



Universidade de Caxias do Sul

Pró-Reitoria de Pesquisa, Inovação e Desenvolvimento Tecnológico

Coordenadoria de Pesquisa e Pós-Graduação *Stricto Sensu*

Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais

JORDANA BORTOLUZ

**OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE POR SÍNTESE  
VERDE A PARTIR DO EXTRATO DE FOLHAS DE LARANJEIRA E AVALIAÇÃO  
DE SUA AÇÃO ANTIMICROBIANA EM FILMES DE LÁTEX DE BORRACHA  
NATURAL**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Giovanela

Coorientadora: Profa. Dra. Janaina da Silva Crespo

Caxias do Sul

2025

JORDANA BORTOLUZ

**OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE POR SÍNTESE  
VERDE A PARTIR DO EXTRATO DE FOLHAS DE LARANJEIRA E AVALIAÇÃO  
DE SUA AÇÃO ANTIMICROBIANA EM FILMES DE LÁTEX DE BORRACHA  
NATURAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de Doutora em Engenharia e Ciência dos Materiais, com a orientação do Prof. Dr. Marcelo Giovanela e coorientação da Profa. Dra. Janaina da Silva Crespo.

Caxias do Sul, 2025

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

B739o Bortoluz, Jordana

Obtenção de nanopartículas de óxido de cobre por síntese verde a partir do extrato de folhas de laranjeira e avaliação de sua ação antimicrobiana em filmes de látex de borracha natural [recurso eletrônico] / Jordana Bortoluz. – 2025.

Dados eletrônicos.

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, 2025.

Orientação: Marcelo Giovanela.

Coorientação: Janaina da Silva Crespo.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Látex. 2. Laranjeira. 3. Nanopartículas. 4. Materiais biomédicos. 5. Ciência dos materiais. I. Giovanela, Marcelo, orient. II. Crespo, Janaina da Silva, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 678.031

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)  
Márcia Servi Gonçalves - CRB 10/1500

Jordana Bortoluz

**OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE POR SÍNTESE  
VERDE A PARTIR DO EXTRATO DE FOLHAS DE LARANJEIRA E AVALIAÇÃO  
DE SUA AÇÃO ANTIMICROBIANA EM FILMES DE LÁTEX DE BORRACHA  
NATURAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de Doutora em Engenharia e Ciência dos Materiais.

Caxias do Sul, 29 de abril de 2025

**Orientadores:**

Prof. Dr. Marcelo Giovanela (orientador)

*Universidade de Caxias do Sul*

Profa. Dra. Janaina da Silva Crespo (coorientadora)

*Universidade de Caxias do Sul*

**Banca examinadora:**

Prof. Dr. Cláudio Antônio Perottoni

*Universidade de Caxias do Sul*

Dra. Nayrim Brizuela Guerra

*Universidade Estadual Paulista*

Profa. Dra. Larissa Nardini Carli

*Universidade Federal de Santa Catarina*

Prof. Dra. Suelem Daiane Ferreira

*Universidade de Caxias do Sul*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Jorge Bortoluz** e **Márcia Maria Panzenhagen Bortoluz**, pelo amor, carinho, incentivo e apoio fornecido, não só no doutorado, mas durante toda a minha jornada. Eu tenho os melhores pais do mundo! Sem vocês minha vida não teria sentido algum. À minha fiel companheira felina, **Olga Cristina**, pelas fofurices e por nos proporcionar tantos momentos de alegria.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Marcelo Giovanela**, por todo o conhecimento, dedicação, e amizade. Não tenho palavras para dimensionar a gratidão que sinto pela oportunidade que tive de trabalhar esses 10 anos contigo, os quais pude crescer muito! Ainda me lembro de quando recebi o convite para ser bolsista de iniciação científica no seu laboratório, e da insegurança que sentia de não ser boa o suficiente. No entanto, você sempre acreditou em mim, teve muita paciência e me incentivou a continuar. Você é um ser humano incrível, com um coração gigante e alguém que considero ser o exemplo de profissional que desejo ser. Obrigada por tudo!

À minha coorientadora, **Profa. Dra. Janaina da Silva Crespo**, por ter me ligado e incentivado a fazer o doutorado – às vezes um empurrãozinho é importante – além de ter me acolhido como parte de seus orientandos. Muito obrigada por toda a ajuda, ideias e conselhos fornecidos durante nossas reuniões e, também, por ter se tornado uma amiga. Além de ótima coorientadora, você também é excelente como coordenadora do PPGMAT.

À **Profa. Dra. Mariana Roesch-Ely**, por disponibilizar seu laboratório para a realização de todos os ensaios microbiológicos deste trabalho, além de me auxiliar, muitas vezes, na resolução de problemas e desafios que encontrei durante os experimentos. À **Profa. Dra. LÍlian Vanessa Rossa**, pelo treinamento concedido para o uso do potenciostato e por disponibilizar o laboratório para a realização dos ensaios de voltametria cíclica. À **Profa. Dra. Giovanna Machado** pelas imagens de MET.

Ao meu irmão, não de sangue, mas de coração, **Leonardo Mathias Leidens**, pelo companheirismo, por todas as vezes que me ajudou e aconselhou quando tive dificuldades – tanto em questões pessoais, quanto profissionais – e pelos 30 anos de amizade. Saiba que te admiro muito e que tua amizade é muito importante pra mim!

Aos meus colegas de profissão e grandes amigos na vida, **Danielle Restelatto** e **Vinícius Bertoncello Molon**, por todas as conversas, almoços e por tantos momentos divertidos que vivemos juntos. Sou muito grata por termos nos unido durante o doutorado. Vocês são muito especiais e me dão muita força!

Aos meus colegas de laboratório e do PPGMAT. Agradeço à **Paula Sartori**, que além de ser uma amiga muito querida, me ensinou tudo que sei sobre bactérias e ensaios microbiológicos. À **Camila Suliani Raota**, pela amizade, por todas as conversas e risadas, e por ter me ajudado no início deste trabalho, relatando toda sua experiência com síntese verde. Ao **Axel John Pascal Jacquot**, que veio da França fazer seu estágio de pesquisa e que, em tão pouco tempo, tornou-se meu companheiro de lanches, academia e um grande amigo. Aos queridos **Aline Lucchesi Schio**, **Andressa Bystronski**, **Cristian Padilha Fontoura**, **Juliana Zanol Merck**, **Keilla Gomes Machado**, **Leonardo Davi Bonatto**, **Lucas Colombo Colissi**, **Michele Strey de Lima**, **Nayrim Brizuela Guerra**, **Rônei de Almeida Aragão** e **Vitória Bertelli**, obrigada pelas conversas e ideias trocadas enquanto estávamos trabalhando no laboratório, pela amizade e por todos os cafés.

À técnica de laboratório e amiga **Julcimára Santos Rossi**, por tantas vezes ter me ajudado disponibilizando equipamentos, mas também pelas conversas, conselhos e risadas. Agradeço também às técnicas **Magda Matos de Borba** e **Sonia Blankenburg** por toda a ajuda concedida durante a realização de experimentos. Ao **Rodrigo Antonio Barbieri** pelas análises de DRX, MEV-FEG e EDS.

À secretária do PPGMAT, **Cristina Rech**, pela atenção, dedicação e paciência.

Aos professores do **PPGMAT** e da **UCS**, que tanto contribuíram para a minha formação.

À **CAPES** pela bolsa de doutorado.

Por fim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

“Hoje, ainda almejamos saber por que estamos aqui e de onde viemos.  
O desejo profundo da humanidade pelo conhecimento é justificativa  
suficiente para nossa busca continua”

**Stephen Hawking**

## RESUMO

O látex de borracha natural (NRL) é um biopolímero de origem vegetal amplamente empregado na fabricação de materiais, como luvas e curativos. Por ser utilizado em aplicações com contato direto com a pele, o NRL deve ser isento de compostos alergênicos e, idealmente, apresentar propriedades antimicrobianas. Nesse contexto, as nanopartículas (NPs) de óxidos metálicos têm despertado crescente interesse, pois podem ser obtidas de forma sustentável por meio de processos verdes e incorporadas a matrizes poliméricas, conferindo-lhes atividade antimicrobiana. Nesse contexto, o presente estudo teve por objetivo investigar os parâmetros experimentais envolvidos na síntese de NPs de óxido de cobre (CuONPs) a partir de extrato aquoso de folhas de laranjeira (*Citrus sinensis*), utilizando dois sais de cobre: acetato de cobre(II) monohidratado ( $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e nitrato de cobre(II) trihidratado ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ). Além disso, foram avaliadas as características químicas, morfológicas e antimicrobianas das NPs obtidas, bem como sua incorporação ao NRL e os efeitos resultantes sobre as propriedades antimicrobianas do material resultante, visando sua potencial aplicação como biomaterial. Os testes iniciais indicaram que o extrato das folhas de laranjeira tem potencial para ser utilizado na síntese verde de CuONPs. Sob condições otimizadas, o extrato apresentou uma concentração de compostos fenólicos de 26,73 mg EAG g<sup>-1</sup> de folhas e uma capacidade antioxidante de 80%. Os resultados relativos à síntese verde mostraram que os parâmetros experimentais exercem influência nas propriedades estruturais e antimicrobianas das CuONPs. O pH do meio ajustado para 7,0, a temperatura de calcinação de 300 °C e a concentração de 10 g L<sup>-1</sup> de  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  foram os parâmetros ideais para a obtenção das NPs. A voltametria cíclica, por sua vez, evidenciou que a mudança do pH do meio desprotona os grupos hidroxila presentes nos compostos fenólicos do extrato de *Citrus sinensis*, que complexam os íons Cu(II) antes da formação das CuONPs. Por fim, verificou-se que as CuONPs obtidas apresentaram tamanho médio de 20-30 nm e que as mesmas podem ser incorporadas em filmes de NRL, mantendo atividade bacteriostática contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os dados obtidos não apenas abrem novas perspectivas para aplicações biomédicas inovadoras, mas também ressaltam a importância da sustentabilidade na ciência dos materiais.

**Palavras-chave:** folhas de laranjeira; síntese verde; nanopartículas de óxido de cobre; caracterização; látex de borracha natural; ensaios microbiológicos

## ABSTRACT

Natural rubber latex (NRL) is a plant-derived biopolymer widely used in the manufacture of materials such as gloves and dressings. Due to its use in applications involving direct contact with the skin, NRL must be free from allergenic compounds and, ideally, exhibit antimicrobial properties. In this context, metal oxide nanoparticles (NPs) have attracted increasing interest, as they can be sustainably produced through green synthesis processes and incorporated into polymeric matrices, endowing them with antimicrobial activity. In this context, this study aimed to investigate the experimental parameters involved in the synthesis of copper oxide nanoparticles (CuONPs) using an aqueous extract of orange leaves (*Citrus sinensis*), employing two copper salts: copper(II) acetate monohydrate ( $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) and copper(II) nitrate trihydrate ( $(\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O})$ ). Furthermore, the chemical, morphological, and antimicrobial characteristics of the synthesized NPs were evaluated, as well as their incorporation into NRL and the resulting effects on the antimicrobial properties of the final material, aiming at their application as a biomaterial. Preliminary tests indicated that the orange leaf extract has potential for use in the green synthesis of CuONPs. Under optimized conditions, the extract showed a phenolic compound concentration of 26.73 mg GAE  $\text{g}^{-1}$  of leaves and an antioxidant capacity of 80%. The green synthesis results demonstrated that the experimental parameters influence the structural and antimicrobial properties of CuONPs. The ideal parameters for NP synthesis were pH adjusted to 7.0, calcination temperature of 300 °C, and  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  of 10 g  $\text{L}^{-1}$ . Cyclic voltammetry analysis revealed that changing the pH of the medium leads to deprotonation of hydroxyl groups in the phenolic compounds from the *Citrus sinensis* extract, which complex with Cu(II) ions prior to CuONP formation. Finally, the synthesized CuONPs exhibited an average size of 20-30 nm and were successfully incorporated into NRL films, maintaining bacteriostatic activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains. The findings not only open new perspectives for innovative biomedical applications but also highlights the importance of sustainability in materials science.

**Keywords:** orange leaves; green synthesis; copper oxide nanoparticles; characterization; natural rubber latex; microbiological assays

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
1.1 OBJETIVOS .....	14
1.1.1 Objetivo geral .....	14
1.1.2 Objetivos específicos .....	15
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>17</b>
2.1 LÁTEX DE BORRACHA NATURAL .....	17
2.1.1 Propriedades antimicrobianas do NRL .....	20
2.1.1 Vulcanização do NRL.....	23
2.2 NANOTECNOLOGIA .....	25
2.2.1 CuONPs .....	28
2.3 BIOMATERIAIS À BASE DE NRL E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS E DE ÓXIDOS METÁLICOS COM PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS .....	42
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>48</b>
3.1 MATERIAIS .....	48
3.2 SÍNTESE VERDE DE CuONPS.....	49
3.2.1 Preparação e caracterização do extrato de folha de <i>Citrus sinensis</i> .....	49
3.2.2 Otimização dos parâmetros experimentais de síntese verde.....	52
3.2.3 Voltametria cíclica.....	56
3.2.4 Caracterização das CuONPs .....	57
3.3 CONFECCÃO DE FILMES DE NRL CONTENDO CuONPs .....	58

3.4 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS .....	60
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
4.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE FOLHAS DE <i>CITRUS SINENSIS</i> .....	64
4.1.1 Quantificação de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu .....	64
4.1.2 Atividade antioxidante do extrato de folhas de <i>Citrus sinensis</i> .....	71
4.2 SÍNTESE VERDE DE CuONPs .....	73
4.2.1 Otimização dos parâmetros experimentais .....	73
4.2.2 Voltametria cíclica.....	95
4.2.3 Caracterização das CuONPs .....	100
4.2.4 Concentração mínima inibitória (CMI) .....	105
4.3 CONFECÇÃO DE FILMES DE NRL CONTENDO CuONPs.....	107
4.3.1 Surfactante .....	108
4.3.2 Incorporação de CuONPs à matriz de NRL .....	115
4.3.3 Quantidade de CuONPs.....	117
4.3.4 Aplicação das CuONPs obtidas por síntese verde em filmes de NRL .....	119
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>121</b>
<b>6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>124</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>126</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Processo “ <i>tapping</i> ” para coleta de NRL da <i>Hevea brasiliensis</i> .....	18
<b>Figura 2</b> - Representação dos principais constituintes do látex: <b>(a)</b> partículas de NR, <b>(b)</b> lutoídes, <b>(c)</b> partículas de Frey-Wyssling e <b>(d)</b> soro citoplasmático .....	19
<b>Figura 3</b> - Processo de centrifugação do NRL e as três fases distintas formadas após esse processo .....	22
<b>Figura 4</b> - Representação do processo de vulcanização por meio da adição de enxofre .....	24
<b>Figura 5</b> - Modelo comparativo de diversas estruturas em escala nanométrica .....	25
<b>Figura 6</b> - Dependência da cor das AuNPs em relação ao seu tamanho e forma .....	26
<b>Figura 7</b> - Taça <i>Lycurgus</i> em luz <b>(a)</b> refletida e <b>(b)</b> transmitida .....	27
<b>Figura 8</b> - Principais <b>(a)</b> características físico-químicas e estruturais, e <b>(b)</b> estrutura cristalina e aspecto visual do CuO.....	29
<b>Figura 9</b> - Abordagem <i>top-down</i> e <i>bottom-up</i> para a síntese de NPs .....	31
<b>Figura 10</b> - Mecanismo de formação das CuONPs utilizando o extrato de pó de henna .....	34
<b>Figura 11</b> - Diferenças das estruturas da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	41
<b>Figura 12</b> - Ensaio bactericida realizado por Rathnayake et al. (2014b) contra cepas <b>(a)</b> <i>E. coli</i> e <b>(b)</b> <i>S. aureus</i> .....	45
<b>Figura 13</b> - Reação entre o ácido gálico e o reagente de Folin-Ciocalteu .....	51
<b>Figura 14</b> - Sistema com refluxo utilizado na síntese das CuONPs .....	53

<b>Figura 15</b> - Partículas formadas (a) antes do processo de centrifugação; e partículas obtidas a partir dos precursores (b) $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e (c) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , após o processo de centrifugação.....	54
<b>Figura 16</b> - Ensaio microbiológico para a avaliação do efeito bacteriostático das amostras CuONPs e de NRL .....	61
<b>Figura 17</b> - Ensaio microbiológico para a avaliação do efeito bactericida das amostras de CuONPs e de NRL.....	62
<b>Figura 18</b> - Influência da secagem das folhas de <i>Citrus sinensis</i> e do solvente utilizado na preparação do extrato.....	65
<b>Figura 19</b> - Influência da temperatura do solvente na preparação do extrato de folhas de <i>Citrus sinensis</i> .....	68
<b>Figura 20</b> - Influência do tempo de contato na preparação do extrato de folhas de <i>Citrus sinensis</i> .....	70
<b>Figura 21</b> - Reação de redução do radical DPPH .....	71
<b>Figura 22</b> - Diferentes diluições do extrato da folha de <i>Citrus sinensis</i> em contato direto com o radical DPPH (da esquerda para direita tem-se a amostra de extrato puro, seguido de suas diluições de 75, 50 e 25%, respectivamente).....	72
<b>Figura 23</b> - Difrátogramas de raios X das amostras comerciais de (a) CuONPs e (b) CuO comparadas a (c) carta com picos de difração característicos de CuO .....	74
<b>Figura 24</b> - Ensaios microbiológicos utilizando as amostras comerciais de CuONPs e CuO. Em (a) e (c) encontram-se os resultados referentes aos ensaios que avaliaram o efeito bacteriostático contra as cepas de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> , respectivamente; em (b) e (d) encontram-se os resultados que avaliaram o efeito bactericida contra as cepas de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> , respectivamente .....	76

**Figura 25** - Difractogramas de raios X das amostras obtidas pelas metodologias propostas nas sínteses das categorias “B” e “C”. As condições experimentais utilizadas foram: (a)  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (II) e pH = 7,0; (b)  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  e pH = 7,0; (c)  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (II) e pH = 10,0; (d)  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (II) e pH = 10,0. **Observação:** nenhuma dessas amostras foi calcinada. .... 79

**Figura 26** - Difractogramas de raios X das amostras de CuONPs obtidas por meio da síntese da categoria “D”, utilizando pH = 7,0, os sais (a)  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e (b)  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  e uma temperatura de calcinação de 400 °C comparadas a (c) carta com picos de difração característicos de CuO ..... 81

**Figura 27** - Difractogramas de raios X das amostras de CuONPs obtidas por meio da síntese da categoria “E”, utilizando pH = 10,0, os sais (a)  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e (b)  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  e uma temperatura de calcinação de 400 °C comparadas a (c) carta com picos de difração característicos de CuO ..... 82

**Figura 28** - Ensaios microbiológicos com amostras obtidas por meio das sínteses “D1” e “D2”. Em (a) e (c) encontram-se os resultados dos ensaios que avaliaram o efeito bacteriostático contra as cepas de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente; e em (b) e (d) os resultados dos ensaios que avaliaram o efeito bactericida contra as cepas de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente ..... 84

**Figura 29** - Ensaios microbiológicos com amostras obtidas por meio das sínteses “E1” e “E2”. Em (a) e (c) encontram-se os resultados dos ensaios que avaliaram o efeito bacteriostático contra as cepas de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente; e em (b) e (d) os resultados dos ensaios que avaliaram o efeito bactericida contra as cepas de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente ..... 85

**Figura 30** - Difractogramas de raios X das amostras de CuONPs obtidas por meio da síntese da categoria “F”, utilizando pH = 7,0, os sais (a)  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e (b)  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$

· 3H<sub>2</sub>O e uma temperatura de calcinação de 200 °C comparadas a (c) carta com picos de difração característicos de CuO e a (d) carta com picos de difração característicos de Cu<sub>2</sub>O..... 87

**Figura 31** - Ensaio microbiológico com amostras de CuONPs obtidas por meio das metodologias propostas nas sínteses da categoria “F”. Em (a) e (c) encontram-se os resultados dos ensaios que avaliaram o efeito bacteriostático contra as cepas de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente; e em (b) e (d) os resultados dos ensaios que avaliaram o efeito bactericida contra as cepas de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente ..... 90

**Figura 32** - Difratoformas de raios X das amostras de CuONPs obtidas por meio da síntese da categoria “G”, utilizando pH = 7,0, os sais (a) Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O e (b) Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 3H<sub>2</sub>O e uma temperatura de calcinação de 300 °C comparadas a (c) carta com picos de difração característicos de CuO e a (d) carta com picos de difração característicos de Cu<sub>2</sub>O..... 91

**Figura 33** - Ensaio microbiológico utilizando as amostras de CuONPs obtidas por meio da síntese da categoria “G”. Em (a) e (c) encontram-se os resultados dos ensaios que avaliaram o efeito bacteriostático contra as cepas de *E. coli* e de *S. aureus*, respectivamente; e em (b) e (d) os resultados dos ensaios que avaliaram o efeito bactericida contra as cepas de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente ..... 93

**Figura 34** - Voltamogramas cíclicos do (a) Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O em diferentes concentrações; (b) do eletrólito de suporte KCl comparado ao Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O na concentração inicial da síntese; (c) do extrato de folhas *Citrus sinensis* comparado ao Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O na concentração inicial da síntese; (d) da amostra obtida a partir da síntese “G1” antes do tratamento térmico comparado ao Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O na concentração inicial da síntese; (e) da amostra obtida a partir da síntese “G1” sem mudança de pH inicial do meio comparado ao Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O na concentração inicial da síntese..... 96

**Figura 35** - Gráfico de distribuição de espécies de Cu(II) em meio aquoso em função do pH ..... 98

<b>Figura 36</b> - Mecanismo de ação do extrato de folhas de <i>Citrus sinensis</i> na síntese verde de CuONPs usando a eriocitrina como composto modelo .....	99
<b>Figura 37</b> - Micrografias de MEV-FEG da (a) amostra comercial de CuONPs e das (b) CuONPs obtidas por meio da metodologia proposta na síntese “G1” .....	101
<b>Figura 38</b> - Espectros de EDS da (a) amostra comercial de CuONPs e das (b) CuONPs obtidas por meio da metodologia proposta na síntese “G1” .....	102
<b>Figura 39</b> - Imagens de MET da (a) amostra comercial de CuONPs e das (b) CuONPs obtidas por meio da metodologia proposta na síntese “G1” com os respectivos histogramas de distribuição de tamanho.....	104
<b>Figura 40</b> - Ensaios para a avaliação da CMI utilizando a cepa de <i>E. coli</i> com a (a) amostra comercial de CuONPs e as (b) CuONPs obtidas por meio da síntese “G1”.....	106
<b>Figura 41</b> - Ensaios para a avaliação da CMI utilizando a cepa de <i>S. aureus</i> com a (a) amostra comercial de CuONPs e as (b) CuONPs obtidas por meio da síntese “G1”.....	106
<b>Figura 42</b> - Filme de NRL contendo CuONPs comerciais preparado com hidróxido de amônio como surfactante: (a) aspecto físico do filme; (b) e (d) ensaios microbiológicos contra a cepa de <i>S. aureus</i> ; e (c) e (e) ensaios microbiológicos com a cepa de <i>E. coli</i> .....	109
<b>Figura 43</b> - Fotografias registradas durante o ensaio de avaliação do hidróxido de amônio como surfactante: (a) resíduos de CuONPs e agentes de vulcanização que não foram adequadamente dispersados; (b) processo de incorporação das CuONPs e dos agentes de vulcanização na matriz de NRL.....	110
<b>Figura 44</b> - Estrutura química do surfactante Tween 80 .....	111
<b>Figura 45</b> - Filmes de NRL contendo CuONPs comerciais preparados com Tween 80 como surfactante: (a) processo de incorporação das CuONPs e dos agentes de vulcanização na matriz de NRL; (b) e (c) aspecto físico do filme das amostras “B1” e “B2”, respectivamente .....	112

<b>Figura 46</b> - Estrutura química do surfactante Triton X-100 .....	113
<b>Figura 47</b> - Filmes de NRL contendo CuONPs comerciais preparado com Triton X-100 como surfactante: aspecto físico dos filmes <b>(a)</b> “C1” e <b>(d)</b> “C2”; <b>(b)</b> e <b>(e)</b> ensaios microbiológicos contra a cepa de <i>S. aureus</i> ; em <b>(c)</b> e <b>(f)</b> ensaios microbiológicos contra a cepa de <i>E. coli</i> .....	114
<b>Figura 48</b> - Filme de NRL sem a adição de CuONPs em sua composição: <b>(a)</b> aspecto físico do filme; <b>(b)</b> e <b>(d)</b> ensaios microbiológicos contra a cepa de <i>S. aureus</i> ; <b>(c)</b> e <b>(e)</b> ensaios microbiológicos contra a cepa de <i>E. coli</i> .....	116
<b>Figura 49</b> - Filmes de NRL contendo diferentes quantidades de CuONPs comerciais em sua composição: <b>(a)</b> e <b>(d)</b> aspecto físico dos filmes contendo 1,04 e 2,03 phr de NPs, respectivamente; <b>(b)</b> e <b>(e)</b> ensaios microbiológicos contra a cepa de <i>S. aureus</i> ; <b>(c)</b> e <b>(f)</b> ensaios microbiológicos contra a cepa de <i>E. coli</i> .....	118
<b>Figura 50</b> - Ensaios microbiológicos com os filmes de NRL contendo as CuONPs produzidas por meio da síntese “G1” contra as cepas de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> .....	119

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Metodologias de síntese verde de CuONPs reportadas na literatura (continua).....	35
<b>Tabela 2</b> - Relação das condições de extração otimizadas e dos parâmetros experimentais de cada ensaio .....	50
<b>Tabela 3</b> - Diferentes metodologias avaliadas para a síntese verde de CuONPs com o extrato de <i>Citrus sinensis</i> .....	55
<b>Tabela 4</b> - Quantidades dos agentes de vulcanização utilizados na confecção dos filmes de NRL .....	59
<b>Tabela 5</b> - Lista de surfactantes testados e suas respectivas quantidades .....	60

## LISTA DE SIGLAS, TERMOS E ABREVIACOES

<b>Ac</b>	Absorvncia da amostra controle
<b>A<sub>E</sub></b>	Absorvncia da amostra do extrato
<b>AgNPs</b>	Nanoprticulas de prata
<b>AuNPs</b>	Nanoprticulas de ouro
<b>NR</b>	<i>Natural rubber</i>
<b>CitrusBr</b>	Associao Nacional dos Exportadores de Sucos Ctricos
<b>CuONPs</b>	Nanoprticulas de óxido de cobre
<b>DO</b>	Densidade ptica
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilidrazila
<b>DRX</b>	Difraco de raios X
<b>EAG</b>	Equivalentes de cido glico
<b>eV</b>	eltron-Volt
<b>°C</b>	graus Celsius
<b>h</b>	Horas
<b>IRSG</b>	<i>International Rubber Study Group</i>
<b>NRL</b>	<i>Natural rubber latex</i>
<b>µL</b>	Microlitro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mmol L<sup>-1</sup></b>	Milimol por litro
<b>MPa</b>	Megapascal
<b>nm</b>	Nanmetro
<b>NPs</b>	Nanoprticulas
<b>P.A.</b>	Para anlise
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico

<b>phr</b>	Partes por cem de borracha
<b>%m/m</b>	Percentual massa por massa
<b>%v/v</b>	Percentual volume por volume
<b>RS</b>	Rio Grande do Sul
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i>
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>s</b>	Segundos
<b>SCE</b>	<i>Saturated calomel electrode</i>
<b>UFC mL<sup>-1</sup></b>	Unidades formadoras de colônia por mililitro
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>ZnONPs</b>	Nanopartículas de óxido de zinco

## 1 INTRODUÇÃO

O látex de borracha natural (NRL) é um material de grande importância para a indústria pelo fato de apresentar, após o processo de vulcanização, propriedades físicas únicas, como alta elasticidade, resiliência e resistência ao desgaste. Essas características fazem com que esse material seja amplamente utilizado para produzir materiais na área da saúde, como luvas e cateteres; na área automotiva, como pneus e mangueiras; além de poder ser empregado na fabricação de balões e preservativos (BOTTIER, 2020; KURIAN; MATHEW, 2011; PINTO-SALAMANCA; RIGAIL-CEDEÑO; MENDOZA OLIVEROS, 2020). De acordo com o *Grand View Research*, a produção global de borracha natural em 2023 foi de aproximadamente 14,5 milhões de toneladas, sendo, atualmente, a Tailândia e a Indonésia, os maiores produtores e exportadores de NRL do mundo.

O NRL possui uma composição química bastante complexa. No entanto, pode-se dizer que as moléculas de poli(*cis*-1,4-isopreno) são predominantes em sua estrutura (BOTTIER, 2020). O NRL possui também algumas proteínas que, conforme mostram alguns estudos (ARAKKAL et al., 2021; BERTHELOT; PERUCH; LECOMTE, 2016; BOONRASRI; SAE-OUI; RACHTANAPUN, 2020; CHURNGCHOW; SUNTARO; WITTSUWANNNAKUL, 1995; DARULIZA et al., 2011; GIORDANI et al., 1999; KANOKWIROON et al., 2008; VAN PARIJS et al., 1991), apresentam atividade antimicrobiana. Entretanto, as proteínas de alta massa molar são frequentemente removidas por meio do processo de centrifugação, visando evitar alergias pelo contato direto da pele humana com os artefatos produzidos a partir desse material (DE BARROS et al., 2016; HERCULANO et al., 2009, 2011; MIRANDA et al., 2018a). Isso pode, no entanto, contribuir para a proliferação de micro-organismos, como bactérias e fungos, que podem causar danos à saúde humana e gerar um problema ainda maior quando esse material é aplicado na área da saúde como um biomaterial. Para tentar minimizar

esse problema, vários estudos têm sido conduzidos para desenvolver agentes antimicrobianos para o NRL (KRAINOI et al., 2021; MAM; DANGTUNGEE, 2019; RATHNAYAKE et al., 2014a, 2012, 2014b).

Nesse contexto, as nanopartículas (NPs) têm recebido muita atenção em função de suas propriedades, especialmente no que diz respeito à sua alta área superficial específica (KUMAR et al., 2021; SANTOS et al., 2015). Essa característica permite que as NPs apresentem uma grande variedade de aplicações, incluindo a sua utilização como agentes antimicrobianos em diversos materiais. Um aumento do caráter antimicrobiano contra diversas espécies de bactérias (Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Salmonella*, e Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*) tem sido observado, sobretudo quando NPs metálicas e de óxidos metálicos são empregadas (GARZA-CERVANTES et al., 2017; GRIGORE et al., 2016; PRABHU; POULOSE, 2012). Dessa forma, essas partículas podem ser utilizadas como coadjuvantes ou substitutos de antibióticos convencionais no combate à resistência bacteriana, em particular contra bactérias Gram-negativas, que apresentam maior patogenicidade e resistência aos antibióticos (EREN; BAYSAL; DOĞAN, 2020).

As nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs) são um exemplo de NPs de óxido metálico que têm despertado o interesse da comunidade científica nos últimos 20 anos, uma vez que resultados satisfatórios em relação à sua aplicação contra o crescimento de bactérias e fungos têm sido observados (KALAIYAN et al., 2020; KUMAR et al., 2015; NAIKA et al., 2015; VELSANKAR et al., 2020). A utilização dessas NPs torna-se ainda mais atraente, pois, quando comparadas às de prata, por exemplo, são economicamente mais viáveis, chegando a ser quase 10 vezes mais baratas (MALLAKPOUR; AZADI; MUSTANSAR HUSSAIN, 2020).

Outro aspecto bastante interessante é que as CuONPs podem ser preparadas por síntese verde, a partir da utilização do extrato de diferentes partes de plantas que podem ser facilmente encontradas na natureza. Isso evita o emprego de reagentes químicos caros e que nem sempre

são ambientalmente amigáveis (BANDEIRA et al., 2020a; CUONG et al., 2022). Folhas de *Simarouba glauca* (KALAIYAN et al., 2020), pedaços da casca de *Punica granatum* (SIDDIQUI et al., 2021), frutos de *Hyphaene thebaica* (MOHAMED; THEMA; DHLAMINI, 2021), raízes de *Berberis lycium* (AIN; SAFDAR; YASMIN, 2019) e alho cru (*Allium sativum*) (VELSANKAR et al., 2020) são alguns exemplos de plantas que já foram utilizadas com sucesso na síntese verde de CuONPs.

As folhas de laranjeiras (*Citrus sinensis*), por sua vez, são uma interessante fonte de flavonoides naturais e outros compostos fenólicos para a síntese verde de CuONPs (LAGHA-BENAMROUCHE; MADANI, 2013). As árvores de laranjeira, amplamente cultivadas em todo o mundo, têm grande importância econômica, pois estão diretamente ligadas à produção de frutos, sucos de laranja e óleos essenciais (CHI et al., 2020; GARCIA et al., 2017). Para ilustrar sua relevância, o Brasil produziu, na safra de 2023/2024, cerca de 307 milhões de caixas de laranja de 40,8 kg, segundo dados do Fundo de Defesa da Citricultura (*Fundecitrus*).

Considerando todos esses aspectos, este trabalho teve por objetivo principal produzir CuONPs por síntese verde, utilizando o extrato de folhas de *Citrus sinensis*, para posterior aplicação dessas partículas em filmes de NRL. Além disso, foram investigadas as propriedades antimicrobianas de filmes de NRL contendo CuONPs, com o intuito de abrir novas perspectivas de aplicação do material resultante na área de biomateriais.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho é investigar os parâmetros experimentais envolvidos na síntese de CuONPs a partir do extrato aquoso de folhas de laranjeira (*Citrus*

*sinensis*), bem como avaliar as características químicas, morfológicas e antimicrobianas das NPs obtidas. Além disso, pretende-se incorporar as CuONPs ao NRL e avaliar a sua influência nas propriedades antimicrobianas do material resultante, visando sua potencial aplicação como biomaterial.

### 1.1.2 Objetivos específicos

a) Avaliar as melhores condições experimentais para a preparação do extrato de folhas de *Citrus sinensis*, caracterizando as amostras obtidas por meio da quantificação de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu e da sua atividade antioxidante com o reagente DPPH;

b) Sintetizar as CuONPs por síntese verde, a partir do extrato de folhas de *Citrus sinensis*, avaliando a influência de vários parâmetros experimentais (pH inicial do meio, temperatura de calcinação e tipo e concentração de sal precursor) nas características estruturais e cristalinas, bem como na atividade antimicrobiana do material resultante;

c) Comparar CuONPs comerciais com as amostras obtidas por síntese verde por meio da caracterização por difração de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) acoplada à espectroscopia de energia dispersiva (EDS), e microscopia eletrônica de transmissão (TEM);

d) Avaliar a capacidade antimicrobiana das CuONPs obtidas contra cepas de *S. aureus* e *E. coli* e compará-las com amostras comerciais por meio de testes de disco-difusão e diluição em caldo;

e) Compreender o mecanismo de ação do extrato de folhas de *Citrus sinensis* na síntese verde de CuONPs com o auxílio da técnica de voltametria cíclica;

f) Preparar filmes de NRL vulcanizados, avaliando a utilização do hidróxido de amônio, Tween 80 e Triton X-100 como surfactantes para dispersão dos agentes de vulcanização e das NPs, além de testar diferentes teores de CuONPs na composição desses filmes;

g) Avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes de NRL obtidos contra as cepas de *S. aureus* e *E. coli* por meio de testes de disco-difusão e diluição em caldo.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 LÁTEX DE BORRACHA NATURAL

O NRL é um líquido branco leitoso que exsuda da casca da seringueira *Hevea brasiliensis*, espécie nativa da Floresta Amazônica brasileira. Em termos biológicos, trata-se do citoplasma de células laticíferas interconectadas, que formam vasos organizados em anéis concêntricos no floema e que são especializadas na síntese de *cis*-1,4-poliisopreno, também conhecido como borracha natural (NR) (BOTTIER, 2020). O NRL, produzido por essa árvore, possui grande importância em virtude de suas características excepcionais, podendo ser utilizado como matéria-prima para a produção industrial de diversos artefatos, como na fabricação de luvas, preservativos, elásticos, balões, travesseiros e colchões de espuma, entre outros (KURIAN; MATHEW, 2011; PINTO-SALAMANCA; RIGAIL-CEDENO; MENDOZA OLIVEROS, 2020).

A obtenção do NRL da *Hevea brasiliensis* ocorre por meio de um processo conhecido como “*tapping*” (**Figura 1**), no qual os vasos presentes na casca são abertos por meio da remoção de uma fina lasca (cerca de 1,0 mm de espessura), atingindo uma profundidade próxima ao câmbio. O corte em espiral é feito em um ângulo de aproximadamente 30° em relação à horizontal, da esquerda superior para a direita inferior (BOTTIER, 2020).

O NRL está presente nos vasos da árvore sob alta pressão hidrostática (aproximadamente 1,0 a 1,9 MPa), que é chamado de turgor. Esse turgor atinge seu máximo antes do nascer do sol, razão pela qual o *tapping* é realizado no início da manhã para obter um melhor rendimento (KURIAN; MATHEW, 2011; NAIR, 2021). Uma seringueira madura pode produzir entre 10 e 20 g de NRL por dia, que é coletado em copos fixados ao tronco

(BRÜNING, 2015). Depois de fluir por várias horas, os vasos formam um coágulo. Se for necessário reabrir no dia seguinte, o NRL flui novamente (SEMEGEN, 2003).

**Figura 1** - Processo “*tapping*” para coleta de NRL da *Hevea brasiliensis*



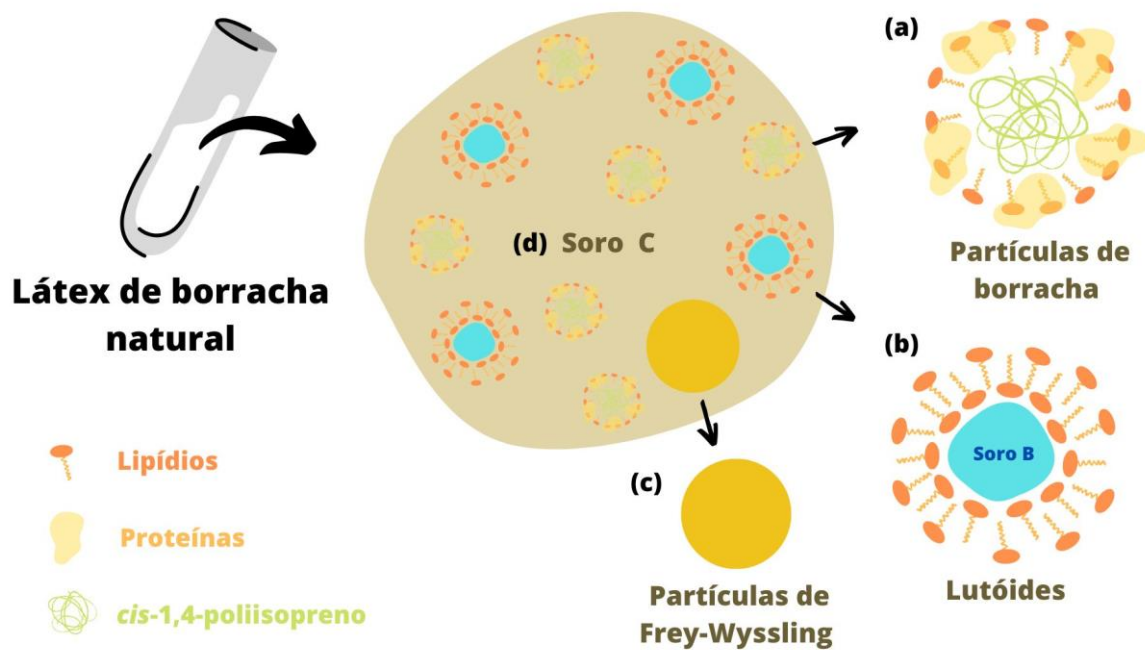
**Fonte:** Bottier (2020)

Após a coleta, o NRL deve ser processado imediatamente. Caso contrário, a adição de aditivos se torna necessária para evitar a coagulação espontânea da borracha. Para estabilizar o NRL são comumente utilizados conservantes como amônia (0,01%), sulfito de sódio (0,05%) ou formaldeído (0,02%) (SEMEGEN, 2003). Dentre esses, a amônia é o conservante mais empregado, pois eleva o seu pH, inibindo a atividade microbiana por um longo período de tempo (DO NASCIMENTO et al., 2019; KURIAN; MATHEW, 2011). Antes de qualquer modificação química, esse material é constituído de aproximadamente 35,0% de *cis*-1,4-poliisopreno, 1,5% de proteínas, 1,3% de lipídios, 1,5% de carboidratos, 0,5% de minerais, 0,5% de solutos orgânicos e 59,7% de água (BOTTIER, 2020).

Em termos estruturais, o NRL é uma dispersão coloidal composta por partículas de diferentes tamanhos (variando de nanômetros a microns), recobertas por uma fina camada de

proteínas, lipídios e longas cadeias de ácidos graxos, o que confere às partículas uma carga negativa e assegura a estabilidade coloidal do meio. O material presente no NRL pode ser dividido nos seguintes componentes: partículas de borracha (37 a 67% m/m de látex fresco), lutoídes (12% a 22% m/m de látex fresco) e partículas de Frey-Wyssling (2% a 3% m/m de látex fresco), todos eles dispersos no soro citoplasmático (soro C) (18 a 29% m/m de látex fresco) (BOTTIER, 2020). A **Figura 2** ilustra a composição do látex descrita acima.

**Figura 2** - Representação dos principais constituintes do látex: (a) partículas de NR, (b) lutoídes, (c) partículas de Frey-Wyssling e (d) soro citoplasmático



Fonte: adaptado de Bottier (2020)

As partículas de borracha são consideradas os constituintes mais importantes do NRL. Elas são feitas de uma monocamada de lipídios e proteínas que envolvem um núcleo hidrofóbico de cadeias de poli(*cis*-1,4-isopreno) (BOTTIER, 2020). Em 1991, Tanaka (1991) mostrou que essas cadeias poliméricas são compostas por um grupo iniciador (chamado de  $\omega$ ), duas unidades de poli(*trans*-1,4-isopreno), uma longa sequência de unidades de *cis*-1,4-

isopreno e um grupo terminal (chamado de  $\alpha$ ). É importante ressaltar que os lipídios e as proteínas que envolvem essas cadeias poliméricas desempenham um papel fundamental na estabilização das partículas do látex (NAIR, 2021).

O segundo constituinte mais abundante é o soro C, que concentra os demais componentes presentes no NRL. As partículas lutoides são compostas por uma camada dupla de moléculas lipídicas em torno de um núcleo hidrofílico feito de soro B, que é um desestabilizador do hidrocarboneto de borracha (BOTTIER, 2020; NAIR, 2021). O soro B é rico em várias enzimas e a maior proteína encontrada nas partículas lutoides é a heveína (BOTTIER, 2020). Finalmente, as partículas de Frey-Wyssling, constituintes de menor abundância do NRL, são amareladas e possuem uma estrutura complexa que desempenha algumas atividades bioquímicas importantes, com possíveis sítios de biossíntese da borracha (GUERRA et al., 2021).

### **2.1.1 Propriedades antimicrobianas do NRL**

O tempo entre a sangria da árvore e o processo de coagulação é conhecido como “maturação”, e nesse período o coágulo sofre alterações bioquímicas intrínsecas nas quais os micro-organismos desempenham um papel importante (GUERRA et al., 2021). Dessa forma, para resistir aos cortes frequentes que as seringueiras sofrem diariamente, elas precisam ter um mecanismo de autodefesa (GIORDANI et al., 1999) e, em função disso, alguns autores têm estudado as características antimicrobianas que os compostos químicos presentes no NRL apresentam.

Diversos estudos indicam que as proteínas presentes no NRL desempenham um papel fundamental em suas propriedades antimicrobianas. Estima-se que sua composição inclua aproximadamente 1500 tipos de proteínas e enzimas diferentes (BERTHELOT; PERUCH;

LECOMTE, 2016). Entre as principais destacam-se quitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, hevaminas, heveína, glucosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -*N*-acetil-glucosaminidase, polifenol oxidase e um inibidor de protease (KANOKWIROON et al., 2008).

A atividade antimicrobiana da heveína, uma proteína e principal componente do soro B, foi investigada por Van Parijs et al. (1991). Para avaliar essa propriedade, os autores testaram a proteína contra diversos micro-organismos patogênicos, incluindo *Pyrenophora tritici-repentis*, *Botrytis cinerea*, *Septoria nodorum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Trichoderma hamatum* e *Pyricularia oryzae*. Os resultados indicaram que a heveína apresenta propriedades antimicrobianas efetivas, atribuídas à sua baixa massa molar (4,7 kDa).

Alguns anos depois, Kanokwiroon et al. (2008) também estudaram a heveína e reportaram excelentes resultados para diferentes micro-organismos como *Candida krusei*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Nos dois primeiros casos, os valores referentes a concentração mínima inibitória (CMI) foram iguais a 190 e 95  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Além disso, a heveína também apresentou atividade antifúngica satisfatória, uma vez que induziu a inibição do crescimento desses fungos em disco difusão.

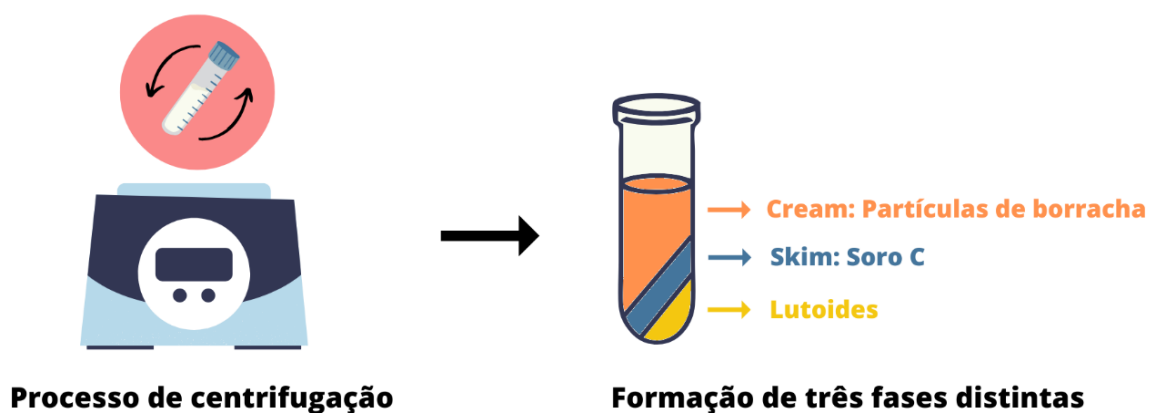
Duas enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase, denominadas como GI (70% de pureza) e GII (17% de pureza), provenientes das partículas lutoides, foram purificadas e avaliadas por Churngchow et al. (1995). O estudo revelou um achado interessante, pois observou-se que quanto maior a frequência do processo de sangria, maior a quantidade de GI e GII no NRL. Além disso, esses mesmos autores demonstraram que a proteína GII apresenta a maior atividade antifúngica, desempenhando um papel fundamental na proteção da árvore contra micro-organismos.

A importância da fase soro C como agente antimicrobiano do NRL também foi investigada. No estudo de Daruliza et al. (2011), suas propriedades antifúngicas foram demonstradas. Os experimentos pelo método de disco-difusão mostraram que o soro C

apresenta atividade antifúngica efetiva para *Aspergillus niger*, enquanto os resultados relacionados à *Candida albicans* não foram satisfatórios. Além disso, os autores ressaltaram que a atividade biológica do soro de *Hevea brasiliensis* pode contribuir para o desenvolvimento de diversos produtos na indústria de polímeros e nos setores farmacêutico e de saúde.

Embora o NRL contenha proteínas com reconhecida atividade antimicrobiana, é importante destacar que essas proteínas nem sempre estão presentes em sua composição final. Antes de ser utilizado pela indústria para a produção de artefatos, é muito comum que o NRL passe por um processo de centrifugação com o intuito de remover as proteínas de alta massa molar. Essas proteínas são retiradas, pois são consideradas alérgicas para algumas pessoas (DE BARROS et al., 2016; HERCULANO et al., 2009, 2011; MIRANDA et al., 2018b). Quando o NRL passa pelo processo de centrifugação, três fases ficam evidentes. Elas são conhecidas por “cream” (grandes partículas de borracha), “skim” (pequenas partículas de borracha e partículas de Frey-Wyssling dispersas em soro C) e lutoides (BOTTIER, 2020; GUERRA et al., 2021). Dessa forma, é possível remover as fases mais densas do NRL, onde se encontram essas proteínas alérgênicas. A **Figura 3** ilustra esse processo.

**Figura 3** - Processo de centrifugação do NRL e as três fases distintas formadas após esse processo



Fonte: adaptado de Guerra et al. (2021)

### 2.1.1 Vulcanização do NRL

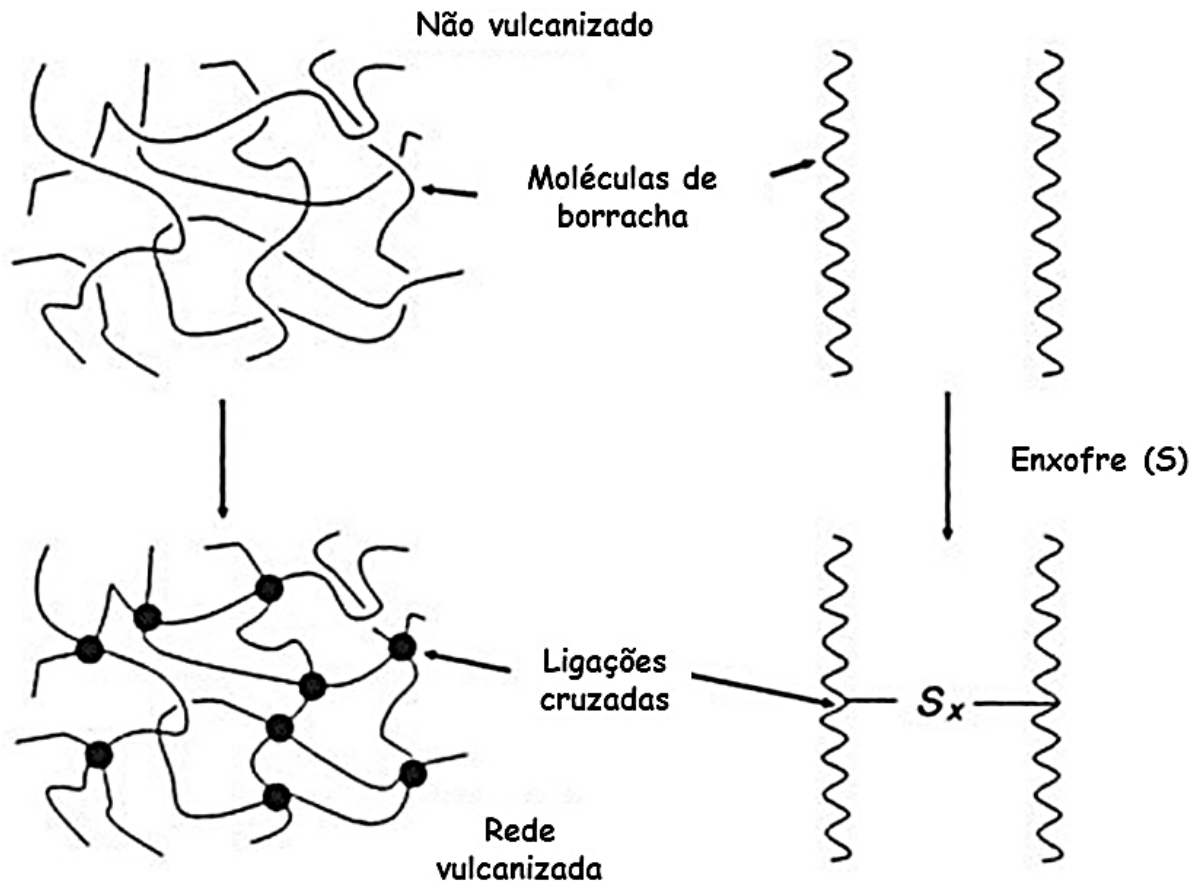
Apesar de naturalmente possuir uma série de características extraordinárias, o NRL necessita passar por um processo de cura para ser utilizado na produção de artefatos. Os aventureiros espanhóis, que sucederam a Colombo no princípio do século XVI, ficaram encantados ao descobrirem a vasta possibilidade de aplicações deste material, que já era conhecido pelos índios americanos. Apesar disso, foi observado que o mesmo apresentava dois grandes problemas: os artefatos tornavam-se moles e pegajosos quando submetidos ao calor e, quando era frio, o material tornava-se duro e rígido, além de se deteriorar rapidamente (COSTA et al., 2003).

Cerca de 450 anos depois, a utilização do NRL e, mais especificamente, da NR, passou a ser reconhecida mundialmente devido à descoberta do processo de vulcanização (COSTA et al., 2003). O primeiro método comercial de vulcanização foi atribuído a Charles Goodyear. Seu processo (aquecimento da NR com enxofre) foi usado pela primeira vez em Springfield, Massachusetts, em 1841. Thomas Hancock usou, essencialmente, o mesmo processo cerca de um ano depois na Inglaterra. No entanto, Hancock registrou sua patente em 21 de novembro de 1843, 8 semanas antes de Goodyear registrar sua patente nos EUA em 30 de janeiro de 1844 (CORAN, 2013).

A vulcanização é um processo, onde o NRL é submetido a uma reação com enxofre para produzir uma rede de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas (**Figura 4**). Quando um número suficiente de ligações cruzadas é formado, o artefato adquire uma forma fixa, não mais moldável, porém ainda flexível e elástica. No entanto, deve-se tomar cuidado com a quantidade de ligações cruzadas, pois quando estão em excesso, o elastômero torna-se em um sólido rígido (COSTA et al., 2003). Devido à formação da rede, a borracha torna-se insolúvel em qualquer solvente e não pode ser processada por métodos que exijam fluxo. Por isso, é

essencial que a vulcanização ocorra apenas após o artefato adquirir sua forma geométrica final (CORAN, 2013).

**Figura 4** - Representação do processo de vulcanização por meio da adição de enxofre



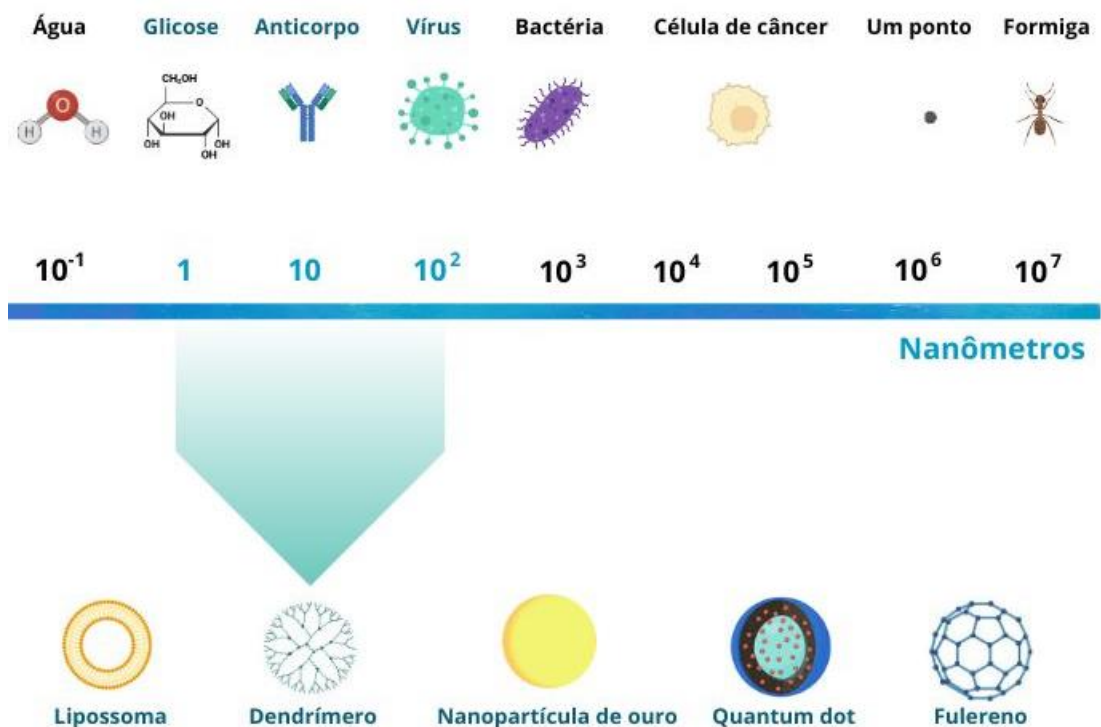
**Fonte:** adaptado de Coran (2013)

Diversos aditivos podem ser incorporados ao processo de vulcanização, dependendo das características desejadas no material final. Entre eles, destacam-se as cargas de reforço, cargas de enchimento, plastificantes, agentes de expansão, ativadores e aceleradores de vulcanização, entre outros. Os aceleradores e ativadores de vulcanização são essenciais nesse processo, pois aceleram a formação de ligações cruzadas, aprimorando as características químicas e mecânicas do produto final (CORAN, 2003).

## 2.2 NANOTECNOLOGIA

Nos últimos anos, a nanotecnologia tem se destacado devido ao seu grande avanço em vários campos da ciência, como na física, química, biologia, meio ambiente, ciência dos materiais, medicina e farmácia (RANA; YADAV; JAGADEVAN, 2020). O seu primeiro conceito foi introduzido pelo ganhador do prêmio Nobel Richard Feynman (1959), que a definiu como um meio de manipulação e controle da matéria, em uma escala que varia de 1 a 100 nm (KHAN; SAEED; KHAN, 2019; RANA; YADAV; JAGADEVAN, 2020; SANTOS et al., 2015). A **Figura 5** mostra um modelo comparativo de diversas estruturas representadas em escala nanométrica. Os lipossomas, os dendrímeros, as nanopartículas de ouro (AuNPs), os *quantum dots* e os fulerenos são exemplos de estruturas que podem apresentar dimensões entre 1 e 100 nm.

**Figura 5** - Modelo comparativo de diversas estruturas em escala nanométrica



Fonte: adaptado de Maciel (2016)

As NPs podem ser divididas em várias categorias, dependendo de suas propriedades químicas. Dentre as mais conhecidas destacam-se aquelas à base de carbono, metálicas, cerâmicas, semicondutoras, poliméricas e à base de lipídios (KHAN; SAEED; KHAN, 2019). Mais do que sua natureza química diversificada, as NPs também podem ser preparadas com variadas configurações geométricas, tais como cilindros, esferas, folhas finas, fibras, anéis, tubos cíclicos, entre outros (GATOO et al., 2014; KUMAR et al., 2021).

A relevância dos nanomateriais tornou-se evidente quando os pesquisadores perceberam que a redução de materiais a dimensões nanométricas poderia provocar alterações ativas em suas propriedades físico-químicas. A variação das propriedades óticas é um exemplo desse fenômeno (KHAN; SAEED; KHAN, 2019; ROBINSON; HSU, 2017). A **Figura 6** ilustra uma imagem contendo AuNPs dispersas em solução aquosa, e que foram sintetizadas em diversos tamanhos e formatos. Nela, é possível perceber que as NPs exibem cores distintas, dependendo das variações em suas características morfológicas (DREADEN et al., 2012).

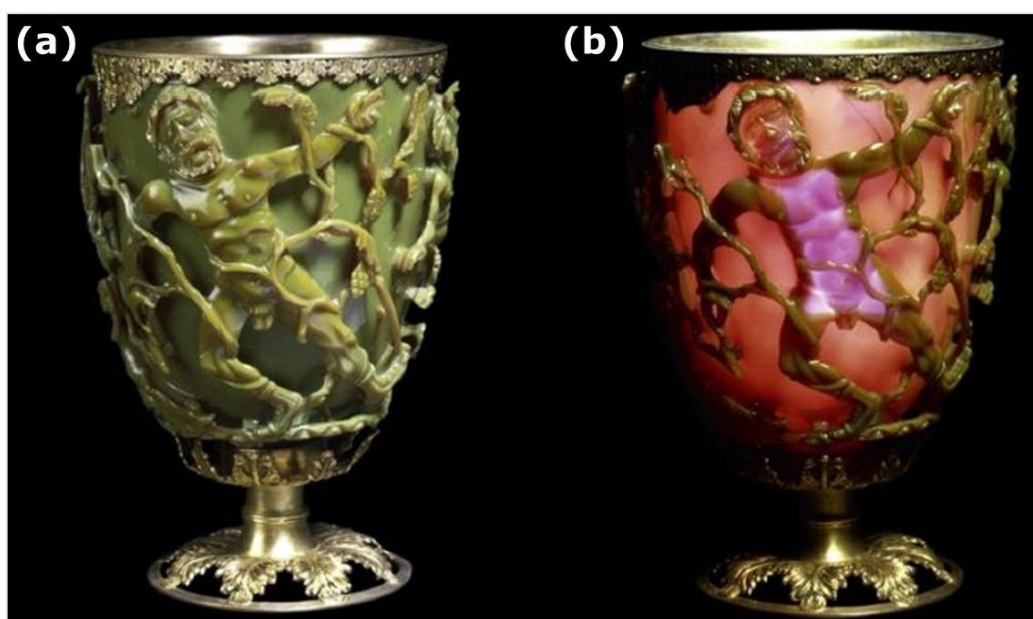
**Figura 6** - Dependência da cor das AuNPs em relação ao seu tamanho e forma



**Fonte:** adaptado de Dreaden et al. (2012)

Outro exemplo desse comportamento pode ser visualizado na **Figura 7**, onde AuNPs foram utilizadas para conferir uma cor vermelha intensa ao vidro rubi. A taça *Lycurgus*, fabricada pelos romanos no século IV, exibe uma cor verde à luz do dia (**Figura 7a**), mas muda para vermelho (**Figura 7b**) quando iluminada por dentro (HEILIGTAG; NIEDERBERGER, 2013).

**Figura 7** - Taça *Lycurgus* em luz (a) refletida e (b) transmitida



**Fonte:** Heiligtag and Niederberger (2013)

As propriedades dos materiais podem ser diferentes em nanoescala por dois motivos principais: a área superficial específica dos nanomateriais é maior, principalmente quando comparada com materiais em macroescala, resultando em um aumento da reatividade química e afetando as propriedades mecânicas e elétricas; e, os efeitos quânticos dominam o comportamento da matéria em nanoescala, afetando, conseqüentemente, o comportamento óptico, elétrico e magnético dos materiais (KUMAR et al., 2021; SANTOS et al., 2015).

É importante ressaltar que as características físicas e químicas exclusivas dos nanomateriais podem ser exploradas para a descoberta de novos materiais, processos e

fenômenos (ROBINSON; HSU, 2017). Desenvolvimentos recentes em nanotecnologia têm proporcionado uma variedade de aplicações de nanomateriais no campo da medicina, agricultura, cosméticos, alimentos, tratamento de águas residuais, entre outros (SOLANKI et al., 2021). Por essa razão, este campo de estudo tem se mostrado fundamental para abrir novas perspectivas na ciência e tecnologia, impactando diretamente a economia e a sociedade, podendo promover uma revolução industrial moderna (ROBINSON; HSU, 2017).

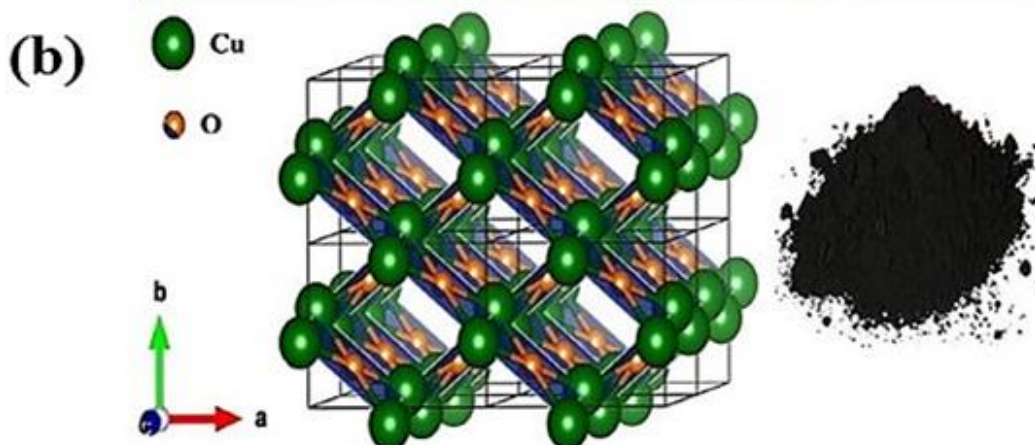
### 2.2.1 CuONPs

O óxido de cobre (II), também conhecido como óxido cúprico (CuO), é um sólido preto, com propriedades antiferromagnéticas, sendo um dos dois óxidos estáveis do cobre. Ele é um óxido semicondutor do tipo *p*, com um intervalo de banda que varia de 1,2–1,5 eV, e a sua estrutura (o mineral tenorita natural) pertence ao sistema monoclinico. Além disso, o CuO possui características interessantes do ponto de vista comercial, como sua abundância, acessibilidade, processo de produção simples, escalabilidade e atoxicidade (MALLAKPOUR; AZADI; MUSTANSAR HUSSAIN, 2020). A **Figura 8** ilustra as principais propriedades do CuO, bem como a estrutura cristalina de sua célula unitária.

Nos últimos anos, o número de estudos sobre a utilização das CuONPs tem crescido consideravelmente, devido às possibilidades de aplicação dessas NPs (MALLAKPOUR; AZADI; MUSTANSAR HUSSAIN, 2020; SIDDIQI; HUSEN, 2020). Quando comparadas a outras NPs, as CuONPs apresentam menor toxicidade para células vivas, o que as torna amplamente utilizadas na área biomédica, onde podem atuar como agentes antibacterianos, antifúngicos, antidiabéticos, antioxidantes e anticâncer (VELSANKAR et al., 2020; WARIS et al., 2021).

**Figura 8** - Principais (a) características físico-químicas e estruturais, e (b) estrutura cristalina e aspecto visual do CuO

<b>(a)</b>	<b>Fórmula química:</b>	<b>CuO</b>
	<b>Estrutura cristalina:</b>	<b>Monoclinico</b>
	<b>Grupo espacial:</b>	<b>C2/c, #15</b>
	<b>Parâmetros de rede:</b>	<b>a = 4.6837 Å</b>
		<b>b = 3.4226 Å</b>
		<b>c = 5.1288 Å</b>
		<b><math>\alpha = 90^\circ</math></b>
		<b><math>\beta = 99.54^\circ</math></b>
		<b><math>\gamma = 90^\circ</math></b>
	<b>Distâncias:</b>	
	<b>Cu-Cu</b>	<b>2.90 Å</b>
	<b>Cu-O</b>	<b>1.96 Å</b>
	<b>O-O</b>	<b>2.62 Å</b>
<b>Massa molar:</b>	<b>79.57</b>	
<b>Densidade:</b>	<b>6.515 g cm<sup>-3</sup></b>	
<b>Ponto de fusão:</b>	<b>1201°C</b>	
<b>Ponto de ebulição:</b>	<b>2000°C</b>	
<b>Band gap:</b>	<b>1.2 - 1.5 eV</b>	



Fonte: adaptado de Mallakpour et al. (2020)

Devido ao seu caráter semicondutor, elas podem também ser empregadas na fabricação de materiais condutores de eletricidade, em células de energia solar, além de sensores para detecção de gases e infestação de fungos (KALAIYAN et al., 2020; SIDDIQI; HUSEN, 2020). Além disso, as CuONPs são frequentemente utilizadas como catalisadores, facilitando reações químicas sob condições de alta temperatura e pressão (GAWANDE et al., 2016; SIDDIQI; HUSEN, 2020). Elas também têm aplicações ambientais, sendo empregadas como nanoadsorventes na remediação de efluentes industriais (KALAIYAN et al., 2020; VELSANKAR et al., 2020; WARIS et al., 2021).

As CuONPs podem ser obtidas por diferentes rotas sintéticas e, dependendo da metodologia utilizada, podem apresentar características distintas (AKINTELU et al., 2020). Aspectos inerentes à síntese de CuONPs serão discutidos a seguir.

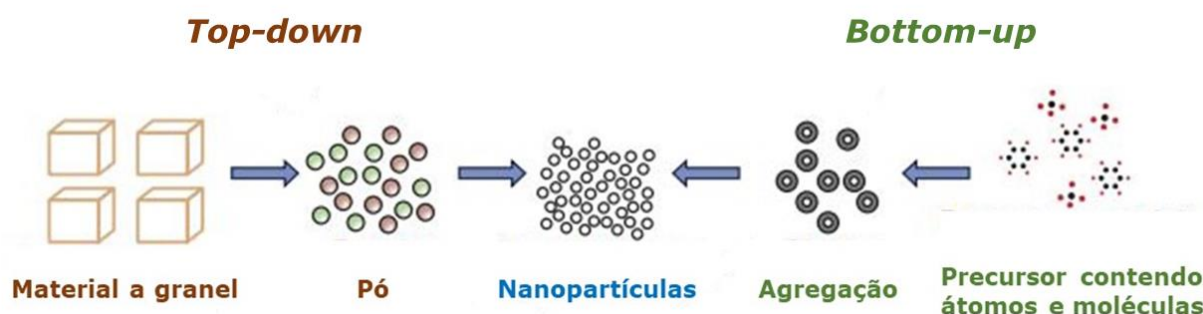
#### 2.2.1.1 Síntese de CuONPs

Até o presente momento, uma série de diferentes estratégias de síntese tem sido propostas com sucesso para a preparação de CuONPs. Em geral, esses processos são realizados por meio de duas abordagens, conhecidas como *top-down* (ou abordagem destrutiva) e *bottom-up* (ou abordagem construtiva), ambas ilustradas na **Figura 9**.

A primeira abordagem se inicia a partir de uma massa sólida que, através de qualquer método mecânico, se transforma em partículas menores para, posteriormente, serem estabilizadas e atingirem o tamanho necessário (DEVATHA; THALLA, 2018; KHAN; SAEED; KHAN, 2019; RANA; YADAV; JAGADEVAN, 2020; WARIS et al., 2021). De maneira geral, a abordagem *top-down* é executada por meio de métodos físicos como, por exemplo, eletropulverização, pirólise a laser, ablação a laser e evaporação-condensação

(AKINTELU et al., 2020). Entretanto, essa abordagem nem sempre fornece partículas com as dimensões esperadas (DEVATHA; THALLA, 2018).

**Figura 9** - Abordagem *top-down* e *bottom-up* para a síntese de NPs



**Fonte:** adaptado de Devatha and Thalla (2018)

A segunda abordagem, por sua vez, parte de um material com dimensões atômicas, que é submetido a um gradual processo de agregação (DEVATHA; THALLA, 2018). Geralmente associada a métodos químicos, essa abordagem envolve o uso de reagentes químicos específicos para a redução de íons cobre durante a síntese de CuONPs (AKINTELU et al., 2020). Entre os agentes redutores comumente empregados, destacam-se o boroidreto de potássio (ZHANG et al., 2010), o ácido ascórbico (KHAN et al., 2016; WU, 2007), o etilenoglicol e a hidrazina (ZHU; ZHANG; YIN, 2005), além da anilina (ROSTAMI-TAPEH-ESMAEIL et al., 2021), entre outros. Essa abordagem também pode ser conduzida por meio da síntese verde, na qual plantas, micro-organismos, algas, enzimas e biomoléculas são utilizados como precursores da reação (DEVATHA; THALLA, 2018; RANA; YADAV; JAGADEVAN, 2020). Entre as duas rotas de obtenção de NPs, a abordagem *bottom-up* costuma ser a mais utilizada, pois proporciona maior uniformidade e menor incidência de defeitos no produto final (KHAN; SAEED; KHAN, 2019).

Embora os métodos físicos e químicos sejam bastante conhecidos e frequentemente utilizados, eles apresentam algumas desvantagens. Os métodos físicos, por exemplo, são demorados, exigem uma grande quantidade de energia e necessitam de equipamentos caros e robustos, o que onera de forma considerável o valor dos produtos finais (BANDEIRA et al., 2020a; KUMAR et al., 2021; SOLANKI et al., 2021). Nos métodos químicos, por outro lado, são empregados reagentes caros e que, muitas vezes, não são ambientalmente seguros (SHARMA et al., 2021; SOLANKI et al., 2021).

Nesse sentido, a síntese verde surge como uma alternativa promissora e tem se destacado no campo da nanotecnologia por revolucionar a produção de NPs, principalmente ao minimizar os efeitos negativos provocados ao meio ambiente durante o processo (KUMAR et al., 2021). Essa metodologia emprega exclusivamente produtos naturais e solventes mais seguros (BANDEIRA et al., 2020a). Devido a essas características, a síntese verde apresenta diversas vantagens em relação aos métodos convencionais, especialmente no que se refere ao custo-benefício e à simplicidade operacional (SOLANKI et al., 2021).

Dentre os materiais comumente empregados nesse método, as plantas apresentam algumas vantagens em relação às bactérias e fungos, como fácil e abundante disponibilidade, segurança no manuseio, ausência de necessidade de cultivo, além de serem geralmente atóxicas, ecologicamente corretas e economicamente atrativas (SOLANKI et al., 2021). Por essas razões, o uso de plantas na síntese de CuONPs é amplamente difundido, uma vez que seus extratos, ricos em compostos oxidantes, atuam como excelentes agentes redutores na síntese verde destas NPs.

De forma geral, o mecanismo de síntese mediada por plantas permanece em constante investigação. No entanto, é sabido que as plantas contêm diversos metabólitos secundários, como flavonoides, açúcares, proteínas, taninos, fenóis, terpenoides, entre outros. Muitos estudos indicam que esses compostos atuam como excelentes agentes redutores (AKINTELU

et al., 2020; EL-SEEDI et al., 2019; NASROLLAHZADEH et al., 2021; SOLANKI et al., 2021), além de contribuírem para minimizar a aglomeração, proteger e estabilizar as NPs (SHARMA et al., 2015).

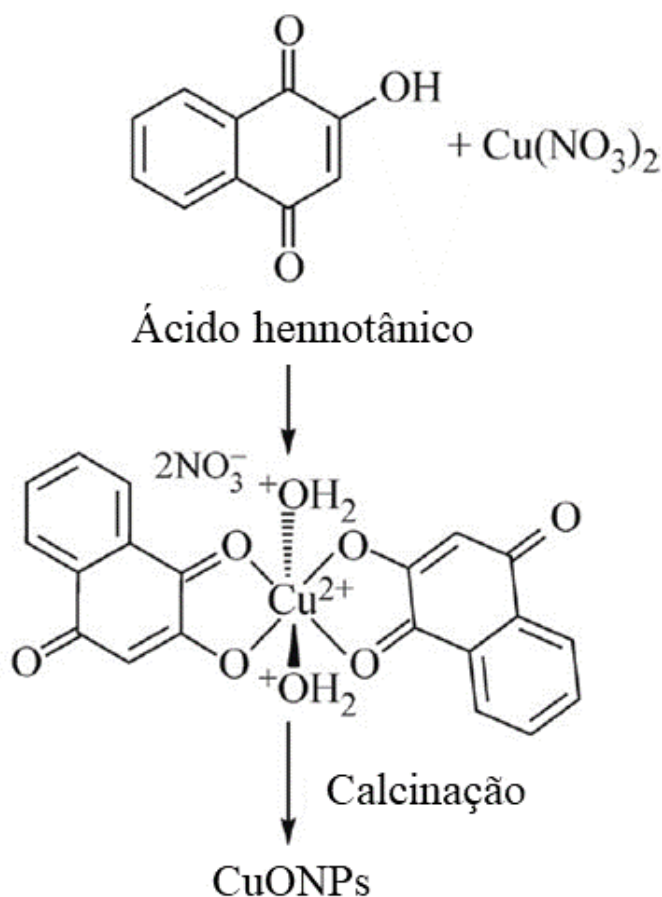
No trabalho proposto por Kalaiyan et al. (2020), por exemplo, os autores verificaram que a reação entre o nitrato de cobre (II) tri-hidratado ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) e o extrato das folhas de *Simarouba glauca* resultou na formação de hidróxido de cobre (II) ( $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ). Mas, para obter as CuONPs, o material teve que ser calcinado. Sharma et al. (2015) e Taghavi Fardood et al. (2018), em outro estudo, explicam que os compostos químicos presentes nos metabólitos secundários produzem um complexo com o cobre, presente no sal precursor. Esses complexos sofrem decomposição durante a calcinação, resultando em CuONPs. A **Figura 10** mostra o mecanismo de formação das CuONPs proposto por Taghavi Fardood et al. (2018). Neste trabalho foram utilizados o  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  e o extrato de pó de henna (*Lawsonia inermis*), que é rico em “*lawsone*”, também conhecido como ácido hennotânico. Esse composto é responsável por formar complexos de cobre-*lawsone* e sofre decomposição durante a calcinação.

Em outro trabalho, Nasrollahzadeh et al. (2015) obtiveram CuONPs sem a necessidade de calcinação. O extrato utilizado por esses autores foi obtido a partir das folhas da árvore *Tamarix gallica*, que é rica em polifenóis. Esses compostos, por sua vez, foram responsáveis por atuar como agentes redutores do cloreto de cobre (II) ( $\text{CuCl}_2$ ).

Do ponto de vista operacional, a síntese verde é um método relativamente simples. Inicialmente, obtém-se um extrato vegetal utilizando solventes como água e etanol. Em seguida, adiciona-se uma solução do sal precursor a uma quantidade específica desse extrato, mantendo a mistura sob agitação e temperatura controladas por algumas horas. Ao término da reação, a mistura passa por um processo de filtração ou centrifugação, a fim de separar as partículas

formadas. Finalmente, o material obtido passa por um tratamento térmico, envolvendo secagem e/ou calcinação (CUONG et al., 2022; JADOUN et al., 2021; VELSANKAR et al., 2020).

**Figura 10** - Mecanismo de formação das CuONPs utilizando o extrato de pó de henna



**Fonte:** adaptado de Taghavi Fardood et al. (2018)

Apesar da facilidade operacional associada à síntese verde de NPs, diversos estudos têm explorado metodologias distintas para a obtenção de CuONPs. Diferentes tipos e concentrações de sais de cobre, variações no pH do meio, tempo e temperatura de reação, bem como condições de calcinação, têm sido relatadas na literatura (**Tabela 1**). A modificação desses parâmetros experimentais, por sua vez, influencia diretamente as características do produto final.

**Tabela 1** - Metodologias de síntese verde de CuONPs reportadas na literatura

(continua)

Agente redutor (concentração e volume)	Fonte de cobre (quantidade)	Condições experimentais	Tratamento térmico	Tamanho médio (nm)	Formato	Referência
Casca de <i>Punica granatum</i> (NE)	Acetato de cobre (II) (NE)	pH = 10,0; 80 °C, 4 h	12 h de secagem (50 °C) e 3 h de calcinação (300 °C)	35,8	Esférico	(SIDDIQUI et al., 2021)
<i>Allium sativum</i> cru (50 g L <sup>-1</sup> ; NE)	Nitrato de cobre (II) (18,75 g L <sup>-1</sup> )	Agitação a 70 °C, 2-3 h	Secagem durante a noite (80 °C) e 3-4 h de calcinação (400 °C)	20-40	Variado	(VELSANKAR et al., 2020)
Frutos de <i>Hyphaene thebaica</i> (100 g L <sup>-1</sup> ; 100 mL)	Sulfato de cobre (II) (2,6 g)	NE	Secagem (100 °C) e 2 h de calcinação (500 °C)	25	Esférico	(MOHAMED; THEMA; DHLAMINI, 2021)
Folhas de <i>Simarouba</i> <i>glauca</i> (33,33 g L <sup>-1</sup> ; 30 mL)	Nitrato de cobre (II) (1,0 g)	Agitação a 80 °C até modificar de verde escuro para uma pasta de cor verde claro	1 h de calcinação (250 °C)	Comprimento (10-30) e largura (10-15)	Variado	(KALAIYAN et al., 2020)
Caldo de cana <i>Saccharum</i> <i>officinaru</i> (NE; 2, 5 e 10 mL)	Nitrato de cobre (II) (0,1 mol L <sup>-1</sup> , 100 mL)	Agitação a 80 °C, 1 h, até passar da coloração azul para verde. Adição de hidróxido de amônio e agitação por mais 8 h.	8 h de secagem (80 °C) e 3 h de calcinação (500 °C)	29,5-60,5	Variado	(ANGELINE MARY; THAMINUM ANSARI; SUBRAMANIAN, 2019)
Raízes de <i>Berberis lycium</i> (2% e 50%)	Sulfato de cobre (II) (50 %)	pH = 7,0, 8,0 e 11,0; 1 h de agitação; e então mantida sob incubação a 90 ± 2 °C por 72 h	NE	20-24	Esférico	(AIN; SAFDAR; YASMIN, 2019)

\*NE: condição experimental não especificada

(conclusão)

<b>Agente redutor</b> (concentração e volume)	<b>Fonte de cobre</b> (quantidade)	<b>Condições experimentais</b>	<b>Tratamento térmico</b>	<b>Tamanho médio</b> (nm)	<b>Formato</b>	<b>Referência</b>
Folhas de <i>Calotropis procera</i> (NE; 50 mL)	Acetato de cobre (II) (2,5 g)	Aquecimento durante 2 h até se transformar em uma pasta de cor verde azulada	2 h de calcinação (700 °C)	46	Cilíndrico	(REDDY, 2017)
Folhas de <i>Tinospora cordifolia</i> (20 g L <sup>-1</sup> ; 30 g L <sup>-1</sup> ; 40 g L <sup>-1</sup> , e 50 g L <sup>-1</sup> ; NE)	Nitrato de cobre (II) (1,205 g)	NE	5 min de calcinação (400 °C)	6-8	Esférico	(UDAYABHANU et al., 2015)
Folhas de <i>Gloriosa superba</i> L. (NE; 5, 10, 15 e 20 mL)	Nitrato de cobre (II) (2,32 g)	Temperatura ambiente, 10 min	3-4 min de calcinação (400 °C)	5-10	Esférico	(NAIKA et al., 2015)
Folhas de <i>Calotropis gigantea</i> (500 g L <sup>-1</sup> ; 50 mL)	Nitrato de cobre (II) (5,0 g)	60-80 °C; fervura até reduzir a uma pasta de cor amarelo escuro	2 h de calcinação (400 °C)	20	Esférico	(SHARMA et al., 2015)
Pó de goma Karaya (1 g L <sup>-1</sup> ; 10 mL)	Cloreto de cobre (II) (10,0 mM; 10 µL)	Agitação a 75 °C durante 1 h; após esse processo, o material foi liofilizado	NE	4,8-7,8	Esférico	(ČERNÍK; THEKKAE PADIL, 2013)
Folhas de <i>Capparis spinosa</i> (66,66 g L <sup>-1</sup> ; 10 mL)	Sulfato de cobre (II) (5,0 mM; 10 mL)	Agitação durante 2 h; após esse processo, o material foi liofilizado	12 h de secagem em estufa (90 °C)	21-58	Esférico	(SAMARI et al., 2019)

\*NE: condição experimental não especificada

Há resultados bastante controversos na literatura em relação à variação da concentração e volume de extrato utilizado. Udayabhanu et al. (2015) propuseram a síntese verde de CuONPs usando extrato de folhas de *Tinospora cordifolia*. Os autores testaram quatro concentrações diferentes de extrato vegetal e concluíram que esse parâmetro desempenha um papel importante no controle do tamanho das partículas, sendo que o tamanho médio dos cristalitos encontrados foi de 6,5, 6,4, 6,47 e 8,47 nm, respectivamente, à medida que a concentração do extrato foi aumentada. Angeline Mary et al. (2019) testaram volumes de 2, 5 e 10 mL do extrato de *Saccharum officinarum* e obtiveram partículas com tamanhos de 60,5, 40,4 e 29,5 nm, respectivamente. Os autores concluíram que o aumento da concentração do extrato resulta na diminuição do tamanho das partículas, com maior uniformidade e formato esférico. Taghavi Fardood et al. (2018) também observaram NPs com tamanho de cristalito menor quando o volume de extrato foi aumentado, e explicaram que esse efeito pode ser atribuído ao fato de que a henna (*Lawsonia inermis*) impede a agregação das CuONPs. Por outro lado, no estudo de Naika et al. (2015), a concentração do extrato vegetal de folhas de *Gloriosa superba L.* não influenciou na forma ou microestrutura das CuONPs.

No que diz respeito a concentração de sal de cobre, Černík and Thekkae Padil (2013) demonstraram em seu estudo que a diminuição do tamanho de partículas pode ocorrer à medida que a concentração de sal de cobre é aumentada. Os autores utilizaram concentrações de 1, 2 e 3 mM de  $\text{CuCl}_2$  e obtiveram partículas com tamanhos aproximados de 7,8, 5,5 e 4,8 nm, respectivamente.

Ain et al. (2019), por sua vez, discutiram a importância da modificação do pH no processo de síntese verde de CuONPs a partir do extrato de raízes de *Berberis lycium* e constataram que a variação do pH altera a carga dos fitoquímicos naturais, o que influencia sua capacidade de se ligarem e reduzirem íons metálicos, afetando, conseqüentemente, a morfologia e o rendimento das NPs. Além disso, os autores constataram que NPs de maior

tamanho foram obtidas em valores de pH mais altos (9,0 e 11,0), enquanto NPs relativamente menores foram formadas em pH 7,0. Entretanto, os autores observam que há uma grande possibilidade de a solução conter uma mistura de NPs de Cu<sub>2</sub>O e CuO quando as condições de pH são mais ácidas. De maneira análoga, Samari et al. (2019) observaram a formação de CuONPs de maior tamanho em pHs situados entre 9,0 e 12,0. No entanto, nesse trabalho, os autores optaram por utilizar o pH 7,0 e explicaram que, quanto maior o pH, maior é a instabilidade e aglomeração das NPs.

Diferentes temperaturas de calcinação foram avaliadas por Taghavi Fardood et al. (2018), que realizaram a síntese das CuONPs utilizando o extrato de pó de henna (*Lawsonia inermis*). Os autores realizaram o controle dos resultados por meio da técnica de difração de raios X (DRX) e verificaram que o tamanho dos cristalitos das CuONPs aumentou de 22,5 para 38,3 nm, à medida que a temperatura de calcinação foi elevada de 400 para 800 °C.

Embora diversos estudos já tenham sido publicados sobre a síntese verde de CuONPs, utilizando diferentes partes de plantas, existem várias lacunas na literatura, especialmente no que diz respeito à investigação dos efeitos dos parâmetros experimentais de síntese e, principalmente, à correlação desses parâmetros com as características do material final obtido. Portanto, observa-se que ainda existem oportunidades para avanços nesta área de pesquisa.

#### 2.2.1.2 Mecanismo antimicrobiano das CuONPs

A utilização de NPs como agentes antimicrobianos tem ganhado relevância crescente nos últimos anos, com estudos focados na avaliação de sua capacidade de inibição, especialmente contra bactérias e fungos. De maneira geral, a ação antimicrobiana inicia-se com a aproximação das NPs ao microrganismo, seguida pela formação de uma ligação com a célula microbiana. Nesse processo, as NPs se fixam à superfície celular e são posteriormente

absorvidas. Uma vez dentro da célula, elas interagem com componentes vitais que desempenham papel fundamental nas atividades metabólicas. Essa interação inibe a função desses componentes, resultando na interrupção das atividades celulares e, por fim, na morte da célula (SHARMA et al., 2021).

Embora haja um entendimento geral sobre o funcionamento das NPs contra microrganismos, o mecanismo exato da ação antimicrobiana das CuONPs ainda não foi totalmente elucidado. Alguns autores destacam características de grande relevância que podem influenciar a toxicidade das CuONPs e atuar como os possíveis mecanismos relacionados a morte celular, incluindo tamanho, características superficiais da partícula, capacidade de liberação de íons, e ação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (L. VEGA-JIMÉNEZ et al., 2019).

Quanto ao tamanho, pode-se afirmar que quanto menores forem as NPs, maior será sua toxicidade. A redução do tamanho resulta em um aumento da área superficial específica, o que não apenas favorece a acumulação das NPs nos microrganismos, mas também melhora sua interação e reatividade com as biomoléculas (CHANG et al., 2012).

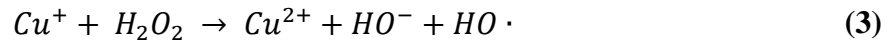
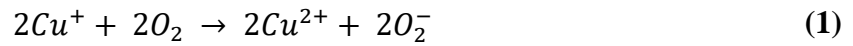
Além do tamanho, características como a carga das NPs, podem influenciar a sua toxicidade. Nesse contexto, pode-se afirmar que os grupos eletronegativos presentes nos polissacarídeos da membrana bacteriana oferecem locais de atração para cátions metálicos. A diferença de carga entre as membranas bacterianas e as NPs de óxidos de metálicos resulta em atração eletrostática, promovendo o acúmulo de NPs na superfície da bactéria. Esse acúmulo altera a sua estrutura e a permeabilidade da membrana celular (L. VEGA-JIMÉNEZ et al., 2019).

A liberação de íons metálicos por adsorção, dissolução e hidrólise também é sugerida como um possível mecanismo de atividade antimicrobiana. É interessante ressaltar que as CuONPs são mais solúveis do que partículas de CuO, pois, devido à sua maior área superficial

específica, elas interagem de forma mais eficiente com o solvente, potencializando seus efeitos tóxicos. Os íons de óxidos metálicos, por sua vez, podem induzir a decomposição das células bacterianas, devido à sua difusão nas mesmas (L. VEGA-JIMÉNEZ et al., 2019). No entanto, a liberação de íons metálicos pode variar conforme o meio reacional, como relatado por Ruparelia et al. (2008). Nesse estudo, os autores estimaram a concentração de íons liberados para 10 mg de CuONPs suspensas em 100 mL de meio nutritivo e água destilada. Eles verificaram que, após 24 h de incubação, a concentração de íons Cu(II) liberados no meio nutritivo foi de 17 mg L<sup>-1</sup>, enquanto em água destilada a concentração foi de apenas 0,5 mg L<sup>-1</sup>.

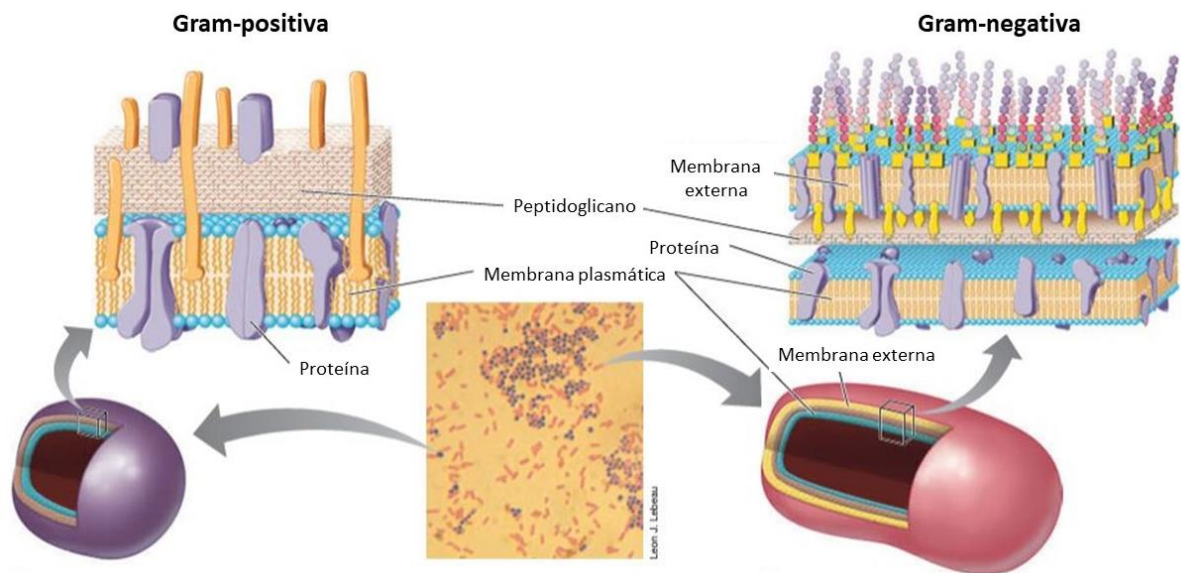
Finalmente, o estresse oxidativo induzido por ROS é um importante mecanismo antibacteriano de NPs. ROS é um termo genérico para moléculas e intermediários reativos que têm forte potencial redox positivo. É importante ressaltar que diferentes tipos de NPs, com composições químicas distintas, produzem diferentes tipos de ROS, reduzindo as moléculas de oxigênio (L. VEGA-JIMÉNEZ et al., 2019). Os quatro tipos de ROS são o radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), o radical hidroxila (·OH), o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o oxigênio singleto (O<sub>2</sub>) que exibem diferentes níveis de dinâmica e atividade antimicrobiana. Estudos indicaram que O<sub>2</sub><sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causam reações de estresse menos agudas e podem ser neutralizados por antioxidantes endógenos, como enzimas superóxidos e catalase, enquanto ·OH e O<sub>2</sub> podem levar à morte microbiana aguda.

As ROS podem danificar todos os tipos de componentes celulares, como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios presentes no organismo das bactérias (FASNACHT; POLACEK, 2021; L. VEGA-JIMÉNEZ et al., 2019; WANG; HU; SHAO, 2017). A principal ROS gerada pelo cobre é o radical hidroxila (·OH). A reação inicia-se através da interação de um íon Cu(I) com O<sub>2</sub> (**Equação 1**), seguida da reação de Haber-Weiss (**Equação 2**), para finalmente ocorrer a reação de Fenton (**Equação 3**) e a formação do radical ·OH (HASAN et al., 2020).



Outro ponto importante a ser destacado é que, dependendo da estrutura do microrganismo, a interação das CuONPs com o mesmo pode ser facilitada ou dificultada. No caso das bactérias, dois principais tipos, classificados de acordo com as características de suas paredes celulares, serão investigados na presente tese: as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A **Figura 11** ilustra as principais diferenças estruturais nas paredes celulares dessas bactérias.

**Figura 11** - Diferenças das estruturas da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas



**Fonte:** adaptado de Madigan et al. (2019)

Conforme pode ser observado na **Figura 11**, a estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas possui duas camadas, enquanto a de Gram-positivas possui apenas uma,

porém, a sua camada de peptidoglicano é mais espessa. Essas diferenças fazem com que as bactérias reajam de formas diferentes a antibióticos e outros agentes bactericidas (MADIGAN et al., 2019).

### 2.3 BIOMATERIAIS À BASE DE NRL E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS E DE ÓXIDOS METÁLICOS COM PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS

Os biomateriais têm sido definidos de diferentes formas ao longo dos anos. De acordo com Biswal et al. (2020), os biomateriais são materiais de origem natural ou sintética, que entram em contato com sistemas biológicos, como tecidos e órgãos, com o objetivo de reparar, substituir ou aumentar funções corporais. Em geral, o termo biocompatibilidade é definido como a capacidade de um material ser tolerado pelo corpo humano, não causando reações adversas (WILLIAMS, 2012). Alguns autores consideram que dispositivos médicos destinados a interagir com sistemas biológicos também podem ser definidos como biomateriais (HOLLINGER, 2012). Além disso, é importante destacar que os biomateriais podem ser da classe dos polímeros, metais, cerâmicos ou de seus compósitos (BISWAL; BADJENA; PRADHAN, 2020).

A importância terapêutica e comercial dos biomateriais é refletida na expressiva quantidade de produtos que existem para essa finalidade. No ano de 2005, por exemplo, já era estimada a utilização de cerca de 300 mil diferentes tipos de produtos pertencentes a essa classe de materiais, na área da saúde. Quase 15 anos depois, em 2019, o mercado de biomateriais foi estimado em mais de 100 bilhões de dólares (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015; XUE et al., 2021). Nesse contexto, alguns exemplos de dispositivos biomédicos incluem biossensores, tubos de circulação sanguínea, sistemas de hemodiálise, materiais implantáveis (como suturas, placas, substitutos ósseos, tendões, telas ou malhas, válvulas cardíacas, lentes e dentes),

dispositivos para a liberação controlada de medicamentos (na forma de filmes, implantes subdérmicos e partículas), órgãos artificiais (como coração, rim, fígado, pâncreas, pulmões, pele), além de curativos, luvas, entre outros (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Nos últimos anos, vários materiais de origem natural (marinha, animal ou vegetal) têm sido avaliados para serem utilizados na área dos biomateriais. Dentre os materiais de origem vegetal, o NRL tem se destacado em diversos estudos. No artigo de revisão de Guerra et al. (2021), sobre a utilização do NRL para aplicações biomédicas, os autores mostram uma série de resultados interessantes sobre a aplicação desse material em tecidos moles, reparação de ossos e na liberação de compostos com atividade terapêutica. Nesse artigo, os autores também destacam as propriedades antimicrobianas, angiogênicas e anti-inflamatórias que algumas proteínas presentes no NRL possuem.

De fato, conforme mencionado na **Seção 2.1.1**, o NRL contém proteínas com ação antimicrobiana. No entanto, caso proteínas de alta massa molar não sejam removidas antes do uso do NRL na produção de artefatos, elas podem causar alergias em alguns usuários, especialmente aqueles que utilizam esses produtos com frequência. Como resultado, Mam e Dangtungee (2019) explicam que uma grande quantidade de bactérias e outros microrganismos podem se acumular nos artefatos. Assim, dependendo da aplicação e considerando que muitos artefatos de NRL são destinados ao uso humano direto, essa questão pode ser tornar um problema. Nesse contexto, diversos estudos têm investigado a possibilidade de incorporar NPs metálicas e de óxidos metálicos em matrizes de NRL, com o objetivo de conferir propriedades antimicrobianas à matriz polimérica.

Nanopartículas de prata (AgNPs) têm sido frequentemente testadas para essa finalidade. Mam e Dangtungee (2019) investigaram a atividade antibacteriana de espumas de NRL contendo AgNPs contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Neste estudo, os autores expuseram amostras de espuma de NRL contendo 0,2 partes por cem (phr) de AgNPs em placas de Petri

contaminadas com uma concentração de bactérias de  $10^6$  unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC mL<sup>-1</sup>), mantidas a 37 °C por 24 h. As amostras sem AgNPs apresentaram um pequeno halo de difusão, provavelmente devido à presença de nanopartículas de óxido de zinco (ZnONPs) na composição da matriz polimérica, enquanto as amostras com 0,2 phr de AgNPs geraram zonas inibitórias maiores. Com a presença das AgNPs, a capacidade antibacteriana da espuma de NRL aumentou em 43,8% contra *E. coli* e 25% contra *S. aureus*. Além disso, esse estudo também revelou que as AgNPs inibiram o crescimento bacteriano contra *E. coli* de maneira mais eficaz do que *S. aureus*, o que, segundo os autores, se deve à maior atração eletrostática entre as membranas celulares de bactérias carregadas negativamente e as AgNPs carregadas positivamente.

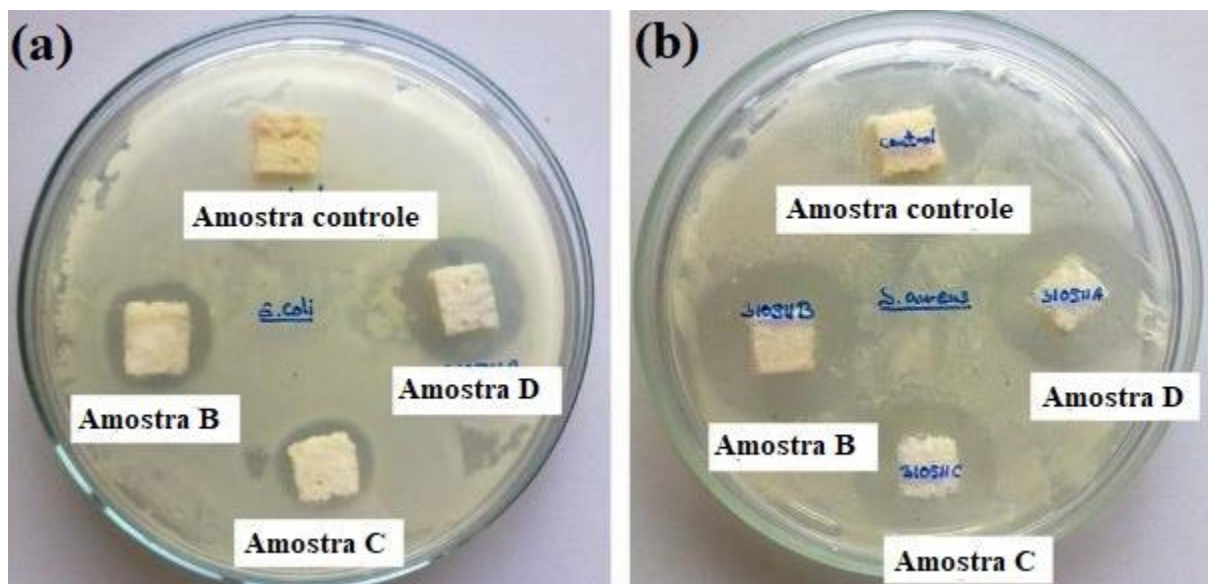
Rathnayake et al. (2014) sintetizaram AgNPs em matriz de NRL centrifugado por redução *in situ* de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>), sem a adição de qualquer agente redutor ou estabilizador. A técnica de disco-difusão em ágar foi utilizada para estimar a atividade antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* e *E. coli*. As concentrações bacterianas foram determinadas pela quantificação da densidade óptica (DO) a 600 nm. As amostras de NRL contendo AgNPs mostraram uma redução evidente na população microbiana. Após 3 h, mais de 95% da DO do meio de cultura bacteriana foi reduzida, confirmando forte atividade antimicrobiana. Os autores concluíram que o método de abordagem verde é uma alternativa promissora para a preparação de AgNPs incorporados à matriz de NRL, e que esse material poderá, no futuro, ser utilizado em aplicações clínicas.

As atividades antimicrobianas de nanocoloides de prata obtidos pela redução química de AgNO<sub>3</sub> por citrato trissódico em meio aquoso, e posteriormente incorporados à espuma NRL, foram investigados por Rathnayake et al. (2012). As atividades antibacterianas foram avaliadas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, enquanto as atividades antifúngicas foram testadas contra *Aspergillus niger*. No estudo, os autores observaram um

aumento da atividade antibacteriana nas amostras de espuma de NRL modificadas, em comparação às amostras sem as NPs em sua composição. Além disso, foi constatado que a espuma de NRL modificada apresentou propriedades antifúngicas contra *Aspergillus niger*.

As ZnONPs também demonstraram atividade antimicrobiana, conforme evidenciado no estudo de Rathnayake et al. (2014b). Nesse trabalho, essas NPs foram incorporadas como agente gelificante em espumas de NRL, enquanto uma amostra controle foi preparada sem sua adição. Os resultados indicaram que as NPs foram as principais responsáveis pela atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *E. coli*. Além disso, observou-se que as espumas de NRL contendo ZnONPs apresentaram atividade antibacteriana superior àquelas formuladas com ZnO microdimensionado. A **Figura 12** ilustra o ensaio de inibição bactericida, onde esses resultados foram observados.

**Figura 12** - Ensaio bactericida realizado por Rathnayake et al. (2014b) contra cepas (a) *E. coli* e (b) *S. aureus*



**Nota:** a amostra controle não possui adição de NPs, a amostra B possui 2 phr de ZnONPs, a amostra C possui micro-ZnO e amostra D possui 4 phr de ZnONPs

**Fonte:** adaptado de Rathnayake et al. (2014b)

Em um estudo mais recente, Krainoi et al. (2021) prepararam filmes de NR com ZnONPs, previamente revestidos com carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), nas proporções de 90:10 e 60:40. A utilização dessas ZnONPs modificadas resultou na eliminação completa das bactérias *E. coli* e *S. aureus*, processo esse que ocorreu por meio da formação de ROS e da liberação de íons Zn(II), que foram transferidos das moléculas de NR por meio de forças eletrostáticas.

Luvas cosméticas para amputados de membros superiores com propriedades antimicrobianas foram desenvolvidas por Restelatto et al. (2024). Neste estudo, os autores investigaram diferentes formulações para a produção das luvas, além das propriedades mecânicas e térmicas do material obtido e os parâmetros de processamento utilizados para a moldagem por imersão. Para conferir atividade antimicrobiana, um aditivo comercial contendo AgNPs e ZnONPs foi incorporado ao material. Os autores mostraram que as luvas exibiram efeito bacteriostático contra *S. aureus* e efeito bactericida contra *E. coli*.

Peter et al. (2023) prepararam um nanomaterial híbrido de CuO/Ag, que foi incorporado à superfície de um filme de NR por meio de uma estratégia de imersão simples. A síntese do nanomaterial híbrido utilizou carboximetilquitosana como agente estabilizador. Os resultados demonstraram que o filme revestido foi capaz de eliminar 83% de *E. coli* e 92% de *S. aureus*. Além das excelentes propriedades antibacterianas, a NR modificada com CuO/Ag também apresentou a capacidade de reduzir a adesão de microrganismos.

No trabalho de Zheng et al. (2022), luvas cirúrgicas comerciais de NRL foram impregnadas com CuONPs, visando à prevenção de infecções nosocomiais durante a amamentação. As CuONPs foram sintetizadas a partir do extrato de folhas de *Cinnamomum camphora* e incorporadas às luvas por meio de imersão em uma solução previamente preparada, permanecendo submersas por aproximadamente de 10 min. Os autores mostraram que as luvas revestidas com CuONPs foram capazes de reduzir a concentração de todas as bactérias testadas

em aproximadamente 30 s de contato, incluindo *S. aureus* resistente à meticilina, *Enterococcus* resistente à vancomicina, *E. coli*, *Acinetobacter* e *Candida albicans*.

Por outro lado, Bystronski et al. (2023) prepararam curativos de NRL contendo própolis vermelha e cobre depositados pela técnica de *magnetron sputtering* e observaram que, de modo geral, as amostras não apresentaram propriedades bactericidas. No entanto, após a deposição de cobre por 10 s, propriedades bacteriostáticas foram identificadas. Como conclusão principal, os autores sugerem que filmes de NRL contendo própolis vermelha e cobre possuem potencial para aplicações biomédicas, embora estudos mais aprofundados sejam necessários.

Como demonstrado nos estudos aqui relatados, as NPs metálicas e de óxidos metálicos podem modificar de maneira eficaz matrizes de NRL, conferindo-lhes propriedades antimicrobianas. Embora diversos trabalhos evidenciem a atividade antimicrobiana de CuNPs e CuONPs – foco da presente tese – há poucos relatos na literatura sobre a incorporação dessas NPs em matrizes de NRL.

No entanto, as CuONPs já foram amplamente estudadas em outras matrizes poliméricas para conferir atividade antimicrobiana. No artigo de revisão de Mallakpour et al. (2020), os autores mencionam vários estudos que empregaram polímeros naturais, como celulose, quitosana e alginato, e sintéticos, como polianilina, polivinilpirrolidona e poliuretano, como suportes para as CuONPs, visando aplicações biomédicas.

Dessa forma, o comportamento das CuONPs em matrizes de NRL ainda precisa ser investigado, e os resultados podem ser bastante promissores, considerando os achados prévios com outras NPs e matrizes poliméricas.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 MATERIAIS

As folhas de *Citrus sinensis* utilizadas para a preparação do extrato foram coletadas no município de Caxias do Sul (RS). Para a caracterização do extrato das folhas foram utilizados o reagente de Folin-Ciocalteu 2N (Dinâmica Química Contemporânea Ltda), carbonato de cálcio P.A. (Dinâmica Química Contemporânea Ltda.), cloridrato de *tris* (hidroximetil) aminometano (Tris-HCl) ( $\geq 99,0\%$ , Sigma-Aldrich), 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH, Sigma-Aldrich) e etanol 99% (Dinâmica Química Contemporânea Ltda). Os materiais utilizados para realizar a síntese verde incluíram nitrato de cobre (II) tri-hidratado ( $\geq 99,0\%$ , Sigma-Aldrich) ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), acetato de cobre (II) monohidratado ( $\geq 98,0\%$ , Sigma-Aldrich) ( $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e água deionizada do tipo 1, obtida a partir de um sistema Direct-Q 3 UV da Millipore. Para fins de comparação foram utilizadas CuONPs comerciais (<50 nm tamanho de partícula, Sigma-Aldrich) e o óxido de cobre (II) (CuO) ( $\geq 99,0\%$ , Sigma-Aldrich).

Os filmes foram preparados utilizando o NRL centrifugado, com concentração de 60% em massa e diluído em solução de amônia, fornecido pela empresa RubberSul (Estância Velha, RS). Além do NRL foram utilizados o hidróxido de amônio (P.A., Química Moderna), Tween 80 (Sigma-Aldrich), Triton X-100 (Sigma-Aldrich), óxido de zinco (Votorantim S/A) (ZnO), etil-fenil-ditiocarbamato de zinco ( $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{S}_4\text{Zn}$ , ZEPC, Basile Química), enxofre (Basile Química) e fenol-estireno (Basile Química).

A atividade antimicrobiana das amostras de CuONPs (comerciais e sintetizadas por rota verde), do CuO e dos filmes de NRL foi avaliada contra cepas de *E. coli* (ATCC 25922, Gram-negativa) e *S. aureus* (ATCC 25923, Gram-positiva). O cultivo das bactérias foi realizado em ágar Mueller-Hinton (K25-1058, Kasvi) e caldo Mueller Hinton (K25-1214, Kasvi).

## 3.2 SÍNTESE VERDE DE CuONPS

### 3.2.1 Preparação e caracterização do extrato de folha de *Citrus sinensis*

As folhas de *Citrus sinensis* foram coletadas manualmente e lavadas em água corrente, a fim de retirar possíveis contaminantes de sua superfície. Uma parte das folhas frescas coletadas foi separada para a sua utilização *in natura* e outra parte passou por um processo de secagem. A secagem das folhas foi realizada em uma estufa a 45 °C por 8 h (BANDEIRA et al., 2020b). Depois de secas, as folhas foram trituradas com o auxílio de um liquidificador até formarem um pó que, em seguida, foi armazenado em um frasco de vidro envolvido com papel alumínio. O pó de folhas de *Citrus sinensis* foi conservado à temperatura ambiente e ao abrigo da luz em dessecador, a fim de evitar a degradação dos compostos ativos presentes em sua composição.

O extrato foi preparado por meio da técnica de maceração (AZMIR et al., 2013). De forma mais detalhada, inicialmente foi adicionado em um béquer determinada quantidade de folhas e volume de solvente. Em seguida, a mistura foi colocada em um agitador magnético, onde permaneceu sob agitação constante, durante um período pré-definido de tempo. Por fim, uma filtração simples foi necessária para separar o extrato do pó seco ou pedaços de folhas utilizados para extração.

A definição das condições experimentais mais adequadas para a preparação do extrato foi realizada por meio da quantificação dos compostos fenólicos totais, utilizando o método de Folin-Ciocalteu. As condições avaliadas, bem como os detalhes da metodologia empregada, são apresentados a seguir.

### 3.2.1.1 Quantificação de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu

Inicialmente, foram realizados alguns ensaios preliminares com o intuito de verificar as melhores condições de preparação do extrato de folhas de *Citrus sinensis*. Para tanto, extrações utilizando diferentes parâmetros experimentais foram realizadas. A **Tabela 2** mostra uma relação das condições de extração que foram otimizadas, e os demais parâmetros experimentais de cada ensaio realizado. Esses experimentos foram feitos em triplicata.

**Tabela 2** - Relação das condições de extração otimizadas e dos parâmetros experimentais de cada ensaio

Ensaio	Amostra	Parâmetros experimentais do ensaio					
		Massa de folhas (g)	Preparo da folha	Solvente	Volume do solvente (mL)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	A1	2	<i>In natura</i>	Etanol/água tipo 1 (1:1)	20	TA*	30
	B1	2	Seca	Etanol/água tipo 1 (1:1)	20	TA	30
	C1	2	<i>In natura</i>	Água tipo 1	20	60-70	30
	D1	2	Seca	Água tipo 1	20	60-70	30
2	A2	2	Seca	Água tipo 1	20	25	30
	B2	2	Seca	Água tipo 1	20	40	30
	C2	2	Seca	Água tipo 1	20	70	30
3	A3	2	Seca	Água tipo 1	20	70	5
	B3	2	Seca	Água tipo 1	20	70	10
	C3	2	Seca	Água tipo 1	20	70	30

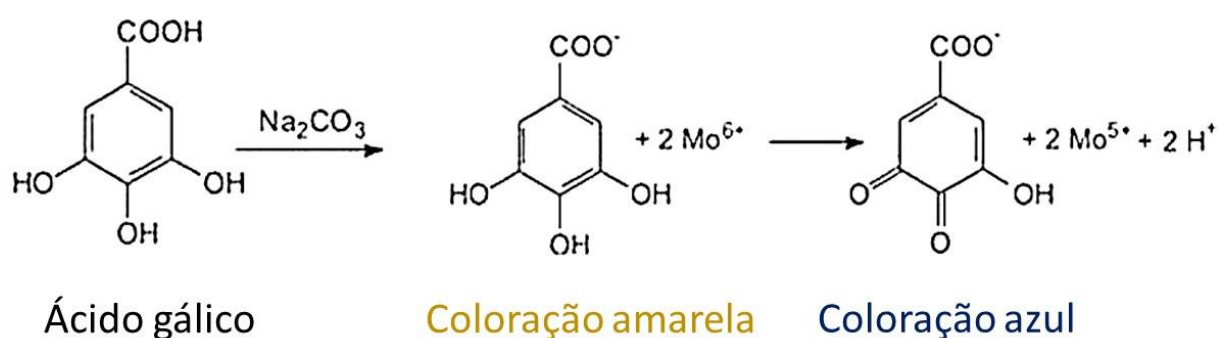
\*TA: temperatura ambiente

**Fonte:** a autora (2025)

O método de Folin-Ciocalteu foi escolhido para determinar as melhores condições de cada processo avaliado, visto que este fornece o teor de compostos fenólicos presentes no

extrato. O método funciona da seguinte forma: os compostos fenólicos presentes no extrato da planta reduzem o íon Mo(VI) encontrado no reagente Folin-Ciocalteu, que provoca uma mudança de cor que vai do amarelo para o azul, através da formação de compostos de coordenação (PIRES et al., 2017). A **Figura 13** ilustra a reação que ocorre entre o ácido gálico (composto fenólico padrão) e o reagente de Folin-Ciocalteu.

**Figura 13** - Reação entre o ácido gálico e o reagente de Folin-Ciocalteu



**Fonte:** adaptado de Pires et al. (2017)

O teor de fenólicos totais foi determinado, seguindo o procedimento adaptado de Singleton e Rossi (1965). Para o teste, 150  $\mu\text{L}$  de amostra de extrato foram adicionados a 750  $\mu\text{L}$  de reagente de Folin-Ciocalteu (10% v/v) e 600  $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (7,5% m/v). A mistura foi então mantida em estufa a 55  $^\circ\text{C}$  durante 5 min.

Para quantificar os fenólicos totais dos extratos foi necessária a utilização de um espectrofotômetro UV-Visível (Shimadzu, modelo UV-2600i) e a construção prévia de uma curva de calibração externa com seis concentrações conhecidas (1,5 a 100,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em termos de ácido gálico, partindo de uma solução estoque de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  preparada com os solventes etanol e água (1:1 v/v).

Posteriormente, a leitura foi realizada utilizando o comprimento de onda de 760 nm. Os resultados obtidos foram expressos em µg equivalentes de ácido gálico (EAG) por mililitro de extrato, e em miligrama equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de folhas.

### 3.2.1.2 Atividade antioxidante do extrato de folha de *Citrus sinensis*

O extrato obtido sob as condições de extração otimizadas também foi avaliado pelo teste com o radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH), que evidencia a presença de compostos antioxidantes essenciais para a síntese verde. O ensaio de DPPH foi realizado conforme o procedimento descrito por Yamaguchi et al. (1998), com algumas adaptações. Em tubos de ensaio, foram adicionados 100 µL de amostra de extrato puro, 400 µL da solução tampão Tris-HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH = 7,0) e 500 µL de uma solução de DPPH 0,5 mmol L<sup>-1</sup>. A amostra controle foi preparada substituindo-se o extrato vegetal por seu solvente. Depois de serem agitadas, as amostras permaneceram em repouso e protegidas da luz por 20 min, sendo então analisadas em espectrofotômetro UV-Vis a 517 nm. O percentual de inibição foi calculado de acordo com a **Equação 4**, onde  $A_C$  é a absorvância da amostra controle e  $A_E$  é a absorvância da amostra contendo o extrato puro:

$$\% \text{ inibição} = \frac{A_C - A_E}{A_C} \times 100 \% \quad (4)$$

### 3.2.2 Otimização dos parâmetros experimentais de síntese verde

Após a obtenção do extrato, iniciaram-se os estudos para a otimização dos parâmetros experimentais da síntese verde das CuONPs, visando maximizar a atividade antimicrobiana das

mesmas. Os ensaios foram conduzidos em um sistema equipando com dois agitadores magnéticos e dois balões de fundo redondo, posicionados em recipientes para banho-maria. Além disso, foram utilizados dois condensadores, suportes universais, garras e um banho ultratermostático com circulação interna e controle de temperatura (Modelo M214M2, MYLABOR). A **Figura 14** ilustra o sistema utilizado na síntese das CuONPs do presente trabalho.

**Figura 14** - Sistema com refluxo utilizado na síntese das CuONPs



**Fonte:** a autora (2025)

De forma análoga à preparação do extrato, diversos parâmetros experimentais foram otimizados e avaliados. Para tanto, 175 mL de uma solução de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ou  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , em diferentes concentrações e a 70 °C, foram adicionados a 25 mL de extrato puro de folhas de *Citrus sinensis*. O pH da mistura foi ajustado conforme a condição

avaliada. Em seguida, a mistura foi transferida para um balão de fundo redondo, onde permaneceu sob agitação constante durante 4 h. Durante todo o procedimento, o banho-maria foi mantido entre 70 e 80 °C para minimizar a eventual degradação de compostos fenólicos do extrato, devido às altas temperaturas e ao tempo de processo. O banho ultratermostático, responsável pela refrigeração dos condensadores, foi mantido a 15 °C durante toda a síntese.

Ao término do procedimento, as partículas formadas no balão de fundo redondo, indicadas pela seta laranja na **Figura 15(a)**, foram separadas do meio por centrifugação a 5000 rpm e durante 10 min. O sobrenadante foi descartado, e a amostra lavada com 200 mL de água tipo 1 para remover possíveis resíduos do sal que não reagiram, além de outras impurezas. A pasta formada a partir do  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  encontra-se na **Figura 15(b)**, enquanto a obtida a partir do  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  é mostrada na **Figura 15(c)**. O material resultante foi seco em estufa a 100 °C por 1 h até se tornar um pó escuro, seguido de uma pré-moagem com o auxílio de almofariz e pistilo. Por fim, o pó foi calcinado em diferentes temperaturas e novamente triturado.

**Figura 15** - Partículas formadas **(a)** antes do processo de centrifugação; e partículas obtidas a partir dos precursores **(b)**  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e **(c)**  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , após o processo de centrifugação



**Fonte:** a autora (2025)

Os principais parâmetros da síntese verde das CuONPs avaliados nesta tese encontram-se na **Tabela 3**.

**Tabela 3** - Diferentes metodologias avaliadas para a síntese verde de CuONPs com o extrato de *Citrus sinensis*

Síntese	Parâmetros experimentais			
	Tipo de sal precursor	Concentração do sal precursor (g L <sup>-1</sup> )	pH inicial	Temperatura de calcinação (°C)
A1	Cu(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	5	3,0	-
A2	Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 3H <sub>2</sub> O	5	3,0	-
B1	Cu(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	5	7,0	-
B2	Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 3H <sub>2</sub> O	5	7,0	-
C1	Cu(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	5	10,0	-
C2	Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 3H <sub>2</sub> O	5	10,0	-
D1	Cu(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	5	7,0	400
D2	Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 3H <sub>2</sub> O	5	7,0	400
E1	Cu(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	5	10,0	400
E2	Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 3H <sub>2</sub> O	5	10,0	400
F1	Cu(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	5	7,0	200
F2	Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 3H <sub>2</sub> O	5	7,0	200
G1	Cu(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	10	7,0	300
G2	Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 3H <sub>2</sub> O	10	7,0	300

**OBS:** todas as sínteses foram realizadas com o extrato de folhas de *Citrus sinensis* com concentração igual a 0,1 g mL<sup>-1</sup>, utilizando as condições experimentais previamente otimizadas.

**Fonte:** a autora (2025)

As quantidades e concentrações de cada componente foram definidas com base em estudos previamente publicados sobre essa temática. Cada metodologia proposta foi avaliada preliminarmente por meio da caracterização das NPs obtidas, utilizando a técnica de DRX e o

ensaio de inibição do crescimento bacteriano. Além disso, as CuONPs produzidas foram comparadas com amostras comerciais de CuONPs e CuO. A metodologia que resultou nos melhores resultados foi selecionada para produzir as CuONPs que foram utilizadas para preparar os filmes de NRL, as quais serão caracterizadas em detalhes por meio de outras técnicas instrumentais. As CuONPs obtidas e que apresentaram atividade antimicrobiana foram caracterizadas por DRX. As amostras comerciais de CuO e CuONPs também foram caracterizadas por meio dessa técnica, a fim de verificar possíveis diferenças em relação às NPs produzidas por síntese verde.

### **3.2.3 Voltametria cíclica**

O mecanismo de formação de CuONPs mediado pelos componentes do extrato de folhas de *Citrus sinensis* foi investigado por meio da técnica de voltametria cíclica, utilizando uma célula convencional de três eletrodos à temperatura ambiente, com um potenciostato (Ivium Technologies, Eindhoven, Holanda), operando em uma faixa de potencial de  $-0,9$  V a  $+0,9$  V, taxa de varredura de  $50,0$  mV s<sup>-1</sup> e passo de  $5,0$  mV. Todos esses parâmetros foram definidos com base em estudos anteriores (AL-HARAZIE et al., 2023; MOUCHREK FILHO; CHIERICE; MARQUES, 1999).

Os voltamogramas cíclicos foram obtidos utilizando um eletrodo de trabalho de carbono vítreo, um fio de platina como contra-eletrodo e um eletrodo de referência de calomelano. O eletrodo de trabalho foi polido com pó de alumina e limpo com acetona por 5 min em um banho ultrassônico antes de cada análise. Além disso, uma solução de eletrólito de suporte de KCl ( $1,0$  mol L<sup>-1</sup>) foi usada. Para cada leitura, 10 mL de amostra foram adicionados a 40 mL da solução de suporte (AGOSTINHO et al., 2004).

### 3.2.4 Caracterização das CuONPs

#### 3.2.4.1 Difração de raios X (DRX)

Os padrões de DRX das amostras comerciais de CuONPs e CuO, bem como das CuONPs sintetizadas neste trabalho, foram registrados em um difratômetro de pó (Shimadzu, modelo XRD-6000) equipado com um ânodo de Cu ( $K\alpha_1 = 1,5406 \text{ \AA}$ ) em uma faixa de  $2\theta$  de  $20^\circ$  a  $80^\circ$ , com um tempo de aquisição de 5 s. A análise dos difratogramas foi realizada com o auxílio do *software* QualX.

#### 3.2.4.2 Microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo (MEV-FEG) acoplada à espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

A morfologia das CuONPs comerciais e daquelas obtidas por síntese verde foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo (MEV-FEG). As amostras foram previamente recobertas com uma fina camada de ouro por aproximadamente 3 min, e as micrografias foram obtidas em um microscópio eletrônico TESCAN MIRA3, operando com um feixe de elétrons de 20 kV.

#### 3.2.4.3 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Para a análise TEM, as CuONPs comerciais e obtidas por síntese verde foram previamente dispersas ultrassonicamente em isopropanol por 30 min e, em seguida, gotejadas em *grids* de cobre. As micrografias foram obtidas utilizando um microscópio FEI Morgagni 268D, com uma tensão de aceleração de 80 kV. O tamanho médio das partículas foi

determinado com o auxílio do software *Image J*, com base na medição de aproximadamente 150 NPs (RUEDEN et al., 2017).

### 3.3 CONFECÇÃO DE FILMES DE NRL CONTENDO CuONPs

Após definir a metodologia de síntese verde que produziu as CuONPs com as características físicas, químicas e antimicrobianas mais adequadas, iniciaram-se os ensaios de incorporação dessas NPs em uma matriz de NRL, com o objetivo de produzir filmes. De modo geral, a metodologia de incorporação e preparação dos mesmos manteve-se constante durante todos os ensaios.

Inicialmente, diferentes quantidades de CuONPs foram pesadas e dispersadas em 100 g de uma mistura contendo surfactante e água, durante 20 min, com o auxílio de um banho ultrassônico. Em seguida, os agentes de vulcanização foram adicionados à mistura, onde permaneceram em processo de dispersão por mais 40 min. Após esse período, um béquer contendo 100 g de NRL foi colocado em um agitador magnético, onde os agentes de vulcanização e as CuONPs foram adicionadas e agitadas por mais 2 h, para garantir a completa incorporação das NPs à matriz de NRL. Finalmente, toda a mistura foi vertida em placa de Petri e levada para estufa a 60 °C, sem circulação forçada de ar, onde permaneceu durante 7 dias até a secagem completa dos filmes.

Após os filmes de NRL estarem completamente secos, foi realizado um processo de lixiviação para remover o excesso de reagentes que não foram devidamente incorporados à matriz. Para tanto, os filmes de NRL ficaram submersos em 1000 mL de água deionizada a 60° C durante 5 min. Em seguida, para finalizar a confecção e vulcanização dos filmes, os mesmos foram levados novamente à estufa a 110 °C, onde permaneceram por mais 45 min. É

importante destacar que os filmes de NRL precisaram passar por uma etapa de vulcanização para serem manipulados e caracterizados.

A formulação em relação aos componentes de vulcanização utilizada durante a produção dos filmes neste trabalho foi a mesma desenvolvida por Restelatto et al. (2024), uma vez que esse estudo apresentou resultados satisfatórios em termos de resistência à tração, resistência ao rasgamento e alongamento na ruptura. A **Tabela 4** mostra as quantidades utilizadas para cada um dos componentes da matriz de NRL.

**Tabela 4** - Quantidades dos agentes de vulcanização utilizados na confecção dos filmes de NRL

Componente	Quantidade (phr)
NRL	100,0
Hidróxido de potássio	0,20
Fenol-estireno <sup>1</sup>	0,50
Óxido de zinco <sup>2</sup>	0,25
ZEPC <sup>3</sup>	0,50
Enxofre	0,75

**OBS:** <sup>1</sup>antioxidante, <sup>2</sup>ativador, <sup>3</sup>acelerador

**Fonte:** a autora (2025)

Neste trabalho, por outro lado, foram testados três diferentes surfactantes, com teores variados, para dispersar as CuONPs e os agentes de vulcanização. A **Tabela 5** apresenta as variações nos tipos e concentrações dos surfactantes utilizados. Além disso, após a definição do surfactante mais adequado, também foi ajustada a quantidade de CuONPs (4,16, 2,03 e 1,04 phr) inseridas na formulação do filme de NRL. De forma análoga ao estudo realizado para definir a metodologia mais adequada para a síntese verde, os filmes de NRL foram avaliados quanto às suas propriedades antimicrobianas após a sua preparação.

**Tabela 5** - Lista de surfactantes testados e suas respectivas quantidades

<b>Amostra</b>	<b>Surfactante</b>	<b>Concentração</b>
A1	Hidróxido de amônio	0,01% (v/v)
B1	Tween 80	1% (m/m)
B2	Tween 80	4% (m/m)
C1	Triton X-100	1% (m/m)
C2	Triton X-100	4% (m/m)

**Fonte:** a autora (2025)

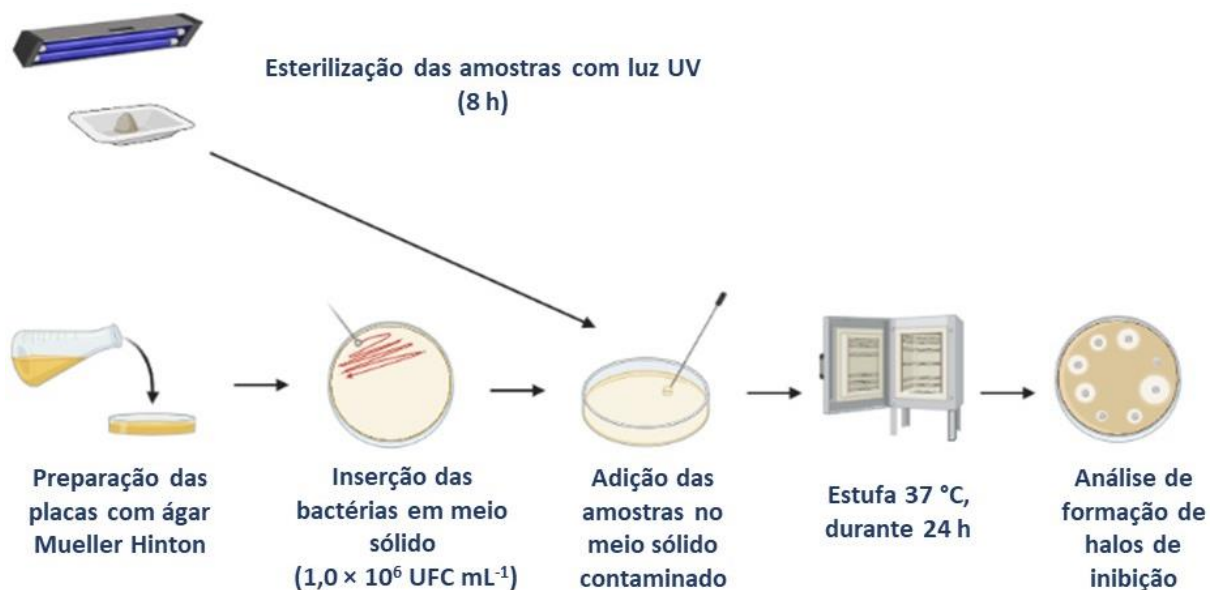
Por fim, é importante destacar que os ensaios preliminares de otimização das condições experimentais foram realizados utilizando 4,16 phr de CuONPs comerciais, devido ao baixo rendimento associado à produção de CuONPs por síntese verde. Após a definição do surfactante e da quantidade ideal de CuONPs, os filmes contendo CuONPs provenientes de síntese verde foram confeccionados.

### 3.4 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

Para verificar o efeito de inibição do crescimento bacteriano foram realizados ensaios tanto em meio sólido (disco-difusão), quanto em meio líquido (diluição em caldo), seguindo as normas técnicas M2-A8 e M7-A6, respectivamente. A partir desses ensaios, foi possível avaliar o efeito bacteriostático e/ou bactericida das amostras de CuONPs comerciais e das obtidas por síntese verde, do CuO e dos filmes de NRL. Os ensaios foram realizados com cepas de *E. coli* (Gram-negativa) e *S. aureus* (Gram-positiva). Antes de iniciar os ensaios, as amostras foram esterilizadas com luz UV durante 8 h.

O ensaio que verificou o efeito bacteriostático das amostras está ilustrado na **Figura 16**. Nesse ensaio, ambas as cepas bacterianas foram inoculadas nos meios de cultura com uma concentração de  $1,0 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> e, em seguida, 10 mg das amostras de CuONPs e de CuO ou amostras circulares de NRL com 1,5 cm de diâmetro, foram adicionadas às placas de Petri com o ágar Mueller-Hinton. Por fim, as placas foram incubadas em uma estufa bacteriológica a 37 °C, onde permaneceram por 24 h. Ao término desse período, a presença ou ausência de halos de inibição em torno dos locais onde foram colocadas as amostras de CuONPs foi avaliada visualmente, e os resultados foram registrados por meio de fotografias digitais.

**Figura 16** - Ensaio microbiológico para a avaliação do efeito bacteriostático das amostras CuONPs e de NRL



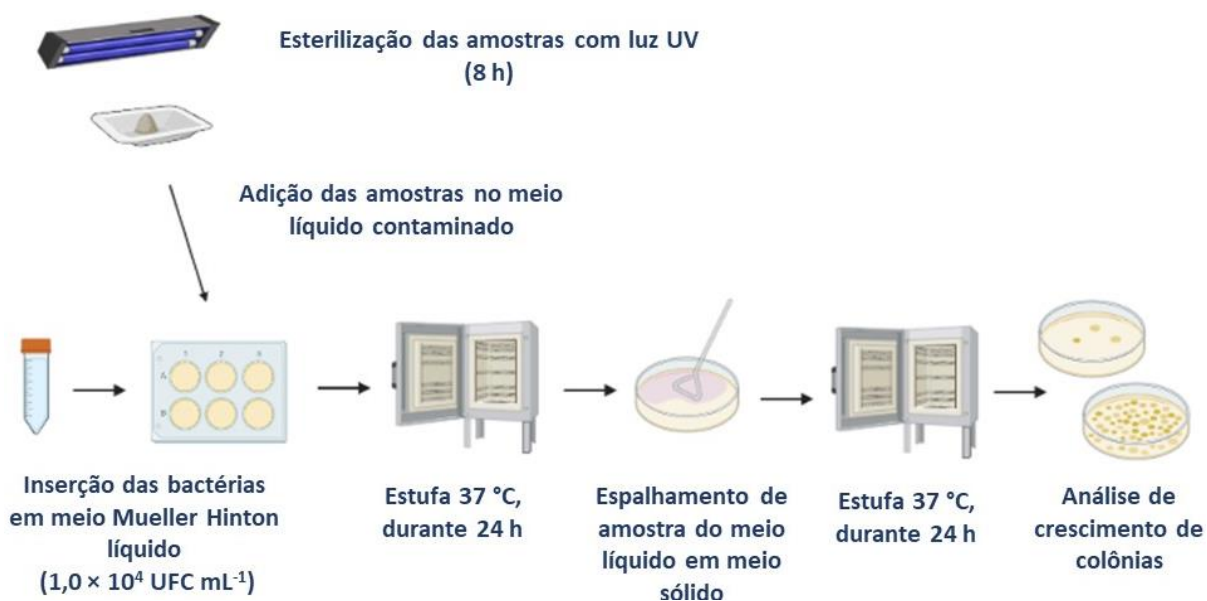
**Fonte:** a autora (2025)

Para avaliar o efeito bactericida das amostras, os ensaios foram realizados em meio líquido (**Figura 17**). Inicialmente, as cepas bacterianas, com concentração de  $1,0 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>, foram inoculadas em placas de 12 poços, contendo o caldo Mueller-Hinton. Em seguida, e de forma similar aos ensaios em meio sólido, foram adicionadas 10 mg

das amostras de CuONPs e de CuO ou amostras circulares de NRL com 1,5 cm de diâmetro, em cada poço que continha o meio de cultura e as bactérias. As placas foram mantidas por 24 h em uma estufa bacteriológica a 37 °C.

Para a validação dos ensaios em meio líquido e a verificação de contaminação com outras bactérias, foram realizados controles: um controle positivo, no qual apenas o meio de cultura e as bactérias foram adicionados; e um controle negativo, no qual foi colocado apenas o meio de cultura.

**Figura 17** - Ensaio microbiológico para a avaliação do efeito bactericida das amostras de CuONPs e de NRL



**Fonte:** a autora (2025)

Para verificar o efeito bactericida no ensaio em meio líquido, usualmente se adiciona o corante resazurina aos meios em que as bactérias e as amostras foram inseridas. O corante tem a função de indicar a presença ou ausência de respiração celular bacteriana. Quando o meio fica rosa, o ensaio mostra que existe respiração e, portanto, não se observa efeito bactericida. Por outro lado, quando o meio se torna azul, o ensaio revela que não existe respiração celular e, por

isto, observa-se efeito bactericida. No entanto, as CuONPs, especificamente, apresentam uma coloração azulada, que é característica de íons cobre (II) que são eventualmente lixiviados por estarem em meio aquoso. Por esse motivo, visando verificar o efeito bactericida das amostras, foi inserida uma etapa adicional ao ensaio. Com o auxílio de um *swab*, uma amostra do meio que esteve em contato com as bactérias e a amostra por 24 h foi coletada e esfregada em uma placa de Petri contendo ágar. As placas foram então incubadas em uma estufa bacteriológica a 37 °C por mais 24 h, e o crescimento de colônias bacterianas foi observado e registrado por meio de fotografias digitais.

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada com o intuito de determinar a concentração mínima de agente necessária para inibir e/ou causar a morte dos microrganismos (SJOLLEMA et al., 2018). Para tanto, o mesmo procedimento apresentado na **Figura 17** foi utilizado, e essa avaliação foi feita somente para as amostras de CuONPs comerciais e as obtidas por síntese verde. Nesse ensaio, diferentes quantidades de amostras (2,0, 4,0, 6,0 e 8,0 mg) foram inseridas nos poços que continham sempre a mesma concentração de bactérias.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE FOLHAS DE *CITRUS SINENSIS*

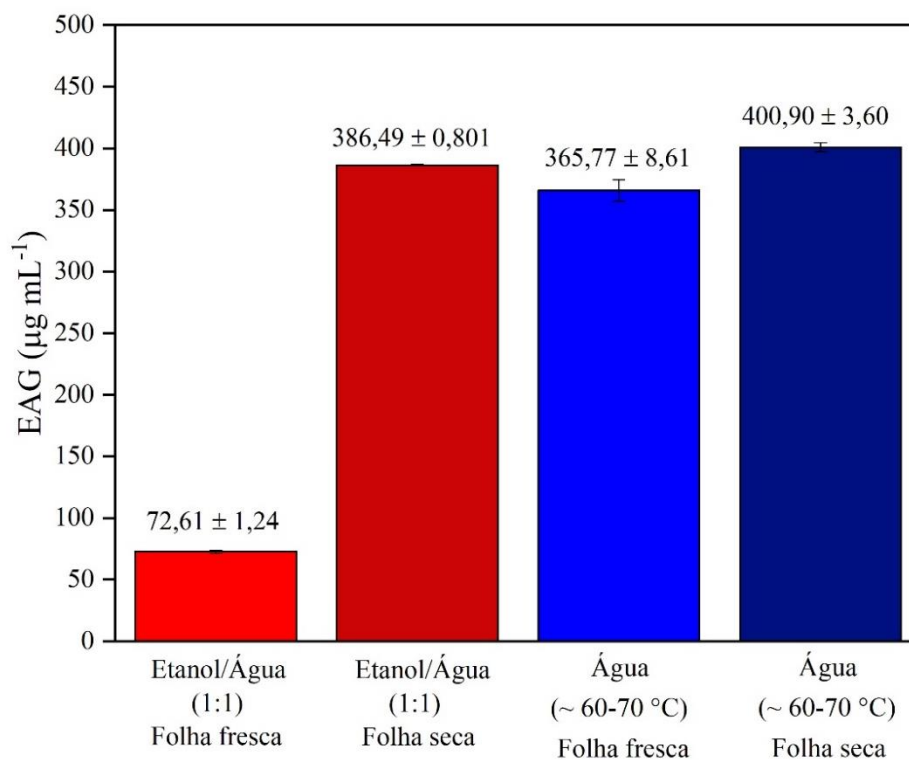
#### 4.1.1 Quantificação de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu

Três ensaios preliminares foram realizados, a fim de estabelecer as melhores condições experimentais para extrair os compostos ativos das folhas de *Citrus sinensis*, e que são essenciais para o processo de síntese verde das CuONPs. Como as folhas são constituídas em grande parte por compostos fenólicos, os ensaios foram avaliados pelo método de Folin-Ciocalteu, conforme descrito na **Seção 3.2.1.1**. De acordo com Azmir et al. (2013), os fatores mais comuns que afetam os processos de extração incluem o pré-tratamento da planta e a maneira como ela é empregada, o solvente, a temperatura, a pressão e o tempo. Com exceção à pressão do sistema, os demais fatores foram avaliados nesta etapa do trabalho.

Após a coleta das folhas de *Citrus sinensis*, realizou-se uma avaliação preliminar para verificar se as mesmas deveriam ser pré-tratadas, a fim de potencializar uma maior extração de compostos fenólicos, e qual seria a melhor maneira de conservá-las. Em geral, a maioria das plantas é utilizada na forma fresca ou *in natura*, especialmente para fins medicinais, pois essa condição contribui para presença dos compostos responsáveis pelos efeitos desejados. No entanto, a comercialização torna a utilização das plantas *in natura* inviável, pois a planta fresca possui alto teor de água, o que favorece o seu apodrecimento e a degradação de seus princípios ativos (RODRIGUES et al., 2011). Por esse motivo, a presença de compostos fenólicos presentes nas folhas de *Citrus sinensis* foi avaliada de duas formas: *in natura* e após processo de secagem. A **Figura 18** apresenta os resultados do “ENSAIO 1”, referentes aos efeitos da

utilização da folha de *Citrus sinensis* na forma fresca (*in natura*) e seca (em pó) e duas soluções extratoras.

**Figura 18** - Influência da secagem das folhas de *Citrus sinensis* e do solvente utilizado na preparação do extrato



**Fonte:** a autora (2025)

Como pode ser observado na **Figura 18**, os extratos obtidos a partir das folhas que passaram pelo processo de secagem e moagem apresentaram maiores concentrações de compostos fenólicos quando comparadas às folhas frescas. Isso foi constatado tanto para as amostras que foram extraídas pela mistura etanol/água (1:1), quanto para aquelas que utilizaram apenas água (60-70 °C). Ainda que o processo de secagem das folhas possa degradar alguns compostos, como foi mencionado anteriormente, a secagem, seguida de moagem, possibilitou que as folhas fossem transformadas em um pó. Azmir et al. (2013) explicam que essa prática

faz com que uma maior área superficial da folha esteja disponível para entrar em contato com o solvente, o que resulta em uma maior eficiência de extração. Além disso, outro fator importante a ser destacado é que grande parte da água que envolve os compostos presente na estrutura da folha foi removida durante o processo de secagem. Isso implica que a mesma massa de amostra seca e em *in natura* não apresenta a mesma concentração de compostos fenólicos, uma vez que, na amostra *in natura*, uma parcela considerável da massa corresponde à água.

A maioria dos estudos que investigaram extratos de folhas de plantas relata a utilização prévia dos processos de secagem e moagem. Singh et al. (2016), por exemplo, prepararam o extrato de folhas de *Origanum majorana* e *Citrus sinensis* para posterior síntese de AgNPs. Neste trabalho, as folhas coletadas foram lavadas, secas ao sol e fragmentadas em pequenos pedaços, antes da preparação do extrato. No entanto, os autores não especificaram o tempo do processo de secagem. Ekwenye e Edeha (2010), por sua vez, avaliaram o efeito antibacteriano do extrato de folhas de *Citrus sinensis*. Para obtê-lo, as plantas recém-colhidas foram lavadas em água, sendo posteriormente secas em estufa a 65 °C por 36 h. Em um outro estudo, no qual foram analisadas a presença de compostos fenólicos e a atividade antioxidante de folhas de *Citrus sinensis L.* e *Citrus aurantium*, Lagha-Benamrouche e Madani (2013) cortaram e secaram as folhas em estufa a 40 °C durante uma semana antes do uso.

Outro parâmetro experimental bastante importante a ser considerado no processo de extração é a escolha do solvente. Venkatesan et al. (2019) explicam que, geralmente, misturas aquosas de solventes orgânicos são as mais adequadas para extração de compostos fenólicos de fontes vegetais. No entanto, de acordo com os princípios da química verde, conforme discutido na **Seção 2.2.1.1**, o solvente a ser escolhido deve ser seguro, ambientalmente amigável e economicamente viável. Segundo Adamu et al. (2020) que, de forma análoga ao presente trabalho, também analisaram extratos de folhas de *Citrus sinensis*, verificou-se que, apesar das diferenças de polaridade, tanto a água quanto o metanol foram capazes de extrair alcaloides,

taninos, flavonoides, esteroides e terpenoides. Levando em consideração esses aspectos, optou-se pelo uso de apenas duas soluções extratoras: a mistura de etanol e água tipo 1 (1:1 v/v) e água tipo 1, à temperatura entre 60-70 °C.

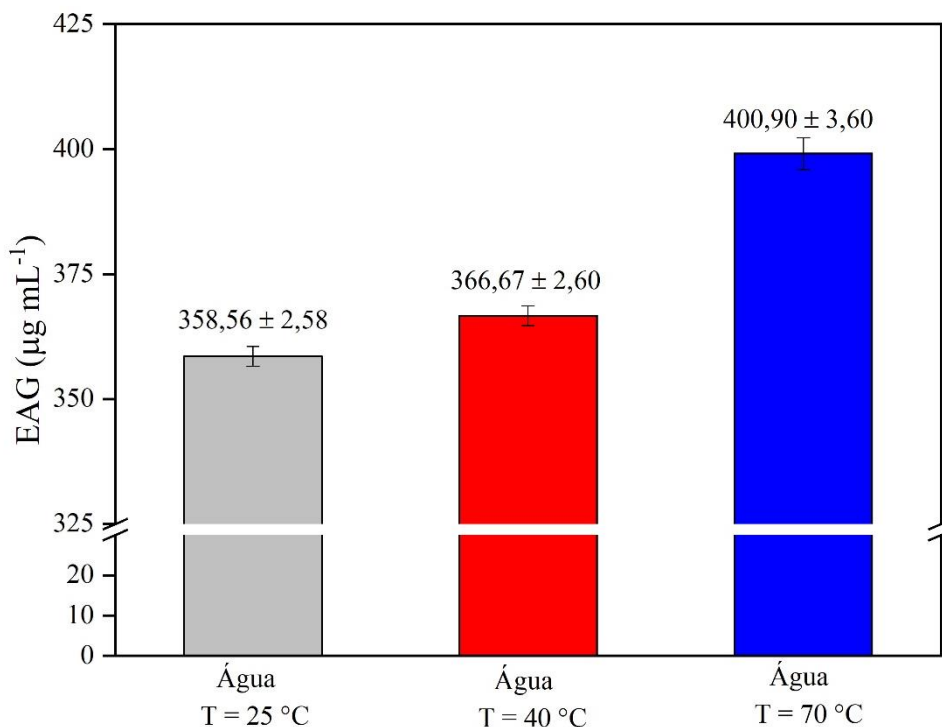
Conforme pode ser observado na **Figura 18**, as amostras de extrato obtidas apenas com água (60-70 °C) apresentaram, em média, um valor relativamente superior de compostos fenólicos (400,90 µg EAG mL<sup>-1</sup> de extrato), quando comparadas às amostras obtidas com a mistura de etanol e água (1:1 v/v) (386,49 µg EAG mL<sup>-1</sup> de extrato). A partir desse resultado, é possível perceber que grande parte dos compostos presentes nas amostras de folhas de *Citrus sinensis* apresentam maior afinidade pela água do que pelo etanol, e que estes podem ser antocianinas, taninos, saponinas, terpenoides, entre outros. Esse resultado pode variar de acordo com o período de colheita e grau de maturação das plantas. Além disso, é importante destacar que esse resultado é interessante, uma vez que a água é um solvente que está em consonância com os princípios da química verde.

De maneira análoga a este estudo, Adnan et al. (2014) verificaram, por meio do método de Folin-Ciocalteu, que a água destilada a 50 °C resultou em uma maior remoção de compostos fenólicos de folhas de três tipos de espécies cítricas (*Citrus paradisi*, *Citrus sinensis* e *Citrus jambhiri*) em comparação com a extração utilizando o metanol em diferentes concentrações (50, 80 e 100%). O extrato obtido, especificamente, a partir de folhas de *Citrus sinensis* apresentou, em média, os seguintes teores de compostos fenólicos: 1379,3; 1284,8; 985 e 608 mg EAG g<sup>-1</sup> de folhas para as extrações com água destilada a 50 °C e metanol a 50, 80 e 100%, respectivamente.

Após definir que as folhas passariam por um processo de secagem e moagem, e que o solvente utilizado seria a água, percebeu-se a necessidade de avaliar a temperatura do solvente escolhido. Como os testes iniciais foram realizados a uma temperatura relativamente elevada, o objetivo desse ensaio foi verificar se seria possível obter a mesma quantidade de compostos

fenólicos com temperaturas mais baixas. Para isso, foi realizado o “ENSAIO 2”, no qual foram avaliadas outras três temperaturas, utilizando a água como solvente: 25, 45 e 70 °C. A **Figura 19** apresenta os resultados obtidos para esse ensaio.

**Figura 19** - Influência da temperatura do solvente na preparação do extrato de folhas de *Citrus sinensis*



**Fonte:** a autora (2025)

Os resultados presentes na **Figura 19** indicaram que o aumento da temperatura favoreceu o processo de extração, pois uma maior concentração de compostos fenólicos foi detectada. Os valores obtidos foram 358,56; 366,67 e 399,10 µg EAG mL<sup>-1</sup> de extrato, utilizando água a 25, 40 e 70 °C, respectivamente.

De acordo com Che Sulaiman et al. (2017), quando a planta é submetida a altas temperaturas, seus tecidos vegetais são amolecidos, o que enfraquece as membranas celulares presentes. Como resultado, os compostos fenólicos podem ser extraídos pelo solvente com

maior facilidade. Além disso, Ibañez et al. (2012) explicam que temperaturas elevadas podem aumentar a taxa de transferência de massa, devido à maior agitação das moléculas, além de reduzir a viscosidade e a tensão superficial dos solventes, o que melhora a eficiência do processo de extração.

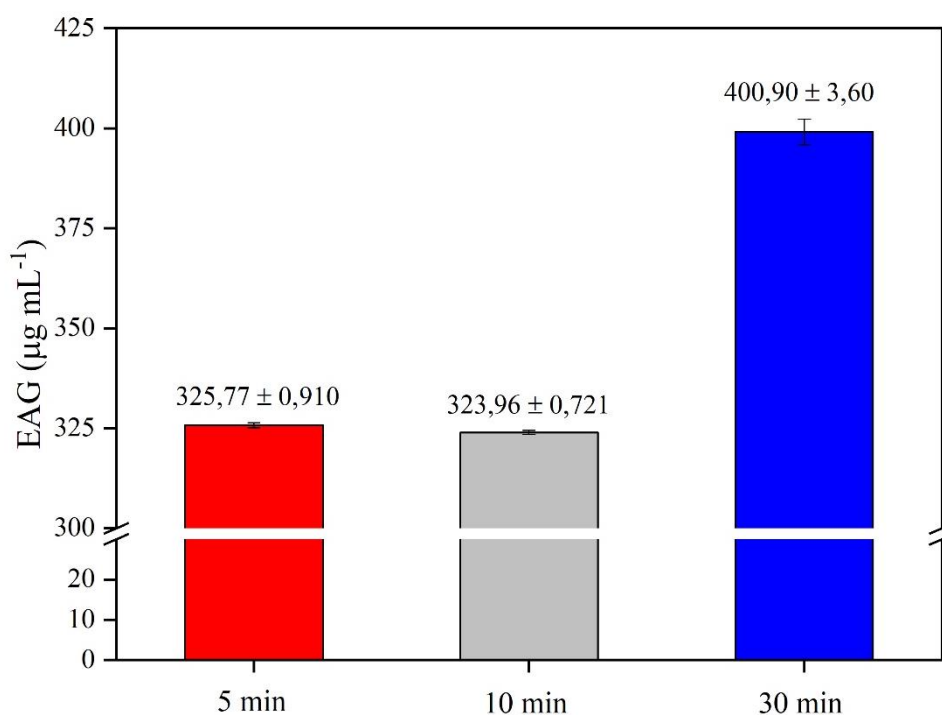
Segundo Antony e Farid (2022), o maior rendimento de compostos fenólicos em extrações tradicionais ocorre entre 60 e 80 °C. No entanto, devido à perda de solvente em temperaturas mais elevadas, o seu emprego não é muito comum. No estudo de Akowuah et al. (2009) foi constatado que temperaturas mais elevadas no processo de extração podem, inclusive, causar a degradação de alguns compostos fenólicos mais sensíveis presentes na estrutura da planta. Nesse trabalho, os autores avaliaram a extração de compostos fenólicos com uma solução extratora contendo água e metanol (4:1 v/v) e folhas de *Gynura procumbens*. Eles trabalharam com temperaturas variando de 40 a 100 °C e verificaram que a quantidade de compostos fenólicos caiu de 21,74 mg EAG g<sup>-1</sup> de folhas (para a temperatura mais baixa) para 8,54 mg EAG g<sup>-1</sup> de folhas (para a temperatura mais alta), com a principal queda observada a 80 °C (12,22 mg EAG g<sup>-1</sup> de folhas). Por todos esses motivos, a temperatura de extração escolhida para o presente estudo foi de 70 °C.

O último parâmetro avaliado no processo de extração foi o tempo de contato entre o pó das folhas de *Citrus sinensis* e o solvente utilizado. Nos primeiros ensaios realizados, fixou-se o tempo em 30 min, tomando por base os trabalhos de Velsankar et al. (2020) e Rehana et al. (2017), que prepararam seus extratos utilizando 30 e 20 min, respectivamente. Dessa forma, visando otimizar o processo, optou-se por avaliar tempos menores, como 5 e 10 min. A **Figura 20** apresenta os resultados encontrados para o “ENSAIO 3”.

Através da **Figura 20**, é possível observar que em apenas 5 e 10 min de ensaio, uma quantidade relativamente elevada de compostos fenólicos pôde ser extraída das folhas de *Citrus sinensis*. Ainda assim, após 30 min, obteve-se 75 µg EAG a mais por mililitro de extrato.

Embora a quantidade de compostos fenólicos extraídos com o acréscimo de 20 min não tenha sido muito maior do que com 5 e 10 min, optou-se por manter o tempo inicial para as demais extrações, visando obter a maior quantidade possível desses compostos, uma vez que esse tempo adicional não representa um grande custo energético. É importante ressaltar que a presença de compostos fenólicos no extrato é fundamental no processo de síntese verde, e, portanto, quanto maior a quantidade, mais rápida e eficiente será a síntese.

**Figura 20** - Influência do tempo de contato na preparação do extrato de folhas de *Citrus sinensis*



**Fonte:** a autora (2025)

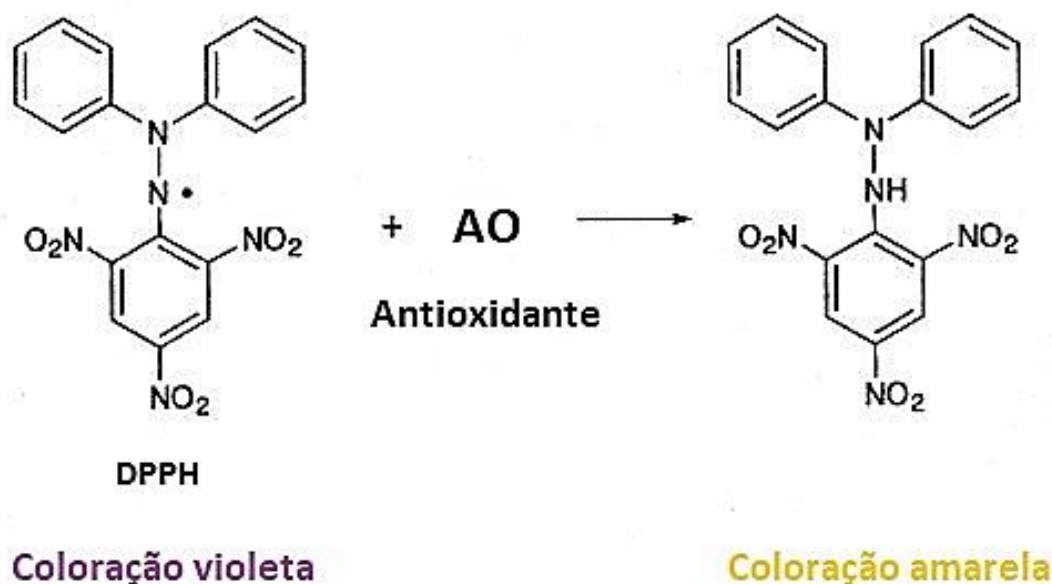
Finalmente, o método de Folin-Ciocalteu revelou que, sob as condições experimentais de extração otimizadas, é possível obter a quantidade de compostos fenólicos de aproximadamente 400,90 µg EAG mL<sup>-1</sup> de extrato ou 26,73 mg EAG g<sup>-1</sup> de folhas de *Citrus sinensis*. A quantidade de compostos fenólicos extraída das folhas de *Citrus sinensis* no presente trabalho é relativamente menor do que a observada no trabalho de Adnan et al. (2014)

(1379,3 mg EAG g<sup>-1</sup> de folhas de *Citrus sinensis*), mas bastante semelhante àquela encontrada por Tawaha et al. (2007) (23,4 mg EAG g<sup>-1</sup> de folhas de *Citrus sinensis*). A água foi o solvente escolhido em ambos os estudos.

#### 4.1.2 Atividade antioxidante do extrato de folhas de *Citrus sinensis*

Mais importante do que a presença de compostos fenólicos na composição do extrato para o processo de síntese verde, é a capacidade antioxidante desses compostos. Dessa forma, a realização do ensaio de DPPH torna-se fundamental para avaliar se o extrato poderá atuar como um agente redutor nessa circunstância. Nesse método, as substâncias antioxidantes presentes no extrato reduzem o radical DPPH, conforme reação mostrada na **Figura 21**, ocasionando a mudança da cor da solução de violeta para amarelo.

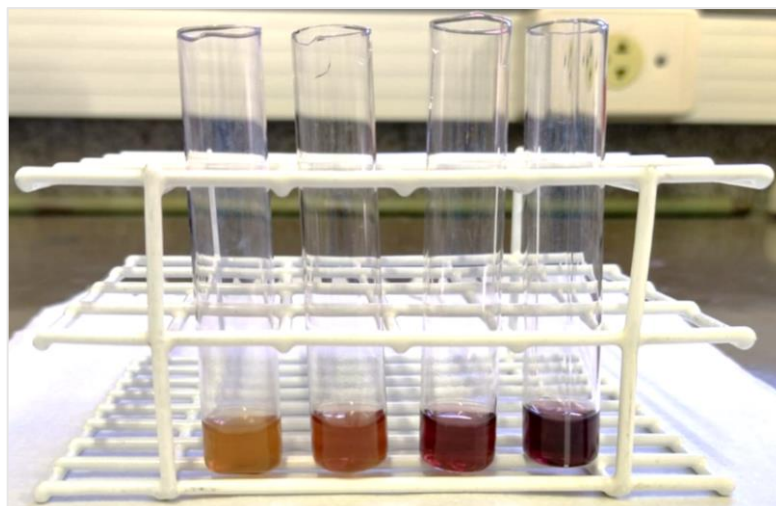
**Figura 21** - Reação de redução do radical DPPH



**Fonte:** adaptado de Yamaguchi et al. (1998)

A **Figura 22** apresenta uma fotografia de um ensaio no qual quatro amostras do extrato, com diferentes diluições, foram colocadas em contato direto com o radical DPPH, sem a adição de *tris*-cloridrato. Considerando que a cor característica do radical DPPH é roxo, é possível perceber que quanto mais concentrado é o extrato, mais amarelada se torna a amostra. Essa característica visual indica a atividade redutora do extrato.

**Figura 22** - Diferentes diluições do extrato da folha de *Citrus sinensis* em contato direto com o radical DPPH (da esquerda para direita tem-se a amostra de extrato puro, seguido de suas diluições de 75, 50 e 25%, respectivamente)



**Fonte:** a autora (2025)

Através da **Equação (4)**, apresentada na **Seção 3.2.1.2**, foi possível determinar que o extrato puro, obtido a partir da folha de *Citrus sinensis*, apresentou atividade sequestrante de aproximadamente 80 % do radical DPPH. Esse resultado é excelente, uma vez que mostra que o extrato contém uma grande quantidade de compostos com atividade antioxidante. Khettal et al. (2017) também avaliaram a atividade antioxidante de vários extratos obtidos a partir das folhas de diferentes espécies de *Citrus* e observaram atividade sequestrante de DPPH variando entre 48 e 84%. Além disso, os autores realizaram extrações utilizando solventes diferentes para

fins de comparação. Os extratos aquosos das espécies *Citrus aurantifolia*, *Citrus hamlin* e *Citrus limon* apresentaram maior atividade antioxidante do que os extratos metanólicos. Por outro lado, nenhuma grande diferença no poder sequestrante do radical DPPH foi observada entre os extratos metanólicos e aquosos de *Citrus naval*, *Citrus grandis* e *Citrus clementina*.

A partir desses resultados, pôde-se concluir que o extrato de folhas de *Citrus sinensis* possui atividade antioxidante adequada para ser utilizado no processo de síntese verde das CuONPs.

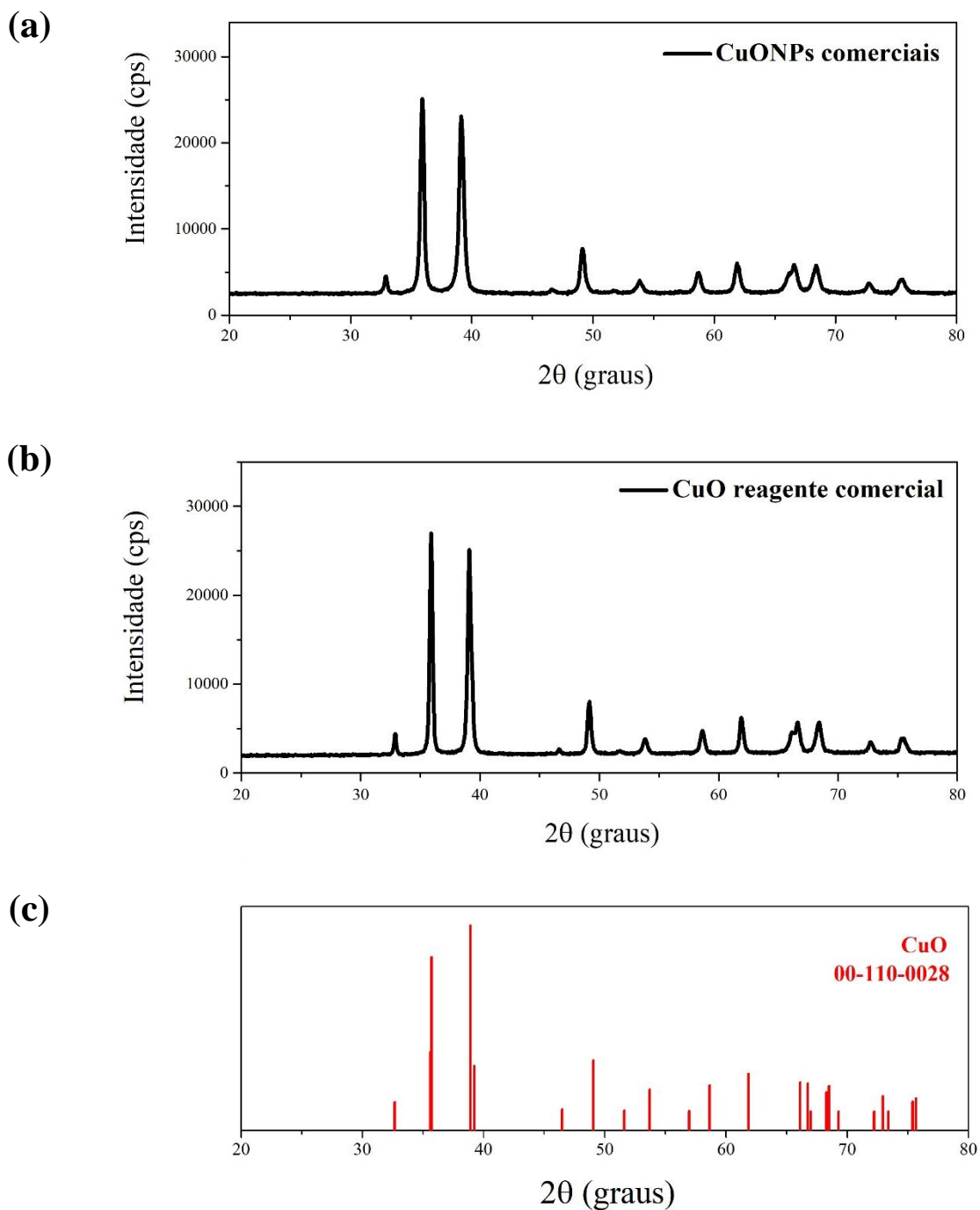
## 4.2 SÍNTESE VERDE DE CuONPs

### 4.2.1 Otimização dos parâmetros experimentais

A síntese verde das CuONPs, a partir do extrato de folhas de *Citrus sinensis*, foi avaliada a partir de quatorze diferentes metodologias, nas quais foram testados vários parâmetros experimentais, incluindo tipo e concentração do sal precursor de cobre (II), pH da síntese e temperatura de calcinação. Ao término de cada síntese, os difratogramas de raios X foram registrados para verificar se as amostras obtidas apresentam o perfil característico das CuONPs. As amostras também foram submetidas a ensaios de inibição de crescimento bacteriano para avaliar se a metodologia proposta era de fato adequada à produção de NPs com características antimicrobianas. Esse sistema de avaliação foi escolhido, devido à dificuldade de acesso e custo de outras técnicas instrumentais que poderiam, de forma mais rápida e completa, como a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), caracterizar as CuONPs obtidas e identificar se estas apresentavam ou não ação antimicrobiana. Assim, optou-se por caracterizar de forma mais detalhada apenas as NPs que apresentaram os melhores resultados.

Para fins de comparação, amostras comerciais de CuONPs e CuO também foram analisadas. Os difratogramas de raios X dessas amostras estão apresentados na **Figura 23**.

**Figura 23** - Difratogramas de raios X das amostras comerciais de (a) CuONPs e (b) CuO comparadas a (c) carta com picos de difração característicos de CuO



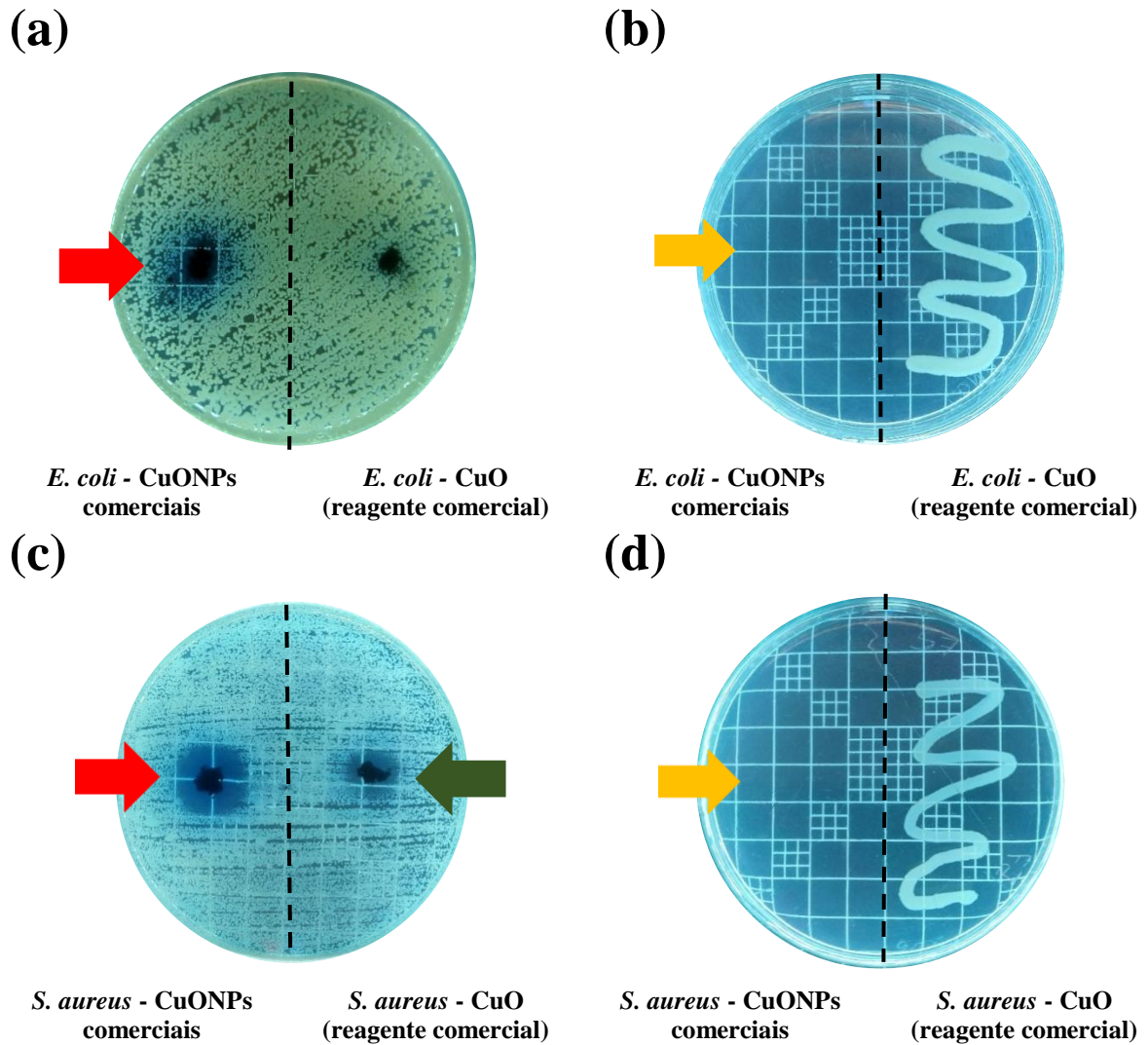
Fonte: a autora (2025)

Como pode ser observado, os padrões obtidos para as amostras comerciais de CuONPs e CuO são bastante semelhantes entre si, apresentando apenas variações nas intensidades de seus picos. Desta forma, embora as CuONPs possuam um tamanho reduzido ( $< 50$  nm) em comparação às partículas do CuO, pode-se concluir que esse fator não altera os padrões de DRX. Portanto, embora a técnica não seja a mais adequada para avaliar o tamanho das partículas, ela pode ser útil para confirmar se o material obtido possui os picos de difração característicos do material desejado.

Os picos observados no difratograma de raios X das CuONPs comerciais estão localizados em  $32,91^\circ$ ;  $35,92^\circ$ ;  $39,17^\circ$ ;  $49,13^\circ$ ;  $53,83^\circ$ ;  $58,68^\circ$ ;  $61,93^\circ$ ;  $66,59^\circ$ ;  $68,39^\circ$ ;  $72,79^\circ$  e  $75,44^\circ$ , e foram indexados aos planos (1 1 0), (1 1 -1), (2 0 0), (2 0 -2), (0 2 0), (2 0 2), (1 1 -3), (3 1 -1), (1 1 3), (3 1 1) e (0 0 4), respectivamente. Em relação ao difratograma de raios X do CuO, os picos observados foram muito próximos dos encontrados para as CuONPs comerciais, localizando-se em  $32,91^\circ$ ;  $35,92^\circ$ ;  $39,12^\circ$ ;  $49,18^\circ$ ;  $53,83^\circ$ ;  $58,63^\circ$ ;  $61,93^\circ$ ;  $66,59^\circ$ ;  $68,39^\circ$ ;  $72,74^\circ$  e  $75,44^\circ$ , e indexados aos planos (1 1 0), (1 1 -1), (2 0 0), (2 0 -2), (0 2 0), (2 0 2), (1 1 -3), (3 1 -1), (1 1 3), (3 1 1) e (0 0 4), respectivamente. Ambos os difratogramas foram analisados pelo *software* QualX e, com base na carta 00-110-0028 (**Figura 23(c)**), apresentam picos de difração característicos de CuO, sem evidência de outras fases nas amostras analisadas.

Juntamente com as análises de DRX, também foram realizados ensaios microbiológicos com ambas as amostras comerciais. Os resultados desses ensaios estão apresentados na **Figura 24**, onde é possível observar a formação de halos de inibição bacteriana, evidenciando os efeitos bacteriostático e bactericida das NPs contra as cepas de *E. coli* e *S. aureus*. Além disso, verificou-se que as CuONPs comerciais apresentaram um efeito antimicrobiano superior ao do CuO, especialmente em relação a bactéria *E. coli*.

**Figura 24** - Ensaio microbiológico utilizando as amostras comerciais de CuONPs e CuO. Em (a) e (c) encontram-se os resultados referentes aos ensaios que avaliaram o efeito bacteriostático contra as cepas de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente; em (b) e (d) encontram-se os resultados que avaliaram o efeito bactericida contra as cepas de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente



**Fonte:** a autora (2025)

Uma análise mais detalhada das **Figura 24(a)** e **24(c)** revela ainda que a presença das CuONPs no meio de cultura contaminado inibiu o crescimento de ambas as cepas bacterianas, formando halos de inibição (indicados por setas vermelhas). Por outro lado, a amostra de CuO

demonstrou capacidade de inibição apenas contra a cepa de *S. aureus* (indicada pela seta verde). Dessa forma, foi possível concluir que as CuONPs comerciais possuem efeito bacteriostático para ambas as cepas bacterianas, enquanto que o CuO exerce esse efeito apenas contra a cepa de *S. aureus*.

Os ensaios que verificaram o efeito bactericida das amostras comerciais (**Figura 24(b)** e **24(d)**), por sua vez, demonstraram que apenas as CuONPs possuem ação bactericida, pois não houve crescimento de colônias nos meios de cultura (setas amarelas), para ambas as cepas bacterianas avaliadas, após 24 h de contato com as NPs em meio líquido.

Os resultados observados nesses ensaios evidenciam que o tamanho das partículas é fundamental quando a ação antimicrobiana é o principal objetivo da aplicação. Azam et al. (2012) discutem em seu estudo que a eficácia bactericida das NPs depende de fatores como tamanho, estabilidade e concentração no meio de crescimento das bactérias. Além disso, os autores explicam que as células bacterianas têm um tamanho na faixa de micrômetros enquanto os poros de suas membranas celulares estão na faixa de nanômetros. Assim, para conseguir romper e atravessar essas membranas celulares, as NPs precisam ter um tamanho adequado, compatível com os poros das bactérias.

Outro aspecto relevante observado na **Figura 24**, é a coloração azulada mais intensa ao redor das amostras comerciais de CuONPs. Isso indica uma maior lixiviação de íons Cu(II) para o meio quando as partículas estão em escala nanométrica. Esse fator, por sua vez, pode ter facilitado o contato do material antimicrobiano com as bactérias.

Por fim, esse ensaio também revelou que a cepa de *S. aureus* sofreu maior inibição que a cepa de *E. coli* para ambas as amostras avaliadas. Isso pode ser constatado pela maior circunferência do halo em torno das amostras comerciais de CuONPs e pelo pequeno halo em torno da amostra de CuO, como mostrado na **Figura 24(c)**. Azam et al. (2012) obtiveram resultados semelhantes e explicam que a variação na sensibilidade ou resistência entre as

populações de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pode estar relacionada à estrutura celular, fisiologia, metabolismo ou ao grau de contato dos microrganismos com as NPs. Os autores ainda destacam que a maior sensibilidade das bactérias Gram-positivas, como a *S. aureus*, às CuONPs é atribuída à maior abundância de grupos amino e carboxila em sua superfície celular, além da maior afinidade do cobre por esses grupos. Já as bactérias Gram-negativas, como a *E. coli*, possuem uma estrutura de membrana celular especial, que apresenta grande capacidade de resistir a agentes antimicrobianos.

Após a conclusão desses ensaios iniciais com as amostras comerciais de CuONPs e CuO, procedeu-se à síntese verde das CuONPs. As metodologias propostas nas sínteses “A1” e “A2” representam as primeiras tentativas de produzir essas NPs, utilizando o extrato de folhas de *Citrus sinensis*. Nessas metodologias, o pH da mistura contendo o extrato de folhas de *Citrus sinensis* e  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ou  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  foi ajustado para 3,0. No entanto, após 4 h de reação, verificou-se que a síntese foi bastante comprometida, com um rendimento muito baixo na reação com  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (170,0 mg para cada 1,0 g de sal) e rendimento praticamente nulo na reação com  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Além disso, a pequena quantidade de material obtido na reação com  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  não era suficientemente representativa para ser analisada ou para ser submetida ao processo de calcinação.

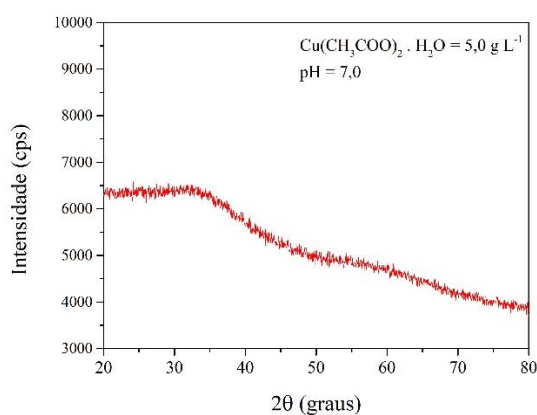
Esse resultado mostrou claramente que a síntese de CuONPs não é favorecida em meio ácido e, por esse motivo, essa condição experimental foi descartada. Alguns autores, como Ain et al. (2019) e Samari et al. (2019), observaram em seus estudos que, à medida que se diminui o pH do meio, ocorre também uma redução no tamanho das partículas obtidas. No entanto, em nenhum dos trabalhos mencionados foi avaliada a utilização de pHs < 7,0, como foi realizado no presente trabalho.

As metodologias propostas nas sínteses das categorias “B” e “C”, por sua vez, tiveram por objetivo avaliar a possibilidade de obtenção das CuONPs, alterando o pH da reação para

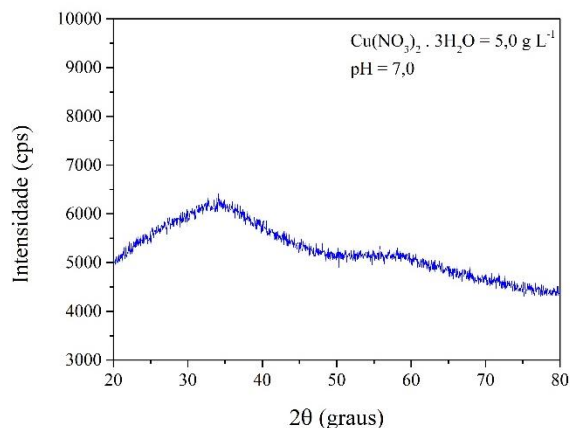
neutro (7,0) e alcalino (10,0), respectivamente, sem a necessidade do processo de calcinação. É importante ressaltar que a calcinação é um procedimento amplamente utilizado na produção de CuONPs, mas que, infelizmente, envolve um alto custo energético. A **Figura 25** apresenta os difratogramas de raios X das amostras obtidas por meio dessas duas sínteses.

**Figura 25** - Difratogramas de raios X das amostras obtidas pelas metodologias propostas nas sínteses das categorias “B” e “C”. As condições experimentais utilizadas foram: **(a)**  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (II) e  $\text{pH} = 7,0$ ; **(b)**  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{pH} = 7,0$ ; **(c)**  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (II) e  $\text{pH} = 10,0$ ; **(d)**  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (II) e  $\text{pH} = 10,0$ . **Observação:** nenhuma dessas amostras foi calcinada.

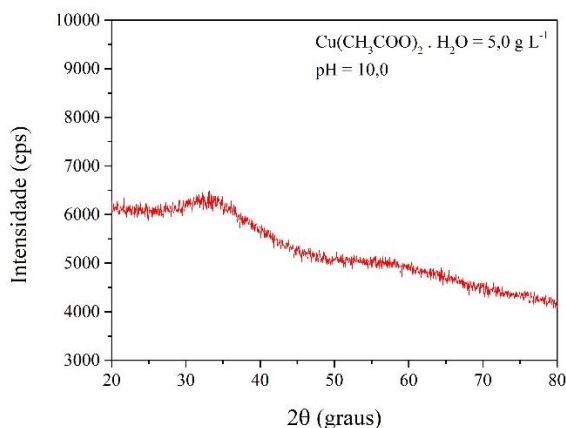
**(a)**



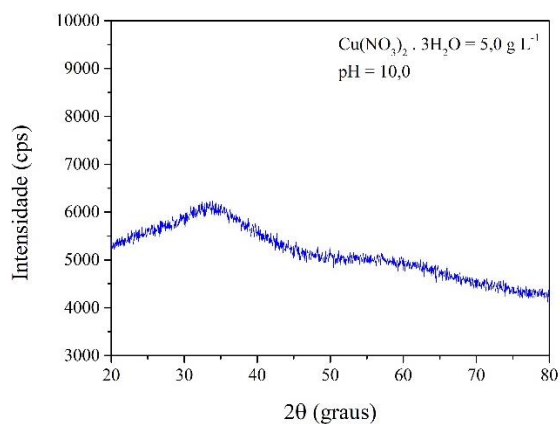
**(b)**



**(c)**



**(d)**



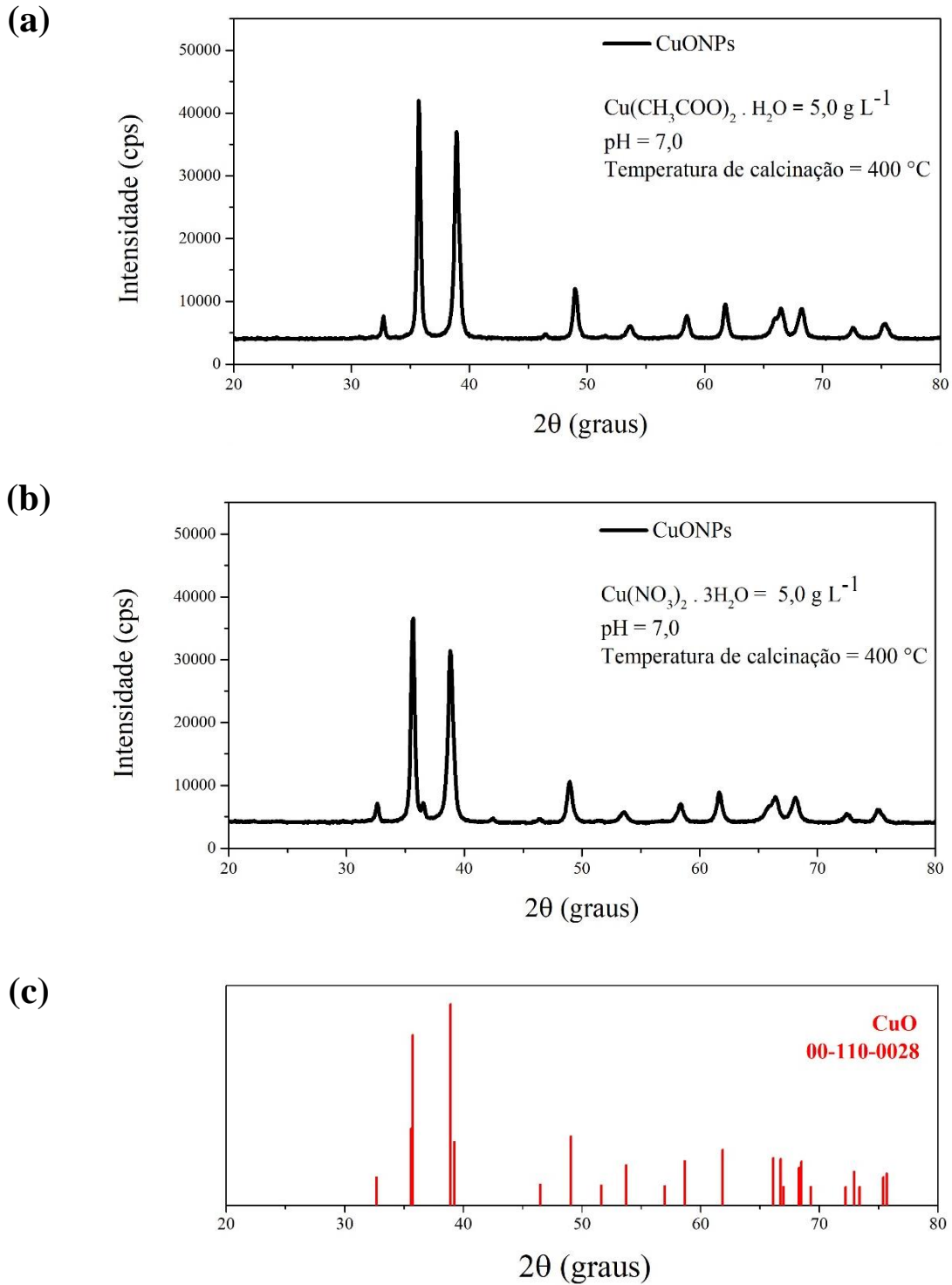
**Fonte:** a autora (2025)

Como pode ser constatado, as amostras obtidas a partir das sínteses das categorias “B” e “C” não apresentaram características de material cristalino, uma vez que os picos de difração correspondentes ao CuO não estão claramente definidos nos difratogramas de raios X. Esse comportamento pode estar relacionado ao fato de as amostras não terem sido calcinadas. Conforme discutido em estudos anteriores (KALAIYAN et al., 2020; SHARMA et al., 2015; TAGHAVI FARDOOD et al., 2018), o processo de calcinação pode degradar resíduos de moléculas orgânicas provenientes do extrato que reagem com o sal de cobre (II) durante a síntese e que, eventualmente, podem permanecer aderidas à estrutura das CuONPs ou formar complexos com os íons cobre. Como consequência, obtém-se um material mais amorfo.

Sankar et al. (2014) sintetizaram CuONPs a partir do extrato de folhas de *Carica papaya* e sulfato de cobre (II) e, assim como nas metodologias propostas nas sínteses das categorias “B” e “C”, não submeteram a amostra à calcinação. A análise de DRX do material revelou um perfil bastante semelhante aos observados na **Figura 25**. Ainda assim, esses autores concluíram que houve a formação de CuONPs. No entanto, os perfis obtidos no nosso trabalho foram analisados pelo *software* QualX, que não detectou nenhuma estrutura cristalina. Dessa forma, diferentemente do estudo de Sankar et al. (2014), a formação de CuONPs não foi considerada efetiva para as metodologias testadas, e essas amostras não foram aplicadas em testes microbiológicos.

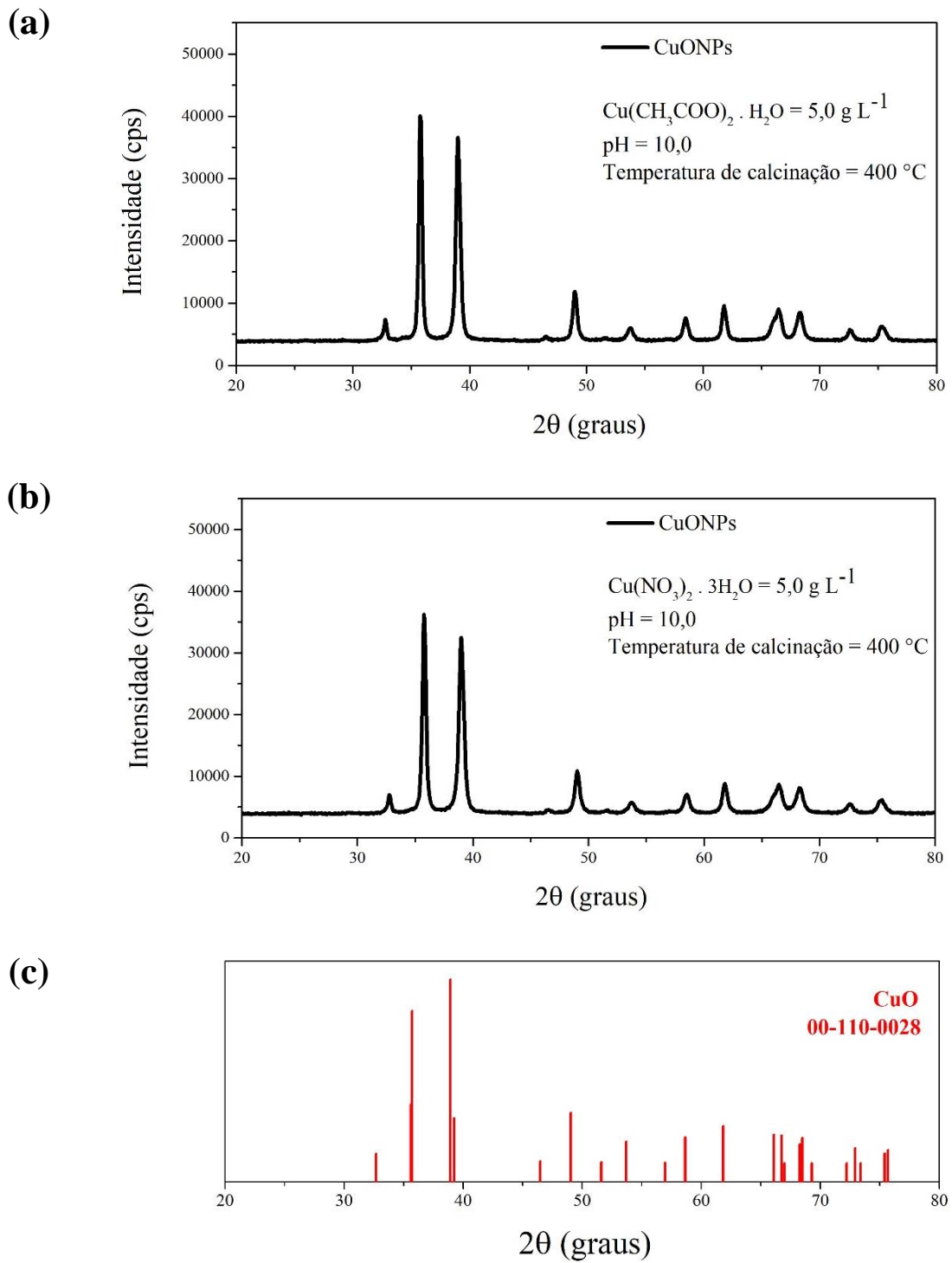
As sínteses das categorias “D” e “E” seguiram a mesma metodologia proposta nas sínteses das categorias “B” e “C”, com a diferença de que, desta vez, as amostras foram calcinadas. A **Figura 26** e **27** apresentam, respectivamente, os difratogramas de raios X das amostras obtidas, em pH 7,0 e 10,0, após serem submetidas à calcinação a 400 °C.

**Figura 26** - Difratomogramas de raios X das amostras de CuONPs obtidas por meio da síntese da categoria “D”, utilizando pH = 7,0, os sais (a)  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e (b)  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  e uma temperatura de calcinação de 400 °C comparadas a (c) carta com picos de difração característicos de CuO



Fonte: a autora (2025)

**Figura 27** - Difratomogramas de raios X das amostras de CuONPs obtidas por meio da síntese da categoria “E”, utilizando pH = 10,0, os sais (a)  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e (b)  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  e uma temperatura de calcinação de 400 °C comparadas a (c) carta com picos de difração característicos de CuO



Fonte: a autora (2025)

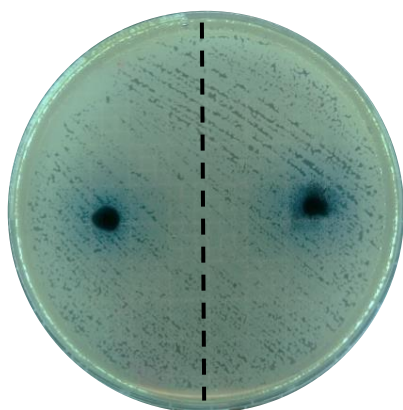
Os resultados evidenciam a importância desse processo na obtenção de CuONPs, uma vez que todas as amostras provenientes das sínteses das categorias “B” e “C” passaram a exibir um perfil característico de CuO após a calcinação a 400 °C por 1 h, conforme identificado pelo *software* QualX. Outro aspecto relevante a ser discutido é que, por meio da análise de DRX, as CuONPs que foram produzidas em pH 7,0 apresentaram um perfil praticamente idêntico ao das amostras obtidas em pH 10,0. Ain et al. (2019) mencionam que a redução do pH pode aumentar a possibilidade de formação de uma mistura de Cu<sub>2</sub>O e CuO. No entanto, os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que apenas uma fase foi identificada pelo *software* QualX para as amostras obtidas a partir das metodologias propostas nas sínteses das categorias “D” e “E”.

Após confirmar que o material obtido a partir das metodologias propostas nas sínteses das categorias “D” e “E” apresentava, de fato, o perfil característico de CuONPs, as amostras foram submetidas aos ensaios microbiológicos. A **Figura 28** e a **29** mostram, respectivamente, os resultados desses ensaios contra as cepas de *E. coli* e *S. aureus*. Como pode ser observado, nenhuma das amostras avaliadas apresentou efeito antimicrobiano. Embora não tenha sido observado crescimento de colônias abaixo de onde as amostras foram inseridas no meio de cultura, não houve formação de halo em (a) e (c), tanto na **Figura 28** quanto na **Figura 29**. Dessa forma, pode-se afirmar que as CuONPs provenientes das sínteses das categorias “D” e “E” não exibiram efeito bacteriostático contra ambas as cepas bacterianas testadas.

Além disso, os ensaios em meio líquido, representados nas **Figura 28(b)**, **Figura 28(d)**, **Figura 29(b)** e **Figura 29(d)**, também indicaram que as amostras não apresentaram caráter bactericida. Esses resultados sugerem que, embora as metodologias empregadas tenham produzido amostras com características de CuO, o tamanho das partículas obtidas pode não ter sido adequado para conferir atividade antimicrobiana, especialmente quando comparado aos efeitos observados para as amostras comerciais de CuONPs e CuO.

**Figura 28** - Ensaio microbiológico com amostras obtidas por meio das sínteses “D1” e “D2”. Em (a) e (c) encontram-se os resultados dos ensaios que avaliaram o efeito bacteriostático contra as cepas de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente; e em (b) e (d) os resultados dos ensaios que avaliaram o efeito bactericida contra as cepas de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente

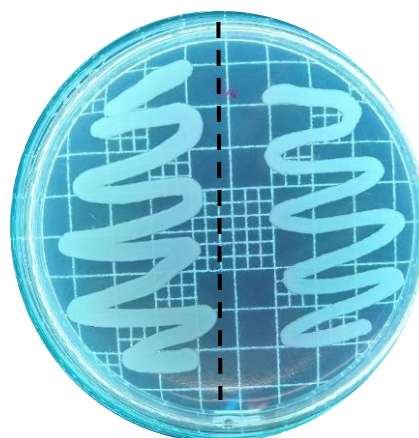
(a)



*E. coli* - D1  
( $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )

*E. coli* - D2  
( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )

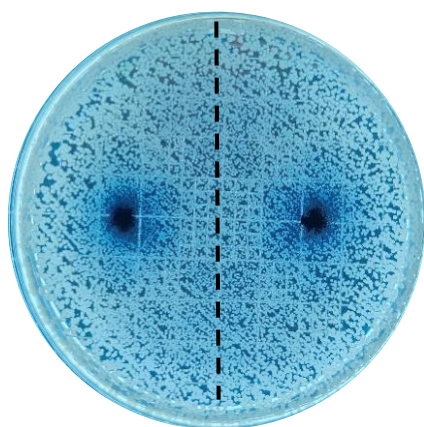
(b)



*E. coli* - D1  
( $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )

*E. coli* - D2  
( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )

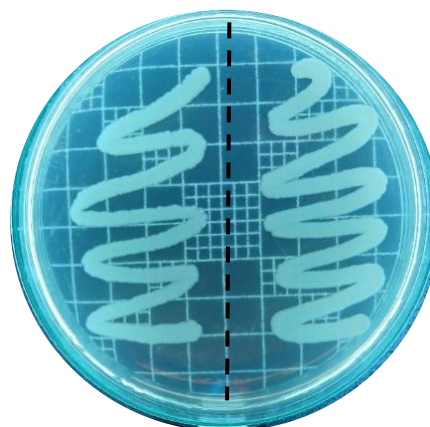
(c)



*S. aureus* - D1  
( $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )

*S. aureus* - D2  
( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )

(d)



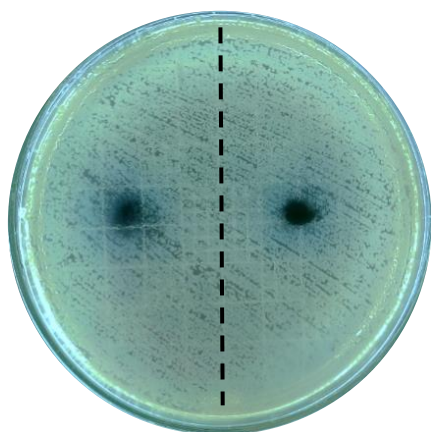
*S. aureus* - D1  
( $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )

*S. aureus* - D2  
( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )

Fonte: a autora (2025)

**Figura 29** - Ensaio microbiológico com amostras obtidas por meio das sínteses “E1” e “E2”. Em (a) e (c) encontram-se os resultados dos ensaios que avaliaram o efeito bacteriostático contra as cepas de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente; e em (b) e (d) os resultados dos ensaios que avaliaram o efeito bactericida contra as cepas de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente

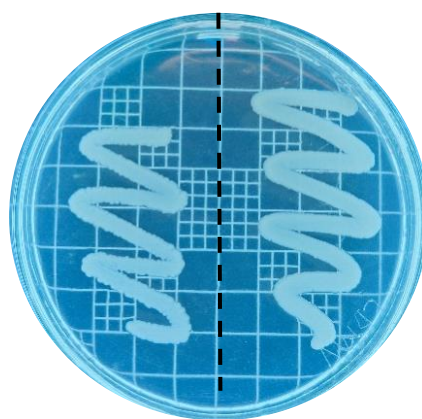
**(a)**



*E. coli* - E1  
(Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O)

*E. coli* - E2  
(Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 3H<sub>2</sub>O)

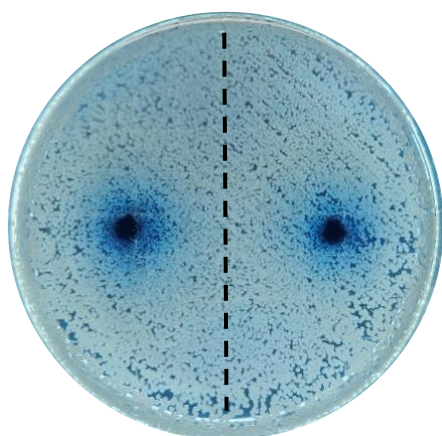
**(b)**



*E. coli* - E1  
(Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O)

*E. coli* - E2  
(Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 3H<sub>2</sub>O)

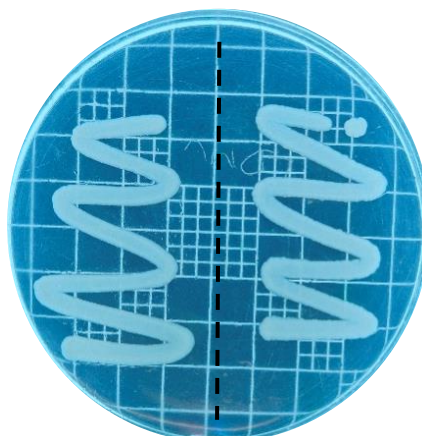
**(c)**



*S. aureus* - D1  
(Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O)

*S. aureus* - D2  
(Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 3H<sub>2</sub>O)

**(d)**



*S. aureus* - E1  
(Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O)

*S. aureus* - E2  
(Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 3H<sub>2</sub>O)

**Fonte:** a autora (2025)

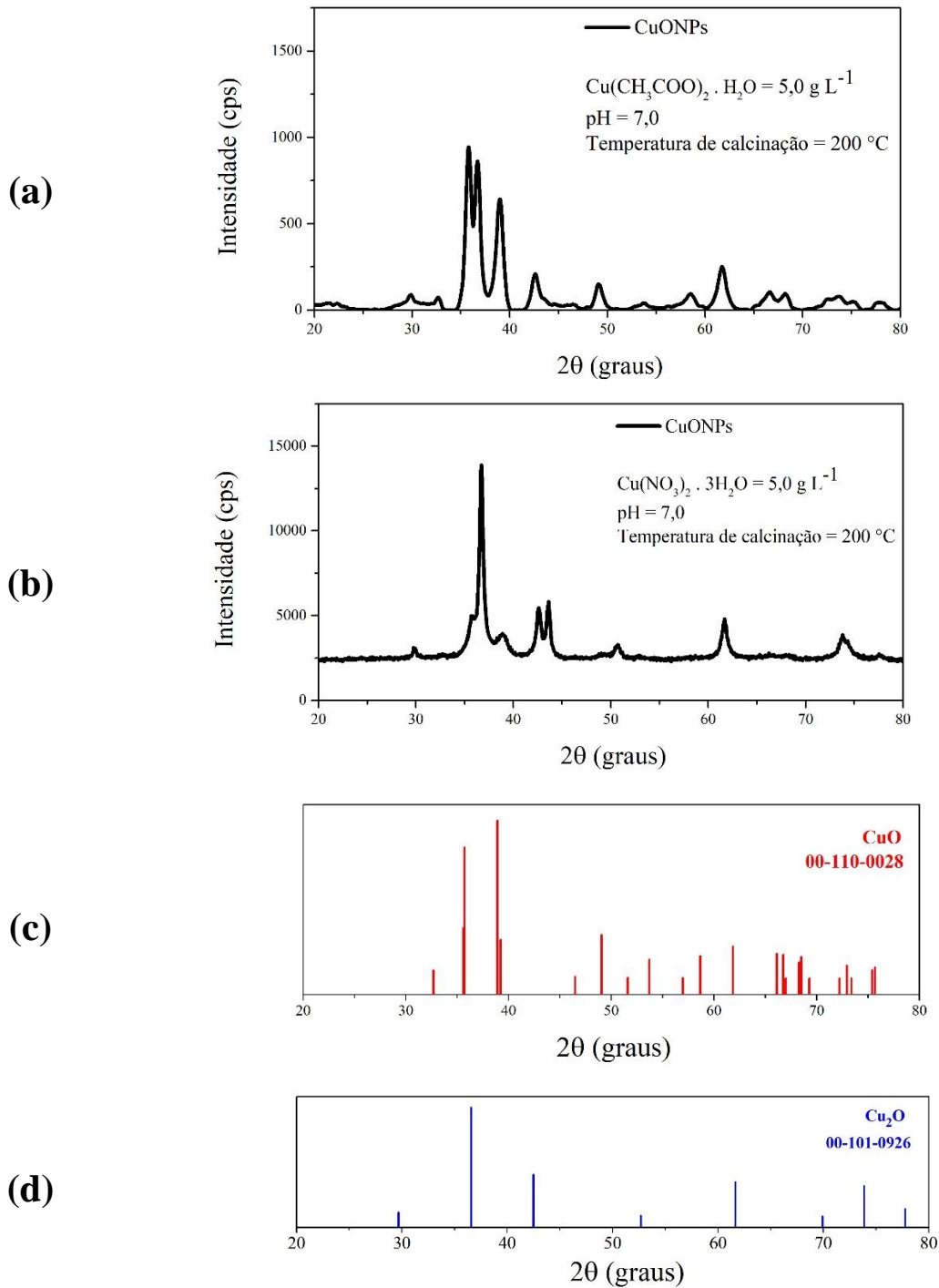
Taghavi Fardood et al. (2018) investigaram o efeito de diferentes temperaturas de calcinação no tamanho de CuONPs por síntese verde. Os autores concluíram que os tamanhos dos cristalitos aumentou à medida que as NPs foram submetidas a temperaturas de calcinação mais elevadas. Silva et al. (2011) explicam que esse fenômeno ocorre porque o aumento da temperatura pode favorecer a coalescência das partículas, resultando em um crescimento do tamanho médio e na consequente redução da área superficial específica.

No que diz respeito ao pH de síntese, não foram observadas grandes diferenças entre as amostras avaliadas, tanto em relação ao perfil das CuONPs obtidas, quanto ao seu efeito antimicrobiano. Diante disso, e visando minimizar possíveis impactos ambientais, optou-se por conduzir os estudos subsequentes em relação à síntese utilizando pH 7,0.

Embora diversos estudos tenham empregado altas temperaturas de calcinação na síntese verde de CuONPs, como 500 °C (MOHAMED; THEMA; DHLAMINI, 2021; TAGHAVI FARDOOD et al., 2018) e 400 °C (NAIKA et al., 2015; TAGHAVI FARDOOD et al., 2018; UDAYABHANU et al., 2015; VELSANKAR et al., 2020), verificou-se que, para obter CuONPs a partir do extrato de folhas de *Citrus sinensis*, a temperatura de calcinação deveria ser reduzida. Kalaiyan et al. (2020) conseguiram, por exemplo, produzir CuONPs com caráter cristalino, e de uma única fase, utilizando uma temperatura de calcinação de 250 °C por 1 h.

Com base nesse resultado e nas observações de Taghavi Fardood et al. (2018), que destacam a relação entre temperatura de calcinação e crescimento de cristalitos, a metodologia proposta na síntese da categoria “F” teve por objetivo reduzir a temperatura de calcinação para 200 °C. Essa abordagem visou não apenas garantir a formação de CuONPs, mas também minimizar o tamanho das partículas produzidas. A **Figura 30** apresenta os difratogramas de raios X das amostras de CuONPs sintetizadas a partir de  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , em pH = 7,0, sob essa condição.

**Figura 30** - Difratomogramas de raios X das amostras de CuONPs obtidas por meio da síntese da categoria “F”, utilizando pH = 7,0, os sais (a)  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e (b)  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  e uma temperatura de calcinação de 200 °C comparadas a (c) carta com picos de difração característicos de CuO e a (d) carta com picos de difração característicos de  $\text{Cu}_2\text{O}$



Fonte: a autora (2025)

A análise dos difratogramas de raios X das amostras calcinadas a 200 °C revelou a presença de duas fases cristalinas. Esse resultado foi constatado tanto nas amostras obtidas a partir de  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  quanto naquelas sintetizadas com  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Além disso, o *software* QualX forneceu uma estimativa percentual da composição de cada fase presente nas amostras.

No difratograma de raios de X da amostra proveniente da síntese da categoria “F1” (com  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , **Figura 30(a)**), estimou-se que aproximadamente 25,8 % da composição corresponde à fase  $\text{Cu}_2\text{O}$ , enquanto 74,2 % está na forma de  $\text{CuO}$ . Já a amostra da síntese da categoria “F2” (com  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , **Figura 30(b)**) apresentou percentual maior de  $\text{Cu}_2\text{O}$  (77,0 %) em relação à fase  $\text{CuO}$  (23,0 %). Embora esses percentuais não sejam exatos, devido à possibilidade de contaminações não detectadas pelo *software*, a análise desses valores é relevante, pois permite avaliar a semelhança entre os perfis das amostras e os padrões de DRX utilizados como referência.

Tendo em vista todas essas observações, percebeu-se que temperaturas mais baixas de calcinação (200 °C) podem favorecer a formação da fase  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Além disso, esse comportamento pode estar associado ao pH do meio reacional utilizado na síntese (pH = 7,0). No estudo de Zayyoun et al. (2016), os autores explicam que, em soluções com  $\text{pH} \leq 6,0$ , a menor concentração de íons  $\text{OH}^-$  dificulta a formação de  $\text{CuO}$ , uma vez que essa fase requer a presença de dois mols de  $\text{OH}^-$  para cada mol de  $\text{Cu}(\text{II})$  em solução, enquanto que, a formação de  $\text{Cu}_2\text{O}$  é favorecida devido à menor disponibilidade de íons  $\text{OH}^-$ . Por outro lado, quando o pH aumenta ( $\text{pH} \geq 12,0$ ), a alta concentração de íons  $\text{OH}^-$  favorece a formação de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ , que, por sua vez, se converte na fase mais estável de  $\text{CuO}$ .

A partir dessa perspectiva, é importante destacar que, nas amostras obtidas a partir das sínteses da categoria “D”, a fase  $\text{Cu}_2\text{O}$  não foi identificada, apesar de terem sido produzidas sob o mesmo pH das sínteses da categoria “F”. No entanto, nas sínteses da categoria “D”, a

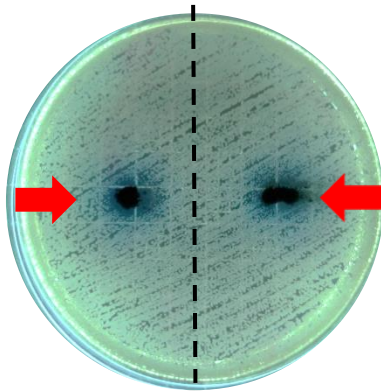
temperatura de calcinação utilizada foi de 400 °C. Isso sugere que, embora a presença da fase Cu<sub>2</sub>O possa estar associada à realização da síntese em condições neutras de pH, esse fator não é o único determinante para sua formação. Além disso, constatou-se mais uma vez que a temperatura de calcinação é um parâmetro experimental crucial para a conversão completa dos complexos de cobre formados durante a síntese em CuO, indicando que a formação de partículas de Cu<sub>2</sub>O pode representar uma etapa intermediária desse processo.

A atividade antimicrobiana das CuONPs obtidas a partir da metodologia proposta nas sínteses da categoria “F” também foram avaliadas. A **Figura 31** apresenta os resultados dos ensaios contra as cepas de *E. coli* e *S. aureus*, sendo **(a)** e **(c)** referentes à avaliação do efeito bacteriostático, enquanto **(b)** e **(d)** correspondem à avaliação do efeito bactericida. Como pode ser observado, as CuONPs obtidas a partir dos sais Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O e Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 3H<sub>2</sub>O apresentam efeito de inibição bacteriana contra ambas as cepas (**Figura 31(a)** e **Figura 31(c)**), uma vez que houve formação de halo (indicado pelas setas vermelhas) em torno das amostras. Isso indica que ambas as amostras possuem atividade bacteriostática. O efeito bactericida, por sua vez, foi somente observado quando a amostra produzida através da síntese da categoria “F1” entrou em contato com a cepa de *S. aureus* (indicado pela seta amarela na **Figura 31(d)**). No entanto, essa mesma amostra não apresentou efeito bactericida contra a cepa de *E. coli*.

Embora as sínteses da categoria “F” tenham produzido amostras que demonstraram inibição bacteriana, elas ainda apresentaram a fase Cu<sub>2</sub>O, o que indica que essas metodologias ainda não são as mais adequadas para a produção de CuONPs. Com o intuito de melhorar a pureza das amostras de CuONPs, foi realizado um novo ensaio, utilizando uma temperatura de calcinação intermediária (300 °C). Além disso, considerando que as amostras obtidas nas metodologias testadas anteriormente apresentaram baixa atividade bactericida, optou-se por avaliar a utilização de uma concentração de solução de sal de cobre (II) duas vezes maior. A **Figura 32** apresenta os resultados obtidos nas sínteses da categoria “G”.

**Figura 31** - Ensaio microbiológico com amostras de CuONPs obtidas por meio das metodologias propostas nas sínteses da categoria “F”. Em (a) e (c) encontram-se os resultados dos ensaios que avaliaram o efeito bacteriostático contra as cepas de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente; e em (b) e (d) os resultados dos ensaios que avaliaram o efeito bactericida contra as cepas de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente

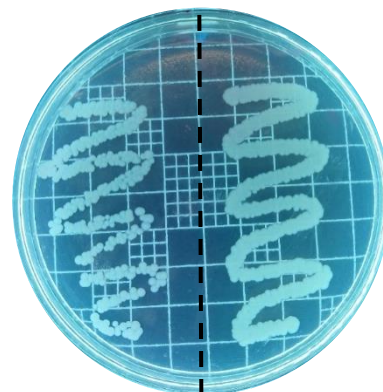
(a)



*E. coli* - F1  
(Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O)

*E. coli* - F2  
(Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 3H<sub>2</sub>O)

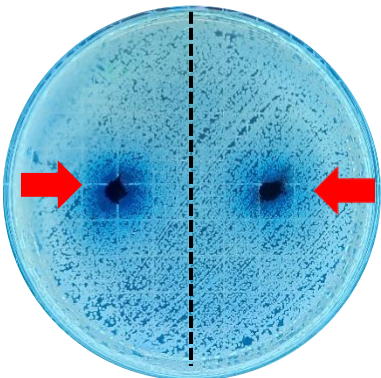
(b)



*E. coli* - F1  
(Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O)

*E. coli* - F2  
(Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 3H<sub>2</sub>O)

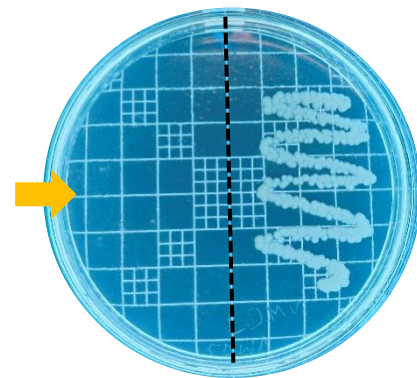
(c)



*S. aureus* - F1  
(Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O)

*S. aureus* - F2  
(Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 3H<sub>2</sub>O)

(d)

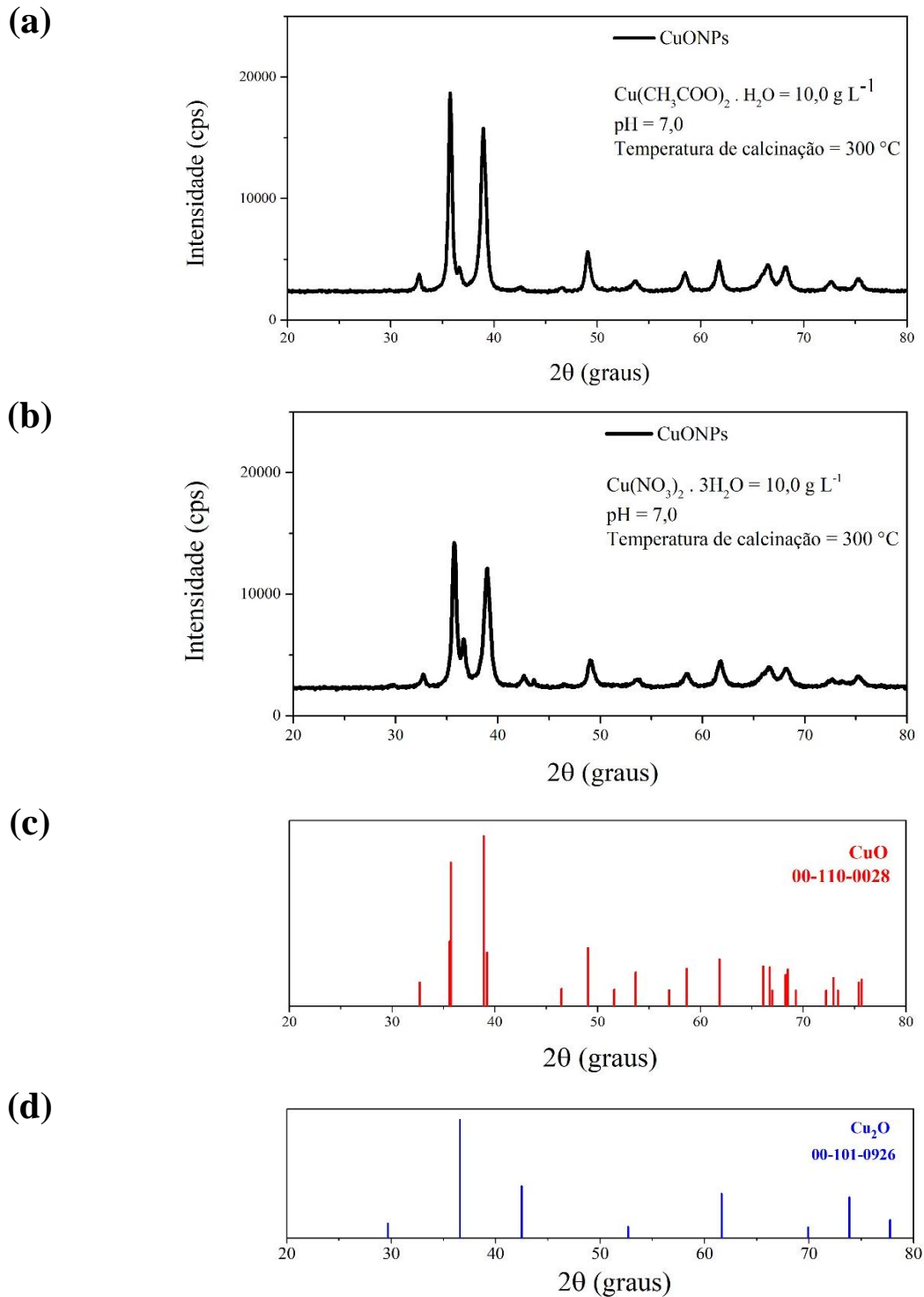


*S. aureus* - F1  
(Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O)

*S. aureus* - F2  
(Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 3H<sub>2</sub>O)

Fonte: a autora (2025)

**Figura 32** - Difratoogramas de raios X das amostras de CuONPs obtidas por meio da síntese da categoria “G”, utilizando pH = 7,0, os sais (a)  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e (b)  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  e uma temperatura de calcinação de 300 °C comparadas a (c) carta com picos de difração característicos de CuO e a (d) carta com picos de difração característicos de  $\text{Cu}_2\text{O}$



Fonte: a autora (2025)

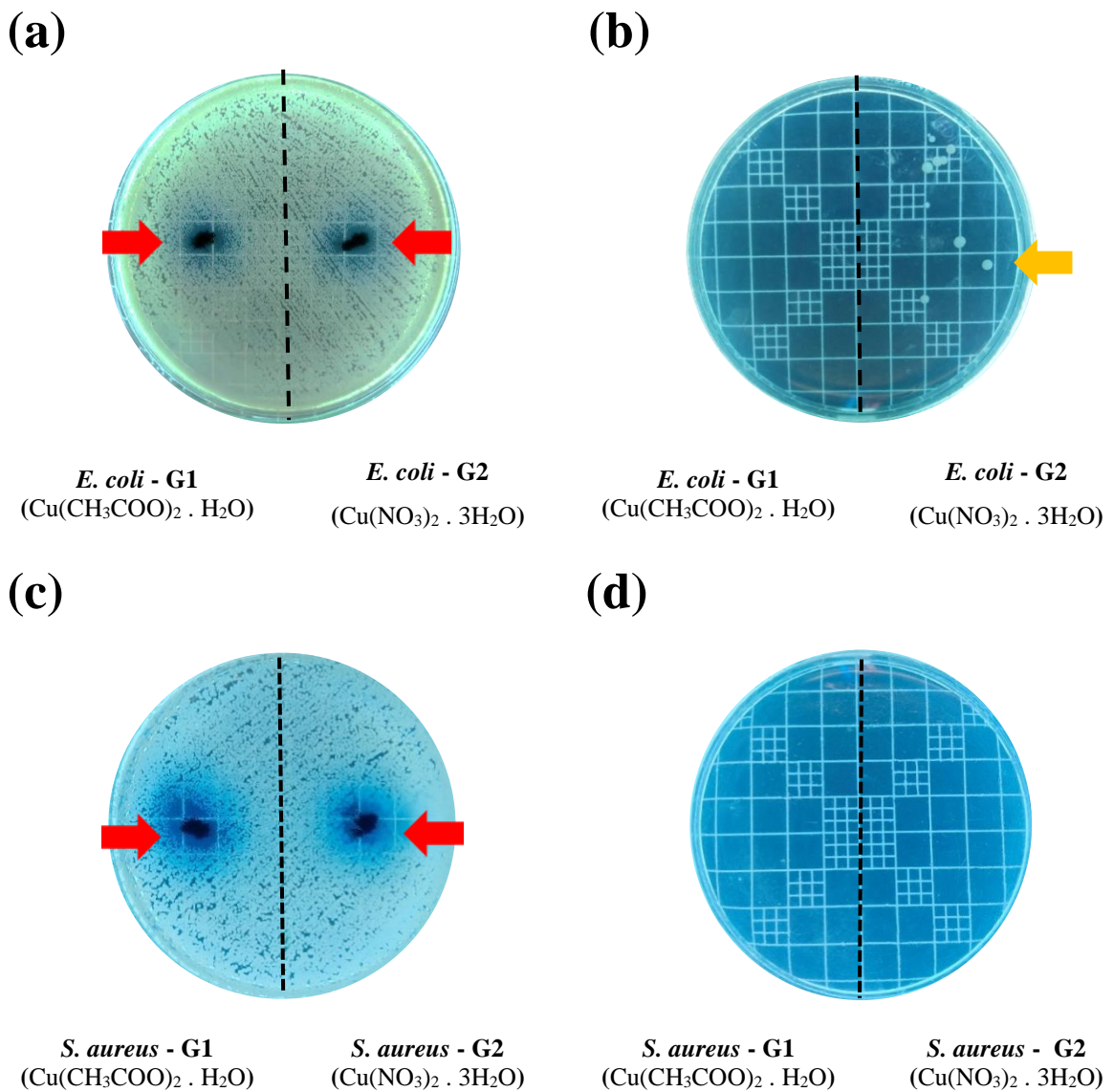
Conforme pode ser observado, as amostras obtidas a partir das metodologias propostas nas sínteses da categoria “G” apresentaram, predominantemente, perfil cristalino característico de partículas de CuO. A amostra obtida a partir do sal  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (síntese “G2”), em particular, apresentou alguns picos específicos que podem ser atribuídos à fase  $\text{Cu}_2\text{O}$ , porém em quantidade menor que no experimento anterior, em que as amostras foram calcinadas a 200 °C. Isso indica que a temperatura de 300 °C pode ser suficiente para produzir amostras de CuONPs. Esse resultado é particularmente interessante, pois uma menor quantidade de energia é necessária para produzi-las. Dessa forma, a atividade antimicrobiana das CuONPs obtidas por meio das metodologias propostas na síntese da categoria “G” foi avaliada, e os resultados desse ensaio são apresentados na **Figura 33**.

De maneira geral, houve formação de halo (indicados pelas setas vermelhas), tanto no ensaio de inibição bacteriana referente à amostra obtida a partir de  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (síntese “G1”, **Figura 33(a)**), quanto para a amostra obtida a partir de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (síntese “G2”, nas **Figura 33(c)**). Além disso, as **Figura 33(b)** e **33(d)** mostram que não houve crescimento de colônias bacterianas após 24 h de contato com a amostra obtida a partir da síntese “G1” para ambas as cepas. A amostra obtida a partir da síntese “G2”, por sua vez, demonstrou capacidade de inibir o crescimento de *E. coli* (indicado pela seta amarela) e exercer efeito bactericida total frente à cepa de *S. aureus*.

Os resultados obtidos nesse ensaio forneceram informações relevantes, indicando que a redução da temperatura de calcinação das CuONPs, associada ao aumento da concentração de sal precursor de cobre (II) na síntese, impacta diretamente na atividade antimicrobiana das NPs. As amostras obtidas a partir das sínteses da categoria “F” já haviam mostrado sinais de atividade antimicrobiana (com a concentração de 5,0 g L<sup>-1</sup> e temperatura de calcinação de 200 °C), uma vez que ambas formaram halos de inibição, e a amostra da síntese “F1” apresentou efeito bactericida contra a cepa de *S. aureus*. Contudo, não houve redução do número de colônias

bacterianas contra a cepa de *E. coli* após 24 h de contato. Isso indica, principalmente, que a concentração de sal de cobre (II) ainda era insuficiente nas demais metodologias de síntese avaliadas.

**Figura 33** - Ensaio microbiológico utilizando as amostras de CuONPs obtidas por meio da síntese da categoria “G”. Em (a) e (c) encontram-se os resultados dos ensaios que avaliaram o efeito bacteriostático contra as cepas de *E. coli* e de *S. aureus*, respectivamente; e em (b) e (d) os resultados dos ensaios que avaliaram o efeito bactericida contra as cepas de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente



Fonte: a autora (2025)

A partir da análise conjunta de todos esses dados, pode-se concluir que uma maior concentração de sal de cobre (II) proporciona uma maior quantidade de íons cobre no meio, o que, por sua vez, potencializa a atividade antimicrobiana. Além disso, alguns autores observaram que o tamanho das partículas pode ser alterado com o aumento da concentração de sal precursor de cobre (II). De maneira análoga ao presente estudo, Černík and Thekkae Padil (2013) investigaram três diferentes concentrações de  $\text{CuCl}_2$  como sal precursor na síntese de CuONPs. Nesse estudo, os autores demonstraram que as concentrações de sal de cobre (II) iguais a 1, 2 e 3  $\text{mmol L}^{-1}$  resultaram em NPs com tamanhos de 7,8, 5,5 e 4,8 nm, respectivamente. Além disso, foi realizado um ensaio bactericida com as amostras de NPs obtidas, e os resultados evidenciaram que a amostra com as partículas de maior tamanho (7,8 nm) apresentou um halo de inibição menor.

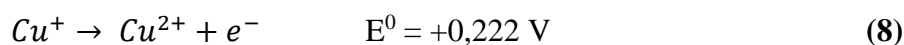
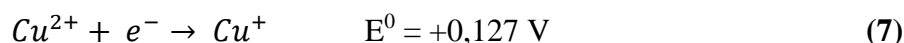
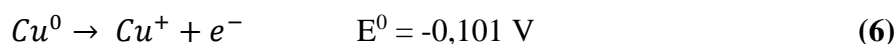
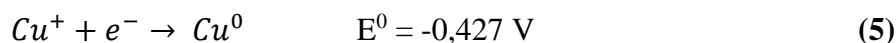
Neste último ensaio, também foi possível observar que o  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  desempenha um papel mais eficaz na formação de CuONPs com propriedades antimicrobianas em comparação ao  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Com a mesma quantidade de CuONPs adicionada ao meio contaminado (10 mg), não houve crescimento de bactérias Gram-negativas no meio que esteve em contato com as amostras produzidas pela síntese “G1”. Por outro lado, foi possível observar o crescimento de pelo menos 10 colônias bacterianas da mesma cepa no meio que ficou em contato com as amostras provenientes da síntese “G2”.

Dessa forma, o  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  se mostrou um sal precursor mais adequado para a obtenção de CuONPs, utilizando o extrato de folhas de *Citrus sinensis*. Esse sal de cobre (II) favoreceu a formação de NPs mais puras, de uma única fase, e com maior atividade antimicrobiana, característica essencial para alcançar o principal objetivo proposto nesta tese. Por essa razão, o  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  foi o escolhido para dar continuidade aos demais experimentos desse trabalho.

#### 4.2.2 Voltametria cíclica

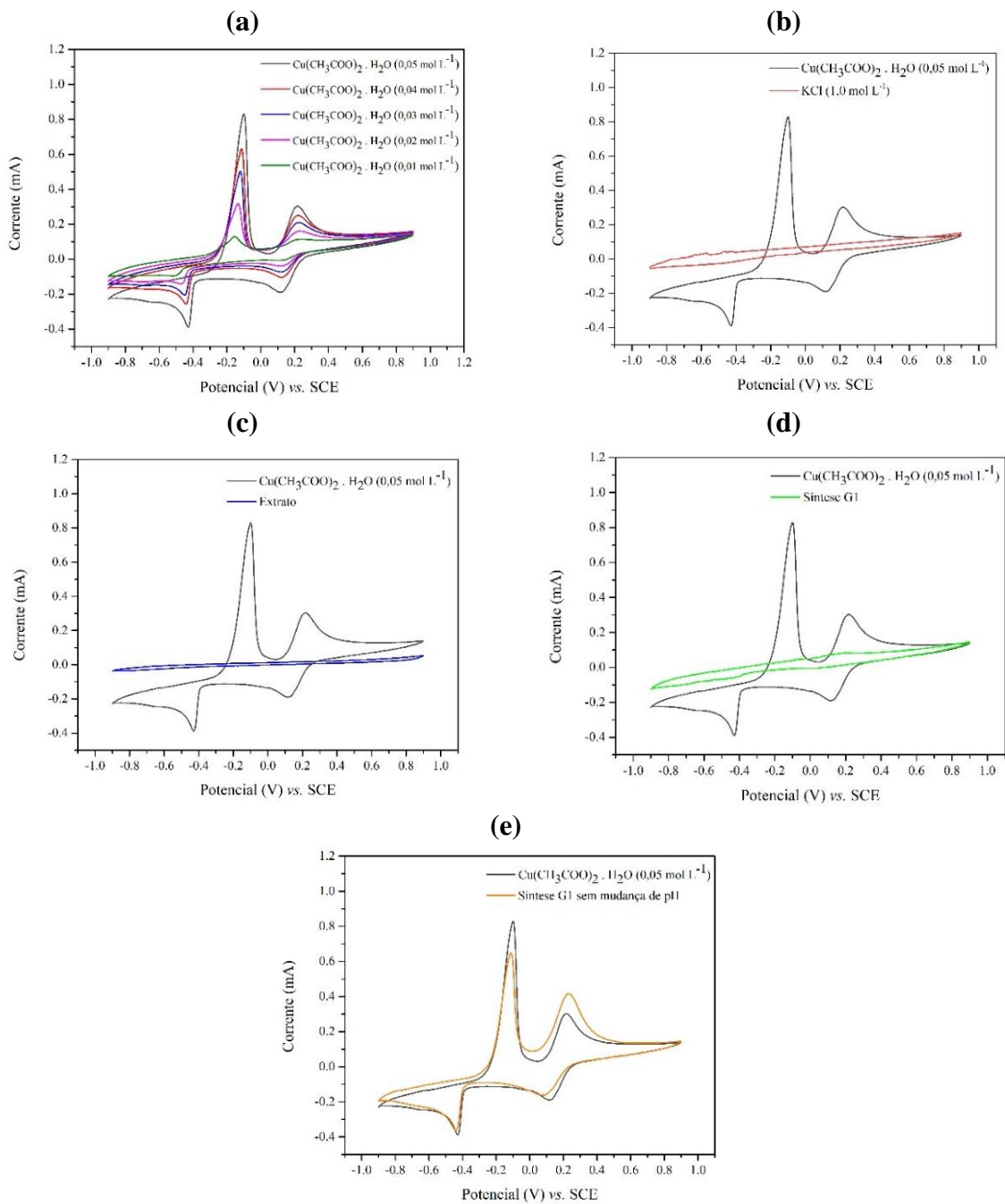
A análise de voltametria cíclica foi realizada para compreender melhor o mecanismo de formação das CuONPs, antes da etapa de calcinação. Ela permite avaliar alterações na corrente elétrica associada às reações de oxidação e redução no sistema, resultantes da transferência de elétrons (BANDEIRA et al., 2020b). Os ensaios foram conduzidos no sentido do maior para o menor potencial.

Na **Figura 34(a)** são apresentados os voltamogramas obtidos para o  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  em diferentes concentrações (0,05 até 0,01 mol L<sup>-1</sup>). Em cada curva, observam-se dois picos na região da redução e dois na região da oxidação, os quais, segundo Al-Harazie et al. (2023), correspondem às conversões entre as espécies Cu(II)/Cu(I) e Cu(I)/Cu(0) (vide **Equações 5, 6, 7 e 8**). Dessa forma, se existirem espécies de cobre presentes na solução analisada, elas poderão ser identificadas por esse perfil eletroquímico.



Já nas **Figura 34(b)** e **Figura 34(c)**, é possível observar os voltamogramas obtidos para o eletrólito de suporte KCl (1,0 mol L<sup>-1</sup>) e para o extrato puro utilizado na síntese de CuONPs, respectivamente. Para fins de comparação, ambas as curvas foram graficadas junto ao voltamograma correspondente à maior concentração de  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . A análise desses resultados indicou que essas duas substâncias não interferem na análise, uma vez que não foram observados picos de oxidação-redução dentro do intervalo de potenciais fixados.

**Figura 34** - Voltamogramas cíclicos do (a)  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  em diferentes concentrações; (b) do eletrólito de suporte KCl comparado ao  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  na concentração inicial da síntese; (c) do extrato de folhas *Citrus sinensis* comparado ao  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  na concentração inicial da síntese; (d) da amostra obtida a partir da síntese “G1” antes do tratamento térmico comparado ao  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  na concentração inicial da síntese; (e) da amostra obtida a partir da síntese “G1” sem mudança de pH inicial do meio comparado ao  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  na concentração inicial da síntese



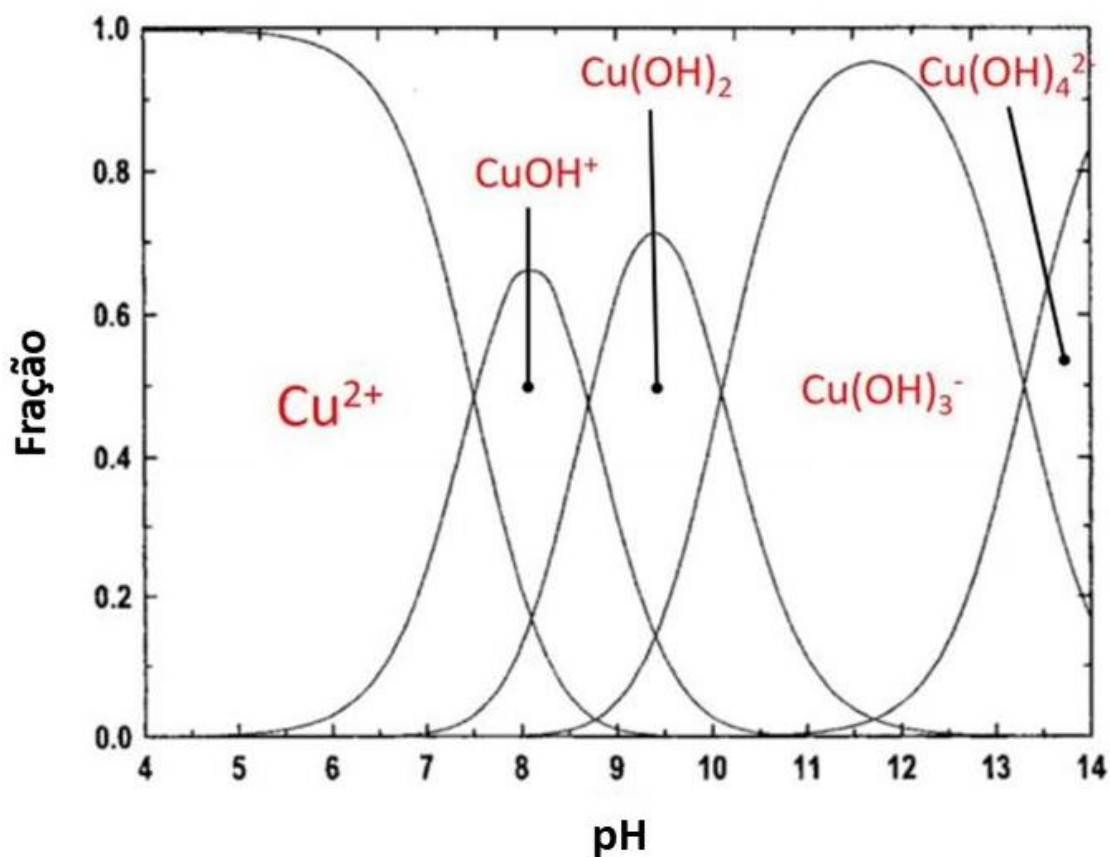
Fonte: a autora (2025)

A **Figura 34(d)** apresenta o voltamograma correspondente à alíquota coletada após 4 h de síntese das CuONPs, sem tratamento térmico, em comparação à curva referente à concentração inicial de  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  utilizada na síntese ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ). Os resultados indicam que, após esse tempo de contato com o extrato de folhas de *Citrus sinensis* e o NaOH empregado para a correção do pH inicial, praticamente todo o cobre disponível foi complexado, uma vez que os picos de oxidação-redução quase não puderam ser detectados pela análise.

Conforme mencionado na revisão bibliográfica desta tese, há um consenso na literatura sobre a capacidade dos compostos fenólicos presentes nos extratos vegetais de formar complexos com íons Cu(II) da solução do sal precursor, antes da formação das CuONPs. As folhas de laranja, por sua vez, contêm diversos compostos fenólicos com propriedades antioxidantes, os quais podem ser extraídos em meio aquoso, conforme demonstrado pelos testes de Folin-Ciocalteu e DPPH. Esses compostos podem ter desempenhado um papel fundamental na complexação dos íons Cu(II), influenciando diretamente o processo de síntese das NPs.

Outro fator relevante a considerar é o ajuste do pH do meio para 7,0 no início da síntese. Conforme ilustrado na **Figura 35**, que apresenta o gráfico de distribuição de espécies de Cu(II) em meio aquoso em função do pH (QUIROZ, 2021), nesse valor de pH há pelo menos 20% de espécies  $\text{CuOH}^+$  e o início da formação de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ , que pode precipitar. Assim, é possível supor que a variação no pH do meio também influencie na síntese, tornando os compostos presentes no extrato mais reativos com os íons Cu(II) disponíveis em solução. De acordo com Selvaraj et al. (2014), os flavonoides, que representam a principal classe de compostos químicos presentes nas plantas, têm tendência a atuar como doadores de hidrogênio, favorecendo a formação de complexos de coordenação com boa estabilidade. Nesse contexto, os principais sítios quelantes dos flavonoides são os grupos hidroxila fenólicos, que geralmente são desprotonados, além dos grupos carbonila, também presentes nesses compostos.

**Figura 35** - Gráfico de distribuição de espécies de Cu(II) em meio aquoso em função do pH



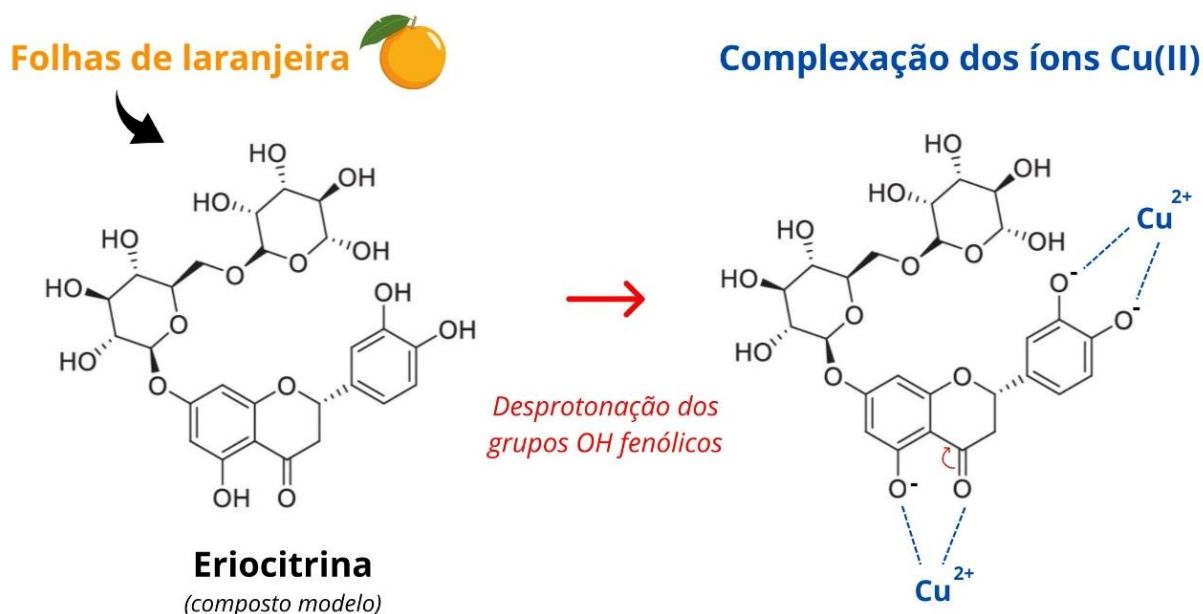
Fonte: adaptado de Quiroz (2021)

Com base nessa observação, a **Figura 34(e)** apresenta o voltamograma obtido para uma amostra coletada após a realização de uma síntese conduzida segundo a mesma metodologia proposta para a síntese “G1”, com a única diferença de que o pH do meio foi mantido em suas condições naturais (pH = 5,45). Como pode ser observado, o comportamento da curva sugere que os íons Cu(II) ainda estão presentes na solução após 4 h de reação do  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  com os compostos presentes no extrato da folha de *Citrus sinensis*. Esse resultado reforça a hipótese previamente levantada de que a alteração do pH pode modificar os compostos presentes no extrato, facilitando a complexação dos íons Cu(II) nessas condições.

Adamu et al. (2020) e Adeolu et al. (2020) observaram que o extrato obtido das folhas de *Citrus sinensis*, utilizando solventes como água e metanol, pode conter alcaloides, taninos,

flavonoides, esteroides e terpenoides em sua composição. Com base nesses estudos e nos resultados obtidos nas análises de voltametria cíclica, foi proposto um mecanismo de ação do extrato de *Citrus sinensis* na síntese verde de CuONPs. A **Figura 36** ilustra a desprotonação do grupo OH, característico de compostos fenólicos, destacando seu papel na complexação e redução dos íons Cu(II) durante a formação das NPs.

**Figura 36** - Mecanismo de ação do extrato de folhas de *Citrus sinensis* na síntese verde de CuONPs usando a eriocitrina como composto modelo



**Fonte:** a autora (2025)

Neste caso, a eriocitrina foi selecionada como composto modelo, uma vez que foi encontrada em altas concentrações nas folhas de *Citrus sinensis*, conforme análise realizada por Adeolu et al. (2020). Essa substância é amplamente distribuída em cascas, polpas, sucos e plantas cítricas, além de apresentar elevada solubilidade em água, metanol e etanol, bem como alta estabilidade em temperaturas elevadas (até 121°C por 15 min) e em meio ácido (pH 4,2), conforme reportado por Yao et al. (2022). Além disso, vale ressaltar que estudos mais

aprofundados seriam necessários para confirmar qual é o componente majoritário presente no extrato de folhas de *Citrus sinensis*. Embora tenha sido realizada uma análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) preliminar, não foi possível obter um resultado satisfatório, pois o desenvolvimento de metodologias para análise de extratos por meio dessa técnica é um processo geralmente longo e complexo, e este não era o foco principal desta tese.

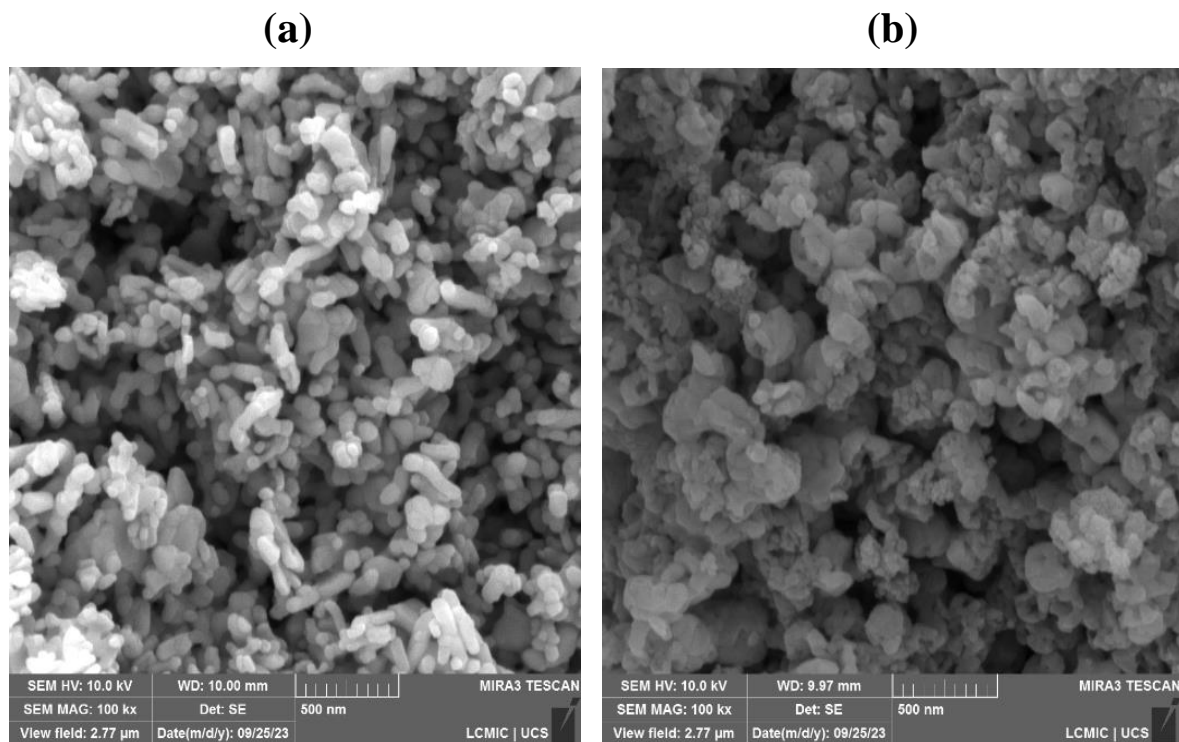
### 4.2.3 Caracterização das CuONPs

#### 4.2.3.1 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) e espectroscopia por energia dispersiva (EDS)

A **Figura 37** apresenta as micrografias de MEV-FEG das amostras comerciais de CuONPs e daquelas sintetizadas por meio da metodologia proposta na síntese “G1”. A comparação entre ambas revela diferenças marcantes em suas morfologias. A amostra comercial (**Figura 37(a)**) exibe partículas com tamanhos aparentemente uniformes, superfície lisa e, apesar do alto grau de aglomeração, a maioria possui formato alongado e arredondado.

Por outro lado, a amostra obtida por meio da síntese “G1” (**Figura 37(b)**) apresenta partículas heterogêneas, tanto em relação ao formato quanto ao tamanho. Essa característica provavelmente está associada à etapa final da síntese, na qual as partículas passaram por um processo de moagem com almofariz e pistilo. Além disso, apesar de as partículas estarem igualmente muito aglomeradas, é possível notar que a maioria delas possui uma superfície rugosa. Morfologia semelhante foi relatada por Sreeju et al. (2019), que também sintetizaram CuONPs por meio de síntese verde, utilizando extrato de folhas de *Psidium guajava*.

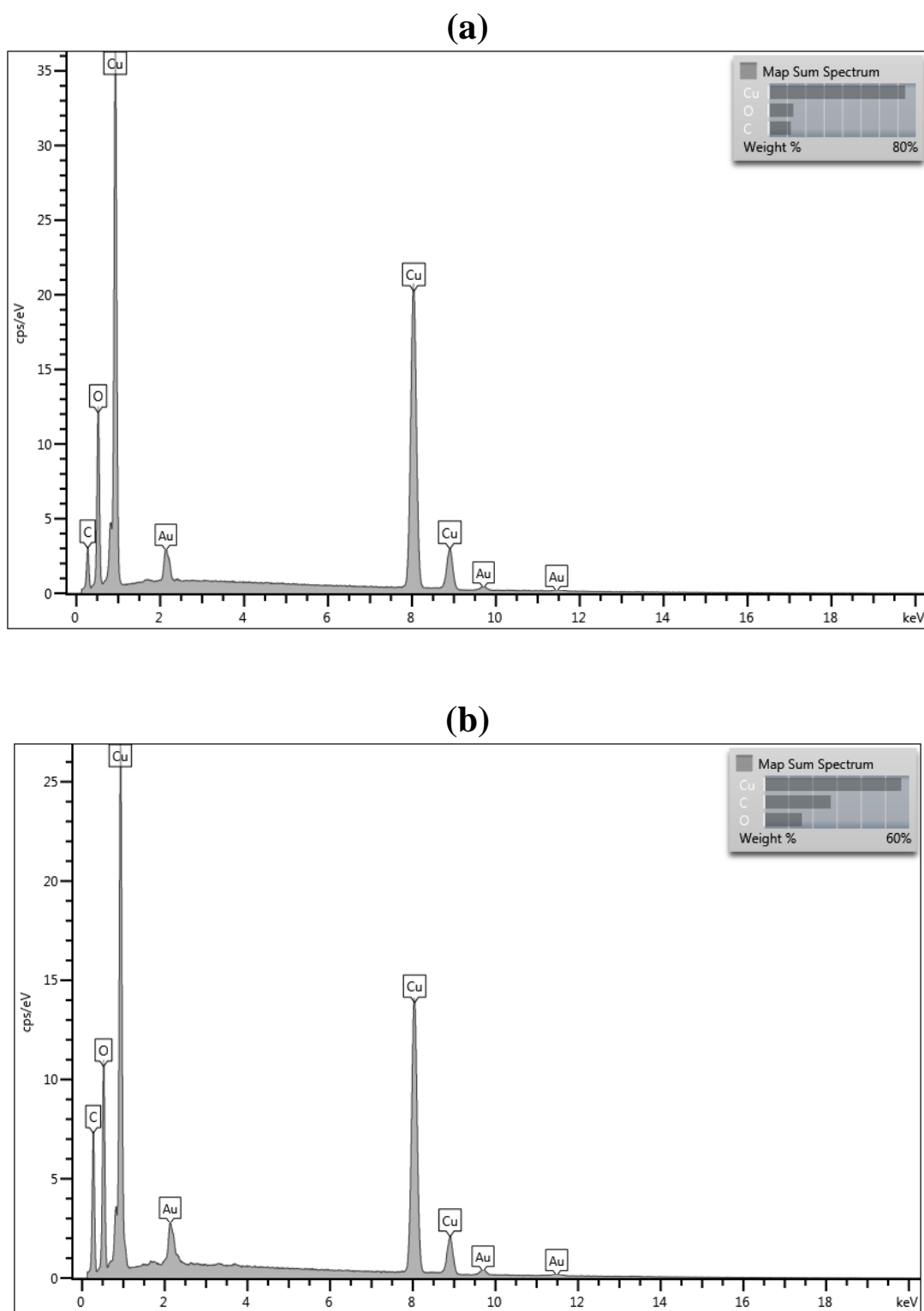
**Figura 37** - Micrografias de MEV-FEG da (a) amostra comercial de CuONPs e das (b) CuONPs obtidas por meio da metodologia proposta na síntese “G1”



**Fonte:** a autora (2025)

Em relação às análises de EDS, os espectros da amostra comercial de CuONPs (**Figura 38(a)**) evidenciaram a presença predominante de Cu e O, seguidos por C e Au em proporções bem menores. Esses resultados indicam que a amostra é composta essencialmente pelos elementos característicos das CuONPs, sendo que a presença de C está associada à fita de carbono utilizada para fixar as NPs nos *stubs* do porta-amostra do microscópio, enquanto o Au resulta do recobrimento prévio aplicado para garantir a condutividade na análise de MEV-FEG. Comportamento semelhante foi igualmente observado no espectro das CuONPs obtidas a partir da metodologia proposta na síntese “G1” (**Figura 38(b)**), diferenciando-se apenas na intensidade relativa dos picos.

**Figura 38** - Espectros de EDS da **(a)** amostra comercial de CuONPs e das **(b)** CuONPs obtidas por meio da metodologia proposta na síntese “G1”



Fonte: a autora (2025)

#### 4.2.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A morfologia e o tamanho das CuONPs da amostra comercial e das obtidas por meio da metodologia proposta na síntese “G1” também foram avaliados por MET. As micrografias e os histogramas de distribuição de tamanho são apresentados na **Figura 39**. Ao comparar as amostras, observa-se que, apesar de apresentarem praticamente a mesma composição química, elas exibem morfologias completamente distintas. A amostra comercial (**Figura 39(a)**) apresenta partículas aparentemente menores, bem dispersas e com formato esférico. Já as partículas obtidas por síntese verde (**Figura 39(b)**) encontram-se agregadas e não possuem formatos bem definidos.

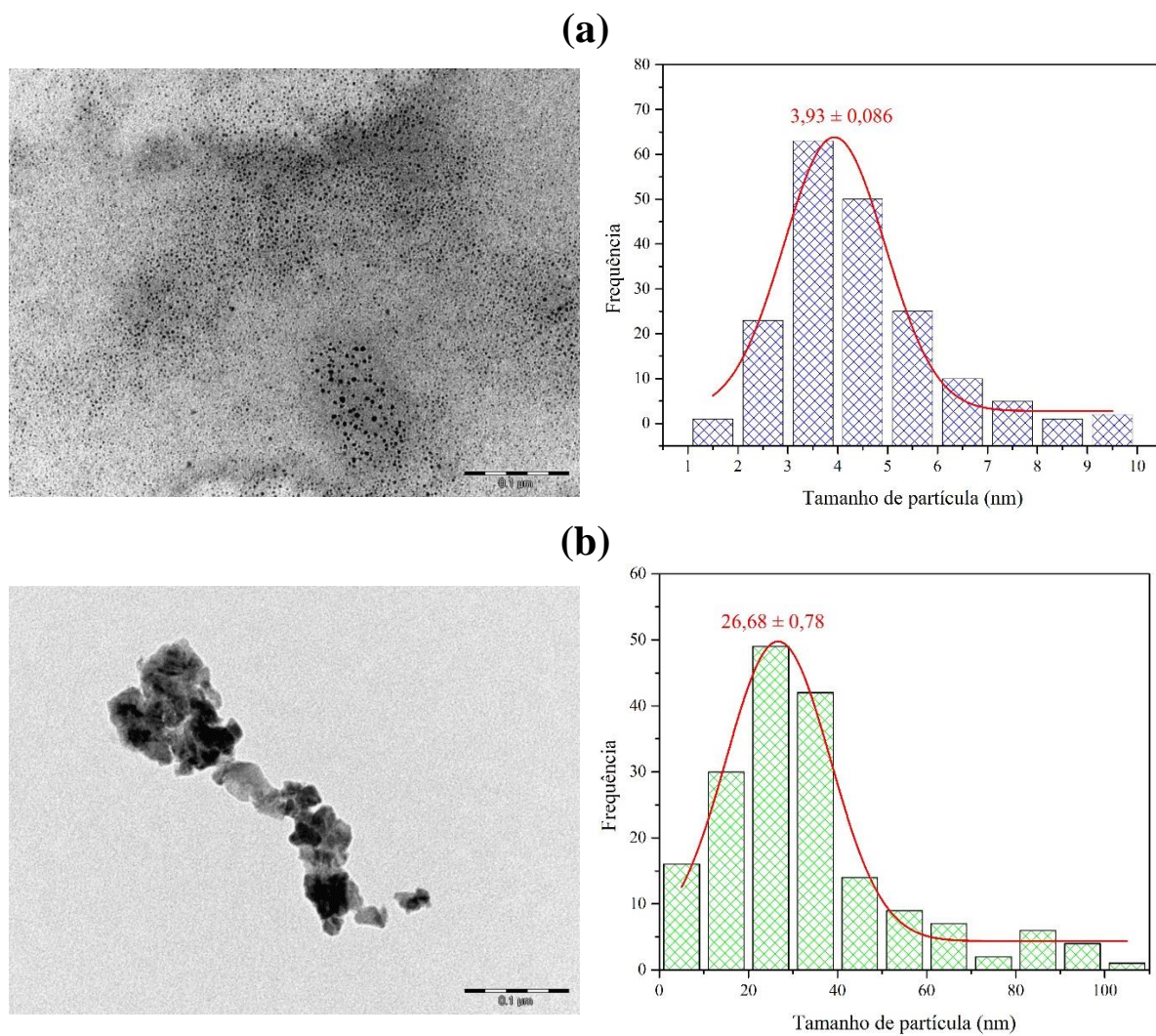
Essa análise também permitiu estimar o tamanho médio das NPs de cada amostra. Conforme pode ser observado, a amostra comercial de CuONPs apresenta uma distribuição de partículas mais uniforme e menor quando comparada àquela da amostra obtida por síntese verde a partir do extrato de folhas de *Citrus sinensis*, com tamanho médio em torno de 3-4 nm, o que as torna particularmente favoráveis para aplicações antimicrobianas.

A amostra produzida por síntese verde, por outro lado, apresentou uma ampla variação de tamanhos durante as medidas (1-110 nm). No entanto, a maior frequência de tamanhos observada na amostra ficou em torno de 20-30 nm. Embora sejam maiores que as partículas comerciais, as CuONPs obtidas por síntese verde ainda apresentam potencial para aplicações antimicrobianas. É importante destacar que essas partículas estavam bastante aglomeradas, o que dificultou a realização das medições. Consequentemente, pode haver um erro maior associado às medidas, o que sugere que a distribuição real de tamanhos pode ser mais restrita do que a observada.

Morfologia e tamanho similares foram observados por Sreeju et al. 2019, que sintetizaram CuONPs por meio de síntese verde utilizando extrato de folhas de *Psidium*

guajava. Nesse estudo, as partículas apresentaram um diâmetro médio de 37 nm, com formato predominantemente esférico, porém altamente agregadas.

**Figura 39** - Imagens de MET da (a) amostra comercial de CuONPs e das (b) CuONPs obtidas por meio da metodologia proposta na síntese “G1” com os respectivos histogramas de distribuição de tamanho



Fonte: a autora (2025)

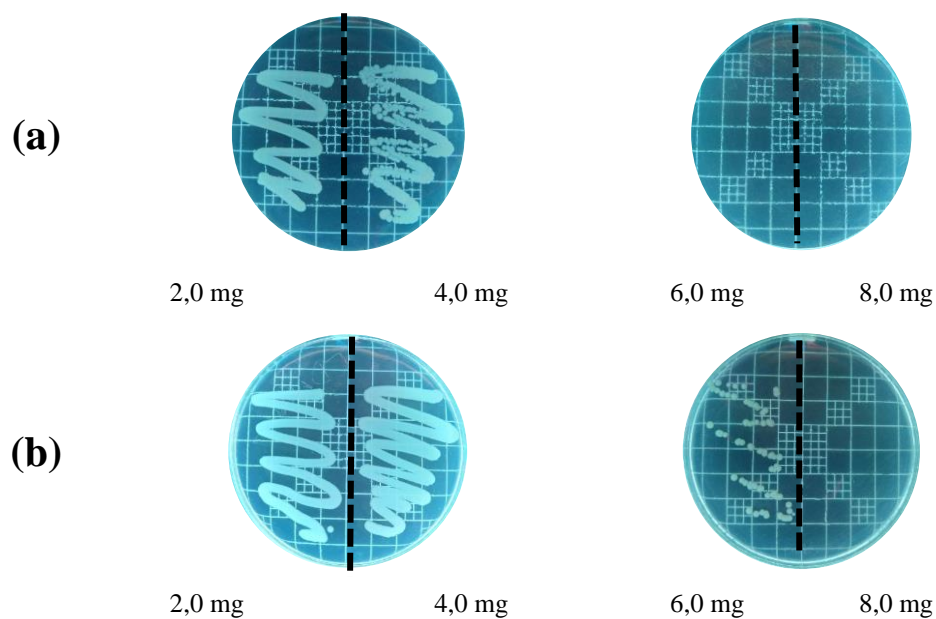
#### 4.2.4 Concentração mínima inibitória (CMI)

Os ensaios microbiológicos preliminares apresentados na **Seção 4.2.1** foram conduzidos utilizando uma massa de 10 mg de CuONPs. No entanto, para determinar a menor quantidade de CuONPs necessária para observar um efeito bactericida, foi realizado o ensaio de CMI, no qual a massa de CuONPs foi reduzida enquanto a concentração e volume do meio bacteriano foram mantidos constantes.

Os resultados desse ensaio para as amostras de CuONPs contra a cepa de *E. coli* são apresentados na **Figura 40**, enquanto aqueles referentes à cepa de *S. aureus* estão na **Figura 41**. Conforme ilustrado na **Figura 40**, a amostra comercial demonstrou maior eficiência bactericida em comparação à obtida por meio da síntese “G1”, exigindo  $6,0 \text{ mg mL}^{-1}$  para inibir o crescimento de *E. coli*, enquanto a segunda requereu pelo menos  $8,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . Tendência semelhante foi observada para a cepa de *S. aureus* (**Figura 41**), diferindo apenas na quantidade necessária para o efeito bactericida. Nesse caso,  $4,0 \text{ mg mL}^{-1}$  da amostra comercial foram suficientes para eliminar praticamente todas as bactérias presentes no meio, enquanto  $6,0 \text{ mg mL}^{-1}$  foram necessários para a erradicação completa.

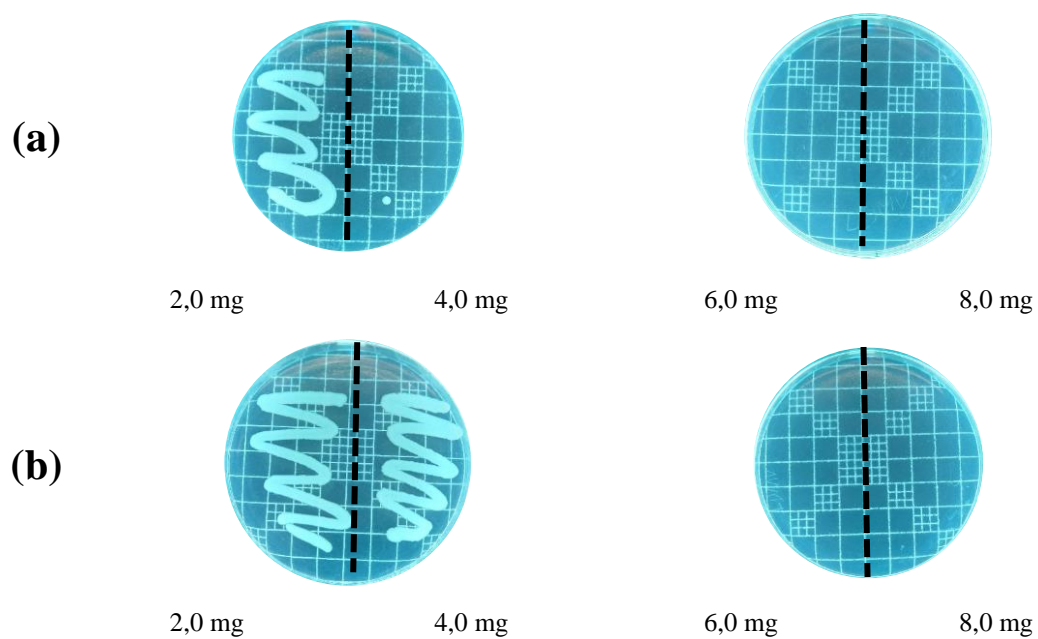
O fato da amostra comercial de CuONPs apresentar maior efeito bactericida do que a proveniente da síntese verde possivelmente está relacionado ao tamanho e formato das partículas. Conforme verificado na análise de TEM, as CuONPs da amostra comercial apresentam maior uniformidade em relação à morfologia, com a maioria das partículas medindo entre 3-4 nm. Por outro lado, a amostra obtida por meio da síntese “G1” apresentou uma distribuição de tamanho mais variada, com predominância de partículas entre 20-30 nm.

**Figura 40** - Ensaio para a avaliação da CMI utilizando a cepa de *E. coli* com a (a) amostra comercial de CuONPs e as (b) CuONPs obtidas por meio da síntese “G1”



**Fonte:** a autora (2025)

**Figura 41** - Ensaio para a avaliação da CMI utilizando a cepa de *S. aureus* com a (a) amostra comercial de CuONPs e as (b) CuONPs obtidas por meio da síntese “G1”



**Fonte:** a autora (2025)

Outros estudos que também prepararam CuONPs por síntese verde obtiveram valores semelhantes para a CMI em relação a essas duas bactérias. Ijaz et al. (2017), utilizando o extrato de folhas de *Abutilon indicum*, produziram CuONPs esféricas com tamanho médio de 16,8 nm. Nesse trabalho, os autores observaram que tanto para *E. coli* quanto para a *S. aureus* foi necessária uma quantidade superior a 5,0 mg mL<sup>-1</sup> de CuONPs para se observar atividade bactericida. Por outro lado, essa mesma concentração foi suficiente para eliminar as bactérias *Klebsiella* (Gram-negativa) e *Bacillus subtilis* (Gram-positiva). Rajamma et al. (2020), por sua vez, utilizaram o extrato de folhas de *Nilgirianthus ciliatus* e, assim como Ijaz et al. (2017), produziram CuONPs esféricas, porém com tamanho da ordem de 20 nm. Neste estudo, as concentrações de 0,5 e 1,0 mg mL<sup>-1</sup> foram testadas contra cepas de *S. aureus* e *S. mutans* (Gram-positivas), além de *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativas). Para ambas as quantidades avaliadas, foram observadas zonas de inibição superiores a 10 mm, indicando boa atividade bactericida.

É importante destacar que, apesar de a amostra de CuONPs obtida por meio da síntese verde apresentar uma eficácia bactericida menor em comparação com a amostra comercial, ela ainda possui potencial para ser aplicada em materiais que requerem propriedades antimicrobianas. No caso da incorporação em biomateriais, por exemplo, a amostra sintetizada pode ser até mais vantajosa, pois pode apresentar uma menor citotoxicidade, o que a torna uma alternativa promissora para aplicações biomédicas e em dispositivos de liberação controlada.

#### 4.3 CONFECÇÃO DE FILMES DE NRL CONTENDO CuONPs

Após a definição da metodologia mais adequada para a síntese verde das CuONPs, iniciaram-se os experimentos que avaliaram a incorporação e a atividade antimicrobiana dessas partículas na matriz de NRL. Embora a formulação utilizada para a produção dos filmes de

NRL tenha sido desenvolvida previamente por Restelatto et al. (2024), dois fatores ainda foram investigados: o tipo de surfactante utilizado para a dispersão das NPs e dos agentes de vulcanização, e a quantidade ideal de CuONPs a ser incorporada na matriz de NRL. A seguir, esses resultados serão apresentados e discutidos.

#### 4.3.1 Surfactante

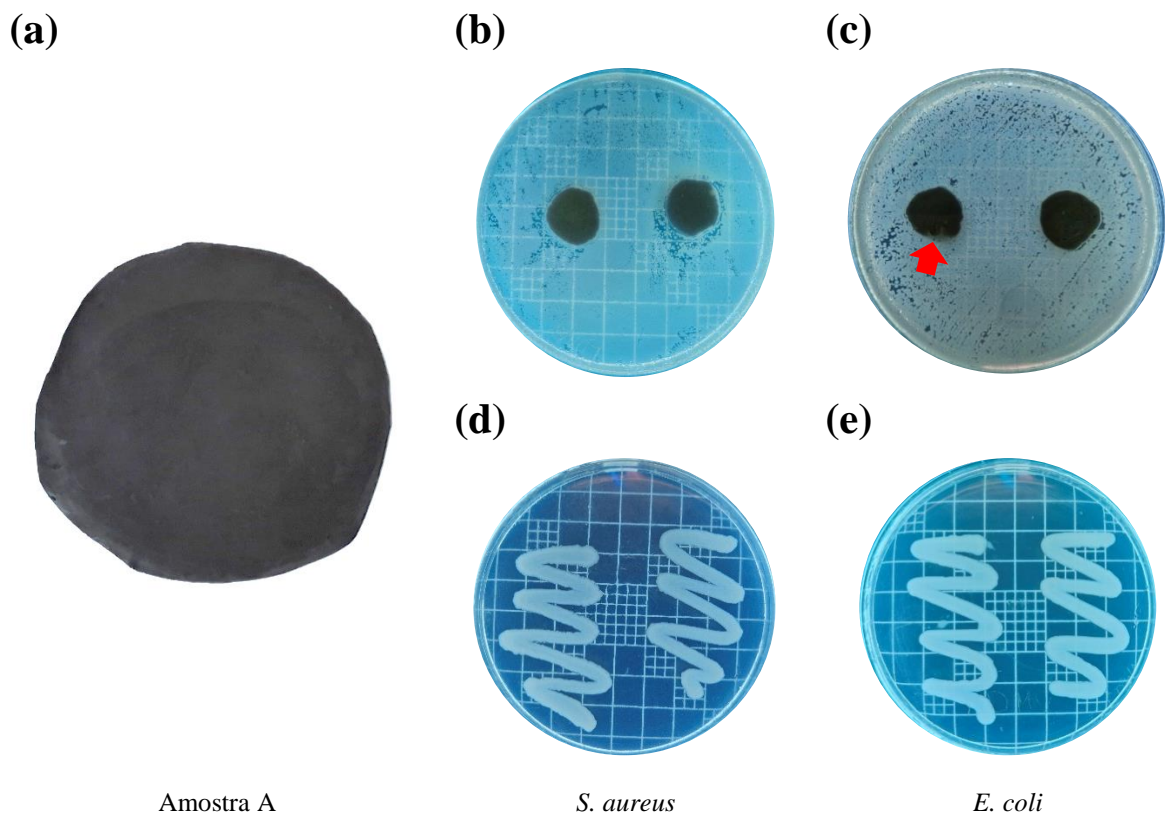
Sabe-se que as NPs, de maneira geral, tendem a se aglomerar devido à alta área superficial por unidade volumétrica (ZARE; RHEE; HUI, 2017). Esse fenômeno pode ser um problema, pois a aglomeração das NPs pode comprometer tanto as propriedades mecânicas quanto as antimicrobianas do material final. Assim, o primeiro aspecto avaliado e definido para o processo de incorporação das CuONPs nos filmes NRL foi a escolha e a quantidade ideal de surfactante empregado.

Conforme discutido no referencial teórico desta tese, o NRL é um material de composição química complexa. Após sua retirada da seringueira, é comum adicionar uma solução contendo hidróxido de amônio para impedir a coagulação desse material. Dessa forma, para evitar a inclusão de mais um componente, optou-se por avaliar a possibilidade de utilizar uma solução de hidróxido de amônio como surfactante para as CuONPs e os agentes de vulcanização.

A **Figura 42** apresenta os resultados da primeira confecção do filme. Como pode ser observado na imagem **(a)**, apesar da amostra “A” apresentar bom aspecto físico, como boa uniformidade na dispersão das CuONPs ao longo da superfície do NRL, secagem eficiente, elasticidade e integridade mecânica, os resultados microbiológicos indicaram que ela não possui atividade bacteriostática **((b) e (c))**, nem bactericida **((d) e (e))**. Na imagem **(c)**, que

avalia a atividade bacteriostática em relação à cepa de *E. coli*, é possível observar, conforme indicado pela seta vermelha, o crescimento bacteriano até sob a amostra.

**Figura 42** - Filme de NRL contendo CuONPs comerciais preparado com hidróxido de amônio como surfactante: (a) aspecto físico do filme; (b) e (d) ensaios microbiológicos contra a cepa de *S. aureus*; e (c) e (e) ensaios microbiológicos com a cepa de *E. coli*



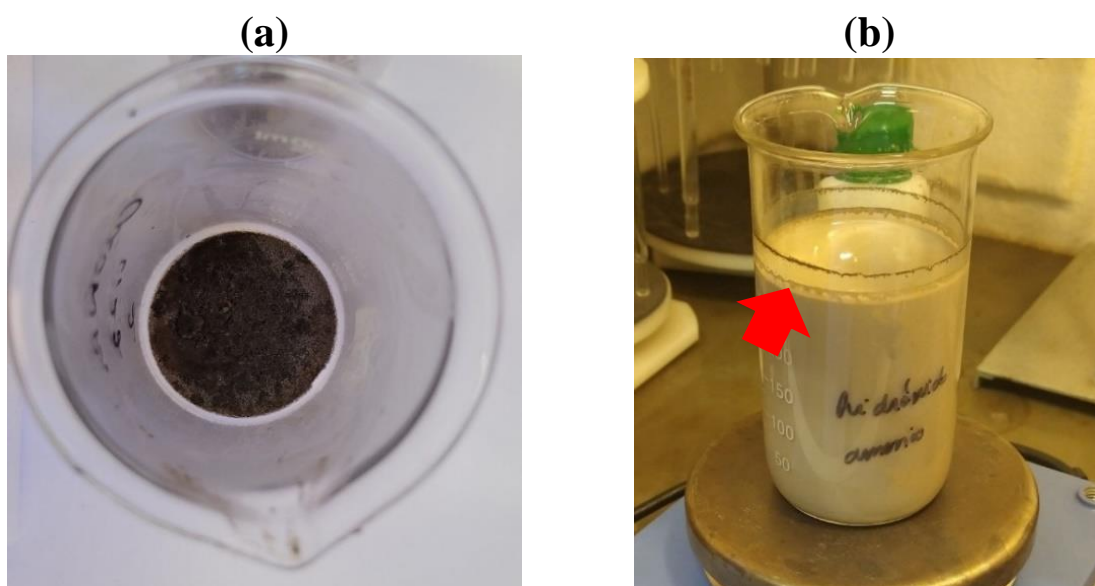
**Fonte:** a autora (2025)

A **Figura 43** mostra duas fotografias registradas durante a confecção da amostra “A”. Na imagem (a), é possível observar a presença de uma quantidade residual considerável de CuONPs e agentes de vulcanização que não foram adequadamente dispersados na solução de hidróxido de amônio. Na imagem (b), por outro lado, é mostrado o processo de incorporação das partículas na matriz de NRL. Nessa imagem, pode-se verificar que uma parte das partículas

fica aderida às paredes do béquer (indicado pela seta vermelha), o que confirma a baixa eficiência do hidróxido de amônio para essa finalidade.

Diante dos resultados obtidos, percebeu-se que o hidróxido de amônio poderia não estar na concentração ideal ou, ainda, não ser o surfactante mais adequado para a dispersão das CuONPs e confecção dos filmes. A concentração escolhida do hidróxido de amônio (0,01%) foi a mesma que é usualmente adicionada ao NRL para a sua estabilização (SEMEGEN, 2003). Outro ponto relevante é o fato de o hidróxido de amônio ser muito volátil, com ponto de ebulição em torno de 38 °C. Considerando que o processo de dispersão envolve a adição das CuONPs e dos agentes de vulcanização no surfactante, e que estes permanecem em banho de ultrassom durante 1 h, uma parte do hidróxido de amônio pode ter evaporado, comprometendo, assim, a dispersão das partículas. Diante desse problema, tornou-se necessário buscar um surfactante não fosse volátil e que facilitasse o manuseio durante o processo.

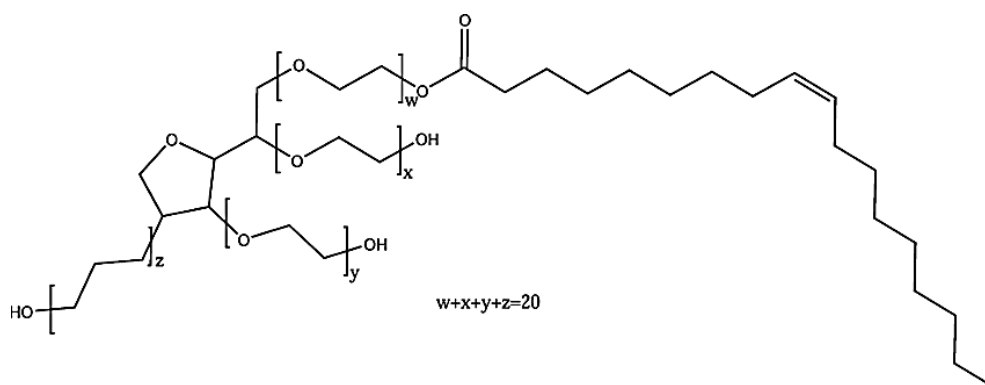
**Figura 43** - Fotografias registradas durante o ensaio de avaliação do hidróxido de amônio como surfactante: **(a)** resíduos de CuONPs e agentes de vulcanização que não foram adequadamente dispersados; **(b)** processo de incorporação das CuONPs e dos agentes de vulcanização na matriz de NRL



**Fonte:** a autora (2025)

O Tween 80 é um surfactante não iônico do tipo polissorbato, produzido pela etoxilação do sorbitano, antes da adição de ácido oleico (**Figura 44**). Sua estabilidade e sua relativa baixa toxicidade permitem seu uso em diversos produtos cosméticos e farmacêuticos (MACCELLI et al., 2019). Além disso, o Tween 80 tem sido empregado na produção de filmes biopoliméricos contendo CuONPs (ASDAGH et al., 2021; HASHEMINYA et al., 2019). Por essas razões, sua utilização foi considerada no presente trabalho.

**Figura 44** - Estrutura química do surfactante Tween 80



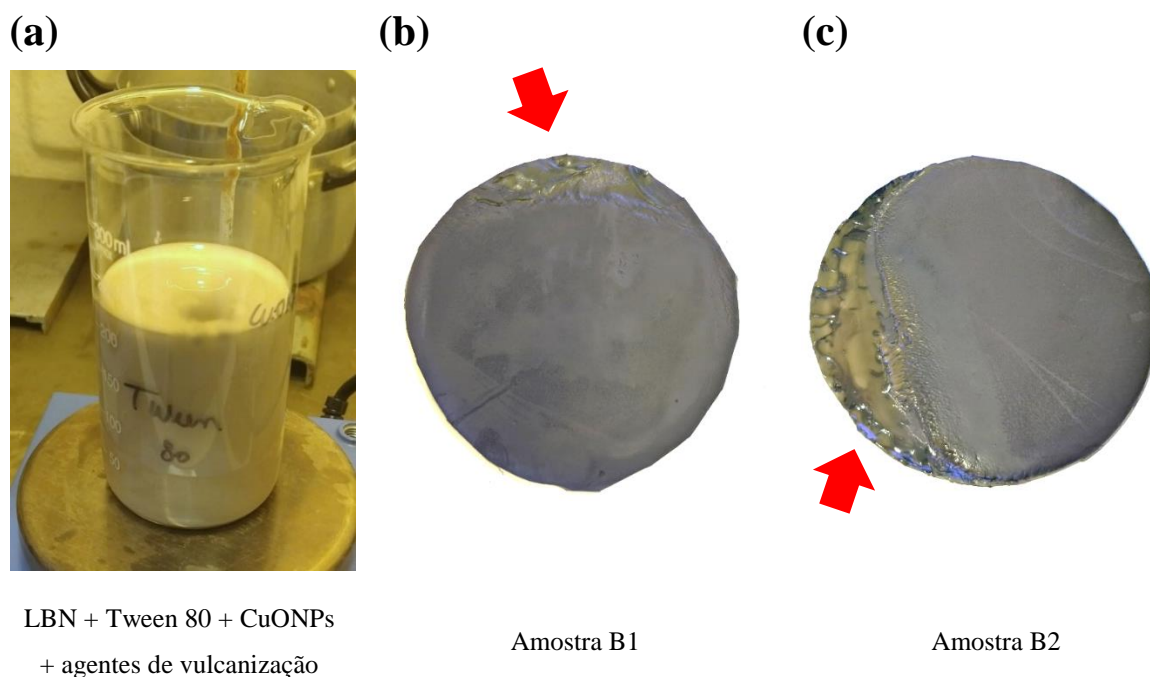
**Fonte:** adaptado de Maccelli et al. (2019)

A **Figura 45** apresenta uma fotografia registrada durante a incorporação das CuONPs e dos agentes de vulcanização no filme de NRL, utilizando o Tween 80 como surfactante, além dos filmes de NRL com CuONPs preparados com duas concentrações diferentes de Tween 80 (amostras “B1” e “B2”, respectivamente).

A imagem **(a)** evidencia que esse surfactante teve um bom desempenho na dispersão das CuONPs, já que, ao contrário do hidróxido de amônio, não causou acúmulo de partículas residuais juntos às paredes do béquer. Nas imagens **(b)** e **(c)**, por outro lado, é possível observar a aparência física dos filmes de NRL e CuONPs preparados com duas concentrações diferentes de Tween 80. Em ambas, as amostras secaram completamente e apresentaram um aspecto

oleoso, mesmo após 7 dias de secagem em estufa. Esse aspecto oleoso pode ser atribuído à presença de uma longa cadeia hidrofóbica na estrutura molecular do Tween 80 (MACCELLI et al., 2019). Considerando que o filme de NRL com CuONPs deve apresentar boa aparência, integridade mecânica e elasticidade para posterior aplicação, o uso do Tween 80 como surfactante foi descartado, mesmo antes de avaliar o potencial antimicrobiano das amostras “B1” e “B2”.

**Figura 45** - Filmes de NRL contendo CuONPs comerciais preparados com Tween 80 como surfactante: (a) processo de incorporação das CuONPs e dos agentes de vulcanização na matriz de NRL; (b) e (c) aspecto físico do filme das amostras “B1” e “B2”, respectivamente



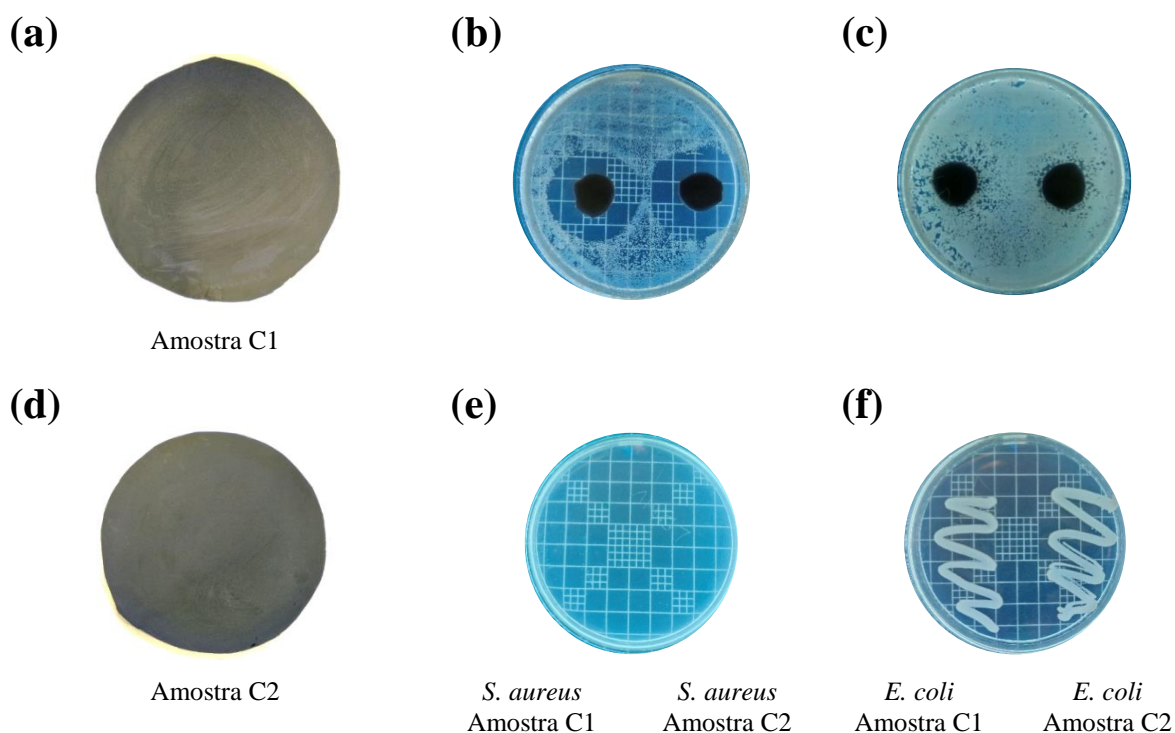
**Fonte:** a autora (2025)

O Triton X representa uma série de surfactantes não iônicos, conhecidos como polioxietilenos (ou polietienoglicóis) (**Figura 46**). Trata-se de uma marca registrada, em que “X” faz referência a diferentes variantes dessa linha de produtos, sendo que o número seguinte



realizadas. Além disso, o aspecto oleoso, que antes era observado com a utilização Tween 80, não foi constatado nestas amostras.

**Figura 47** - Filmes de NRL contendo CuONPs comerciais preparado com Triton X-100 como surfactante: aspecto físico dos filmes (a) “C1” e (d) “C2”; (b) e (e) ensaios microbiológicos contra a cepa de *S. aureus*; em (c) e (f) ensaios microbiológicos contra a cepa de *E. coli*



**Fonte:** a autora (2025)

No que diz respeito aos resultados dos testes microbiológicos, ambas as amostras produzidas com diferentes quantidades de Triton X-100 apresentaram comportamentos semelhantes, ou seja, demonstraram atividade bacteriostática e bactericida contra a cepa de *S. aureus*, conforme pode ser observado nas imagens (b) e (e), e foram consideradas apenas bacteriostáticas contra a cepa de *E. coli* (imagens (c) e (f)), uma vez que não houve crescimento bacteriano sob as amostras. A maior toxicidade das CuONPs contra a cepa de *S. aureus* já era

esperada e foi igualmente constatada nos resultados apresentados na **Seção 4.2.1**, onde as NPs ainda não estavam incorporadas na matriz de NRL.

De maneira similar ao presente estudo, Peter et al. (2023) incorporaram uma mistura de CuONPs e AgNPs em NRL. Os autores observaram que o nanocompósito foi capaz de eliminar cerca de 83% de *E. coli* e 92% de *S. aureus*, após 12 h de incubação. Comparando com os resultados do presente estudo, a maior eficiência bactericida contra *E. coli* pode estar relacionada à adição conjunta de CuONPs e de AgNPs à matriz de NRL. Conforme discutido anteriormente, as CuONPs apresentam menor eficácia bactericida contra cepas Gram-negativas e maior atividade contra bactérias Gram-positivas, devido à maior abundância de grupos funcionais amino e carboxila na superfície celular destas últimas, além da maior afinidade do cobre por esses grupos (AZAM et al., 2012).

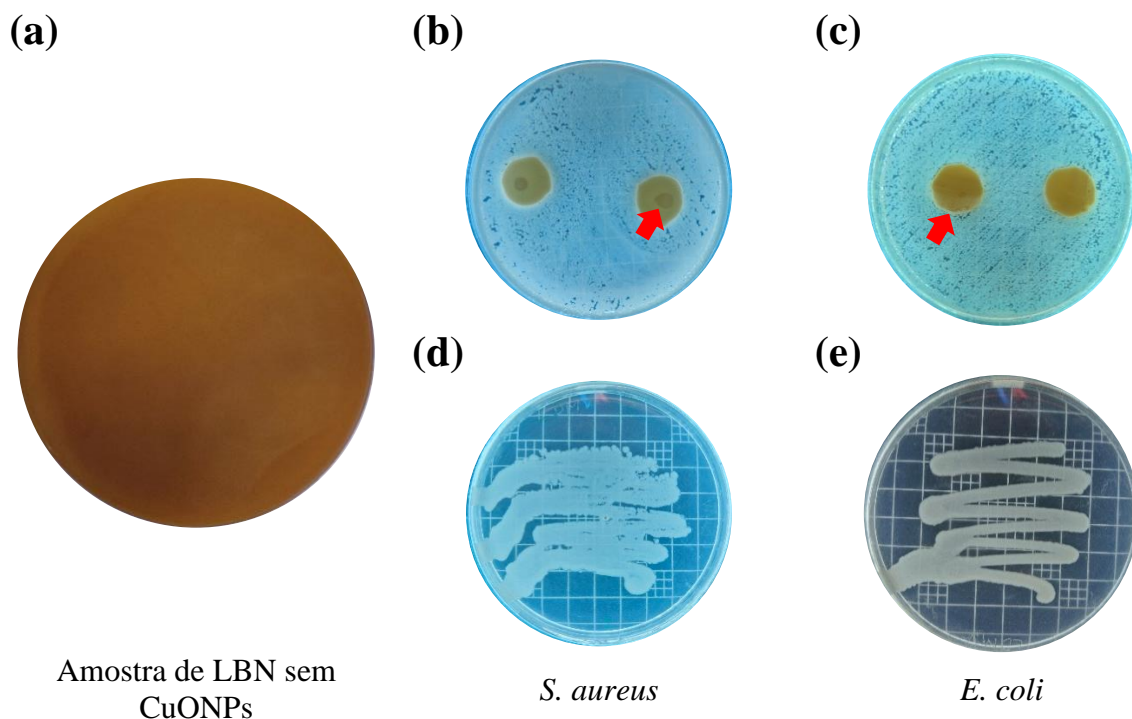
Levando em consideração todos esses resultados, o Triton X-100 foi definido como o surfactante mais adequado para a preparação dos filmes de NRL. Entre as amostras “C1” e “C2”, a amostra “C2”, contendo a maior concentração de surfactante (4% m/m), visualmente apresentou melhor dispersão das partículas e, por esse motivo, sua formulação foi escolhida como a ideal para dar continuidade aos demais ensaios.

#### **4.3.2 Incorporação de CuONPs à matriz de NRL**

Outro ponto importante a ser destacado é que não apenas as CuONPs podem estar exercendo atividade antimicrobiana na superfície de NRL, mas também os agentes de vulcanização adicionados e o próprio surfactante. A literatura apresenta estudos que discutem os impactos ambientais associados ao uso dos agentes de vulcanização (ROBERTS et al., 2021) bem como a citotoxicidade a eles relacionada (SUWANDITTAKUL et al., 2023).

Em função desses aspectos, uma amostra controle foi preparada contendo apenas NRL, agentes de vulcanização e surfactante, com o objetivo de avaliar a influência das CuONPs na matriz de NRL. A **Figura 48** apresenta os resultados dessa avaliação. Na imagem **(a)**, é possível observar o aspecto físico do filme de NRL que, por não apresentar CuONPs em sua composição, resultou em um material de cor clara. Além disso, a ausência de CuONPs na composição das amostras de NRL impactou negativamente na atividade antimicrobiana, pois, nas imagens **(b)** e **(c)**, observa-se crescimento bacteriano em alguns pontos sob as amostras, indicando um efeito bacteriostático reduzido. Já as imagens **(d)** e **(e)** demonstraram que nenhuma das amostras exibiu atividade bactericida.

**Figura 48** - Filme de NRL sem a adição de CuONPs em sua composição: **(a)** aspecto físico do filme; **(b)** e **(d)** ensaios microbiológicos contra a cepa de *S. aureus*; **(c)** e **(e)** ensaios microbiológicos contra a cepa de *E. coli*



**Fonte:** a autora (2025)

Esse resultado evidencia que a adição das CuONPs aos filmes vulcanizados de NRL pode, de fato, potencializar sua atividade bacteriostática e bactericida contra a cepa de *S. aureus*, além de melhorar a sua atividade contra a cepa de *E. coli*. No estudo de Peter et al., (2023), os autores observaram, por meio de medições de ângulo de contato, que a incorporação de CuONPs e AgNPs em uma matriz de NRL aumentou seu caráter hidrofílico em comparação a uma amostra de NRL puro. Superfícies hidrofílicas atraem fortemente moléculas de água, formando uma camada protetora que reduz a adesão bacteriana à película de borracha.

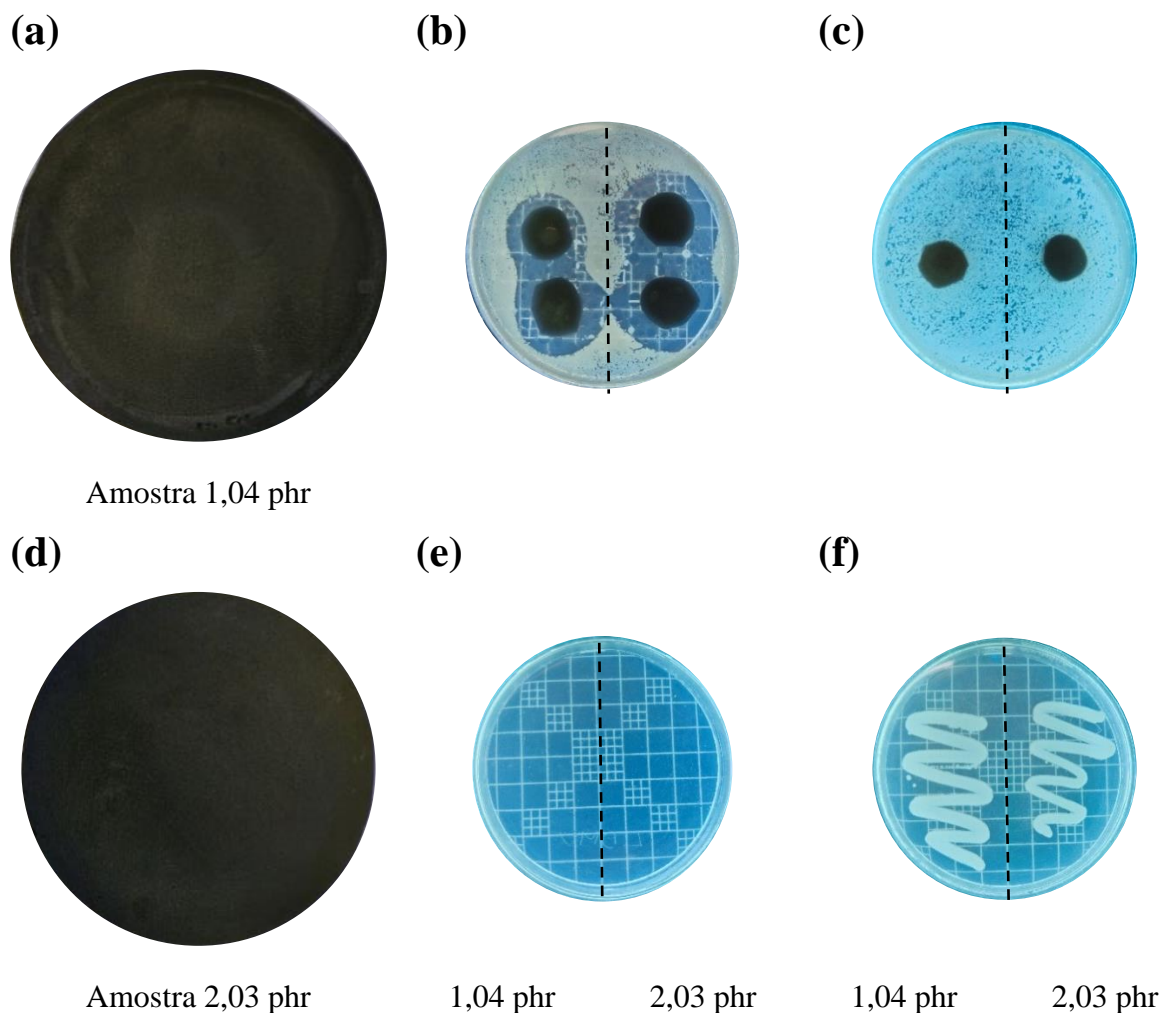
#### 4.3.3 Quantidade de CuONPs

Após a definição do surfactante mais adequado para a confecção dos filmes de NRL, também foi avaliada a possibilidade de reduzir a quantidade de CuONPs adicionadas e verificar se a atividade antimicrobiana do material resultante seria comprometida. Os ensaios iniciais foram conduzidos com 4,16 phr de CuONPs comerciais, que é uma quantidade relativamente alta em comparação a outros estudos que também incorporaram agentes antimicrobianos em suas formulações. Restelatto et al. (2024), por exemplo, testaram teores entre 0,07 e 1,5 phr de um aditivo contendo AgNPs e ZnO, observando que a partir de 0,5 phr, o material já apresentava certa atividade antimicrobiana contra *E.coli*. Dessa forma, foram confeccionados dois novos filmes contendo quantidades menores de CuONPs (2,03 e 1,04 phr, especificamente). A **Figura 49** apresenta os resultados obtidos para ambas as amostras.

Como pode ser constatado, a redução da quantidade de CuONPs na composição das amostras de NRL não comprometeu as características bacteriostáticas contra ambas as cepas bacterianas, nem a atividade bactericida exercida contra a cepa de *S. aureus*, como pode ser observado em **(b)**, **(c)** e **(e)**, respectivamente. Além disso, em **(f)** é possível verificar que o filme continuou não apresentando atividade bactericida contra a cepa de *E. coli*. A única diferença

observada foi o tamanho do halo de inibição entre as amostras com 1,04 e 2,03 phr, sendo que a amostra com menor quantidade de CuONPs apresentou um menor halo. No entanto, como essa redução não afetou a atividade antimicrobiana do material final, a concentração de 1,04 phr foi considerada a mais adequada para a confecção dos filmes de NRL.

**Figura 49** - Filmes de NRL contendo diferentes quantidades de CuONPs comerciais em sua composição: **(a)** e **(d)** aspecto físico dos filmes contendo 1,04 e 2,03 phr de NPs, respectivamente; **(b)** e **(e)** ensaios microbiológicos contra a cepa de *S. aureus*; **(c)** e **(f)** ensaios microbiológicos contra a cepa de *E. coli*

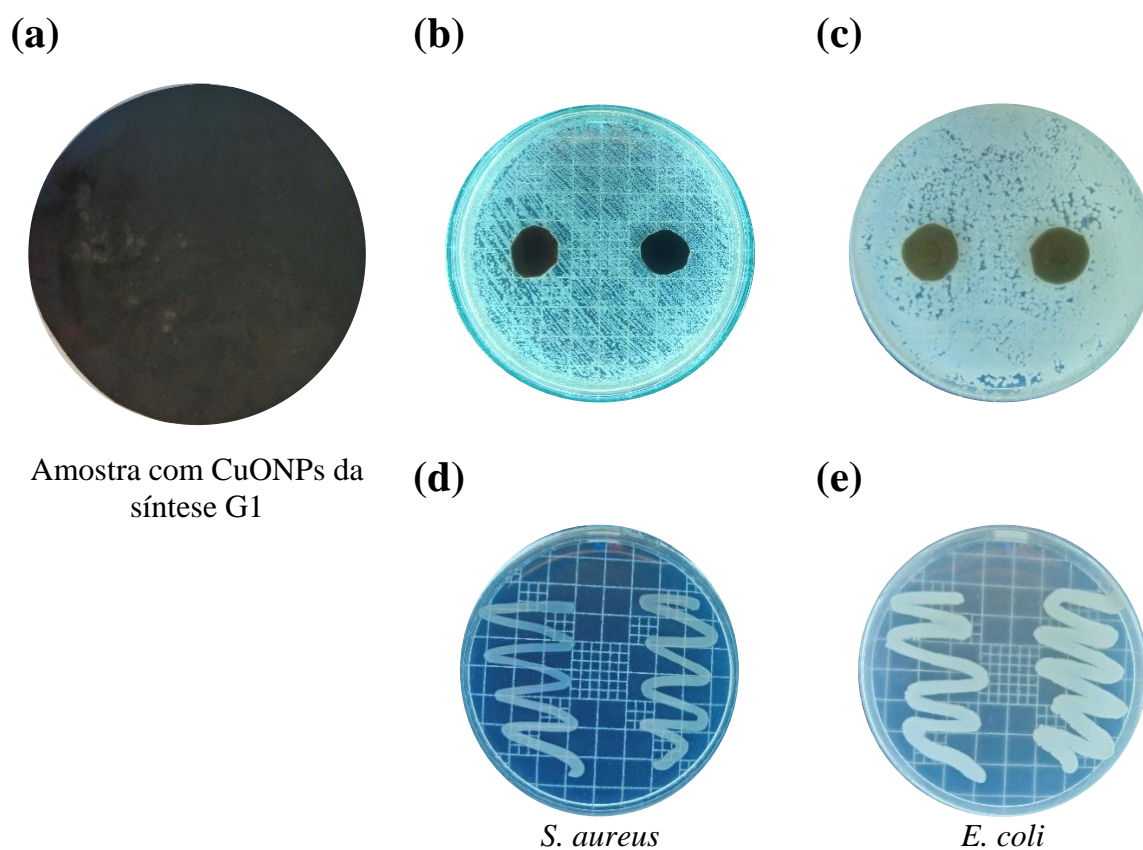


**Fonte:** a autora (2025)

#### 4.3.4 Aplicação das CuONPs obtidas por síntese verde em filmes de NRL

Finalmente, após definir o surfactante e a quantidade ideal de CuONPs que poderia ser adicionada à matriz de NRL, procedeu-se à confecção dos filmes com as CuONPs obtidas por meio da síntese “G1”. A **Figura 50** apresenta os resultados dos ensaios microbiológicos obtidos com esses filmes.

**Figura 50** - Ensaio microbiológico com os filmes de NRL contendo as CuONPs produzidas por meio da síntese “G1” contra as cepas de *E. coli* e *S. aureus*



Fonte: a autora (2025)

Na imagem **(a)**, pode-se observar que o filme de NRL contendo as CuONPs obtidas a partir síntese verde apresenta uma coloração não uniforme, o que pode indicar uma dispersão inadequada das partículas em sua superfície. Como mostrado nas micrografias de MET (**Seção 4.2.3.2**), as CuONPs obtidas por meio da síntese “G1” estavam bastante aglomeradas, mesmo após a dispersão em álcool isopropílico. Assim, embora o surfactante Triton X-100 tenha sido eficaz para dispersar as CuONPs comerciais, ele pode não ter sido tão eficiente para as CuONPs obtidas a partir do extrato de *Citrus sinensis*. Por outro lado, ao analisar as demais características físicas do filme, pode-se concluir que o mesmo manteve elasticidade e integridade mecânica semelhantes às observadas no filme de NRL com CuONPs comerciais.

Quanto aos ensaios microbiológicos (imagens **(b)**, **(c)**, **(d)** e **(e)**), a adição das CuONPs obtidas por meio da síntese “G1” ao filme de NRL comprometeu as propriedades bactericidas que o compósito de NRL e CuONPs comerciais apresentava contra a cepa de *S. aureus*. Além disso, embora as amostras de NRL e CuONPs obtidas por meio desta síntese ainda apresentem caráter bacteriostático, uma vez que não se observa crescimento bacteriano sob as amostras, elas não formam o halo de inibição que era visível nas amostras de NRL e CuONPs comerciais.

Esse resultado, mais uma vez, evidencia que o tamanho das CuONPs tem um papel fundamental na eficácia de sua atividade bactericida, especialmente quando estão imobilizadas na matriz de NRL. Como foi observado na caracterização por MET, as CuONPs comerciais apresentam uma distribuição de tamanho de partículas que varia de 1 a 10 nm, enquanto as CuONPs obtidas por meio da síntese “G1”, possuem uma variação de tamanho entre 1 e 110 nm.

Ainda assim, pelo fato de o material ter apresentado atividade bacteriostática, pode-se considerar que as CuONPs obtidas por meio da síntese “G1” ainda têm potencial para serem utilizadas na confecção de filmes de NRL, abrindo perspectivas para uma futura aplicação desse material na área de biomateriais.

## 5 CONCLUSÕES

Neste estudo, avaliou-se a viabilidade do uso do extrato de folhas de *Citrus sinensis* na síntese verde de CuONPs, com o objetivo de determinar as melhores condições experimentais para sua produção. Além disso, investigou-se a atividade antimicrobiana das CuONPs sintetizadas, comparando-as com amostras comerciais de CuO e CuONPs. Por fim, também foi analisada a possibilidade de incorporar essas NPs em filmes de NRL.

Em relação aos resultados obtidos com o extrato de folhas de *Citrus sinensis*, comprovou-se que ele possui potencial para ser utilizado na síntese verde de CuONPs. O método de Folin-Ciocalteu demonstrou que, nas melhores condições de extração, é possível obter uma quantidade de compostos fenólicos de aproximadamente  $400,90 \pm \mu\text{g EAG mL}^{-1}$  de extrato ou  $26,73 \text{ mg EAG g}^{-1}$  de folhas. Além disso, verificou-se que a secagem, seguida de moagem das folhas de *Citrus sinensis*, a utilização de água tipo 1 como solvente, a temperatura de  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  e o tempo de contato igual a 30 min, são as condições experimentais mais adequadas para preparar o extrato. A atividade antioxidante dos compostos presentes no extrato, obtido sob essas condições otimizadas, também foi confirmada, uma vez que em sua forma mais concentrada foi capaz de neutralizar aproximadamente 80% do radical DPPH.

Os ensaios com as amostras comerciais de CuONPs e de CuO, por sua vez, forneceram resultados que auxiliaram no reconhecimento do perfil desse material, além de permitir a verificação de sua possível atividade antimicrobiana frente às cepas bacterianas de *E. coli* e *S. aureus*. As amostras foram caracterizadas pela técnica de DRX, e ambas apresentaram picos característicos de CuO em fase única. Além disso, os testes microbiológicos evidenciaram que o tamanho nanométrico das partículas desempenha um papel importante na atividade antimicrobiana, tanto do CuO quanto das CuONPs comerciais.

Em relação à síntese verde, foi possível concluir que os parâmetros experimentais, como o pH do meio, a temperatura de calcinação, a concentração e o tipo de sal precursor exercem grande influência nas características estruturais e cristalinas do material obtido, assim como em sua atividade antimicrobiana. Nesse sentido, o pH = 7,0, a temperatura de calcinação de 300 °C e a utilização de 10 g L<sup>-1</sup> do sal precursor Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O mostraram ser o conjunto de parâmetros experimentais que resultaram nas CuONPs com as características físicas e antimicrobianas mais adequadas para o presente trabalho.

As análises de voltametria cíclica, por sua vez, permitiram uma compreensão mais aprofundada do mecanismo de síntese verde de CuONPs, a partir do extrato de folhas de *Citrus sinensis*, e demonstraram que o processo é altamente dependente da variação do pH inicial do meio. Isso ocorre porque esse parâmetro experimental atua diretamente na desprotonação dos grupos hidroxila dos compostos fenólicos presentes no extrato de folhas de *Citrus sinensis*, facilitando a complexação dos íons Cu(II) antes da formação das CuONPs.

Os ensaios de caracterização mostraram que as CuONPs obtidas por meio da síntese “G1” apresentam diferenças, tanto em relação ao tamanho quanto à morfologia quando comparadas com as CuONPs comerciais. Enquanto as CuONPs verdes apresentam a maior quantidade de suas partículas com tamanhos variando entre 20-30 nm, as CuONPs comerciais estão na faixa de 3-4 nm. Além disso, a análise de EDS revelou que ambas amostras apresentam perfil semelhante, sendo constituídas essencialmente por Cu e O.

O ensaio de concentração mínima inibitória (CMI) revelou que tanto as CuONPs obtidas por meio da síntese “G1” quanto as CuONPs comerciais apresentam maior efeito de inibição bacteriana contra a cepa de *S. aureus*. Além disso, foi possível concluir que, para atingir efeito bactericida contra esse microrganismo, são necessários, pelo menos, 4,0 e 6,0 mg mL<sup>-1</sup> das amostras de CuONPs comerciais e das CuONPs sintetizadas, respectivamente. Para a bactéria

*E. coli*, por outro lado, foram necessários, pelo menos, 6,0 e 8,0 mg mL<sup>-1</sup> das amostras de CuONPs comerciais e das CuONPs verdes, respectivamente.

No que diz respeito à incorporação das CuONPs na matriz de NRL, verificou-se que a utilização do surfactante Triton X-100, aliado à quantidade de 1,04 phr de CuONPs, resultou na melhor combinação para a obtenção dos filmes com atividade antimicrobiana. Além disso, foi possível constatar que o filme contendo CuONPs comerciais apresentou atividade bacteriostática contra ambas as bactérias avaliadas, além de atividade bactericida contra *S. aureus*, enquanto o filme contendo as CuONPs obtidas por meio da síntese verde “G1” apresentou apenas efeito bacteriostático contra ambas as bactérias.

Finalmente, a análise conjunta de todos os resultados obtidos permitiu concluir que as amostras de CuONPs obtidas por síntese verde com o extrato de *Citrus sinensis*, bem como as CuONPs comerciais, possuem potencial para serem aplicadas em filmes de NRL, conferindo características bacteriostáticas ao material resultante. Esses resultados abrem perspectivas para aplicações economicamente atraentes e mais sustentáveis na área de biomateriais.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Considerando os resultados obtidos neste estudo, alguns aspectos ainda podem ser explorados para aprimorar a aplicação das CuONPs em filmes de NRL e expandir seu potencial de uso. A seguir, são apresentadas sugestões para futuras investigações que podem contribuir para o desenvolvimento e a otimização dos filmes antimicrobianos:

a) embora a formulação utilizada para a confecção dos filmes de NRL tenha sido previamente desenvolvida e avaliada por Restelatto et al. (2024), ainda seria interessante realizar ensaios reométricos, de resistência à tração, dureza e determinação da densidade de ligações cruzadas para avaliar os efeitos nas propriedades mecânicas decorrentes da adição das CuONPs e do surfactante;

b) obter imagens de MEV-FEG dos filmes de NRL obtidos para melhor compreender os efeitos dos surfactantes na dispersão das CuONPs;

c) realizar um estudo por meio da técnica de ângulo de contato para verificar se a adição das CuONPs altera a afinidade dos filmes de NRL com a água;

d) desenvolver uma metodologia cromatográfica por HPLC para quantificar os principais compostos que são extraídos das folhas de *Citrus sinensis* nas condições otimizadas, de modo a permitir uma melhor compreensão do mecanismo de formação das CuONPs;

e) considerando a proposta desta tese de utilizar os filmes de NRL como biomateriais, especialmente na fabricação de equipamentos de proteção, como luvas, seria fundamental

realizar testes de citotoxicidade para garantir que o material não provoque reações alérgicas na pele humana.

f) realizar testes de liberação controlada de íons Cu(II) em meio aquoso, utilizando a técnica de espectroscopia de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) a fim de verificar os riscos ambientais associados ao uso dos filmes de NRL contendo CuONPs.

## REFERÊNCIAS

ABU-GHUNMI, L.; BADAWI, M.; FAYYAD, M.. **Fate of triton x-100 applications on water and soil environments: a review.** Journal of Surfactants and Detergents, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 833–838, 2014. Disponível em: <<https://aocs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1007/s11743-014-1584-3>>

ADAMU, U. et al. **Phytochemical Screening and GC-MS analysis of *Citrus Sinensis* leaves extracts.** Microbes and Infectious Diseases, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 0–0, 2020. Disponível em: <[https://mid.journals.ekb.eg/article\\_98652.html](https://mid.journals.ekb.eg/article_98652.html)>

ADEOLU, F. J. et al. **Comparative antioxidant potentials and high performance liquid chromatography of leaf extracts of citrus sinensis and its epiphytes.** Pharmacologyonline, [s. l.], v. 2, p. 52–62, 2020.

ADNAN, M. et al. **In vitro evaluation of biological activities of citrus leaf extracts.** Sains Malaysiana, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 185–194, 2014.

AGOSTINHO, S. M. L. et al. **O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo.** Química Nova, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 813–817, 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422004000500022&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000500022&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>

AIN, N.; SAFDAR, N.; YASMIN, A. **Additive-based stability assessment of biologically designed CuO and GSH-CuO nanospheres and their applicability as Nano-biosensors.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, [s. l.], v. 178, n. October 2018, p. 66–73, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.02.048>>

AKINTELU, S. A. et al. **Green synthesis of copper oxide nanoparticles for biomedical application and environmental remediation.** Heliyon, [s. l.], v. 6, n. 7, p. e04508, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04508>>

AKOWUAH, G. A.; MARIAM, A.; CHIN, J. H. **The effect of extraction temperature on total phenols and antioxidant activity of *Gynura procumbens* leaf.** Pharmacognosy Magazine, [s. l.], v. 4, n. 17, p. 81–85, 2009.

AL-HARAZIE, A. G. et al. **spectroscopic characterization, cyclic voltammetry, biological investigations, MOE, and gaussian calculations of VO(II), Cu(II), and Cd(II) heteroleptic Complexes.** ACS Omega, [s. l.], v. 8, n. 15, p. 13605–13625, 2023. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.2c07592>>

ANGELINE MARY, A. P.; THAMINUM ANSARI, A.; SUBRAMANIAN, R. **Sugarcane juice mediated synthesis of copper oxide nanoparticles, characterization and their antibacterial activity.** Journal of King Saud University - Science, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 1103–1114, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.03.003>>

ANTONY, A.; FARID, M. **Effect of temperatures on polyphenols during extraction.** Applied Sciences, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 2107, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/app12042107>>

ARAKKAL, A. et al. **Antibacterial polyelectrolytic chitosan derivatives conjugated natural rubber latex films with minimized bacterial adhesion.** Journal of Applied Polymer Science, [s. l.], v. 138, n. 1, p. 49608, 2021. Disponível em: <<https://doi/10.1002/app.49608>>

ASDAGH, A. et al. **Production and characterization of nanocomposite film based on whey protein isolated/copper oxide nanoparticles containing coconut essential oil and paprika extract.** Journal of Polymers and the Environment, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 335–349, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10924-020-01882-w>>

AZAM, A. et al. **Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and -negative bacterial strains.** International Journal of Nanomedicine, [s. l.], v. 7, p. 3527–3535, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IJN.S29020>

AZMIR, J. et al. **Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review.** Journal of Food Engineering, [s. l.], v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>>

BANDEIRA, M. et al. **Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: A review of the synthesis methodology and mechanism of formation.** Sustainable Chemistry and Pharmacy, [s. l.], v. 15, n. January, p. 100223, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100223>>

BEHERA, K.; DAHIYA, P.; PANDEY, S. **Effect of added ionic liquid on aqueous Triton X-100 micelles.** Journal of Colloid and Interface Science, [s. l.], v. 307, n. 1, p. 235–245, 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979706010435>>

BERTHELOT, K; PERUCH, F.; LECOMTE, S. **Highlights on *Hevea brasiliensis* (pro)hevein proteins.** Biochimie, [s. l.], v. 127, p. 258–270, 2016. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.06.006>>

BISWAL, T.; BADJENA, S. K.; PRADHAN, D. **Sustainable biomaterials and their applications: A short review.** Materials Today: Proceedings, [s. l.], v. 30, p. 274–282, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.01.437>>

BOONRASRI, S.; SAE-OUI, P.; RACHTANAPUN, P. **Chitosan and natural rubber latex biocomposite prepared by incorporating negatively charged chitosan dispersion.** Molecules, [s. l.], v. 25, n. 12, p. 2777, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules25122777>>

BOTTIER, C. Biochemical composition of *Hevea brasiliensis* latex: A focus on the protein, lipid, carbohydrate and mineral contents. **Advances in Botanical Research.** [s. l.]: Elsevier Ltd, 2020. v. 93p. 201–237. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/bs.abr.2019.11.003>>

BRÜNING, Karsten. Natural Rubber. **Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials.** Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015. p. 1377–1382. Disponível em: <[https://doi.org/10.1007/978-3-642-29648-2\\_302](https://doi.org/10.1007/978-3-642-29648-2_302)>

BYSTRONSKI, A. R. et al. **Preparation and characterization of natural rubber latex films containing red propolis and copper for biomedical applications.** MRS Advances, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 90–95, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1557/s43580-023-00651-w>>

ČERNÍK, M.; THEKKAE PADIL, V. V. **Green synthesis of copper oxide nanoparticles using gum karaya as a biotemplate and their antibacterial application.** International Journal of Nanomedicine, [s. l.], v. 8, p. 889, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.2147/IJN.S40599>>

CHANG, Y. et al. **The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles.** Materials, [s. l.], v. 5, n. 12, p. 2850–2871, 2012. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1996-1944/5/12/2850>>

CHE SULAIMAN, I. S. et al. **Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of Clinacanthus nutans Lindau leaves by response surface methodology.** Chemistry Central Journal, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 54, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13065-017-0285-1>>

CHI, P. T. L. et al. **Valorization of Citrus leaves: chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oils.** Waste and Biomass Valorization, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 4849–4857, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12649-019-00815-6>>

CHURNGCHOW, N.; SUNTARO, A.; WITTSUWANNNAKUL, R.  **$\beta$ -1,3-glucanase isozymes from the latex of Hevea brasiliensis.** Phytochemistry, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 505–509, 1995. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00974-C](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00974-C)>

CORAN, A. Y. **Chemistry of the vulcanization and protection of elastomers: A review of the achievements.** Journal of Applied Polymer Science, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 24–30, 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/app.11659>>

CORAN, A. Y. Vulcanization. In: **The Science and Technology of Rubber.** [s.l.] : Elsevier, 2013. p. 337–381.

COSTA, Helson M. Da et al. **Aspectos históricos da vulcanização.** Polímeros, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 125–129, 2003. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-14282003000200011&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282003000200011&lng=pt&tlng=pt)>

CUONG, H. N. et al. **New frontiers in the plant extract mediated biosynthesis of copper oxide (CuO) nanoparticles and their potential applications: A review.** Environmental Research, [s. l.], v. 203, n. July 2021, p. 111858, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111858>>

DARULIZA, K. M. A. et al. **Anti-fungal effect of Hevea brasiliensis latex C-serum on Aspergillus niger.** European Review for Medical and Pharmacological Sciences, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 1027–1033, 2011.

DE BARROS, N. R. et al. **Oxytocin Sustained Release Using Natural Rubber Latex Membranes.** International Journal of Peptide Research and Therapeutics, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 435–444, 2016. Disponível em: <<http://doi.org/10.1007/s10989-016-9523-y>>

DEVATHA, C. P.; THALLA, A. K. Green Synthesis of Nanomaterials. In: **Synthesis of Inorganic Nanomaterials**. [s.l.] : Elsevier, 2018. p. 169–184. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101975-7.00007-5>>

DO NASCIMENTO, R. M. et al. **Towards the production of natural rubber-calcium phosphate hybrid for applications as bioactive coatings**. *Materials Science and Engineering: C*, [s. l.], v. 94, n. August 2018, p. 417–425, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.09.048>>

DREADEN, E. C. et al. **The golden age: gold nanoparticles for biomedicine**. *Chemical Society Review*, [s. l.], v. 41, n. 7, p. 2740–2779, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/c1cs15237h>>

EKWENYE, U, N.; EDEHA, O. V. **The antibacterial activity of crude leaf extract of *Citrus sinensis* (sweet orange)**. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 743–750, 2010.

EL-SEEDI, H. R. et al. **Metal nanoparticles fabricated by green chemistry using natural extracts: biosynthesis, mechanisms, and applications**. *RSC Advances*, [s. l.], v. 9, n. 42, p. 24539–24559, 2019. Disponível em: <<http://doi.org/10.1039/C9RA02225B>>

EREN, T.; BAYSAL, G.; DOĞAN, F. **Biocidal activity of bone cements containing curcumin and pegylated quaternary polyethylenimine**. *Journal of Polymers and the Environment*, [s. l.], v. 28, n. 9, p. 2469–2480, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10924-020-01787-8>>

FASNACHT, M.; POLACEK, N. **Oxidative Stress in Bacteria and the Central Dogma of Molecular Biology**. *Frontiers in Molecular Biosciences*, [s. l.], v. 8, p. 1–13, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.671037>>

FEYNMAN, R. P. **There's plenty of room at the bottom**. *Engineering and Science*, [s. l.], v. 22, p. 22–36, 1960.

GARCIA, A. R. et al. **Cytotoxicity and anti- *Leishmania amazonensis* activity of *Citrus sinensis* leaf extracts**. *Pharmaceutical Biology*, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 1780–1786, 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13880209.2017.1325380>>

GARZA-CERVANTES, J. A. et al. **Synergistic antimicrobial effects of silver/transition-metal combinatorial treatments**. *Scientific Reports*, [s. l.], v. 7, n. 1, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-017-01017-7>>

GATOO, M. A. et al. **Physicochemical Properties of Nanomaterials: Implication in Associated Toxic Manifestations**. *BioMed Research International*, [s. l.], v. 2014, p. 1–8, 2014. Disponível em: <<http://doi.org/10.1155/2014/498420>>

GAWANDE, M. B. et al. **Cu and Cu-Based Nanoparticles: Synthesis and Applications in Catalysis**. *Chemical Reviews*, [s. l.], v. 116, n. 6, p. 3722–3811, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00482>>

GIORDANI, R. et al. **Antifungal action of *Hevea brasiliensis* latex. Its effect in combination with fluconazole on *Candida albicans* growth.** Mycoses, [s. l.], v. 42, n. 7–8, p. 465–474, 1999. Disponível em: <<http://doi.org/10.1046/j.1439-0507.1999.00489.x>>

GODINEZ, I. G.; DARNAULT, C. J. G. **Aggregation and transport of nano-TiO<sub>2</sub> in saturated porous media: Effects of pH, surfactants and flow velocity.** Water Research, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 839–851, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2010.09.013>>

GRIGORE, M. E. et al. **Methods of synthesis, properties and biomedical applications of CuO nanoparticles.** Pharmaceuticals, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 1–14, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ph9040075>>

GUERRA, N. B. et al. **Biomedical applications of natural rubber latex from the rubber tree *Hevea brasiliensis*.** Materials Science and Engineering: C, [s. l.], v. 126, n. 112126, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112126>>

HASAN, M. A. et al. **A review on coronavirus survivability on material's surfaces: present research scenarios, technologies and future directions.** Surface Engineering, [s. l.], v. 36, n. 12, p. 1226–1239, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/02670844.2020.1833277>>

HASHEMINYA, S. et al. **Influence of simultaneous application of copper oxide nanoparticles and Satureja Khuzestanica essential oil on properties of kefir–carboxymethyl cellulose films.** Polymer Testing, [s. l.], v. 73, n. December 2018, p. 377–388, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142941818318440>>

HEILIGTAG, F. J.; NIEDERBERGER, M. **The fascinating world of nanoparticle research.** Materials Today, [s. l.], v. 16, n. 7–8, p. 262–271, 2013. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.07.004>>

HERCULANO, R. D. et al. **Natural rubber latex used as drug delivery system in guided bone regeneration (GBR).** Materials Research, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 253–256, 2009. Disponível em: <<http://doi.org/10.1590/S1516-14392009000200023>>

HERCULANO, R. D. et al. **Nitric oxide release using natural rubber latex as matrix.** Materials Research, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 355–359, 2011. Disponível em: <<http://doi.org/10.1590/S1516-14392011005000055>>

HOLLINGER, J. O. **An Introduction to Biomaterials.** 2ª edição, New York: Taylor & Francis, 2012.

IBAÑEZ, E. et al. Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources: Macro and Micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates. In: **Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications.** New York: Springer US, 2012. p. 55–98. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1247-2>>

IJAZ, Faheem et al. **Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Abutilon indicum***

**leaf extract: Antimicrobial, antioxidant and photocatalytic dye degradation activitie.** Tropical Journal of Pharmaceutical Research, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 743, 2017. Disponível em: <<https://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/view/155510>>

JADOUN, S. et al. **Green synthesis of nanoparticles using plant extracts: a review.** Environmental Chemistry Letters, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 355–374, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10311-020-01074-x>>

KALAIYAN, G. et al. **Green synthesis of CuO nanostructures with bactericidal activities using Simarouba glauca leaf extract.** Chemical Physics Letters, [s. l.], v. 761, n. 3, p. 138062, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2020.138062>>

KANOKWIROON, K. et al. **Antimicrobial activity of a protein purified from the latex of Hevea brasiliensis on oral microorganisms.** Mycoses, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 301–307, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01490.x>>

KHAN, A. et al. **A chemical reduction approach to the synthesis of copper nanoparticles.** International Nano Letters, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 21–26, 2016. Disponível em: <<http://doi.org/10.1007/s40089-015-0163-6>>

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. **Nanoparticles: Properties, applications and toxicities.** Arabian Journal of Chemistry, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 908–931, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>>

KHETTAL, B. et al. **Phenolic compounds from Citrus leaves: antioxidant activity and enzymatic browning inhibition.** Journal of Complementary and Integrative Medicine, [s. l.], v. 14, n. 1, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1515/jcim-2016-0030/html>>

KRAINOI, A. et al. **Disinfectant natural rubber films filled with modified zinc oxide nanoparticles: Synergetic effect of mechanical and antibacterial properties.** Express Polymer Letters, [s. l.], v. 15, n. 11, p. 1081–1100, 2021. Disponível em: <<http://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2021.87>>

KUMAR, J. A. et al. **A focus to green synthesis of metal/metal based oxide nanoparticles: Various mechanisms and applications towards ecological approach.** Journal of Cleaner Production, [s. l.], v. 324, n. 129198, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.129198>>

KUMAR, P. P. N. Vijay et al. **Green Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles Using Aloe vera Leaf Extract and Its Antibacterial Activity Against Fish Bacterial Pathogens.** BioNanoScience, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 135–139, 2015. Disponível em: <<http://doi.org/10.1007/s12668-015-0171-z>>

KURIAN, T.; MATHEW, N. M. Natural Rubber: Production, Properties and Applications. In: **Biopolymers.** Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011. p. 403–436. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/9781118164792.ch14>>

L. VEGA-JIMÉNEZ, A. et al. **In vitro Antimicrobial Activity Evaluation of Metal Oxide Nanoparticles.** In: Nanoemulsions - Properties, Fabrications and Applications. [s.l.]: IntechOpen, 2019. p. 1–18. Disponível em: <<https://doi.org/10.5772/intechopen.84369>>

LAGHA-BENAMROUCHE, S.; MADANI, K. **Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis L.* and *Citrus aurantium L.*) cultivated in Algeria: Peels and leaves.** *Industrial Crops and Products*, [s. l.], v. 50, p. 723–730, 2013. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.048>>

MACCELLI, A. et al. ***Satureja montana L.* Essential Oils: Chemical Profiles/Phytochemical Screening, Antimicrobial Activity and O/W NanoEmulsion Formulations.** *Pharmaceutics*, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 7, 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4923/12/1/7>>

MACIEL, A. A. M. **Avaliação da atividade sinérgica entre miconazol e nanopartículas de prata produzidas por síntese verde contra cepas de *Candida parapsilosis*.** 2016. Universidade Federal do Ceará, [s. l.], 2016.

MADIGAN, M. T. et al. **Brock Biology of Microorganisms.** 15. ed. [s.l.] : Pearson Education, 2019.

MALLAKPOUR, S.; AZADI, E.; MUSTANSAR HUSSAIN, C. **Environmentally benign production of cupric oxide nanoparticles and various utilizations of their polymeric hybrids in different technologies.** *Coordination Chemistry Reviews*, [s. l.], v. 419, p. 213378, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213378> >

MAM, K.; DANGTUNGEE, R. **Effects of silver nanoparticles on physical and antibacterial properties of natural rubber latex foam.** *Materials Today: Proceedings*, [s. l.], v. 17, p. 1914–1920, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.06.230>>

MIRANDA, M. C. R. et al. **Evaluation of peptides release using a natural rubber latex biomembrane as a carrier.** *Amino Acids*, [s. l.], v. 50, n. 5, p. 503–511, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00726-017-2534-y>>

MOHAMED, H. E. A.; THEMA, T.; DHLAMINI, M. S. **Green synthesis of CuO nanoparticles via *Hyphaene thebaica* extract and their optical properties.** *Materials Today: Proceedings*, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 591–594, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.05.592>>

MOUCHREK FILHO, V. E.; CHIERICE, G. O.; MARQUES, A. L. B. **Estudo voltamétrico do complexo de cobre(II) com o ligante vermelho de alizarina S, adsorvido na superfície do eletrodo de grafite pirolítico.** *Química Nova*, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 312–314, 1999. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40421999000300004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40421999000300004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>

NAIKA, H. R. et al. **Green synthesis of CuO nanoparticles using *Gloriosa superba L.* extract and their antibacterial activity.** *Journal of Taibah University for Science*, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 7–12, 2015. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.04.006>>

NAIR, K. P. **Tree Crops.** Springer International Publishing, 2021. Disponível em: <<http://doi.org/10.1007/978-3-030-62140-7>>

NASROLLAHZADEH, M. et al. **Green-synthesized nanocatalysts and nanomaterials for water treatment: Current challenges and future perspectives.** *Journal of Hazardous*

Materials, [s. l.], v. 401, p. 123401, 2021. Disponível em:  
<<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123401>>

NASROLLAHZADEH, M.; SAJADI, S. M.; MAHAM, M. **Tamarix gallica leaf extract mediated novel route for green synthesis of CuO nanoparticles and their application for N-arylation of nitrogen-containing heterocycles under ligand-free conditions.** RSC Advances, [s. l.], v. 5, n. 51, p. 40628–40635, 2015. Disponível em:  
<<http://doi.org/10.1039/C5RA04012D>>

PETER, A. et al. **CuO/Ag hybrid nanomaterial coated hydrophilic natural rubber film with minimal bacterial adhesion and contact killing efficiency.** Results in Engineering, [s. l.], v. 17, n. February, p. 100998, 2023. Disponível em:  
<<https://doi.org/10.1016/j.rineng.2023.100998>>

PINTO-SALAMANCA, C. E.; RIGAIL-CEDENO, A. F.; MENDOZA OLIVEROS, M. E. **Synthesis and characterization of natural rubber/clay nanocomposite to develop electrical safety gloves.** Materials Today: Proceedings, [s. l.], v. 33, p. 1949–1953, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.05.795>>

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. **Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado.** Química Nova, [s. l.], v. 38, n. 7, p. 957–971, 2015. Disponível em: <<http://doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>>

PIRES, J. S. et al. **Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas.** Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, [s. l.], p. 1–5, 2017. Disponível em: <<http://doi.org/10.13140/RG.2.2.29127.80809S>>

PRABHU, S.; POULOSE, E. K. **Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects.** International Nano Letters, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 32, 2012. Disponível em: <<http://doi.org/10.1186/2228-5326-2-32>>

QUIROZ, W. **Speciation analysis in chemistry.** ChemTexts, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 7, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40828-020-00125-8>>

RAJAMMA, R. et al. **Antibacterial and anticancer activity of biosynthesised CuO nanoparticles.** IET Nanobiotechnology, [s. l.], v. 14, n. 9, p. 833–838, 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1049/iet-nbt.2020.0088>>

RANA, A.; YADAV, K.; JAGADEVAN, S. **A comprehensive review on green synthesis of nature-inspired metal nanoparticles: Mechanism, application and toxicity.** Journal of Cleaner Production, [s. l.], v. 272, p. 122880, 2020. Disponível em:  
<<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122880>>

RATHNAYAKE, I. et al. **Imparting antimicrobial properties to natural rubber latex foam via green synthesized silver nanoparticles.** Journal of Applied Polymer Science, [s. l.], v. 131, n. 8, p. n/a-n/a, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/app.40155>>

RATHNAYAKE, W. G. I. U. et al. **Synthesis and characterization of nano silver based natural rubber latex foam for imparting antibacterial and anti-fungal properties.**

Polymer Testing, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 586–592, 2012. Disponível em:  
<<http://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2012.01.010>>

RATHNAYAKE, W. G. I. U. et al. **Enhancement of the antibacterial activity of natural rubber latex foam by the incorporation of zinc oxide nanoparticles.** Journal of Applied Polymer Science, [s. l.], v. 131, n. 1, p. n/a-n/a, 2014. b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/app.39601>>

REDDY, K. R. **Green synthesis, morphological and optical studies of CuO nanoparticles.** Journal of Molecular Structure, [s. l.], v. 1150, p. 553–557, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.09.005>>

REHANA, D. et al. **Evaluation of antioxidant and anticancer activity of copper oxide nanoparticles synthesized using medicinally important plant extracts.** Biomedicine & Pharmacotherapy, [s. l.], v. 89, p. 1067–1077, 2017. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.101>>

RESTELATTO, D. et al. **Cosmetic gloves from natural rubber latex for upper limb prostheses: Preparation and physicochemical, mechanical and biological characterization.** Biomedical Engineering Advances, [s. l.], v. 7, n. March, p. 100126, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bea.2024.100126>>

ROBERTS, C. et al. **Green Chemistry Approaches to Vulcanization: Reducing Environmental Impact in Rubber Manufacturing.** Asia Pacific Journal of Energy and Environment, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 67–76, 2021. Disponível em: <<https://i-proclaim.my/journals/index.php/apjee/article/view/750>>

ROBINSON, P. R.; HSU, C. S. Introduction to Petroleum Technology. In: **Springer Handbook of Nanotechnology.** [s.l.: s.n.]. p. 1–83, 2017. Disponível em: <[https://doi.org/10.1007/978-3-319-49347-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-49347-3_1)>

RODRIGUES, T. S. et al. **Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo).** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, [s. l.], v. 13, p. 587–590, 2011. Disponível em: <<http://doi.org/10.1590/S1516-05722011000500014>>

ROSTAMI-TAPEH-ESMAEIL, E. et al. **Synthesis of copper and copper oxide nanoparticles with different morphologies using aniline as reducing agent.** Solid State Communications, [s. l.], v. 334–335, n. May, p. 114364, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ssc.2021.114364>>

RUEDEN, C. T. et al. **ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data.** BMC Bioinformatics, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 529, 2017. Disponível em: <<https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-017-1934-z>>

RUPARELIA, J. P. et al. **Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles.** Acta Biomaterialia, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 707–716, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.11.006>>

RUIZ, C. C. et al. **Thermodynamic and Structural Studies of Triton X-100 Micelles in**

**Ethylene Glycol–Water Mixed Solvents.** Langmuir, [s. l.], v. 17, n. 22, p. 6831–6840, 2001. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la010529p>>

SAMARI, F. et al. **Controllable phyto-synthesis of cupric oxide nanoparticles by aqueous extract of *Capparis spinosa* (caper) leaves and application in iron sensing.** Microchemical Journal, [s. l.], v. 150, p. 104158, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104158>>

SANKAR, R. et al. **Green synthesis of colloidal copper oxide nanoparticles using *Carica papaya* and its application in photocatalytic dye degradation.** Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, [s. l.], v. 121, n. 75, p. 746–750, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.12.020>>

SANTOS, C. S. C. et al. **Industrial Applications of Nanoparticles – A Prospective Overview.** Materials Today: Proceedings, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 456–465, 2015. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.matpr.2015.04.056>>

SEMEGEN, S. T. Natural rubber. In: **Encyclopedia of Physical Science and Technology.** [s.l.]: Elsevier, 2003. p. 381–394. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B0-12-227410-5/00670-0>>

SELVARAJ, S. et al. **Flavonoid–Metal Ion Complexes: A Novel Class of Therapeutic Agents.** Medicinal Research Reviews, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 677–702, 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/med.21301>>

SEMEGEN, S. T. Rubber, Natural. In: THIRD EDITION (Ed.). **Encyclopedia of Physical Science and Technology.** [s.l.] : Elsevier, 2003. p. 381–394.

SHAHEEN, M. et al. **Efficient surfactant modified copper oxide nanoparticles for solar light driven water purification.** Optical Materials, [s. l.], v. 122, n. PA, p. 111688, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.optmat.2021.111688>>

SHARMA, D. et al. **Insights into the synthesis and mechanism of green synthesized antimicrobial nanoparticles, answer to the multidrug resistance.** Materials Today Chemistry, [s. l.], v. 19, p. 100391, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2020.100391>>

SHARMA, J. K. et al. **Green synthesis of CuO nanoparticles with leaf extract of *Calotropis gigantea* and its dye-sensitized solar cells applications.** Journal of Alloys and Compounds, [s. l.], v. 632, p. 321–325, 2015. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.jallcom.2015.01.172>>

SIDDIQI, K. S.; HUSEN, A. **Current status of plant metabolite-based fabrication of copper/copper oxide nanoparticles and their applications: a review.** Biomaterials Research, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 11, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40824-020-00188-1>>

SIDDIQUI, V. U. et al. **Green synthesis of copper oxide (CuO) nanoparticles by *Punica granatum* peel extract.** Materials Today: Proceedings, [s. l.], v. 36, p. 751–755, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.05.504>>

SILVA, T. P. et al. **Desenvolvimento e caracterização de partículas nanorecobertas à base de nanoargilas de haloisita.** Cerâmica, [s. l.], v. 57, n. 341, p. 115–121, 2011. Disponível em: <<http://doi.org/10.1590/S0366-69132011000100015>>

SINGH, D.; RAWAT, D.; ISHA. **Microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles from *Origanum majorana* and *Citrus sinensis* leaf and their antibacterial activity: a green chemistry approach.** Bioresources and Bioprocessing, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 14, 2016. Disponível em: <<http://doi.org/10.1186/s40643-016-0090-z>>

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphotungstic acid reagents.** American Journal of Enology and Viticulture, 16, 144 – 158. American Journal of Enology and Viticulture, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

SJOLLEMA, J. et al. **In vitro methods for the evaluation of antimicrobial surface designs.** Acta Biomaterialia, [s. l.], v. 70, p. 12–24, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.02.001>>

SOLANKI, B. et al. Copper, Copper oxide, and Zinc oxide Nanoparticles Synthesis by Green Methods. In: **Microbial Synthesis of Nanomaterials.** [s.l.]: Nova Science Publishers, 2021. p. 95–122.

SREEJU, N.; RUFUS, A.; PHILIP, D. **Nanostructured copper (II) oxide and its novel reduction to stable copper nanoparticles.** Journal of Physics and Chemistry of Solids, [s. l.], v. 124, n. ii, p. 250–260, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2018.09.035>>

SUWANDITTAKUL, Piyada et al. **Toxicity reduction of natural rubber gloves using protein crosslinking technique.** Journal of Applied Polymer Science, [s. l.], v. 140, n. 31, 2023. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/app.54110>>

TAGHAVI FARDOOD, S. et al. **A Novel Green Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles Using a Henna Extract Powder.** Journal of Structural Chemistry, [s. l.], v. 59, n. 7, p. 1737–1743, 2018. Disponível em: <<http://doi.org/10.1134/S0022476618070302>>

TANAKA, Y. **Recent Advances in Structural Characterization of Elastomers.** Rubber Chemistry and Technology, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 325–385, 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.5254/1.3538561>>

TAWAHA, K. et al. **Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species.** Food Chemistry, [s. l.], v. 104, n. 4, p. 1372–1378, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.064>>

UDAYABHANU et al. ***Tinospora cordifolia* mediated facile green synthesis of cupric oxide nanoparticles and their photocatalytic, antioxidant and antibacterial properties.** Materials Science in Semiconductor Processing, [s. l.], v. 33, p. 81–88, 2015. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.mssp.2015.01.034>>

VAN PARIJS, J. et al. **Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex.** Planta, [s. l.], v. 183, n. 2, p. 258–264, 1991. Disponível em: <<http://doi.org/10.1007/BF00197797>>

VELSANKAR, K. et al. **Green synthesis of CuO nanoparticles via *Allium sativum* extract and its characterizations on antimicrobial, antioxidant, antilarvicidal activities.** Journal of Environmental Chemical Engineering, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 104123, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104123>>

VENKATESAN, T.; CHOI, Y. W.; KIM, Y. K. **Impact of Different Extraction Solvents on Phenolic Content and Antioxidant Potential of *Pinus densiflora* Bark Extract.** BioMed Research International, [s. l.], v. 2019, p. 1–14, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2019/3520675>>

WANG, L.; HU, C.; SHAO, L. **The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future.** International Journal of Nanomedicine, [s. l.], v. Volume 12, p. 1227–1249, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>>

WARIS, A. et al. **A comprehensive review of green synthesis of copper oxide nanoparticles and their diverse biomedical applications.** Inorganic Chemistry Communications, [s. l.], v. 123, p. 108369, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.inoche.2020.108369>>

WILLIAMS, D. **Concepts in biocompatibility: new biomaterials, new paradigms and new testing regimes.** [s.l.]: Woodhead Publishing Limited, 2012. Disponível em: <<http://doi.org/10.1533/9780857096456.1.1>>

WU, S. **Preparation of fine copper powder using ascorbic acid as reducing agent and its application in MLCC.** Materials Letters, [s. l.], v. 61, n. 4–5, p. 1125–1129, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.06.068>>

XUE, K. et al. **Biomaterials by design: Harnessing data for future development.** Materials Today Bio, [s. l.], v. 12, n. November, p. 100165, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2021.100165>>

YAMAGUCHI, T. et al. **HPLC Method for Evaluation of the Free Radical-scavenging Activity of Foods by Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl.** Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, [s. l.], v. 62, n. 6, p. 1201–1204, 1998. Disponível em: <<http://doi.org/10.1271/bbb.62.1201>>

YAO, L. et al. **Eriocitrin: A review of pharmacological effects.** Biomedicine & Pharmacotherapy, [s. l.], v. 154, n. May, p. 113563, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113563>>

ZARE, Y.; RHEE, K. Y.; HUI, D. **Influences of nanoparticles aggregation/agglomeration on the interfacial/interphase and tensile properties of nanocomposites.** Composites Part B: Engineering, [s. l.], v. 122, p. 41–46, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.compositesb.2017.04.008>>

ZAYYOUN, N. et al. **The effect of pH on the synthesis of stable Cu<sub>2</sub>O/CuO nanoparticles by sol–gel method in a glycolic medium.** Applied Physics A, [s. l.], v. 122, n. 5, p. 488, 2016. Disponível em: <<http://doi.org/10.1007/s00339-016-0024-9>>

ZHANG, Q. et al. **Preparation of copper nanoparticles by chemical reduction method using potassium borohydride.** Transactions of Nonferrous Metals Society of China, [s. l.], v. 20, p. s240–s244, 2010. Disponível em: <[http://doi.org/10.1016/S1003-6326\(10\)60047-7](http://doi.org/10.1016/S1003-6326(10)60047-7)>

ZHENG, X.; WANG, L.; XUE, H.. **Copper oxide nanoparticles impregnated antibacterial surgical gloves for potential application in prevention of nosocomial transmission infections during nursing.** Materials Research Express, [s. l.], v. 9, n. 11, p. 115004, 2022. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/2053-1591/ac995a>>

ZHU, H.; ZHANG, C.; YIN, Y. **Novel synthesis of copper nanoparticles: influence of the synthesis conditions on the particle size.** Nanotechnology, [s. l.], v. 16, n. 12, p. 3079–3083, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/12/059>>