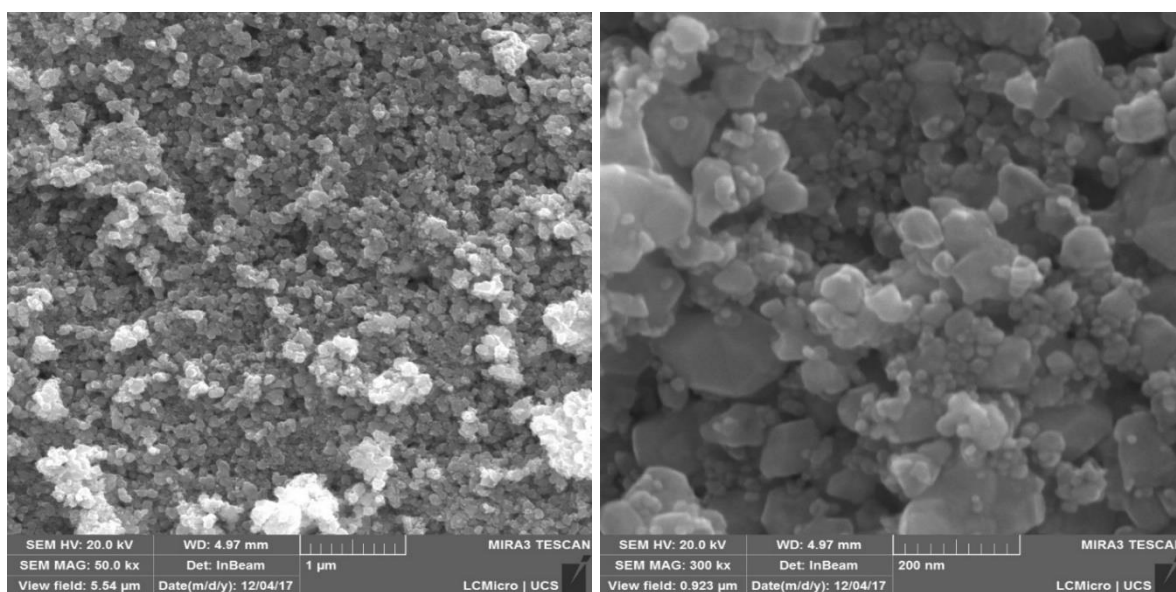
da desnaturação proteica, levando à morte celular (SENTHIL et al., 2017). Essa desnaturação está relacionada à característica da prata em reagir com compostos sulfurados e fosforados de biomoléculas (KUMAR et al., 2017).

As AgNPs demonstraram um potencial bactericida inferior em comparação ao AgNO_3 , visto que o sal de prata, além de causar danos à membrana celular das bactérias, ainda induz à conglomeração do DNA bacteriano (MOSELHY et al., 2015).

4.4.5 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo

As imagens obtidas pela análise de MEV-FEG para as AgNPs sintetizadas em $\text{pH} = 12,7$ encontram-se na **Figura 34**. A precipitação observada pode ter sido originada em função de uma possível desestabilização da solução, causada pela degradação dos compostos orgânicos que conferiam estabilidade às nanopartículas. Consequentemente, as AgNPs, em especial as de diâmetro elevado, sofreram ação da gravidade e precipitaram, arrastando consigo algumas partículas menores.

Figura 34 – Imagens de MEV-FEG das AgNPs sintetizadas em $\text{pH} = 12,7$.



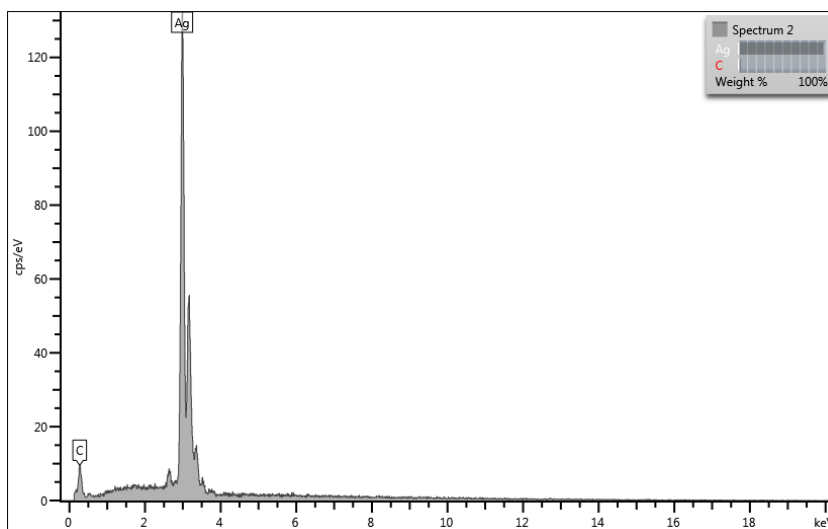
Fonte: a própria autora (2018).

Velgosová, Mražíková e Marcinčáková (2016) também observaram a presença de precipitados após a síntese de AgNPs, e atribuíram esse comportamento à rápida aglomeração de nanopartículas ou ao seu tamanho, causada por uma perda pontual na estabilização proporcionada pela solução extrato.

4.4.6 Espectroscopia por dispersão de energia

O espectro de EDS do precipitado coletado da solução de AgNPs sintetizadas em pH 12,7 apresenta dois picos intensos referentes à prata em 2,98 e 3,15 keV, correspondendo a praticamente 100% em peso da composição química do material analisado (**Figura 35**). Observam-se também dois picos de menor intensidade em 2,62 keV e 3,31 keV, referentes ao cloro e ao potássio, respectivamente. Estes podem ter sua origem no extrato do bagaço de uva utilizado na síntese das nanopartículas, e a sua presença pode ser explicada pelo uso excessivo de fertilizantes como o cloreto de potássio no cultivo de videiras na região Sul do Brasil (MELO; ZALAMENA, 2016). O pico de carbono se refere à fita utilizada para fixar a amostra no *stub*.

Figura 35 – Espectro de EDS das AgNPs sintetizadas em pH = 12,7.



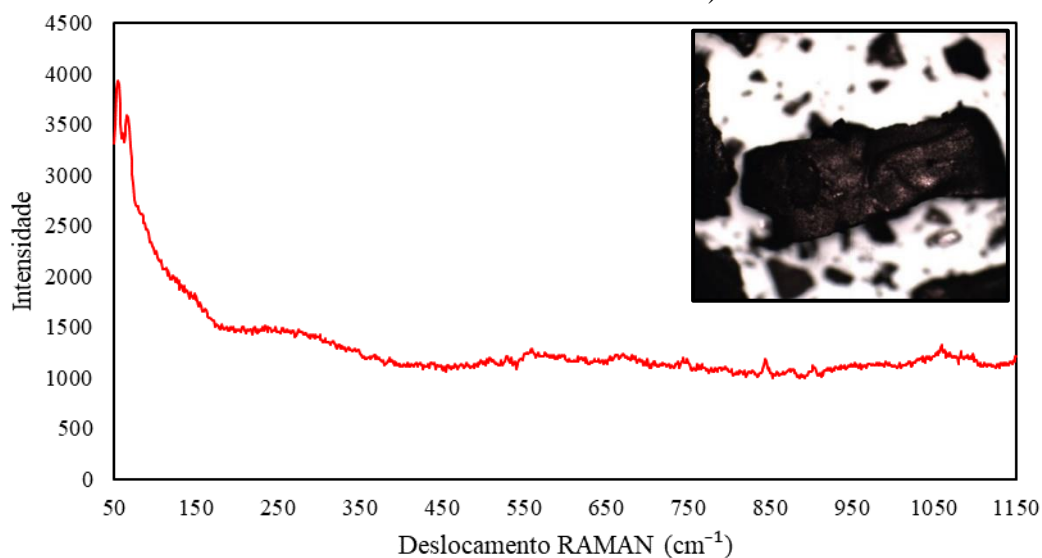
Fonte: a própria autora (2018).

A ausência do pico referente ao oxigênio indica que o precipitado formado nessa condição de pH seja majoritariamente constituído por prata metálica que precipitou da solução, refutando a hipótese de formação de óxidos de prata.

4.4.7 Espectroscopia Raman

O precipitado coletado da solução de AgNPs sintetizadas em pH 12,7 foi também analisado por espectroscopia Raman. No espectro obtido (**Figura 36**), foi possível identificar duas bandas em aproximadamente 55 e 65 cm^{-1} , que correspondem à vibração de rede das ligações Ag-Ag. A presença de óxidos de prata seria confirmada por bandas em 933-950 cm^{-1} , 1050-1070 cm^{-1} e 1100 cm^{-1} , correspondentes às vibrações de estiramento das ligações Ag-O (MARTINA et al., 2012). Waterhouse, Bowmaker e Metson (2001) também reportam uma banda em 430 cm^{-1} correspondente ao estiramento das ligações Ag-O presente em óxidos de prata.

Figura 36 – Espectro Raman das AgNPs sintetizadas em pH = 12,7 (detalhe do material analisado com aumento de 5 ×).



Fonte: a própria autora (2018).

Desta forma, a ausência das bandas correspondentes às vibrações Ag-O indica que o material precipitado seja constituído majoritariamente por prata metálica que perdeu a estabilidade que o mantinha em suspensão, conforme foi discutido na Seção 4.4.5.

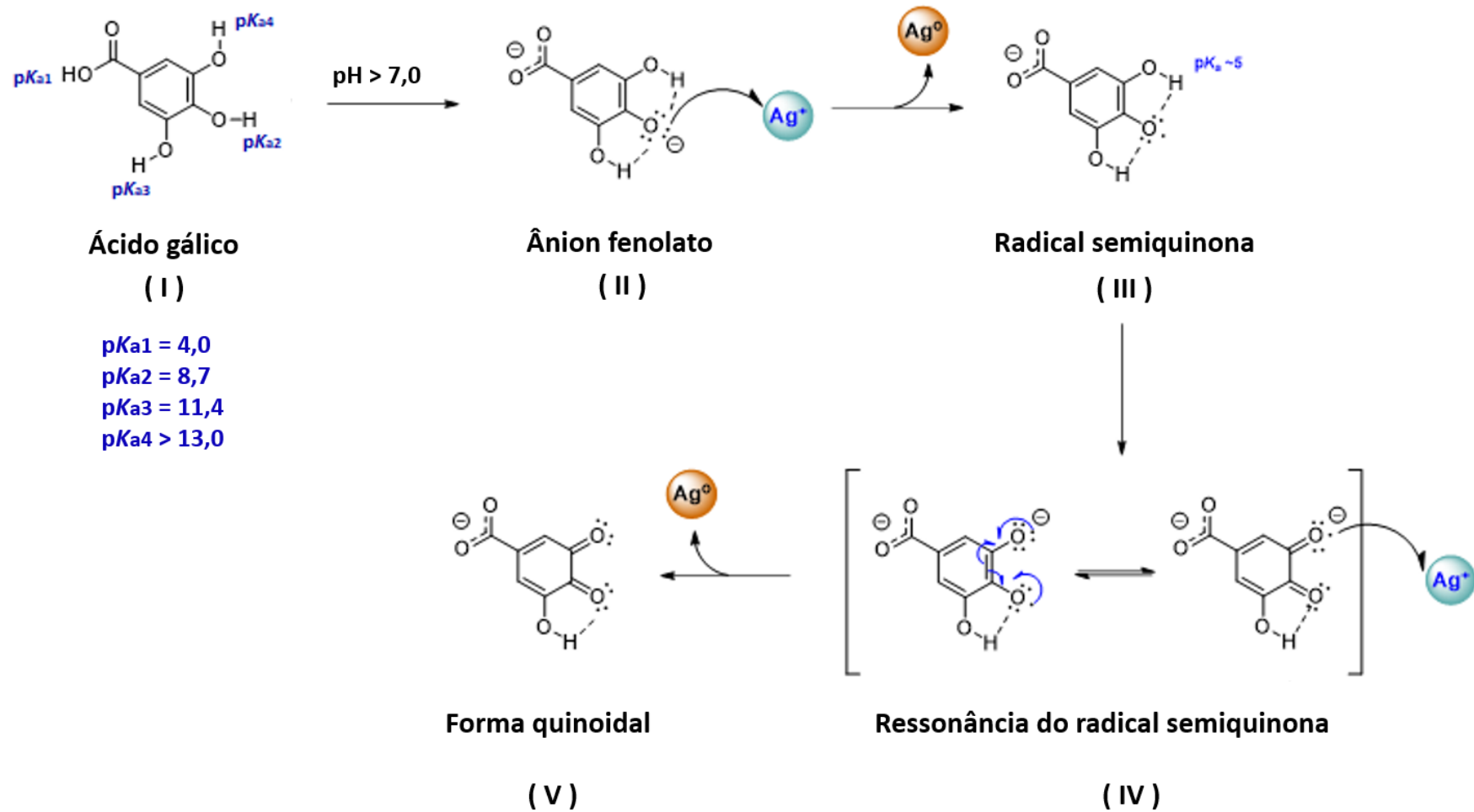
4.5 PROPOSTA DO MECANISMO DA SÍNTESE

Uma proposta de mecanismo para a redução dos íons Ag^+ a Ag^0 metálica é apresentada na **Figura 37**, no qual foi utilizado o ácido gálico como o representante majoritário dos compostos fenólicos presentes no extrato do bagaço de *Vitis labrusca* (cultivar *Ives*).

O ácido gálico (**I**) apresenta quatro hidrogênios ácidos, sendo um proveniente do grupo ácido carboxílico e três do anel polifenólico. Quando em solução alcalina ($\text{pH} > 7,0$), ocorre a abstração preferencial dos dois hidrogênios mais ácidos – inicialmente o hidrogênio que se encontra no grupo ácido carboxílico ($\text{p}K_a = 4,0$), seguido do hidrogênio fenólico que se encontra na posição *para* – levando à formação do íons fenolato (**II**). O ânion (**II**) é estabilizado por meio de ligações intermoleculares de hidrogênio das hidroxilas em posição *meta*. Na sequência, o cátion Ag^+ abstrai um elétron do par eletrónico (mecanismo SET), reduzindo-se a Ag^0 e formando a espécie radical semiquinona (**III**). Esse radical é igualmente estabilizado por ligações de hidrogênio das hidroxilas vizinhas.

De acordo com Eslami et al. (2010), o valor do $\text{p}K_a$ do primeiro hidrogênio fenólico no radical semiquinona (**III**) é reduzido para aproximadamente 5,0, sendo assim, facilmente abstraído na faixa de pH em que ocorre a reação. A remoção do hidrogênio fenólico leva à formação do ânion radical (**IV**), estabilizado por ressonância. Posteriormente, um segundo cátion Ag^+ abstrai um elétron (mecanismo SET), reduzindo-se à Ag^0 e produzindo a forma oxidada (quinoidal) do ácido gálico (**V**).

Figura 37 – Representação da proposta de mecanismo de redução de íons Ag^+ a Ag^0 mediada por ácido gálico.



Fonte: a própria autora (2018).

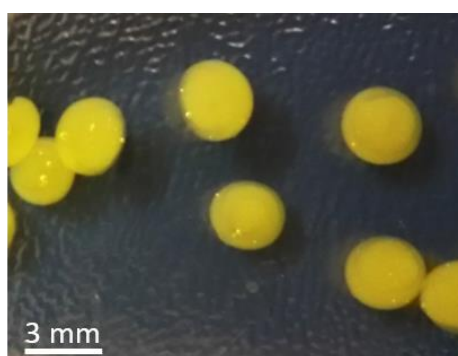
Desta forma, conclui-se que cada molécula de ácido gálico promove a redução de dois íons Ag^+ quando em pH alcalino, através da formação de um ânion fenolato e posteriormente um radical semiquinona. A reação termina quando o equilíbrio é atingido, com a formação das AgNPs e com o ácido gálico estabilizado na sua forma quinoidal.

O mecanismo proposto é uma hipótese, devendo ser comprovado por espectrometria de massas. É necessário que seja realizada uma síntese de AgNPs utilizando uma solução padrão de ácido gálico, em substituição ao extrato do bagaço de *Vitis labrusca* (cultivar *Ives*), e na sequência seja verificado o aparecimento do íon molecular referente à forma quinoidal do ácido gálico na solução de AgNPs.

4.6 SÍNTESE DOS *PELLETS* DE QUITOSANA-AgNPs E TRATAMENTO TERCIÁRIO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS

Os *pellets* de quitosana-AgNPs apresentaram textura lisa e formato esférico, com aproximadamente 3 mm de diâmetro, conforme pode ser observado na **Figura 38**.

Figura 38 – *Pellets* de quitosana-AgNPs.



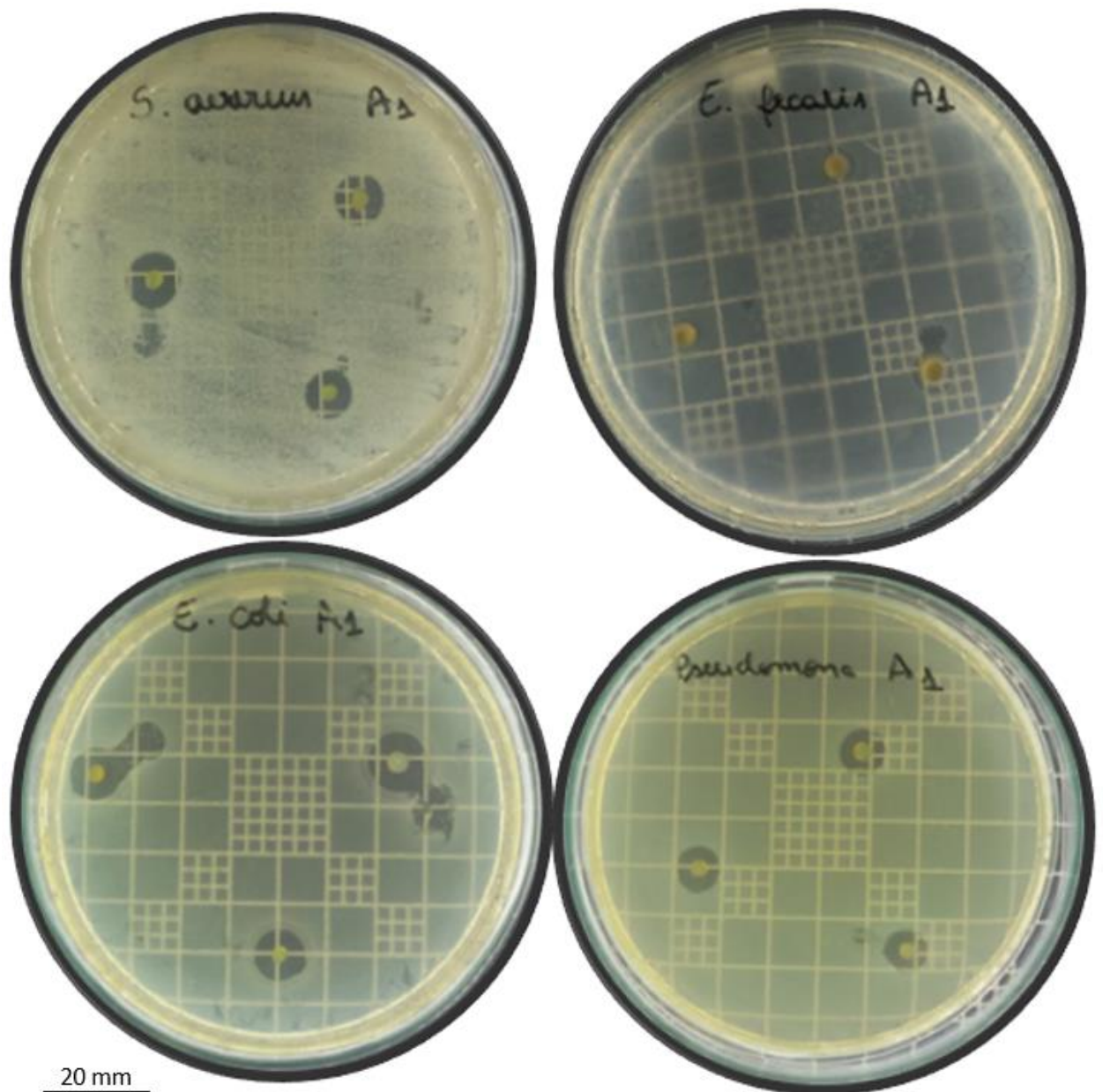
Fonte: a própria autora (2018).

Os *pellets* de quitosana-AgNPs foram preparados anteriormente à sua utilização, tanto para o ensaio de inibição de crescimento bacteriano quanto para o tratamento terciário do efluente industrial.

4.6.1 Inibição do crescimento bacteriano por difusão em superfície

Os *pellets* de quitosana-AgNPs formaram halos de inibição em todas as bactérias avaliadas, conforme ilustra a **Figura 39**.

Figura 39 – Halos de inibição formados pelos *pellets* de quitosana-AgNPs nas placas inoculadas com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.



Fonte: a própria autora (2018).

Os halos foram medidos, e os seus diâmetros são apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6 – Diâmetro médio dos halos de inibição formados pelos *pellets* de quitosana-AgNPs.

	Bactéria	Diâmetro (mm)	Erro padrão (mm)
Gram-negativas	<i>P. aeruginosa</i>	8,45	0,29
	<i>E. coli</i>	10,45	0,92
Gram-positivas	<i>S. aureus</i>	9,89	0,44
	<i>E. faecalis</i>	6,62	0,34

Fonte: a própria autora (2018).

Segundo Kourmouli et al. (2018), a atividade inibitória dos *pellets* está diretamente associada à difusividade de íons Ag^+ liberados da interface do material com o meio de cultura, visto que o diâmetro das partículas promove apenas uma maior superfície de contato para que ocorra a disponibilização dos íons. A presença do halo de inibição comprova que a quitosana reticulada com o glutaraldeído proporciona uma estrutura rígida para os *pellets* sem, no entanto, impedir a difusividade da prata para o meio.

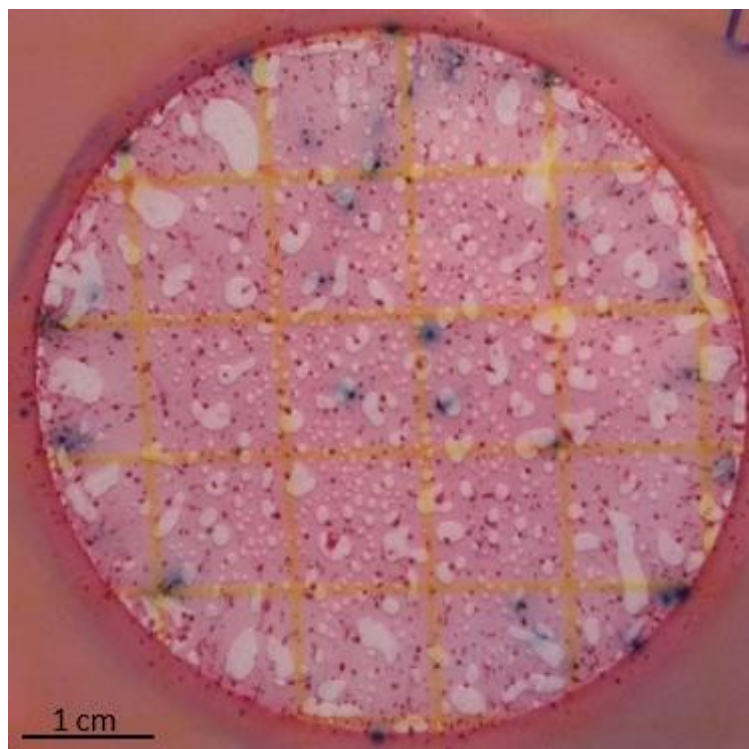
O maior halo de inibição encontrado no ensaio com *E. coli* está em conformidade com o resultado observado por Senthil et al. (2017). Segundo esses autores, isso se deve à espessura da camada peptidoglicana das bactérias. Nas bactérias Gram-positivas, a camada é constituída de ácido lipoteicoico e múltiplas camadas de peptidoglicanos, atingindo espessuras entre 30 e 100 nm. As Gram-negativas, por sua vez, possuem apenas uma fina camada de poucos nanômetros de espessura constituída apenas de peptidoglicanos, sendo assim mais suscetíveis às agressões causadas pela prata.

Os resultados são corroborados pelo ensaio de atividade inibitória mínima (Seção 4.4.4), onde as bactérias Gram-negativas foram mais inibidas que as Gram-positivas.

4.6.2 Avaliação da atividade bactericida dos *pellets* de quitosana-AgNPs no tratamento terciário de efluentes industriais

O efluente bruto (sem tratamento com os *pellets* de quitosana-AgNPs) apresentou uma contaminação por *E. coli* de cerca de 40 UFC mL⁻¹, conforme ilustra a **Figura 40**.

Figura 40 – Petrifilm do ensaio de contagem de *E. coli* do efluente bruto (antes do tratamento) com os *pellets* de quitosana-AgNPs. As colônias azuis correspondem à bactéria *E. coli*.



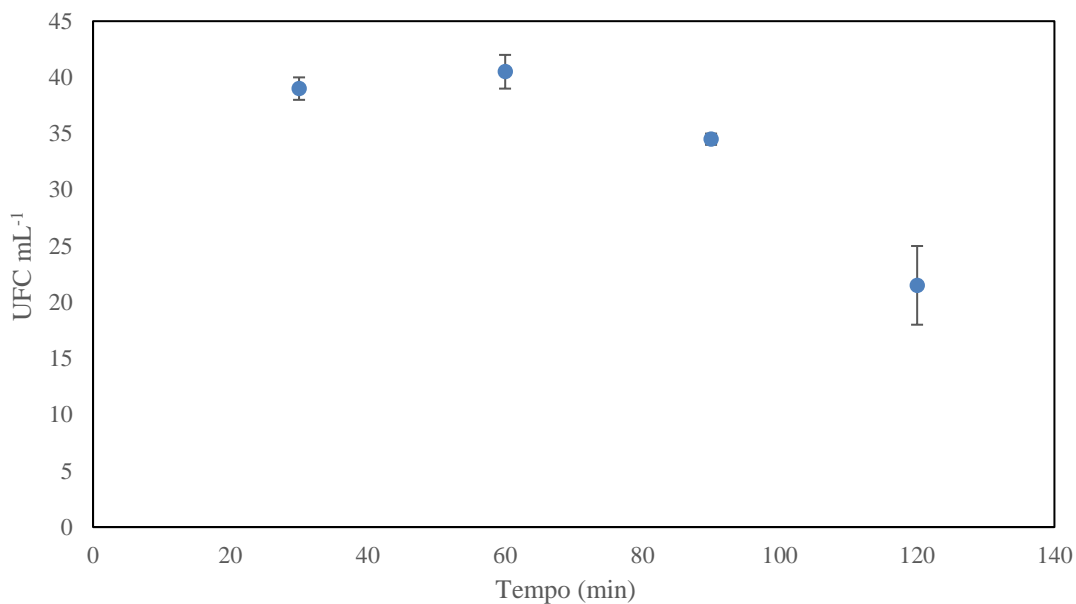
Fonte: a própria autora (2018).

Nos primeiros 60 min de tratamento com os *pellets* de quitosana-AgNPs não ocorreu alteração significativa no número de bactérias. Entretanto, após 1 h de contato, o número de unidades formadoras de colônias por mililitro começou a reduzir, indicando que os *pellets* possuem atividade bactericida (**Figura 41**).

Lovatel et al. (2015) impregnaram AgNPs em um híbrido de montmorillonita e alginato e, após 90 min de tratamento, de um efluente a concentração de bactérias foi reduzida

em 98,5%. O trabalho de Cara et al. (2016) estudou o tratamento de água, evidenciando que AgNPs funcionalizadas com poliamida-66 mostraram redução de 100% na concentração microbiana após 24 h de contato.

Figura 41 – Contagem de *E. coli* em função do tempo de tratamento do efluente industrial com os *pellets* de quitosana-AgNPs.



Fonte: a própria autora (2018).

Desta forma, conclui-se que os *pellets* de quitosana-AgNPs possuem atividade bactericida suficiente para tratar um efluente bruto, especialmente contra bactérias como *E. coli*, atingindo desta forma o objetivo em termos de aplicação do presente trabalho.

5 CONCLUSÕES

A obtenção do extrato do bagaço de *Vitis labrusca* (cultivar *Ives*) foi realizada com uma solução hidroalcoólica a 50% (v/v), através da agitação assistida por um misturador do tipo hélice, sem a necessidade do pré-tratamento do resíduo. A atividade antioxidante do extrato foi quantificada em 17,89 mg de EAG por grama de bagaço bruto, e a solução se mostrou-se capaz de varrer 86,2% do radical DPPH e 81,7% do radical ABTS.

A síntese verde das AgNPs, utilizando o extrato do bagaço de uva, foi evidenciado pela presença da banda plasmônica característica das nanopartículas na região do UV-Vis (entre 300 e 650 nm) e por MET. Os parâmetros de síntese que implicaram nos melhores resultados foram o extrato na concentração de 50 mg mL⁻¹ e a solução de AgNO₃ na concentração de 2,5 mmol L⁻¹, em pH 10,0. Nessas condições, as AgNPs apresentaram um diâmetro médio de 2,9 nm, ficando evidente que o tamanho das nanopartículas é fortemente dependente do pH do meio.

Com relação à estabilidade, as AgNPs apresentaram uma carga negativa superior a ±30,0 mV, indicando que são estáveis em suspensão coloidal. A longo prazo, observou-se uma cinética lenta de redução da prata, sendo a temperatura um fator importante para a formação das AgNPs. Os precipitados formados na solução de pH 12,7 foram analisados por MEV, EDS e espectroscopia Raman, e comprovou-se que são compostos puramente de prata metálica.

No que se refere à atividade bactericida, as AgNPs promoveram a inibição total das bactérias Gram-negativas *P. aeruginosa* e *E. coli* na concentração de 0,416 mmol L⁻¹, enquanto nas Gram-positivas a inibição de crescimento foi parcial. Em relação ao controle positivo, a inibição destas correspondeu a cerca de 75,3% para *S. aureus* e 15,2% para *E. fecalis*. Os *pellets* de quitosana-AgNPs formaram halos de inibição, comprovando que a quitosana reticulada com

o glutaraldeído proporciona uma estrutura rígida para os *pellets* sem, no entanto, impedir a difusividade da prata para o meio, proporcionando o efeito bactericida.

O mecanismo de síntese foi proposto com base no ácido gálico por este ser o composto fenólico majoritário presente no extrato do bagaço de uva. O tratamento terciário de um efluente industrial reduziu a quantidade de bactérias *E. coli* após 1 h de contato, indicando que os *pellets* de quitosana-AgNPs possuem atividade bactericida suficiente para tratar um efluente industrial, atingindo desta forma o objetivo em termos de aplicação do presente trabalho.

Por fim, conclui-se que é possível realizar um processo ambientalmente correto para a síntese de AgNPs utilizando o extrato de bagaço de *Vitis labrusca* (cultivar *Ives*), e aplicar satisfatoriamente os *pellets* de quitosana-AgNPs na desinfecção de efluentes industriais.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, Fabiana et al. Otimização de um método por CLAE-UV para análise de compostos fenólicos em *Myrcia oblongata* DC., *Passiflora caerulea* L. e *Equisetum giganteum* L. **Scientia Chromatographica**, [s.l.], v. 9, n. 3, p.180-193, 2017. Editora Cubo Multimedia. <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2017.015>.
- AKINWUMI, Bolanle; BORDUN, Kimberly-ann; ANDERSON, Hope. Biological Activities of Stilbenoids. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.792-817, 9 mar. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19030792>.
- ALBERNAZ, Vanessa Lima. **Síntese Verde de Nanopartículas de Prata com Extrato Aquoso de Folhas de *Brosimum gaudichaudii*, Caracterização Físicoquímica, Morfológica e suas Aplicações no Desenvolvimento de um Nanobiossensor Eletroquímico**. 2014. 122 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- ALBUQUERQUE, Bianca R. et al. Catechin-based extract optimization obtained from *Arbutus unedo* L. fruits using maceration/microwave/ultrasound extraction techniques. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 95, p.404-415, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.050>.
- ÁLVAREZ, Ana et al. Microwave pretreatment to improve extraction efficiency and polyphenol extract richness from grape pomace. Effect on antioxidant bioactivity. **Food And Bioproducts Processing**, [s.l.], v. 106, p.162-170, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2017.09.007>.

- AMENDOLA, D.; FAVERI, D.M. de; SPIGNO, G. Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts. **Journal Of Food Engineering**, [s.l.], v. 97, n. 3, p.384-392, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.10.033>.
- ANASTAS, Paul; EGHBALI, Nicolas. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chem. Soc. Rev.**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.301-312, 2010. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b918763b>.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.24, n.2, p.319-326, 2006.
- ANTONIOLLI, Andrea et al. Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 178, p.172-178, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.082>.
- AOAC. **Método 991.14**: Determinação Quantitativa de *Escherichia coli* pela técnica de contagem em profundidade. 20ª ed. 2016.
- ASHBY, E. C. Single-electron transfer, a major reaction pathway in organic chemistry. An answer to recent criticisms. **Accounts Of Chemical Research**, [s.l.], v. 21, n. 11, p.414-421, nov. 1988. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ar00155a005>.
- BANACH, Marcin; PULIT-PROCIAK, Jolanta. Synthesis, characteristics, and biocidal activity of silver nanoparticles. **Fabrication And Self-assembly Of Nanobiomaterials**, [s.l.], p.367-399, 2016. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-41533-0.00012-x.nanoparticles>
- BARBOSA, Valcilaine Teixeira. **Síntese Biogênica de Nanopartículas de Prata usando Própolis Vermelha de Alagoas**. 2018. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2018.

- BASTOS, Aline (Brasil). Embrapa Agroindústria de Alimentos. **Bagaco de uva vira alimentos funcionais**. 2014. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2235712/bagaco-de-uva-vira-alimentos-funcionais>>. Acesso em: 24 nov. 2017.
- BONFIGLI, M. et al. Comparison between conventional and ultrasound-assisted techniques for extraction of anthocyanins from grape pomace. Experimental results and mathematical modeling. **Journal Of Food Engineering**, [s.l.], v. 207, p.56-72, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.03.011>.
- BORDIGNON JUNIOR, Celso Luiz et al. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.183-188, mar. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612009000100028>.
- BOUSSETTA, N. et al. Valorization of grape pomace by the extraction of phenolic antioxidants: Application of high voltage electrical discharges. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 128, n. 2, p.364-370, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.035>.
- BURIN, Vívian Maria et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods. **Microchemical Journal**, [s.l.], v. 114, p.155-163, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2013.12.014>.
- BURSZTYN, Marcel. **A difícil sustentabilidade**: Política energética e conflitos ambientais. Rio de Janeiro: Editora Garamond, 2011. 215 p.
- CAMARGO, Pedro H. C. et al. **Metallic Nanostructures**: From Controlled Synthesis to Applications. Springer International Publishing, 2015. 301 p. Disponível em:

<<https://www.springer.com/br/book/9783319113036#aboutBook>>. Acesso em: 14 set. 2018.

CAPALDO, Luca; RAVELLI, Davide. Hydrogen Atom Transfer (HAT): A Versatile Strategy for Substrate Activation in Photocatalyzed Organic Synthesis. **European Journal Of Organic Chemistry**, [s.l.], v. 2017, n. 15, p.2056-2071, 2 mar. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.201601485>.

CARA, Lorena Fernanda Altava. **Desinfecção de água para consumo com Nanopartículas de prata suportada em poliamida 66**. Trabalho apresentado no 5º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente, Bento Gonçalves – RS, 2016.

CARRERA, Ceferino et al. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 732, p.100-104, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.032>.

CASANOVA, Monise Cristina Ribeiro. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis**. 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciências, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

CAVALCANTE, Noelly Bastos. **Atividade antibacteriana e antifúngica de nanopartículas de prata produzidas por *Curvularia inaequalis* (Shear) Boedijn**. 2014. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Mestrado em Recursos Naturais, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2014.

CGEE, Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. **Química Verde no Brasil: 2010 – 2030**. Brasília, 2010.

CORRALES, M. et al. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. **Innovative**

- Food Science & Emerging Technologies**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.85-91, jan. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2007.06.002>.
- COSTA, Flávio Silva. **Análise mensal: uva industrial**. Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), Brasília, jan. 2018.
- DROSOU, Christina et al. A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 75, p.141-149, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.063>.
- EL-NOUR, Kholoud M.m. Abou et al. Synthesis and applications of silver nanoparticles. **Arabian Journal Of Chemistry**, [s.l.], v. 3, n. 3, p.135-140, jul. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.04.008>.
- ELIAS, Welman C. et al. 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**, [s.l.], v. 118, n. 24, p.12962-12971, 5 jun. 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jp503280y>.
- ERENO, Dinorah. Nanopartículas verdes: Plantas do cerrado são usadas na produção de nanossistemas para controle de patógenos e pragas da agricultura, entre outras aplicações. **Pesquisa - Fapesp**, [s. l.], v. 223, n. 1, p.70-73, set. 2014.
- ESLAMI, Angélique C et al. Free radicals produced by the oxidation of gallic acid: An electron paramagnetic resonance study. **Chemistry Central Journal**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.15-19, 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1752-153x-4-15>.

- FERRARI, Valdecir. **A sustentabilidade da vitivinicultura através de seus próprios resíduos**. 2010. 27 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharelado em Ciências Econômicas, Universidade de Caxias do Sul, Bento Gonçalves, 2010.
- GHASSEMPOUR, Alireza et al. Study of New Extraction Methods for Separation of Anthocyanins from Red Grape Skins: Analysis by HPLC and LC-MS/MS. **Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies**, [s.l.], v. 31, n. 17, p.2686-2703, 12 set. 2008. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10826070802353247>.
- GEORGIEV, Vasil; ANANGA, Anthony; TSOLOVA, Violeta. Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. **Nutrients**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.391-415, 21 jan. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu6010391>.
- GOULA, Athanasia M.; THYMIATIS, Konstantinos; KADERIDES, Kyriakos. Valorization of grape pomace: Drying behavior and ultrasound extraction of phenolics. **Food And Bioproducts Processing**, [s.l.], v. 100, p.132-144, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2016.06.016>.
- HEILIGTAG, Florian J.; NIEDERBERGER, Markus. The fascinating world of nanoparticle research. **Materials Today**, [s.l.], v. 16, n. 7-8, p.262-271, jul. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mattod.2013.07.004>.
- HUBER, Lísia Senger; HOFFMANN-RIBANI, Rosemary; RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B.. Quantitative variation in Brazilian vegetable sources of flavonols and flavones. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 113, n. 4, p.1278-1282, abr. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.030>.
- IBRAVIN (Rio Grande do Sul). **Elaboração de Vinhos e Derivados no Rio Grande do Sul - 2006 a 2017**. 2017. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/Dados-Estatisticos>>. Acesso em: 24 nov. 2017.

IBRAVIN (Rio Grande do Sul). **Evolução da quantidade de uvas processadas pelas empresas do RS (milhões de kg)**. 2018. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/admin/arquivos/estatisticas/1529409592.pdf>> . Acesso em: 23 jul. 2018.

IMAGEJ, versão 1,51k. Wayne Rasband: National Institutes of Health, USA.

KABIR, Faisal; SULTANA, Mosammad Shahin; KURNIANTA, Heri. Polyphenolic Contents and Antioxidant Activities of Underutilized Grape (*Vitis vinifera L.*) Pomace Extracts. **Preventive Nutrition And Food Science**, [s.l.], v. 20, n. 3, p.210-214, 30 set. 2015. The Korean Society of Food Science and Nutrition. <http://dx.doi.org/10.3746/pnf.2015.20.3.210>.

KUPPUSAMY, Palaniselvam et al. Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications – An updated report. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s.l.], v. 24, n. 4, p.473-484, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2014.11.013>.

KHAN, Ibrahim; SAEED, Khalid; KHAN, Idrees. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal Of Chemistry**, [s.l.], maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>.

KOURMOULI, Angeliki et al. Can disc diffusion susceptibility tests assess the antimicrobial activity of engineered nanoparticles? **Journal Of Nanoparticle Research**, [s.l.], v. 20, n. 3, p.20-62, mar. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-018-4152-3>.

KŘÍŠOVÁ, Hana; WIENER, Jakub. Synthesis of silver nanoparticles using condensed and hydrolysable tannins. In: **NANOCON**, Brno, 2013.

KUMAR, Vijay et al. Photoinduced green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Physalis angulata* and its antibacterial and antioxidant activity. **Journal Of**

- Environmental Chemical Engineering**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.744-756, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2016.12.055>.
- LIBRÁN, Celia M. et al. Polyphenol extraction from grape wastes: Solvent and pH effect. **Agricultural Sciences**, [s.l.], v. 04, n. 09, p.56-62, 2013. Scientific Research Publishing, Inc., <http://dx.doi.org/10.4236/as.2013.49b010>.
- LOPES, T. et al. Antocianinas: Uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, n. 3, p. 291-297, 2007.
- LOVATEL, R.h. et al. Disinfection of biologically treated industrial wastewater using montmorillonite/alginate/nanosilver hybrids. **Journal Of Water Process Engineering**, [s.l.], v. 7, p.273-279, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jwpe.2015.07.003>.
- MANSUR, Herman Sander. Quantum dots and nanocomposites. Wiley Interdisciplinary Reviews: **Nanomedicine and Nanobiotechnology**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.113-129, 26 jan. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/wnan.78>.
- MARCONE, Glauciene Paula de Souza. Nanotecnologia e nanociência: aspectos gerais, aplicações e perspectivas no contexto do Brasil. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**. [s. l.], v.7, n. 2, p. 01-24. 2015.
- MARTINA, Irene et al. Micro-Raman characterization of silver corrosion products: instrumental set up and reference database. **E-Preservation Science**. v. 9, p.1-12, 2012. Morana RTD.
- MAVANI, Kandarp; SHAH, Mihir. Synthesis of Silver Nanoparticles by using Sodium Borohydride as a Reducing Agent. **International Journal of Engineering Research & Technology**. [s.l.], v. 2, n. 3, p. 1-5, 2013. <http://dx.doi.org/10.13140/2.1.3116.8648>

- MELO, George Wellington; ZALAMENA, Jovani. **Retrato da Fertilidade de Solos Cultivados com Videira nas Regiões da Serra e Campanha Gaúcha: Comunicado Técnico 181**. Bento Gonçalves: Embrapa, 2016.
- MELO, Grasieli Beloni de. **Síntese Verde e Caracterização de Nanopartículas de Prata Usando Extrato Aquoso de Erva Mate (*Ilex paraguariensis*)**. 2015. 39 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2015.
- MELLO, Loiva Maria Ribeiro; SILVA, Gildo Almeida da. **Disponibilidade e Características de Resíduos Provenientes da Agroindústria de Processamento de Uva do Rio Grande do Sul: Comunicado Técnico 155**. Bento Gonçalves: Embrapa, 2014.
- MESQUITA, Ricardy Leonam Pontes. **Síntese de Nanopartículas de Prata através de Ultrassom utilizando Galactomanana**. 2016. 95 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Mestrado em Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- MIGUEL, M. G. Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. **Journal Of Applied Pharmaceutical Science**. [s. l.], p. 07-15. ago. 2011.
- MOURA, Gisely Corrêa et al. **Compostos Bioativos e Atividade Antioxidante em Mirtilos Avaliados em Dois Ciclos Produtivos: Comunicado Técnico 267**. Pelotas: Embrapa, 2011.
- MOSSELHY, Dina A. et al. Comparative synthesis and antimicrobial action of silver nanoparticles and silver nitrate. **Journal Of Nanoparticle Research**, [s.l.], v. 17, n. 12, p.463-473, dez. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-015-3279-8>.
- NETZ, Paulo A. ORTEGA, George G. **Fundamentos de Físico-Química: Uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas**. Artmed Editora, 15 de set de 2014, 296 p.

- OTERO-PAREJA, María et al. Green Extraction of Antioxidants from Different Varieties of Red Grape Pomace. **Molecules**, [s.l.], v. 20, n. 6, p.9686-9702, 26 maio 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules20069686>.
- PARLINSKA-WOJTAN, Magdalena et al. Green synthesis and antibacterial effects of aqueous colloidal solutions of silver nanoparticles using camomile terpenoids as a combined reducing and capping agent. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [s.l.], v. 39, n. 8, p.1213-1223, 15 abr. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-016-1599-4>.
- PEREIRA, Guilherme Pacheco. **Compostos bioativos e atividade antioxidante em bananas (*Musa sp.*)**. 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós- Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2012.
- PING, Yao et al. Green synthesis of silver nanoparticles using grape seed extract and their application for reductive catalysis of Direct Orange 26. **Journal Of Industrial And Engineering Chemistry**, [s.l.], v. 58, p.74-79, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2017.09.009>.
- POSTINGHER, Bruna Mara et al. Organic grape juice pomace as raw material for development of an antioxidant edible flour. **rLAS**. [s.l.], v. 1, n. 1, p.33-47, 2016. Uniplac.
- PRADO, Juliana de Cassia Silva. **Nanopartículas de Prata: Biossíntese, Investigação das Atividades Antibacteriana, Antifúngica e Citotoxicidade**. 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo, Universidade Estadual de Campinas, Limeira, 2014.
- RAO, Bo; TANG, Ren-cheng. Green synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activities using aqueous *Eriobotrya japonica* leaf extract. **Advances In Natural**

Sciences: Nanoscience and Nanotechnology, [s.l.], v. 8, n. 1, p.015014-015022, 2 mar. 2017. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/2043-6254/aa5983>.

RIBEIRO, Leomara Floriano. **Avaliação dos Compostos Bioativos e Atividade Antioxidante *in vitro* e *in vivo* em Bagaços de Uvas (*Vitis vinífera* e *Vitis labrusca*)**. 2016. 125 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

ROBBINS, Rebecca J.. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 51, n. 10, p.2866-2887, maio 2003. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf026182t>.

ROCKENBACH, Ismael Ivan et al. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 28, p.238-244, dez. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612008000500036>.

ROESLER, Roberta et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.53-60, mar. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612007000100010>.

RUFINO, Maria do Socorro Moura et al. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH: Comunicado Técnico 127**. Fortaleza: Embrapa, 2007a.

RUFINO, Maria do Socorro Moura et al. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS•+: Comunicado Técnico 128**. Fortaleza: Embrapa, 2007b.

- SANTOS, Suikinai Nobre et al. **Determinação quantitativa da atividade antioxidante de extratos brutos de microorganismos pelo método de captura do radical livre DPPH: Comunicado Técnico 50**. Jaguariúna: Embrapa, 2011.
- SENTHIL, B. et al. Non-cytotoxic effect of green synthesized silver nanoparticles and its antibacterial activity. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [s.l.], v. 177, p.1-7, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.10.010>.
- SHENG, Zhiya et al. Contradictory effects of silver nanoparticles on activated sludge wastewater treatment. **Journal Of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 341, p.448-456, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.07.051>.
- SILVA, Flavia Martins da; LACERDA, Paulo Sérgio Bergo de; JONES JUNIOR, Joel. Desenvolvimento sustentável e química verde. **Química Nova**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.103-110, fev. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422005000100019>.
- SILVA, Luciane Dias da. **Síntese verde, caracterização e atividade biológica de nanopartículas de prata obtidas utilizando extratos de *Hancornia speciosa* Gomes - Apocynaceae (mangabeira)**. 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- SOCAS-RODRÍGUEZ, Bárbara et al. Recent applications of nanomaterials in food safety. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 96, p.172-200, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2017.07.002>.
- SOUSA-AGUIAR, Eduardo F. et al. GREEN CHEMISTRY: THE EVOLUTION OF A CONCEPT. **Química Nova**, [s.l.], p.1257-1261, 2014. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140212>.

- SOUZA, Volnei Brito de et al. Functional properties and stability of spray-dried pigments from Bordo grape (*Vitis labrusca*) winemaking pomace. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 164, p.380-386, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.049>.
- STRAPASSON, Giovanna Chipon. **Caracterização e utilização do resíduo de produção de vinho no desenvolvimento de alimentos com propriedade funcional**. 2016. 148 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.
- THANH, Nguyen T. K.; MACLEAN, N.; MAHIDDINE, S.. Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 114, n. 15, p.7610-7630, 8 jul. 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr400544s>.
- TEIXEIRA, Ana et al. Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 15, n. 9, p.15638-15678, 4 set. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms150915638>.
- TOALDO, Isabela Maia et al. Bioactive potential of *Vitis labrusca* L. grape juices from the Southern Region of Brazil: Phenolic and elemental composition and effect on lipid peroxidation in healthy subjects. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 173, p.527-535, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.171>.
- TORRESI, Susana I. Córdoba de; PARDINI, Vera L.; FERREIRA, Vitor F.. O que é sustentabilidade? **Química Nova**, [s.l.], v. 33, n. 1, p.1-1, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422010000100001>.
- VELGOSOVÁ, Oksana; MRAŽÍKOVÁ, Anna; MARCINČÁKOVÁ, Renáta. Influence of pH on green synthesis of Ag nanoparticles. **Materials Letters**, [s.l.], v. 180, p.336-339, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2016.04.045>.

- VIJAYARAGHAVAN, K.; ASHOKKUMAR, T.. Plant-mediated biosynthesis of metallic nanoparticles: A review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications. **Journal Of Environmental Chemical Engineering**, [s.l.], v. 5, n. 5, p.4866-4883, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2017.09.026>.
- YILMAZ, Yusuf et al. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. **Journal Of Food Composition And Analysis**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.41-48, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2004.10.009>.
- WATERHOUSE, Geoffrey I. N.; BOWMAKER, Graham A.; METSON, James B.. The thermal decomposition of silver (I, III) oxide: A combined XRD, FT-IR and Raman spectroscopic study. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [s.l.], v. 3, n. 17, p.3838-3845, 2001. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b103226g>.