

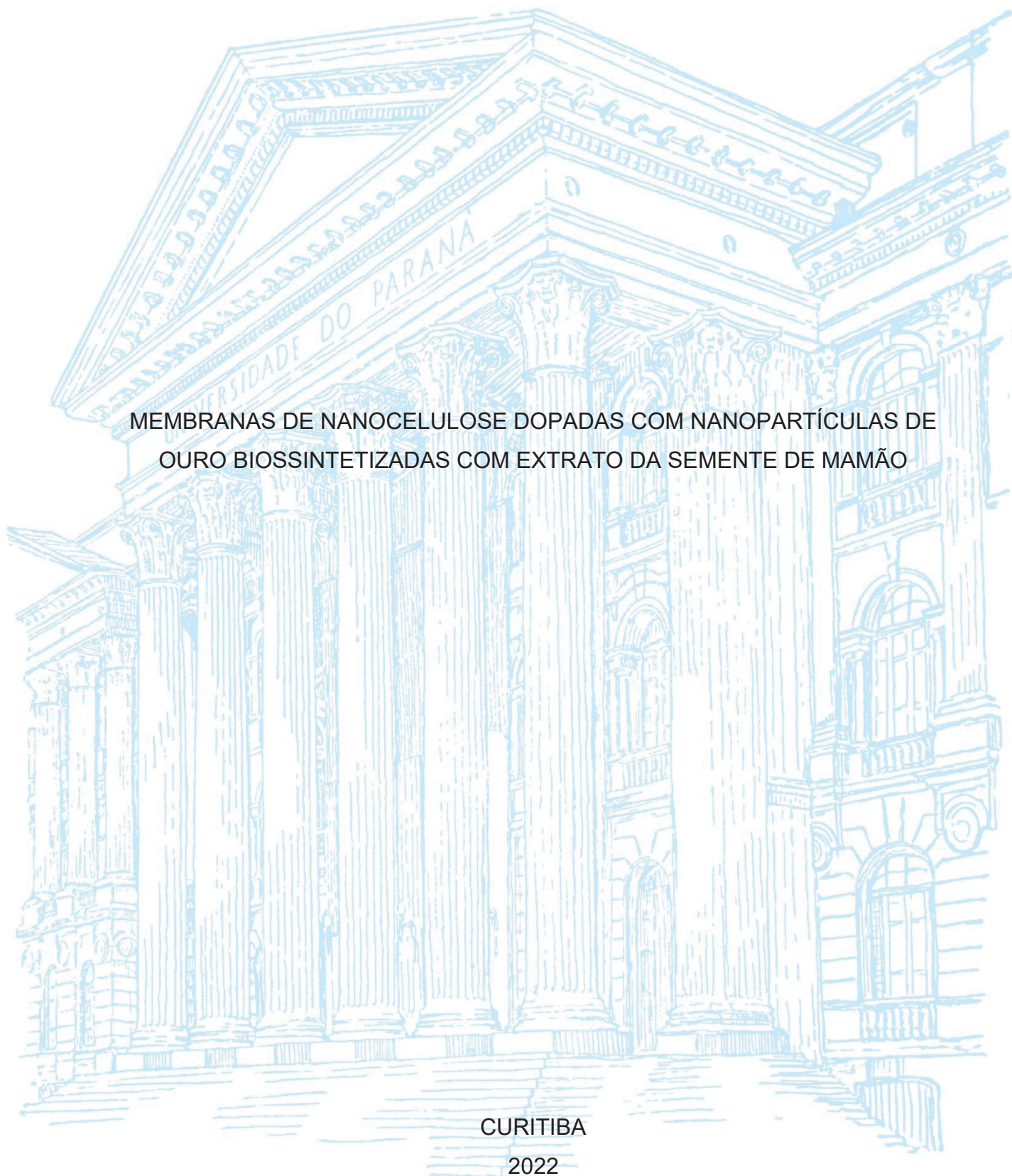
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALICE SCARABELOT BAESSO

MEMBRANAS DE NANOCELULOSE DOPADAS COM NANOPARTÍCULAS DE OURO BISSINTETIZADAS COM EXTRATO DA SEMENTE DE MAMÃO

CURITIBA

2022



ALICE SCARABELOT BAESSO

MEMBRANAS DE NANOCELULOSE DOPADAS COM NANOPARTÍCULAS DE
OURO BIOSINTETIZADAS COM EXTRATO DA SEMENTE DE MAMÃO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Gonzalez de Cademartori

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Marques da Silva Paula

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Baesso, Alice Scarabelot

Membranas de nanocelulose dopadas com nanopartículas de ouro biossintetizadas com extrato da semente de mamão. / Alice Scarabelot Baesso. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Gonzalez de Cademartori

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Marques da Silva Paula

1. Biossíntese. 2. Mamão (Sementes). 3. Nanopartículas de ouro. I. Cademartori, Pedro Henrique Gonzalez de. II. Paula, Marcos Marques da Silva. III. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais. IV. Título.

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585



TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ALICE SCARABELOT BAESSO** intitulada: **MEMBRANAS DE NANOCELULOSE DOPADAS COM NANOPARTÍCULAS DE OURO BISSINTETIZADAS COM EXTRATO DA SEMENTE DE MAMÃO**, sob orientação do Prof. Dr. PEDRO HENRIQUE GONZALEZ DE CADEMARTORI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 03 de Outubro de 2022.

Assinatura Eletrônica

04/10/2022 11:03:05.0

PEDRO HENRIQUE GONZALEZ DE CADEMARTORI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

04/10/2022 11:28:47.0

RILTON ALVES DE FREITAS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

04/10/2022 13:59:24.0

WASHINGTON LUIZ ESTEVES MAGALHÃES

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO)

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

Os meus agradecimentos são vastos, pois sou grata a todos que me auxiliaram de alguma forma na realização do meu trabalho, não importa o tamanho da sua contribuição:

- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro;
- Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Paraná (PIPE-UFPR), especialmente a Neiva;
- À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Florestas), na realização de parte das análises realizadas neste trabalho;
- Ao Laboratório de Anatomia e Qualidade da Madeira (LANAQM/UFPR) por conceder acesso a sua estrutura para realização de parte das análises;
- Ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME/UFPR) pela realização das análises de microscopia;
- Ao Grupo de Cromatografia e Técnicas de Microextração (CroME/UFPR) pela realização da análise cromatográfica.

Além destes, algumas pessoas estiveram presentes com tanta frequência que merecem ter seus nomes para serem lembrados. Agradeço:

- Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro, e à sua esposa Carolina, não apenas pelas orientações pertinentes ao trabalho realizado, mas pela amizade;
- Aos meus amigos e colegas de laboratório, pelas conversas jogadas fora, pelos cafés compartilhados e pelo conhecimento que dividimos. Em especial, ao Daniel, Ivana, Izabelli, Rosinaldo e Tawani;
- À Aline e Eliane, que além de me auxiliarem na realização de algumas caracterizações, se tornaram pessoas por quem desenvolvi um grandecarinho;
- Aos meus pais, que mesmo longe sempre me deram todo o seu apoio;
- Por fim, agradeço especialmente ao homem que escolhi para estar ao meu lado e a companhia da nossa cachorrinha Luna.

“Se você não sabe para onde ir, qualquer caminho serve.”
(LEWIS CARROL, 1865)

RESUMO

As sementes do mamão são um subproduto sem aplicação comercial visível atualmente, porém com uma composição muito vasta e rica em compostos fenólicos, flavonoides, terpenos e fitosteróis. Estes componentes possuem potencial como agente redutor na biossíntese de nanopartículas metálicas, como as nanopartículas de ouro, por exemplo, que possuem propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatória. O uso de nanopartículas biossintetizadas pode ser uma forma de valorizar a utilização da semente de mamão, principalmente ao viabilizar a aplicação dopando membranas de nanocelulose com estas nanopartículas, possibilitando a formação de um nanocompósito de matriz polimérica sustentável, abundante, biocompatível e com boas propriedades mecânicas. Neste trabalho, o extrato da semente de mamão foi obtido utilizando-se etanol para posterior biossíntese das nanopartículas de ouro, as quais foram impregnadas em membranas de nanocelulose nas concentrações 0,5, 1 e 2 %. Para efeitos comparativos, nanopartículas obtidas com citrato de sódio foram utilizadas como referência. Os resultados apontaram que a semente de mamão apresenta um rendimento de 30% na sua extração com etanol, além de possuir uma composição vasta de compostos antioxidantes. As nanopartículas obtidas utilizando este extrato possuem uma morfologia variada em comparação com a referência, apresentando formatos e tamanhos diversos devido a composição variada do extrato da semente. No entanto, os estudos de dopagem das membranas mostraram que as nanopartículas biossintetizadas apresentaram grande concentração de nanopartículas na biossíntese e maior aderência às fibrilas de nanocelulose que as nanopartículas de referência, além de uma distribuição homogênea pela membrana de nanocelulose.

Palavras-chave: Semente de Carica papaya. Biossíntese. GNP. AuNP. CNF.

ABSTRACT

Papaya seeds are a byproduct with no evident commercial purpose at the moment, although they have a very diverse composition and are high in phenolic compounds, flavonoids, terpenes, and phytosterols. These components have the potential to act as reducing agents in the production of metallic nanoparticles with antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory effects, such as gold nanoparticles. Biosynthesized nanoparticles can be used to improve the use of papaya seed, mostly by doping nanocellulose membranes with these nanoparticles, allowing the production of a sustainable, plentiful, biocompatible polymer matrix nanocomposite with high mechanical characteristics. The papaya seed extract was prepared using ethanol for further manufacture of gold nanoparticles, which were impregnated in nanocellulose membranes at concentrations of 0.5, 1, and 2%. For comparison, sodium citrate nanoparticles were utilized. The results demonstrated that the papaya seed had a 30% yield in ethanol extraction as well as a diverse composition of antioxidant chemicals. Due to the variable content of the seed extract, the nanoparticles created using this extract have a different morphology than the reference, showing distinct shapes and sizes. However, membrane doping investigations have revealed that the biosynthesized nanoparticles would have a higher nanoparticle concentration in the biosynthesis and stronger adherence to nanocellulose fibrils than the reference nanoparticles, as well as a homogenous distribution across the nanocellulose membrane.

Keywords: *Carica papaya* seed. Biosynthesis. GNP. AuNPs. NFC.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTUDO COMPARATIVO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIMENTOS UTILIZANDO O EXTRATO DA SEMENTE DE MAMÃO.....	20
FIGURA 2 – ALGUNS MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO, POSSÍVEIS MORFOLOGIAS E APLICAÇÕES.....	22
FIGURA 3 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO MERO DA CELULOSE.....	23
FIGURA 4 – ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL ADOTADA PARA O DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA.....	27
FIGURA 5 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS ETAPAS DA BIOSÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	30
FIGURA 6 – ESPECTRO DE IR DO EXTRATO DA SEMENTE DE MAMÃO.....	37
FIGURA 7 – ESTRUTURA QUÍMICA DE ALGUNS COMPOSTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS NO EXTRATO DA SEMENTE DE MAMÃO.....	39
FIGURA 8 – COMPARAÇÃO DE COLORAÇÃO ENTRE A BIOSÍNTESE E A SÍNTESE DE REFERÊNCIA.....	40
FIGURA 9 – ESPECTRO DE IR DA BIOSÍNTESE.....	41
FIGURA 10 – ESPECTROS DE UV-VIS DA BIOSÍNTESE COM EXTRATO DA SEMENTE DE MAMÃO E DA SÍNTESE DE REFERÊNCIA COM CITRATO DE SÓDIO.....	43
FIGURA 11 – ESPECTROS DE UV-VIS DA BIOSÍNTESE ARMAZENADA A TEMPERATURA AMBIENTE (A) E RESFRIADA (B).....	44
FIGURA 12 – ESPECTROS DE UV-VIS DA SÍNTESE DE REFERÊNCIA ARMAZENADA A TEMPERATURA AMBIENTE (A) E RESFRIADA (B).....	44
FIGURA 13 – DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO HIDRODINÂMICO DAS NANOPARTÍCULAS BIOSINTETIZADAS.....	45
FIGURA 14 – DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO HIDRODINÂMICO DA SÍNTESE DE REFERÊNCIA.....	46
FIGURA 15 – NANOPARTÍCULAS DE OURO DE REFERÊNCIA, OBTIDAS COM CITRATO DE SÓDIO (A, B) E BIOSINTETIZADAS (C, D).....	48
FIGURA 16 – MEMBRANAS DE NANOCELULOSE SEM DOPAGEM (A), DOPADAS COM AS NANOPARTÍCULAS BIOSINTETIZADAS (B) E DE REFERÊNCIA (C).....	49

FIGURA 17 – ESPECTRO EDS DA MEMBRANA DOPADA COM 2,0% DE NANOPARTÍCULAS BIOSINTETIZADAS (NFC:GNPEXT 2,0%).....	51
FIGURA 18 – ESPECTRO DE ATR DAS MEMBRANAS DOPADAS COM AS NANOPARTÍCULAS BIOSINTETIZADAS.....	53
FIGURA 19 – IMAGEM DE ELÉTRONS RETROESPALHADOS (A) E SECUNDÁRIOS (B) DAS NANOFIBRILAS DE CELULOSE SEM DOPAGEM.....	54
FIGURA 20 – IMAGEM DE ELÉTRONS RETROESPALHADOS DAS MEMBRANAS NFC:GNPCIT 0,5% (A, B), NFC:GNPCIT 1,0% (C, D) E NFC:GNPCIT 2,0% (E, F).....	55
FIGURA 21 – IMAGEM DE ELÉTRONS RETROESPALHADOS DAS MEMBRANAS: NFC:GNPEXT 0,5% (A, B), NFC:GNPEXT1,0% (C, D) E NFC:GNPEXT 2,0% (E, F).....	56
FIGURA 22 – CURVA CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO.....	62
FIGURA 23 – ESPECTRO DE UV-VIS DAS BIOSÍNTESES UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO.....	63
FIGURA 24 – BIOSÍNTESE REALIZADA COM EXTRATO 5 MG/ML.....	64
FIGURA 25 – BIOSÍNTESE REALIZADA COM EXTRATO 10 MG/ML.....	65
FIGURA 26 – BIOSÍNTESE REALIZADA COM EXTRATO 15 MG/ML.....	65
FIGURA 27 – ANÁLISE COMPLETA DAS MEMBRANAS NFC:GNPCIT 0,5%.....	69
FIGURA 28 – ANÁLISE COMPLETA DAS MEMBRANAS NFC:GNPCIT 1,0%.....	70
FIGURA 29 – ANÁLISE COMPLETA DAS MEMBRANAS NFC:GNPCIT 2,0%.....	71
FIGURA 30 – ANÁLISE COMPLETA DAS MEMBRANAS NFC:GNPEXT 0,5%.....	72
FIGURA 31 – ANÁLISE COMPLETA DAS MEMBRANAS NFC:GNPEXT 1,0%.....	73
FIGURA 32 – ANÁLISE COMPLETA DAS MEMBRANAS NFC:GNPEXT 2,0%.....	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – TIPOS DE NANOCELULOSE E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	24
TABELA 2 – ALGUMAS PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DA NANOCELULOSE EM CONJUNTO COM NANOPARTÍCULAS DE EXTRATOS NATURAIS.....	26
TABELA 3 – INFORMAÇÕES TÉCNICAS DOS REAGENTES UTILIZADOS.....	28
TABELA 4 – VOLUME DA DISPERSÃO COLOIDAL UTILIZADO NA DOPAGEM DAS MEMBRANAS DE NANOCELULOSE.....	32
TABELA 5 – TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS DO EXTRATO DA SEMENTE DE MAMÃO EXPRESSOS EM EQUIVALENTE DE ÁCIDO GÁLICO (AGE).....	34
TABELA 6 – RESULTADOS DOS ENSAIOS DE IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES, SAPONINAS, TANINOS, TRITERPENOS E ESTERÓIS DO EXTRATO DA SEMENTE DE MAMÃO.....	36
TABELA 7 – PRINCIPAIS BANDAS CARACTERÍSTICAS DO EXTRATO DA SEMENTE DE MAMÃO.....	37
TABELA 8 – COMPARATIVO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS BIOSINTETIZADAS E DE REFERÊNCIA.....	47
TABELA 9 – PERCENTUAIS DE PERDA DAS NANOPARTÍCULAS NA DOPAGEM DAS MEMBRANAS DE NFC.....	50
TABELA 10 – ANÁLISE ELEMENTAR POR EDS DAS MEMBRANAS DOPADAS.....	52
TABELA 11 – RELATÓRIO COMPLETO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO EXTRATO DA SEMENTE DE MAMÃO.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

BNC - Nanocelulose
bacterianaNFC -
Nanofibrilas de celulose NCC
- Nanocristais de celulose
FTIR - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de
FourierATR - Reflectância Total Atenuada
CG-MS - Cromatografia Gasosa com Espectrometria de
MassasGNP - Nanopartículas de ouro
UV - Ultravioleta
NTA - Análise de Rastreamento de
NanopartículasMET - Microscopia Eletrônica
de Transmissão MEV - Microscopia Eletrônica de
Varredura
EDS - Espectroscopia por Dispersão de
ElétronsPA - Padrão Analítico
NFC:GNPcit - Membrana de nanocelulose com nanopartículas de referência
(com citrato de sódio)
NFC:GNPext- Membrana de nanocelulose com nanopartículas biossintetizadas (com extrato
da semente de mamão)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
1.1.1 Objetivo geral	Erro! Indicador não definido.
1.1.2 Objetivos específicos.....	Erro! Indicador não definido.
REVISÃO DE LITERATURA	19
1.2 SEMENTE DE MAMÃO.....	19
1.3 NANOPARTÍCULAS DE OURO	21
1.4 NANOCELULOSE	23
1.4.1 Aplicações de nanocelulose dopada com nanopartículas	25
MATERIAL E MÉTODOS	27
1.5 EXTRAÇÃO DA SEMENTE DE MAMÃO	28
1.5.1 Caracterizações do extrato.....	29
1.6 BIOSSÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	30
1.6.1 Caracterizações das nanopartículas de ouro	31
1.7 PREPARAÇÃO E DOPAGEM DAS MEMBRANAS DE NANOCELULOSE	32
1.7.1 Caracterizações das membranas de nanocelulose	33
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
2.1 EXTRATO DA SEMENTE DE MAMÃO	34
2.1.1 Identificação de compostos químicos do extrato	34
2.1.2 Espectroscopia no Infravermelho médio	37
2.1.3 Cromatografia Gasosa (CG-MS)	38
2.2 NANOPARTÍCULAS DE OURO BIOSSINTETIZADAS	40
2.2.1 Espectroscopia no Infravermelho médio	40
2.2.2 Espectroscopia UV-Vis.....	42
2.2.3 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA).....	45
2.2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	47
2.3 MEMBRANAS DE NANOCELULOSE DOPADAS	49
2.3.1 Adesão das nanopartículas por espectroscopia UV-Vis.....	49
2.3.2 Espectroscopia por Dispersão de Elétrons (EDS).....	51
2.3.3 Espectroscopia no Infravermelho médio (ATR-IR)	53
2.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução (MEV-FEG).....	54
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	58

3.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	58
REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICE 1 – CURVA ÁCIDO GÁLICO.....	62
APÊNDICE 2 – DADOS BIOSÍNTESES	63
APÊNDICE 3 – ANÁLISE COMPLETA DE CG-MS.	66
APÊNDICE 4 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE ALTA RESOLUÇÃO	69

1 INTRODUÇÃO

O mamão é uma fruta tropical de sabor adocicado muito apreciada tanto *in natura* quanto na forma de doces, geleias e sobremesas, e o Brasil é o segundo maior produtor desta fruta, ficando atrás apenas da Índia (TAN; TAN; TAN, 2020). Segundo dados do IBGE, o Brasil possui uma produção de 42 toneladas por hectare e tendo produzido mais de 1,2 milhão de toneladas de frutos no ano de 2020 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2020). Este fruto pode ser quase totalmente aproveitado, com suas partes menos nobres sendo tão ricas e úteis quanto a polpa. Estima-se que entre 10% e 60% do processamento de frutas tropicais seja apenas de subprodutos como casca, sementes e folhas. No caso do mamão, só as sementes podem equivaler a cerca de 15% do seu peso (HAMEED, 2009), dependendo da variedade.

Considerando que a composição desta fruta é rica em diversos fitoquímicos, fibras, vitaminas e minerais, e que boa parte destes compostos estão presentes principalmente nas sementes, estas se tornam um subproduto com grande valor não apenas para consumo, mas também para possíveis aplicações mais nobres, como utilização na redução de nanopartículas metálicas. Por exemplo, as propriedades medicinais da semente do mamão são vastas, com estudos comprovando a suas propriedades anti-helmínticas, antimicrobianas, anticancerígenas, antioxidantes e cicatrizantes (JAISWAL; SINGH, 2008; NAYAK et al., 2012; SALLA et al., 2016).

No entanto, atualmente não há uma aplicação comercial para as sementes de mamão, além do cultivo de sementes específicas para plantio. Por outro lado, alguns estudos técnico-científicos evidenciam os potenciais dos extratos obtidos das sementes de mamão. Por exemplo, a semente de mamão pode ser utilizada como suplemento alimentar, aumentando as propriedades fitoquímicas em alimentos como mingaus (ÁVILA et al., 2020), uma vez que sua composição é rica em compostos que possuem grande potencial antioxidante, como ácido hexadecanóico, ácido oleico, por exemplo (AGADA et al., 2021; IORDĂNESCU et al., 2021).

Concomitantemente, a literatura científica não reporta por completo o potencial das sementes de mamão e seus coprodutos quando aplicados em conjunto com nanoestruturas inorgânicas e orgânicas. O uso combinado de extratos orgânicos e nanoestruturas inorgânicas é uma alternativa de valorizar as propriedades dos extratos, visto que já existem diversos estudos similares nesta área que demonstram

a eficiência de extratos naturais como agentes redutores e estabilizantes na formação de nanopartículas inorgânicas. Alguns exemplos são os trabalhos desenvolvidos por BOTTEON et al. (2021) e NARAYANAN; SAKTHIVEL (2008), que utilizaram folha de coentro e extrato de própolis, respectivamente, como agentes redutores das nanopartículas de ouro.

Outros trabalhos foram além, biossintetizando nanopartículas inorgânicas e aplicando-as em nanoestruturas de celulose, como MOCANU et al. (2019) que utilizou extrato de própolis para produzir nanopartículas de óxido de zinco, além da biossíntese de nanopartículas de prata com extrato de *L. salicaria* (MOHAMMADALINEJHAD; ALMASI; ESMAILI 2019) e há também o trabalho realizado por RAZAVI et al. (2020) que obteve nanopartículas metálicas diversas utilizando extrato de amoreira.

O uso de nanoestruturas inorgânicas, como as nanopartículas de ouro, e orgânicas, como a nanocelulose, são alternativas para agregar valor a um subproduto sem aplicação atualmente, uma vez que estes materiais possuem também propriedades pertinentes às aplicações de alto valor agregado. As nanopartículas de ouro possuem capacidade antioxidante, anti-inflamatória e são biocompatíveis, além de permitirem facilmente sua obtenção utilizando um extrato natural, como o da semente de mamão (AHMED et al., 2016; RAMALINGAM, 2019). Já a nanocelulose, é um material biodegradável e sustentável que também é biocompatível e, além disso, possui boas propriedades mecânicas, o que o torna fácil de manipular e aplicar, principalmente, na forma de membranas e filmes (KARGARZADEH et al., 2018).

Tendo em vista que as sementes de mamão, que compõe 15% do peso total do fruto, atualmente não possuem uma aplicação comercial, e são em sua grande parte descartadas pela indústria de alimentos; Além disso, que o extrato destas sementes possui uma composição rica em fenóis, flavonoides, terpenos, entre outros, e tais componentes têm boa aplicação como agentes redutores e estabilizantes na produção de nanopartículas inorgânicas como a de ouro, por exemplo; Considerando também o uso de nanocelulose como veículo de aplicação para nanopartículas biossintetizadas com extratos, as vantagens advindas do uso de um material de origem abundante e sustentável, as propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade. É justificável realizar um estudo sobre a aplicação do extrato da semente de mamão como agente redutor, com o intuito de dar uma finalidade comercial a este rejeito industrial.

Além disso, utilizar as nanopartículas de ouro biossintetizadas na dopagem de membranas de celulose visa facilitar a aplicação deste produto comercialmente, visto que a maleabilidade desta matriz polimérica torna palpável a utilização das nanopartículas biossintetizadas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O presente trabalho visa o desenvolvimento de membranas de nanocelulose dopadas com nanopartículas de ouro obtidas por biossíntese utilizando o extrato da semente de mamão.

1.1.2 Objetivos específicos

Investigar as melhores condições de extração e caracterização dos compostos presentes na semente de mamão;

Averiguar as melhores condições de biossíntese das nanopartículas de ouro utilizando o extrato da semente de mamão como agente redutor e estabilizante;

Realizar a dopagem das nanopartículas de ouro nas membranas de nanocelulose

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 SEMENTE DE MAMÃO

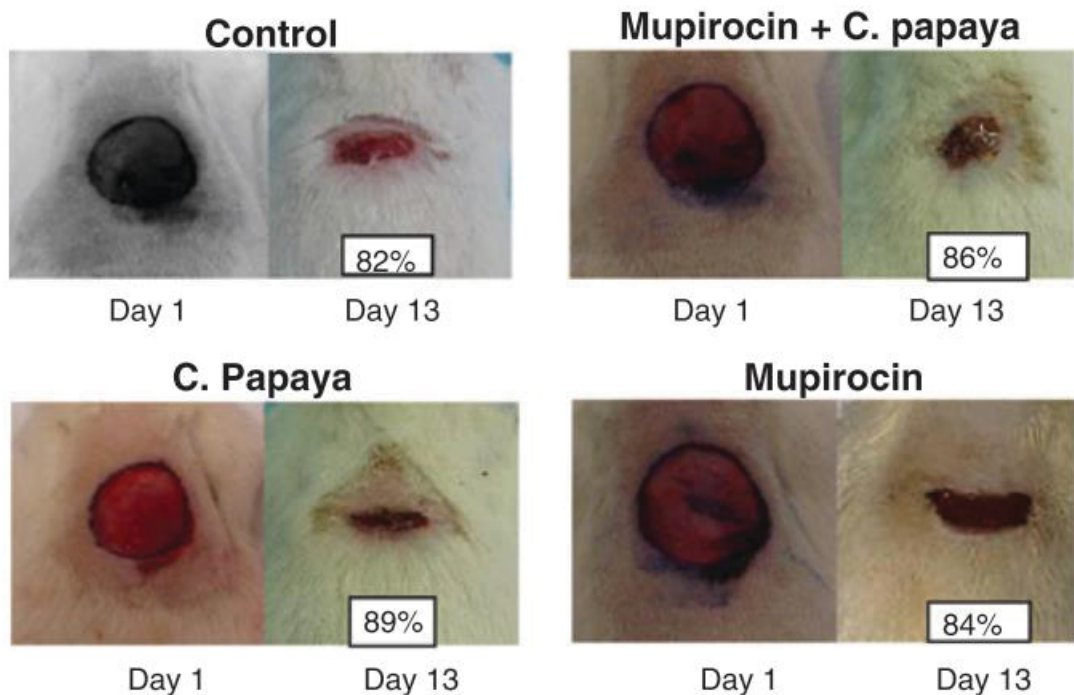
Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor do fruto, com uma produção média de 42 t/ha, e foi responsável pela produção de 1,16 milhões de toneladas no ano de 2019 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2020) movimentando quase 45 milhões de reais na economia brasileira, ficando atrás apenas da Índia.

As sementes compõe cerca de 15% do peso do fruto (HAMEED, 2009) e são comumente descartadas como resíduo, seja no âmbito doméstico ou industrial, o que implica que só na produção brasileira de 2019 pode-se estimar que cerca de 174 toneladas de semente foram totalmente desperdiçadas. E apesar de serem consideradas um resíduo, as sementes possuem uma série de propriedades que as tornam muito interessantes para algumas aplicações de alto valor agregado.

As sementes de mamão possuem uma composição muito ampla, com alcaloides, diversos compostos fenólicos, flavonoides, esteróis e triterpenos, e saponinas. Devido a esta grande variedade de componentes suas propriedades também são muito amplas e, provavelmente, ainda deve haver muito potencial a ser explorado.

Já houve estudos demonstrando que as sementes possuem potencial como agente antimicrobiano, anti-helmíntico, cicatrizante e antioxidante. NAYAK et al. (2012) conduziram um estudo utilizando o extrato etanoico da semente de mamão como agente cicatrizante, e os resultados foram tão bons que superaram até mesmo a mupirocina, um medicamento de uso tópico com forte ação bactericida indicada para problemas como impetigo, foliculite, furunculose e ectima (FIGURA 1). Um outro trabalho executado por JAISWAL; SINGH (2008) verificou que o extrato etanoico de semente de mamão é extremamente tóxico para caracóis *Lymnaea acuminata*, ao mesmo tempo que não apresenta toxicidade aos peixes que dividem o mesmo hábitat.

FIGURA 1 – ESTUDO COMPARATIVO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIMENTOS UTILIZANDO O EXTRATO DA SEMENTE DE MAMÃO.



FONTE: Nayak et al. (2012).

Um estudo muito interessante utilizando solventes de diferentes polaridades demonstrou de forma detalhada como o extrato de semente de mamão possui diversos componentes que lhe conferem um excelente caráter antioxidante (ZHOU et al., 2011). Outro estudo realizado por SALLA et al. (2016) comprova a eficiência dos extratos em metanol e hexano contra o estresse oxidativo em células de câncer de fígado (HepG2) causado por peróxido de hidrogênio, com destaque, principalmente, para o extrato em metanol que possui uma concentração maior de polifenóis. Alguns autores também verificaram nestas sementes certo potencial espermicida (GHAFFARILALEH; FISHER; HENKEL, 2019), anticâncer (PATHAK et al., 2014) e antidiabético (AGADA et al., 2021).

O fato é que as sementes de mamão ainda têm muito a se explorar, uma vez que sua composição rica pode permitir uma infinidade de características e propriedades. Mas até o presente momento já é perceptível que estas podem ser úteis de diversas maneiras e, portanto, possuem um bom potencial para deixarem de ser apenas um resíduo e se tornarem um material de alto valor agregado.

1.2 NANOPARTÍCULAS DE OURO

Os primeiros estudos de cunho científico envolvendo ouro coloidal surgiram no século XIX com Michael Faraday realizando diversos experimentos com metais em suspensão, seus efeitos sob luz e a formação de filmes finos (EDWARDS; THOMAS, 2007).

As nanopartículas de ouro são um destes materiais versáteis e revolucionários que podem ser úteis em diversas áreas, muitas vezes completamente distintas. Suas características morfológicas e dimensionais podem ser alteradas de acordo com a rota de obtenção e, conseqüentemente, podem afetar diretamente a sua funcionalidade final. Sua razão superficial em relação ao volume e seu potencial zeta tornam estas nanopartículas muito interessantes em aplicações de cunho biológico devido a sua alta capacidade de captação celular, principalmente quando se encontra no formato esférico.

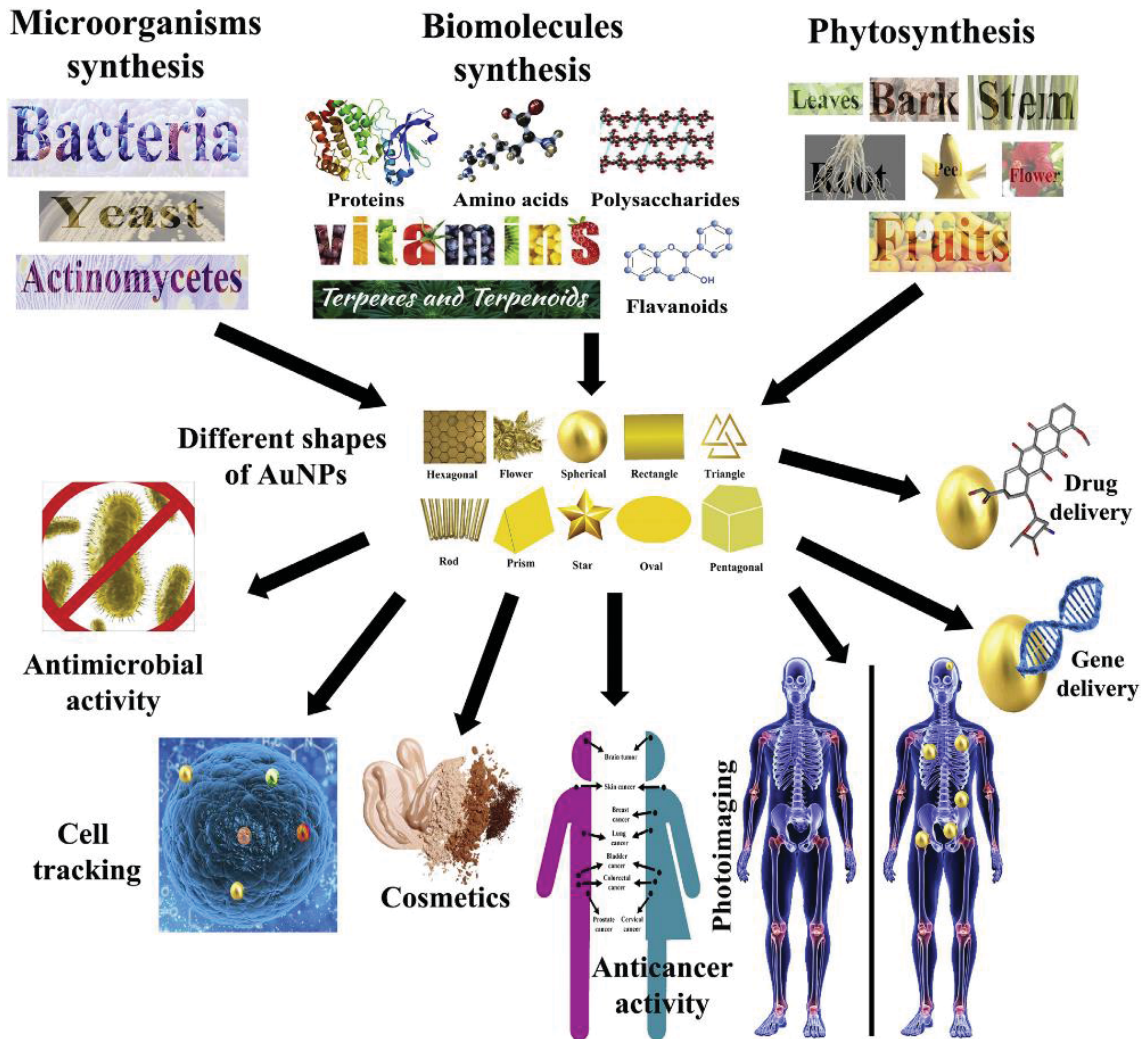
De forma mais genérica, para formação de nano materiais em geral há dos caminhos básicos: *bottom up* e *top down*. No método *bottom up* se utiliza a redução de íons para que ocorra a junção de átomos que irão crescer e formar a nanopartícula. No método *top down* é realizado o caminho reverso, onde se pega o material em escala macroscópica e o dispersa até atingir a escala nanométrica (AHMED et al., 2016; EUSTIS; EL-SAYED, 2006).

O método mais comum e simples de se obter nanopartículas de ouro estáveis segue o sistema *bottom up* e utiliza citrato de sódio como agente redutor e estabilizante. O ácido auro clorídrico (HAuCl_4) é solubilizado em água e aquecido, o que faz com que íons Au^{3+} se dispersem, com a adição do citrato de sódio estes íons são reduzidos e se aglomeram formando as partículas que vão crescendo paulatinamente, ao mesmo tempo em que o citrato também se une a estes aglomerados de ouro e lhes confere estabilidade. A variação da concentração de citrato de sódio afeta diretamente o tamanho da partícula obtida, de forma inversamente proporcional, ou seja, quanto menor a quantidade de citrato maior será a nanopartícula (SENAI, 2014; ZHAO; LI; ASTRUC, 2013).

Todavia, nanopartículas de ouro podem facilmente ser sintetizadas através de outros métodos, sejam eles químicos, físicos ou biológicos, e diversas pesquisas também já mostraram a possibilidade de se obter estas nanopartículas utilizando outros produtos como agentes redutores e estabilizantes, como algumas biomoléculas

que podem ser facilmente encontradas em extratos naturais, por exemplo (FIGURA 2) (AHMED et al., 2016; RAMALINGAM, 2019).

FIGURA 2 – ALGUNS MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO, POSSÍVEIS MORFOLOGIAS E APLICAÇÕES.



FONTE: Ramalingam (2019).

Biossínteses de nanopartículas de ouro já foram realizadas por outros pesquisadores com diversos extratos naturais como, por exemplo, BOTTEON et al. (2021) que utilizaram própolis como agente redutor e resultou em nanopartículas com tamanho entre 8 e 15 nm com boas propriedades antimicrobianas e anticâncer. Extrato de folha de coentro também apresentou bons resultados como agente redutor de ouro na formação de nanopartículas de diversos formatos com tamanho entre 7 e 58 nm (NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2008), assim como as cinzas de nozes num

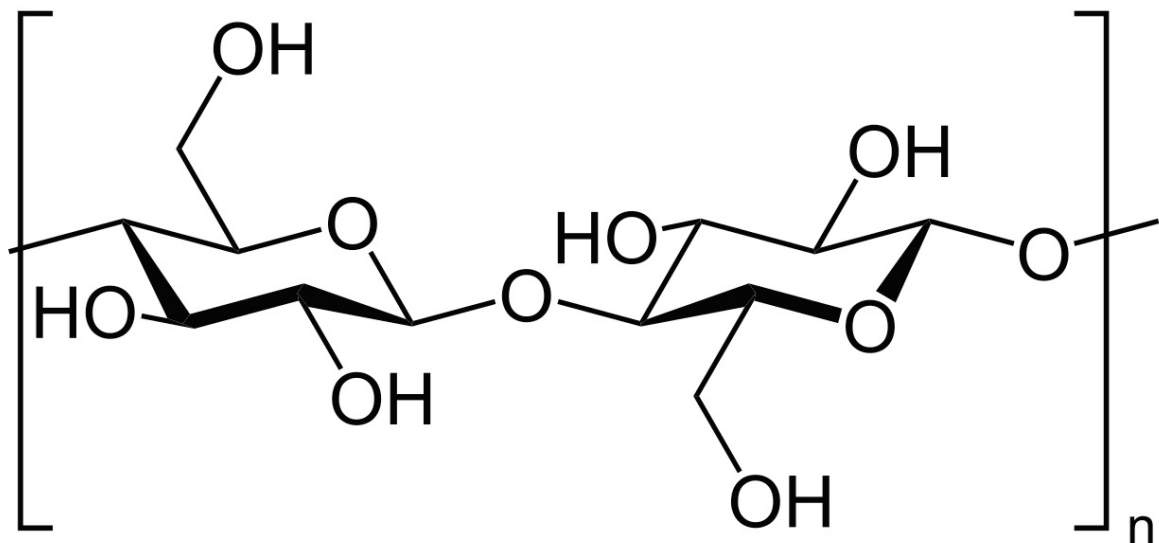
estudo realizado por (IZADIYAN et al., 2018) que obteve nanopartículas esféricas a temperatura moderada com tamanho médio de 14 nm.

As nanopartículas de ouro, de modo geral, possuem excelentes propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, alguma atividade bactericida, possuem baixa toxicidade e são biocompatíveis, entre várias outras propriedades e aplicações nos mais diversos campos da ciência (AHMED et al., 2016; BOISSELIER; ASTRUC, 2009; DOS SANTOS HAUPENTHAL et al., 2020; LIU et al., 2021; RAMALINGAM, 2019). Tais características são muito versáteis e as tornam interessantes para as mais variadas aplicações tecnológicas, principalmente quando há a possibilidade de aliar estas propriedades com outros materiais como é caso de extratos com potencial fitoterápicos, fármacos, entre outros.

1.3 NANOCELULOSE

A celulose é um polímero natural formado pelo monômero de glicose (FIGURA 3) encontrado em abundância, uma vez que é responsável por compor entre 40 e 50% da estrutura de plantas e árvores. A celulose possui diversos grupos hidroxila em sua estrutura que são responsáveis por lhe conceder uma estrutura insolúvel em solventes orgânicos e água.

FIGURA 3 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO MERO DA CELULOSE.



A partir da celulose pode-se obter a nanocelulose, que possui algumas variações e pode ser classificada de acordo com sua morfologia e método de obtenção (TABELA 1).

TABELA 1 – TIPOS DE NANOCELULOSE E SUAS CARACTERÍSTICAS.

Tipo de nanocelulose	Diâmetro	Comprimento	Descrição
Nanocristais (NCC)	Alguns nanômetros	10 e 500 nm	Possui uma etapa de hidrólise ácida na sua produção, que elimina as cadeias amorfas
Nanofibrilas (NFC)	3 a 50 nm	Alguns micrometros	Processo mecânico, com uma morfologia que pode variar muito devido ao processamento, grau de cristalinidade e grau de polimerização
Bacteriana (BNC)	Abaixo de 100 nm	Alguns micrometros	Produzida pelo método bottom-up utilizando bactérias que utilizam fontes de carbono para construir as cadeias de celulose

Fonte: O Autor (2022).

Em geral, o processo é por método *top down* utilizando como matéria prima diversos produtos como madeira de reflorestamento, bagaços ou a própria celulose utilizada na indústria de papel. A única exceção é a celulose bacteriana.

As nanofibrilas de celulose são obtidas principalmente a partir de um processamento mecânico, como a moagem, na qual as fibras de celulose são abertas devido as forças de cisalhamento e as fibrilas internas são expostas. Podem ser aplicados alguns pré-tratamentos para melhorar a qualidade das fibrilas obtidas, como acetilação, ou pré-tratamentos como oxidação para diminuir a interação da parede celular, que está relacionada com o inchamento das fibras da matéria prima. Esta nanocelulose pode apresentar variações na morfologia que estão diretamente correlacionadas com os parâmetros do processamento. O grau de cristalinidade e polimerização também podem ser diferentes de acordo com a matéria prima utilizada. Em geral, o diâmetro das fibrilas estão entre 3 e 50 nm e seu comprimento pode alcançar até alguns micrometros (DELGADO-AGUILAR et al., 2015; THOMAS et al., 2020).

Os nanocristais de celulose são compostos apenas pela parte cristalina da cadeia polimérica da celulose, e sua obtenção consiste num processamento mecânico, como a moagem da celulose, para ocorrer a desfibrilação e,

posteriormente, uma etapa de ataque químico para remover a parte amorfa que degrada quando exposta a presença de ácidos. Este tipo de nanocelulose costuma apresentar diâmetro dos cristais em torno de algumas dezenas de nanômetros e o comprimento variando entre 10 e 500 nm (KARGARZADEH et al., 2018).

A nanocelulose bacteriana, ao contrário das anteriores, segue um processo *bottom up* e utiliza outras fontes para produção de nanocelulose. Neste caso, microrganismos são alimentados com compostos ricos em carbono que são convertidos em monômeros de glicose e interligados para formar as cadeias de celulose de modo controlado. Este tipo de nanocelulose apresenta diâmetro abaixo de 100 nm e comprimento em torno de alguns micrometros (GOLMOHAMMADI et al., 2017).

A nanocelulose se caracteriza por ter uma baixa densidade, boa resistência mecânica, ser flexível e quimicamente inerte, mas permitir a funcionalização da sua superfície devido à presença de grupos hidroxila. Além disso é um material cuja matéria prima é abundante, renovável, biodegradável e de baixo custo, sendo um bom candidato para substituir polímeros sintéticos em algumas aplicações (KARGARZADEH et al., 2018).

1.3.1 Aplicações de nanocelulose dopada com nanopartículas

Há diversas abordagens sobre a combinação entre nanocelulose e nanopartículas inorgânicas com extratos naturais na literatura atualmente, uma vez que estes materiais por si só apresentam características únicas e convidativas para aplicações diversificadas.

A TABELA 2 apresenta alguns exemplos de propriedades e aplicações da nanocelulose em conjunto com nanopartículas e extratos naturais de diversas naturezas.

TABELA 2 – ALGUMAS PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DA NANOCELULOSE EM CONJUNTO COM NANOPARTÍCULAS DE EXTRATOS NATURAIS.

Matriz	Fase dispersa	Propriedades	Aplicações	Referência
BNC	Nanopartículas de ZnO com extrato de própolis	Bactericida	Embalagens alimentícias	MOCANU et al., 2019
NFC	Nanopartículas de prata com extrato de <i>Lythrum salicaria</i>	Antimicrobiana	Embalagens alimentícias, biossensores, purificação de água e curativos	MOHAMMADALINEJH AD; ALMASI; ESMAILI, 2019
BNC	Nanopartículas de Ag, Pd e Cu com extrato de amora	Antimicrobiana	Embalagens alimentícias	RAZAVI et al., 2020
NFC	Nanopartículas de ouro	Catalisadora	Espuma catalisadora renovável para diversas reações	ALLE et al., 2021
BNC	Nanopartículas de Au e Ag com extrato da casca de romã	Catalisadora	Catalisador na conversão de 4-nitrofenol para 4-aminofenol	DESHMUKH; DIKSHIT; KIM, 2022
BNC	Nanopartículas de prata com extrato de <i>Citrullus colocynthis</i>	Cicatrizante e bactericida	Curativos	MONIRI et al., 2018
BNC	Nanopartículas de Fe ₃ O ₄ com extrato de Aloe vera	Cicatrizante e bactericida	Curativos	MONIRI et al., 2018a
NFC	Nanopartículas de prata com extrato da semente de uva	Antimicrobiana e antioxidante	Embalagens alimentícias	WU et al., 2019
NFC	Nanopartículas de prata com extrato da casca de laranja	Adsorvente	Tratamento de efluentes, para remoção de Cd e Cr	TAVKER et al., 2021

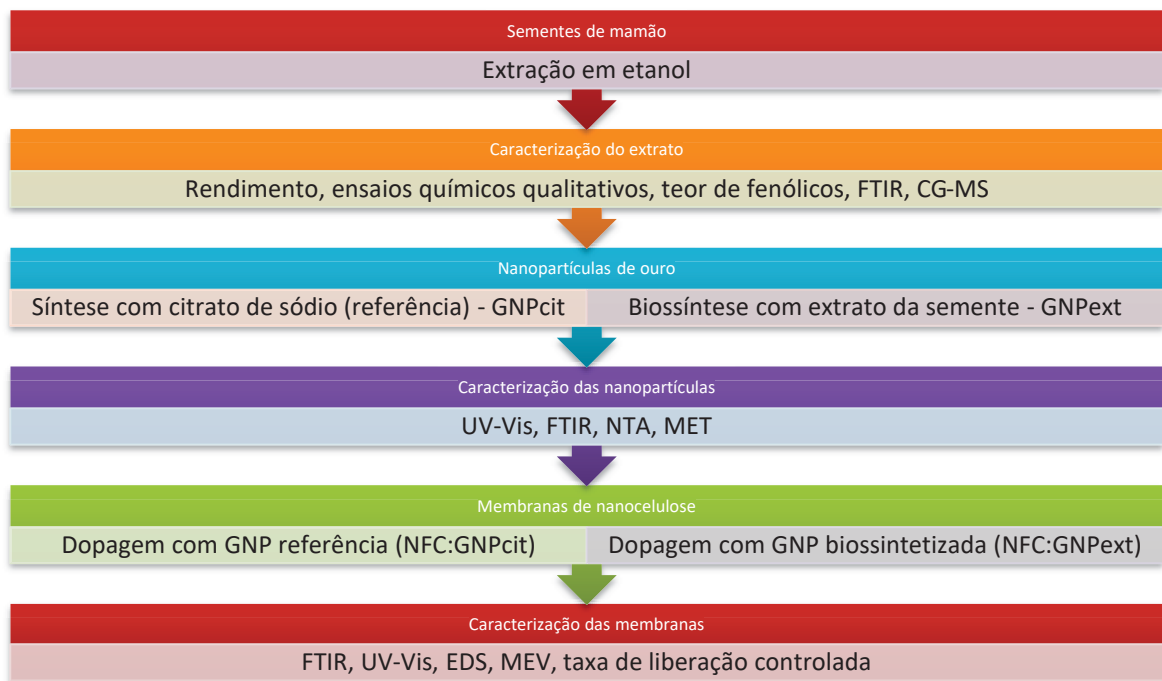
Fonte: Autor (2022).

Como a nanocelulose é um material versátil que permite ser facilmente modificada, o número de possibilidades de dopagem com nanopartículas e extratos envolvendo-a é enorme.

MATERIAL E MÉTODOS

A estratégia experimental adotada no presente trabalho seguiu o esquema representado na FIGURA 4, com a preparação do extrato da semente de mamão, posterior preparação das nanopartículas de ouro utilizando este extrato como agente redutor e estabilizante e, por fim, a dopagem destas nanopartículas em membranas de nanocelulose.

FIGURA 4 – ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL ADOTADA PARA O DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA.



Fonte: O Autor (2022).

Os reagentes utilizados neste trabalho foram Padrão Analítico (P.A), obtidos a partir de diversos fornecedores, conforme listado na TABELA 3.

TABELA 3 – INFORMAÇÕES TÉCNICAS DOS REAGENTES UTILIZADOS.

Reagente	Fórmula Química	Descrição
Álcool etílico absoluto P.A.	C_2H_6O	CAS 64-17-5 Fornecedor Êxodo Científica
Ácido cloro áurico P.A.	$HAuCl_4.3H_2O$	CAS 16961-25-4 Fornecedor Dinâmica Química Contemporânea
Ácido clorídrico 37% P.A.	HCl	CAS 7647-01-0 Fornecedor Neon
Ácido nítrico 65% P.A.	HNO_3	CAS 7697-37-2 Fornecedor Neon
Citrato de sódio tri básico P.A.	$C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$	CAS 6132-04-3 Fornecedor Êxodo Científica
Nanofibrilas de celulose (NFC)	-	CAS 9004-34-6 Universidade do Maine, EUA

Fonte: O Autor (2022).

Os frutos de mamão foram obtidos em supermercados regionais na cidade de Curitiba, PR, Brasil. A nanocelulose utilizada apresentou teor de sólidos de 3,69%. Todos os procedimentos foram realizados utilizando-se água ultrapura ou deionizada tanto para execução dos experimentos quanto na higienização das vidrarias.

1.4 EXTRAÇÃO DA SEMENTE DE MAMÃO

As sementes de mamão (*Carica papaya*) foram removidas de frutos maduros, lavadas e secas em estufa a 40 °C. Para a extração, as sementes foram maceradas e extraídas em água deionizada e etanol sob agitação vigorosa por 24 horas a temperatura ambiente em um Erlenmeyer devidamente fechado. O extrato foi filtrado em sistema Millipore utilizando filtro de celulose com abertura de 0,45 µm e concentrado em rotaevaporador a 65 °C, e o excesso de solvente foi removido em dessecador sob vácuo. Uma segunda etapa de filtração foi realizada após concentrar o extrato utilizando filtros de seringa com abertura de 0,45 µm para garantir a homogeneidade do extrato.

1.4.1 Caracterizações do extrato

Foram realizados ensaios para determinar o teor de fenóis e a presença de flavonoides, saponinas, taninos e triterpenos e esteróis (NAYAK et al., 2012).

O teor de compostos fenólicos foi determinado através do ensaio de Folin-Ciocalteu, que utiliza padrão de ácido gálico como comparativo para determinar o teor de fenóis presentes na amostra (APÊNDICE 1). Neste ensaio foi utilizado um espectrofotômetro Shimadzu UV-Vis 1800 com leitura pontual em 765 nm para verificar a presença dos compostos fenólicos.

Para determinar a presença de flavonoides ferveu-se 100 µL do extrato em 5 ml de acetato de etila em um banho de vapor por 3 minutos, em seguida adicionou-se 0,5 ml de amônia diluída. A formação de um precipitado amarelo indica a presença de flavonoides.

Já o teste saponinas foi realizado com a fervura de 100 µL do extrato em 5 ml de água por 4 minutos. Deixou-se esfriar e agitou-se vigorosamente. Após alguns minutos observou-se se havia a presença de espuma indicativa de saponinas na composição.

Para taninos foi adicionado 2 ml de cloreto férrico 1% em 100 µL do extrato sob vigorosa agitação. A mudança para castanho avermelhado ou preto azulado indica a presença de taninos na composição.

O teor de esteróis foi determinado aquecendo-se 100 µL de extrato em 7 ml de clorofórmio a 55 °C por 30 minutos, em seguida adicionou-se 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. A mudança de cor para marrom avermelhado indica positivo para esteróis e triterpenos.

Realizou-se análise de Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) por método de KBr para leitura de absorbância entre 4000 e 800 cm^{-1} em um Thermo Scientific Nicolet iS50 com 64 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} .

Também se realizou a análise de cromatografia em um cromatógrafo a gás GCMS2010 Plus acoplado a um espectrômetro de massas sequencial do tipo triplo quadrupolo TQ8040, auto mostrador AC 5000 (Shimadzu®, Japão) e software GCMS Solution®. O cromatógrafo é equipado com uma coluna capilar ZB-5MS (Phenomenex®), de dimensões 30m x 0,25mm x 0,25µm. Hélio 5.0 analítico foi utilizado como gás de arraste. Foi adicionado acetato de etila ao extrato concentrado

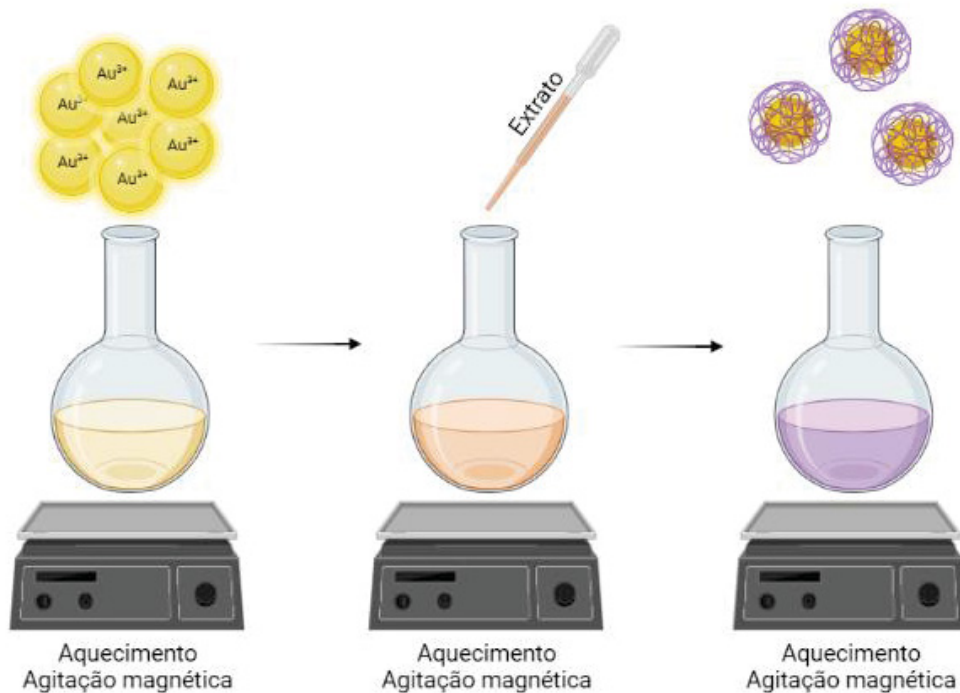
da semente de mamão, realizada agitação e deixado repousar. Uma alíquota de 1,0 μL do sobrenadante foi injetada para análise.

1.5 BIOSÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

Todas as vidrarias utilizadas na síntese de nanopartículas foram previamente higienizadas com uma mistura 3:1 de ácido clorídrico e nítrico (água régia), respectivamente, e lavadas exaustivamente com água para remoção dos ácidos.

Foram realizados testes preliminares para determinar a melhor condição de biossíntese das nanopartículas de ouro utilizando o extrato de semente de mamão, os detalhes estão no APÊNDICE 2. A FIGURA 5 apresenta as etapas da biossíntese das nanopartículas de ouro. O procedimento foi adaptado a partir do método de TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER (1953), utilizando-se 50 ml de solução aquosa e 1 mM de HAuCl_4 aquecida a 80 °C sob agitação vigorosa e adição de 5 ml do extrato da semente de mamão diluído em etanol na concentração de 10 mg/ml.

FIGURA 5 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS ETAPAS DA BIOSÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO.



Fonte: O Autor (2022).

Em paralelo, foi realizada a síntese de modo convencional das nanopartículas de ouro utilizando-se citrato de sódio 135 mM como agente redutor e estabilizante das nanopartículas (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1953). Este método deu origem as nanopartículas de ouro consideradas como controle positivo do presente trabalho.

1.5.1 Caracterizações das nanopartículas de ouro

Realizou-se análise química para verificação da presença do extrato nas nanopartículas utilizando Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) por método de KBr para leitura de absorvância entre 4000 e 800 cm^{-1} em um Thermo Scientific Nicolet iS50 com 64 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} .

Além disso, as nanopartículas obtidas através da biossíntese com extrato e através do método de Turkevich foram caracterizadas por UV-vis através de varreduras em triplicata entre os comprimentos de onda de 200 e 700 nm utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu UV-Vis 1800 para verificar a banda de absorvância característica de nanopartículas de ouro entre 520 e 580 nm (HAISS et al., 2007).

Através da análise de UV-Vis averiguou-se também o *shelf life* das nanopartículas, na qual é possível identificar possíveis alterações na morfologia através do deslocamento da banda no comprimento de onda, e alterações na concentração de partículas a partir da mudança nos valores de absorvância máxima da banda. A biossíntese e a síntese de referência foram armazenados em frascos de vidro ao abrigo da luz em duas condições distintas: a) em uma geladeira comum, com temperatura média de 4 °C; b) e em um armário a temperatura ambiente, em torno de 20 °C. Diariamente, exceto em fins de semana, alíquotas de 4 ml foram coletadas e avaliadas, sem diluição, em um espectrofotômetro Shimadzu UV-Vis 1800 realizando-se varreduras em triplicata entre os comprimentos de onda de 200 a 700 nm.

Foi realizada Análise de Rastreamento de Nanopartículas utilizando o equipamento Nanosight NS300 da Malvern Panalytical, com diluição das nanopartículas na proporção 1:50 (v/v) em água ultrapura, para verificação do diâmetro hidrodinâmico e do movimento browniano das nanopartículas. Importante

frisar que esta análise foi realizada num intervalo de 24 horas após a realização das sínteses das nanopartículas com extrato das sementes de mamão e citrato de sódio.

Para as observações morfológicas, a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi realizada em um equipamento JEOL JEM-1200EX II, 120 keV, e a dispersão coloidal foi depositada sobre *grid* de cobre revestido com carbono e deixada secar a temperatura ambiente.

1.6 PREPARAÇÃO E DOPAGEM DAS MEMBRANAS DE NANOCELULOSE

A metodologia empregada para produção das membranas de nanocelulose foi uma adaptação de MAGALHÃES; CLARO (2018) para obtenção de membranas com gramatura de 20 g/m².

A nanocelulose foi dispersa em água deionizada com concentração de 3 mg/ml por meio de agitação magnética e as membranas foram produzidas através da filtração da suspensão em um sistema Millipore utilizando-se membranas de Nylon com porosidade de 22 µm. Após a filtração, as membranas foram prensadas por uma placa de vidro para remoção do excesso de umidade e, por fim, secas em estufa a 40 °C até massa constante. Produziram-se membranas com 47 mm de diâmetro.

A dopagem das membranas de nanocelulose foi realizada substituindo-se parte da água da suspensão de nanocelulose pela suspensão coloidal de nanopartículas de ouro, preparada com 24 horas de antecedência. Após a adição das nanopartículas à suspensão de nanocelulose, manteve-se a suspensão em agitação magnética por dez minutos e realizou-se normalmente a filtração para formação das membranas. As proporções de massa de nanocelulose e volume de água e suspensão de nanopartículas de ouro para cada concentração estão especificadas na TABELA 4.

TABELA 4 – VOLUME DA DISPERSÃO COLOIDAL UTILIZADO NA DOPAGEM DAS MEMBRANAS DE NANOCELULOSE.

Amostra	Massa (g)	Volume água (ml)	Volume GNP (ml)
NFC:GNP 0,5%	0,938	311,0	1,60
NFC:GNP 1,0%	0,938	309,4	3,20
NFC:GNP 2,0%	0,938	306,6	6,00

1.6.1 Caracterizações das membranas de nanocelulose

A técnica de Espectroscopia por UV-vis foi empregada para avaliar os valores de absorvância das dispersões aquosas dopadas antes e após o processo de filtragem para formação da membrana. Isto foi realizado como análise preliminar para verificar a aderência das nanopartículas nas membranas de nanocelulose.

As membranas foram caracterizadas por Espectroscopia de Raios-X por energia dispersiva (EDS) em um equipamento Tescan, modelo VEGA3 LMU, 15 kV, para verificação das nanopartículas de ouro metálico presente nas membranas.

Também foi realizada a caracterização química por Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) utilizando o modo de Reflectância Total Atenuada (ATR) para leitura de absorvância entre 4000 e 800 cm^{-1} em um Thermo Scientific Nicolet iS50 com 64 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} .

Além disso, realizaram-se ensaios de microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG) em um Microscópio FEI Quanta 450 FEG, 20 kV, para caracterização morfológica das membranas e identificação das nanopartículas de ouro nas membranas dopadas.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 EXTRATO DA SEMENTE DE MAMÃO

A extração da semente de mamão foi realizada tanto em meio aquoso quanto com etanol, porém durante as extrações vários pontos foram observados. O rendimento para a extração em água foi em torno de 22% e o etanol atingiu rendimentos com cerca de 30%. O extrato aquoso apresentou maior dificuldade de concentração, havendo necessidade do uso de maior temperatura e tempo no rotaevaporador, enquanto o extrato etanoico se mostrou bem mais versátil neste aspecto. Ambos os solventes possuem uma boa capacidade de arraste de componentes das sementes, porém pela diferença de rendimento e pela maior facilidade de manipulação, optou-se por seguir com o extrato obtido em etanol.

2.1.1 Identificação de compostos químicos do extrato

Utilizando-se o método de Folin-Ciocalteu verificou-se que o extrato da semente de mamão apresenta um teor de fenólicos total em torno de 81,3 mg AGE/100g (TABELA 5).

TABELA 5 – TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS DO EXTRATO DA SEMENTE DE MAMÃO EXPRESSOS EM EQUIVALENTE DE ÁCIDO GÁLICO (AGE).

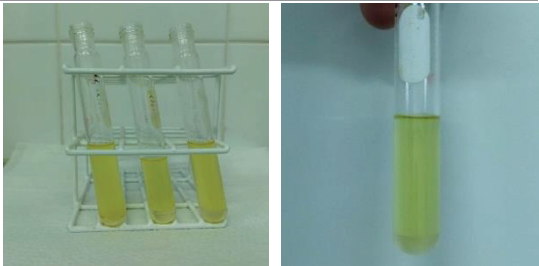
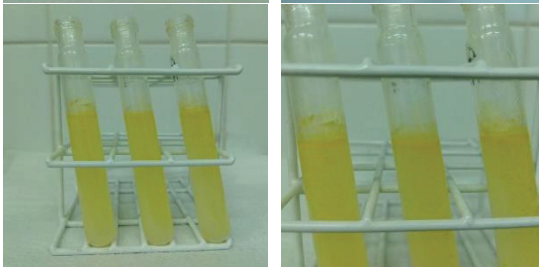


Amostra	m (g)	V _E (ml)	Abs.	C (mg/L)	AGE (mg/100g b.u.)
1	0,04	0,25	0,420	128,76	80,5
2	0,04	0,25	0,459	144,36	90,2
3	0,04	0,25	0,425	130,76	81,7
4	0,04	0,25	0,379	112,36	70,2
5	0,04	0,25	0,434	134,36	84,0
Valor médio					81,3 ± 7,25

Fonte: O Autor (2022).

Dentro da classificação de teor de fenólicos para frutas tropicais, o mamão no geral costuma apresentar valores abaixo de 100 mg AGE/100g, e tais compostos estão diretamente associados ao método de extração, uma vez que a polaridade do solvente pode afetar a eficiência no arraste de fenóis do produto. De modo geral, os valores encontrados, obviamente, mostram que a extração por etanol permitiu o arraste de compostos fenólicos presentes nas sementes do mamão, e que estes resultados estão em consonância com o que já foi reportado em outros trabalhos similares (SALLA et al., 2016).

A TABELA 6 apresenta os resultados dos ensaios para identificação de flavonoides, saponinas, taninos, e triterpenos e esteróis. Em consonância com o teor total de fenólicos, o teste de flavonoides também foi positivo, com a formação da fase amarela característica destes componentes poucos minutos após a adição do hidróxido de amônio. A presença de flavonoides é importante devido, principalmente, a sua capacidade anti-inflamatória (CHEN et al., 2016). O teste de saponinas teve a formação da espuma que persistiu por mais de cinco minutos, porém de maneira muito leve, o que provavelmente indica uma presença muito baixa destes componentes no extrato.

TABELA 6 – RESULTADOS DOS ENSAIOS DE IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES, SAPONINAS, TANINOS, TRITERPENOS E ESTERÓIS DO EXTRATO DA SEMENTE DE MAMÃO.

Ensaio	Resultado	Imagem
Flavonoides	Positivo para compostos flavonoides, visto pela formação de uma fase amarela característica após a adição do hidróxido de amônio.	
Saponinas	Positivo para saponinas, confirmado pela persistência de uma espuma leve após cinco minutos de repouso.	
Taninos	Negativo para taninos, não houve mudança para as colorações castanho avermelhado ou preto azulado características destes componentes.	
Triterpenos e Esteróis	Positivo, atestado pela mudança de coloração para marrom avermelhado.	

Fonte: O Autor (2022).

Para atestar a presença de taninos é esperado que haja alteração de coloração para castanho avermelhado ou preto azulado, porém esta alteração não ocorreu. Por último, o ensaio de triterpenos e esteróis, que foi o mais reativo com mudança de coloração iniciada logo após a adição do ácido sulfúrico e estabilizando num tom forte de marrom avermelhado. A literatura corrobora a presença destes componentes e, inclusive, menciona que sua presença é de suma importância devido as influências positivas no sistema imunológico (NAYAK et al., 2012; RÍOS, 2010).

2.1.2 Espectroscopia no Infravermelho médio

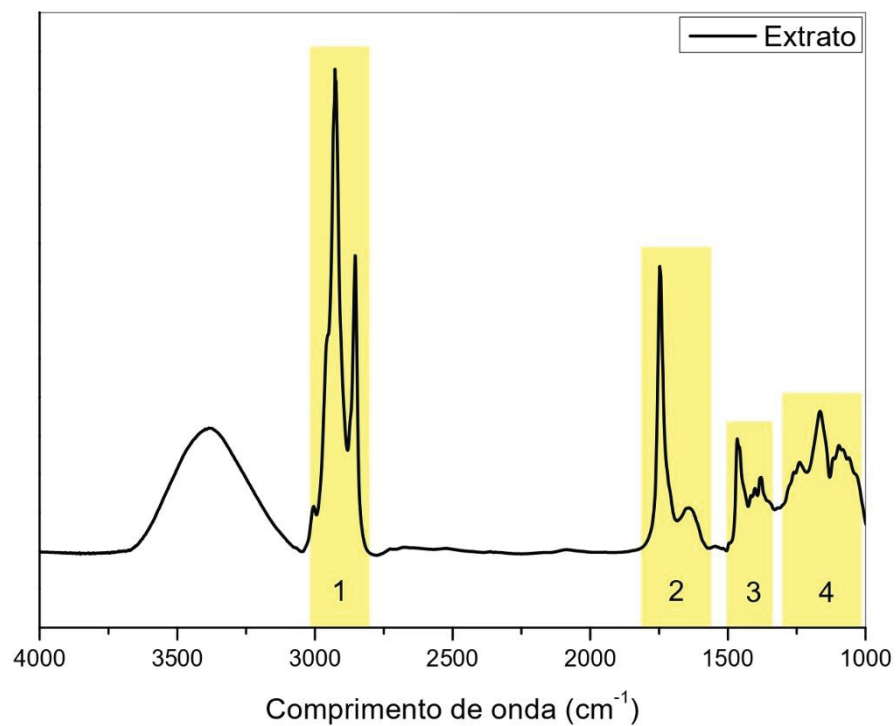
A análise de infravermelho do extrato de semente de mamão (FIGURA 6) apresentou bandas de absorção conforme estão elencadas na TABELA 7, apresentando principalmente indícios de ligações C-H de cadeias alifáticas e ligações de ésteres, com bandas bem pronunciadas para as ligações C-O e C=O.

TABELA 7 – PRINCIPAIS BANDAS CARACTERÍSTICAS DO EXTRATO DA SEMENTE DE MAMÃO.

N.	Banda de absorção	Grupo funcional	Classe do componente
1	3005-2850 cm^{-1}	C-H	Alcanos
2	1743 cm^{-1}	C=O	Ésteres
3	1465 cm^{-1}	C-H	Alcanos
4	1240-1050 cm^{-1}	C-O	Ésteres

Fonte: Autor (2022).

FIGURA 6 – ESPECTRO DE IR DO EXTRATO DA SEMENTE DE MAMÃO.



Fonte: O Autor (2022).

Há também uma região acima de 3100 cm^{-1} , até cerca de 3700 cm^{-1} , que é característica da ligação OH.

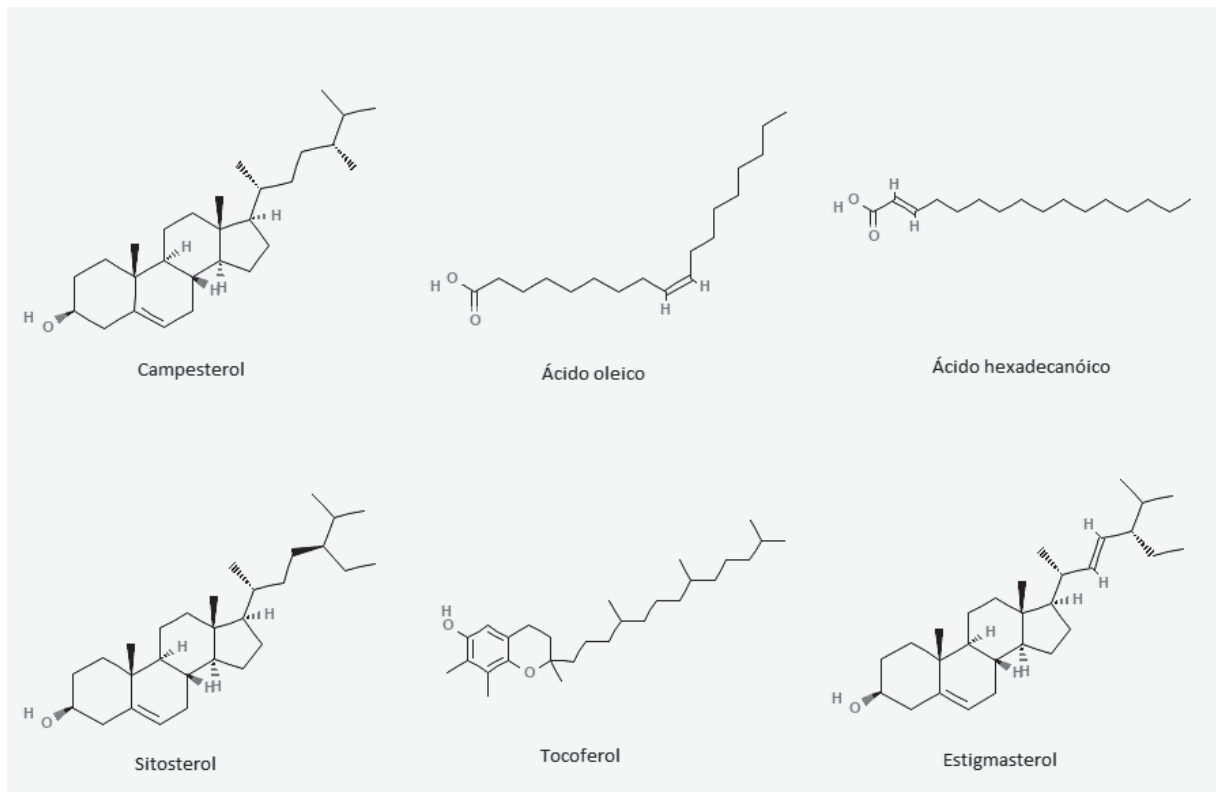
Tais bandas estão de acordo com os resultados preliminares, uma vez que estas ligações são facilmente encontradas em compostos fenólicos, esteróis e terpenos. Principalmente ao considerar as prováveis classes de componentes aos quais estas ligações estão associadas, que são cadeias de carbonos alifáticos e ésteres.

2.1.3 Cromatografia Gasosa (CG-MS)

A análise de cromatografia corroborou os resultados obtidos inicialmente nos testes qualitativos e na análise de FTIR. Os principais componentes identificados estão listados no APÊNDICE 3.

Através da análise de cromatografia pode-se notar que o extrato da semente de mamão possui uma série de fitoterápicos relevantes para aplicações de maior valor agregado ou reaproveitamento em setores como as indústrias de química fina. Alguns dos principais são o ácido oleico, ácido n-hexadecanóico, estigmasterol, campesterol, sitosterol e tocoferol (FIGURA 7).

FIGURA 7 – ESTRUTURA QUÍMICA DE ALGUNS COMPOSTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS NO EXTRATO DA SEMENTE DE MAMÃO.



Fonte: PubChem (2022).

O ácido oleico e o ácido n-hexadecanóico são compostos associados a propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, e ambos também foram identificados no trabalho desenvolvido por AGADA et al. (2021), sendo inclusive parte dos componentes associados aos efeitos antidiabéticos do estudo. Além disso, o ácido oleico também é muito conhecido por ajudar na prevenção de doenças cardiovasculares e já foi demonstrado por outros trabalhos que este é o ácido graxo em maior proporção na semente de mamão e pode ser responsável pela boa estabilidade associada ao extrato deste produto (LEE; LEE; SU, 2011; TAN; TAN; TAN, 2020).

Outros compostos muito notáveis são os fitosteróis que ganham destaque no extrato da semente de mamão e geralmente são compostos muito associados com a redução na absorção de colesterol por possuírem estruturas similares, mas também possuem atividade anticancerígena, antioxidante e anti-inflamatória (VILAHUR et al., 2019; WOYENGO; RAMPRASATH; JONES, 2009).

2.2 NANOPARTÍCULAS DE OURO BIOSSINTETIZADAS

As dispersões coloidais obtidas utilizando o extrato da semente de mamão e o citrato de sódio como agentes redutores e estabilizantes foram, primeiramente, avaliadas visualmente (FIGURA 8). Ambas apresentaram colorações que são esperadas para ouro coloidal, com a síntese de citrato de sódio apresentando sua característica cor avermelhada, enquanto a biossíntese resultou numa coloração arroxeada, similar aos coloides de ouro obtidos em alguns estudos que também utilizaram extratos diversos como agentes redutores (BOTTEON et al., 2021; IZADIYAN et al., 2018; NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2008).

FIGURA 8 – COMPARAÇÃO DE COLORAÇÃO ENTRE A BIOSSÍNTESE E A SÍNTESE DE REFERÊNCIA.



Fonte: Autor (2022).

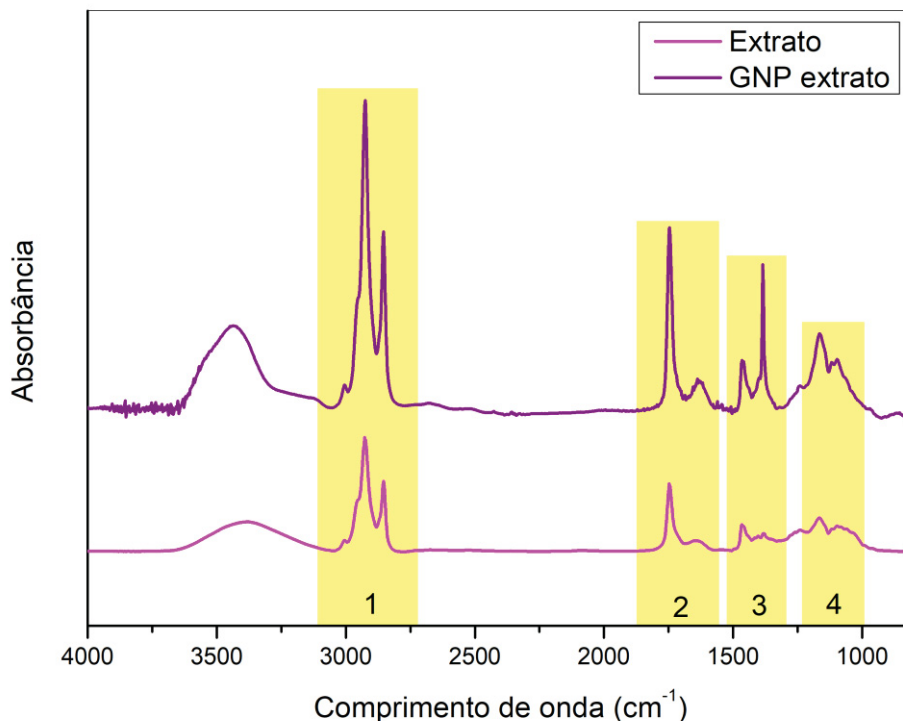
2.2.1 Espectroscopia no Infravermelho médio

Especificamente para as nanopartículas biossintetizadas, realizou-se a análise de Espectroscopia no infravermelho para verificação da presença do extrato. O resultado (FIGURA 9) apresentou similaridade com o espectro do extrato da

semente de mamão, demonstrando com sucesso a presença deste nas nanopartículas produzidas.

Portanto, assim como apresentado no extrato, as regiões identificadas no espectro são referentes as ligações de carbono alifático (regiões 1 e 3) e ligações C=O e C-O (regiões 2 e 4, respectivamente), além da presença do grupo hidroxila (OH) em torno de 3500 cm^{-1} .

FIGURA 9 – ESPECTRO DE IR DA BÍOSSÍNTESE.



Fonte: Autor (2022).

Essas observações ratificam a viabilidade técnica para considerar-se o extrato da semente de mamão como alternativa de agente redutor para a biossíntese de nanopartículas de ouro. Concomitantemente, a presença de grupos funcionais químicos relacionados ao extrato da semente na estrutura das nanopartículas de ouro ressaltam a potencialidade destas nanoestruturas, visto que estes grupos funcionais estão atrelados aos compostos identificados na análise de cromatografia da seção 3.1.3 e os mesmos apresentam características relevantes para aplicações práticas, especialmente de base biotecnológica.

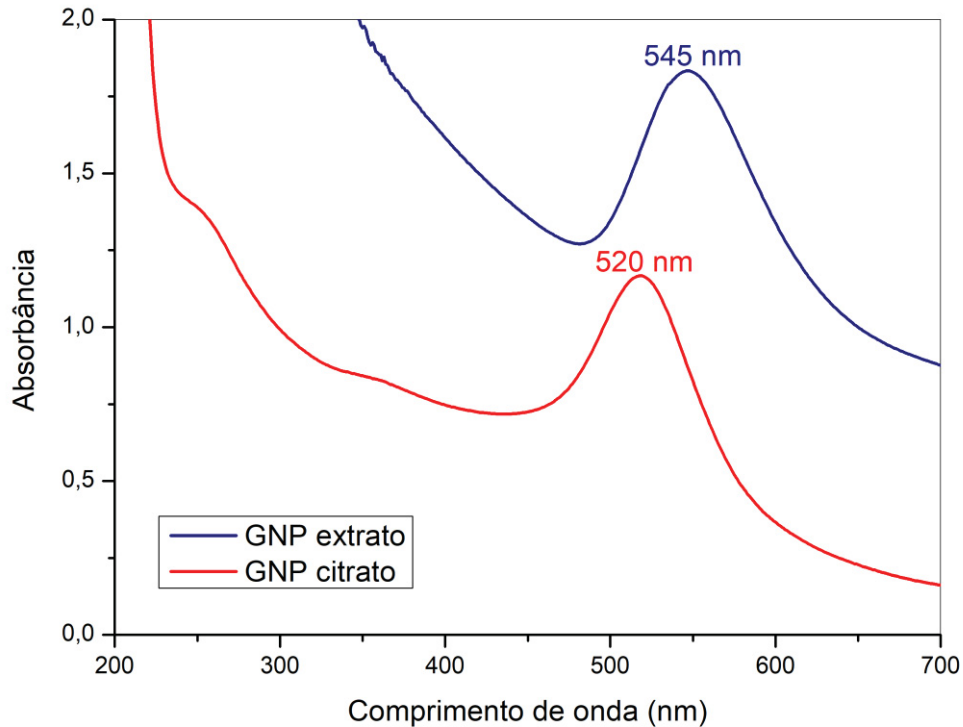
Trabalhos similares que realizaram a biossíntese de nanopartículas de ouro com outros tipos de extratos, e detectaram a presença de grupos funcionais similares, também atrelaram propriedades importantes como caráter antimicrobiano (ANNAMALAI et al., 2013; BOTTEON et al., 2021)

2.2.2 Espectroscopia UV-Vis

Após a realização das sínteses, as dispersões coloidais obtidas foram avaliadas por espectroscopia de UV-Vis, cujos resultados estão apresentados na FIGURA 10.

A partir de um trabalho desenvolvido por HAISS et al. (2007), é possível estimar algumas características como o diâmetro das partículas formadas. Segundo o autor, dispersões coloidais de ouro com ressonância plasmon (λ) entre 520 nm e 580 nm costumam apresentar tamanho de partículas dentro de 2 e 100 nm. No caso das nanopartículas biossintetizadas com o extrato da semente de mamão, cuja λ foi de 545 nm, pode-se prever um tamanho médio de 75 nm, enquanto para a síntese de referência com citrato de sódio a estimativa de tamanho médio seria 9 nm.

FIGURA 10 – ESPECTROS DE UV-VIS DA BIOSÍNTESE COM EXTRATO DA SEMENTE DE MAMÃO E DA SÍNTESE DE REFERÊNCIA COM CITRATO DE SÓDIO.

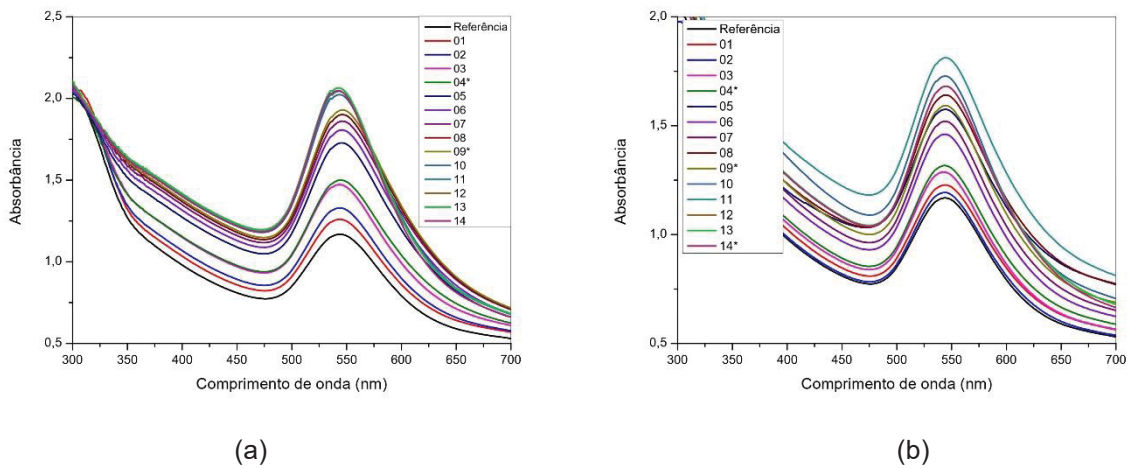


Fonte: Autor (2022).

Na avaliação do *shelf life*, observa-se que o armazenamento a baixa temperatura (4 °C) agiu melhor na conservação da biossíntese (FIGURA 11), reduzindo a variância na mudança de concentração ao longo do tempo. Para a síntese de referência também houve uma pequena melhora nesse aspecto (FIGURA 12).

Um ponto a ser ressaltado é a formação de uma fina película na parede dos frascos a temperatura ambiente, especialmente na síntese de referência que teve uma formação mais evidente. A diferença de estabilidade de acordo com a temperatura de armazenamento também foi reportada por BALASUBRAMANIAN et al. (2010) indicando que baixas temperaturas são melhores na estabilidade das nanopartículas de ouro e, indicando a formação de precipitados escuros quando realizado armazenamento prolongado a temperatura ambiente.

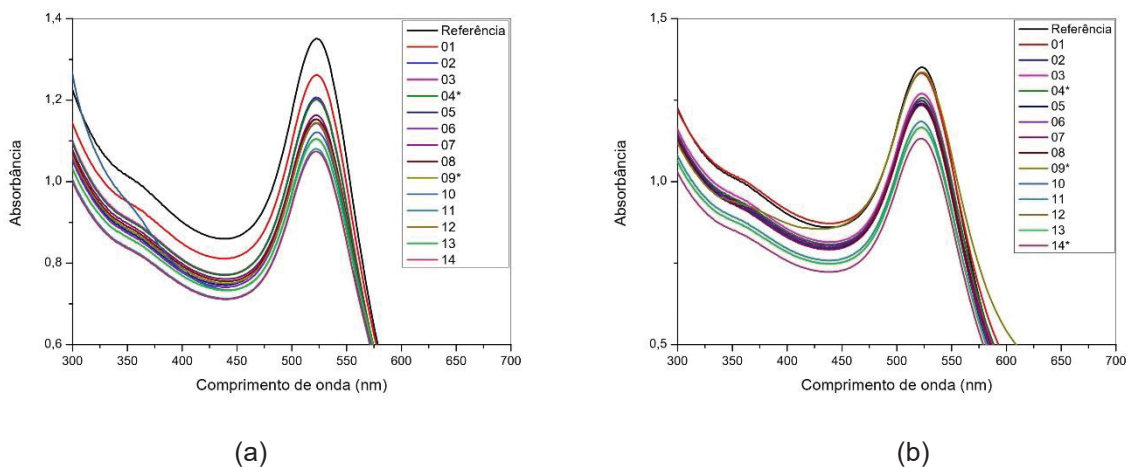
FIGURA 11 – ESPECTROS DE UV-VIS DA BIODISSÍNTese ARMAZENADA A TEMPERATURA AMBIENTE (a) E RESFRIADA (b).



Fonte: Autor (2022).

Com relação ao comprimento de onda, a biossíntese apresentou redução no λ para 543 nm a partir do 10^o dia apenas no armazenamento a temperatura ambiente. Como indicado anteriormente, a morfologia está associada a ressonância plasmon das nanopartículas, logo pode-se deduzir que após o 10^o dia houve uma pequena alteração no tamanho médio das nanopartículas, mas são necessárias análises mais abrangentes para averiguar a amplitude desta alteração.

FIGURA 12 – ESPECTROS DE UV-VIS DA SÍNTESE DE REFERÊNCIA ARMAZENADA A TEMPERATURA AMBIENTE (a) E RESFRIADA (b).



Fonte: Autor (2022).

Resumidamente, quanto a aplicabilidade das nanopartículas, dois pontos podem ser ressaltados:

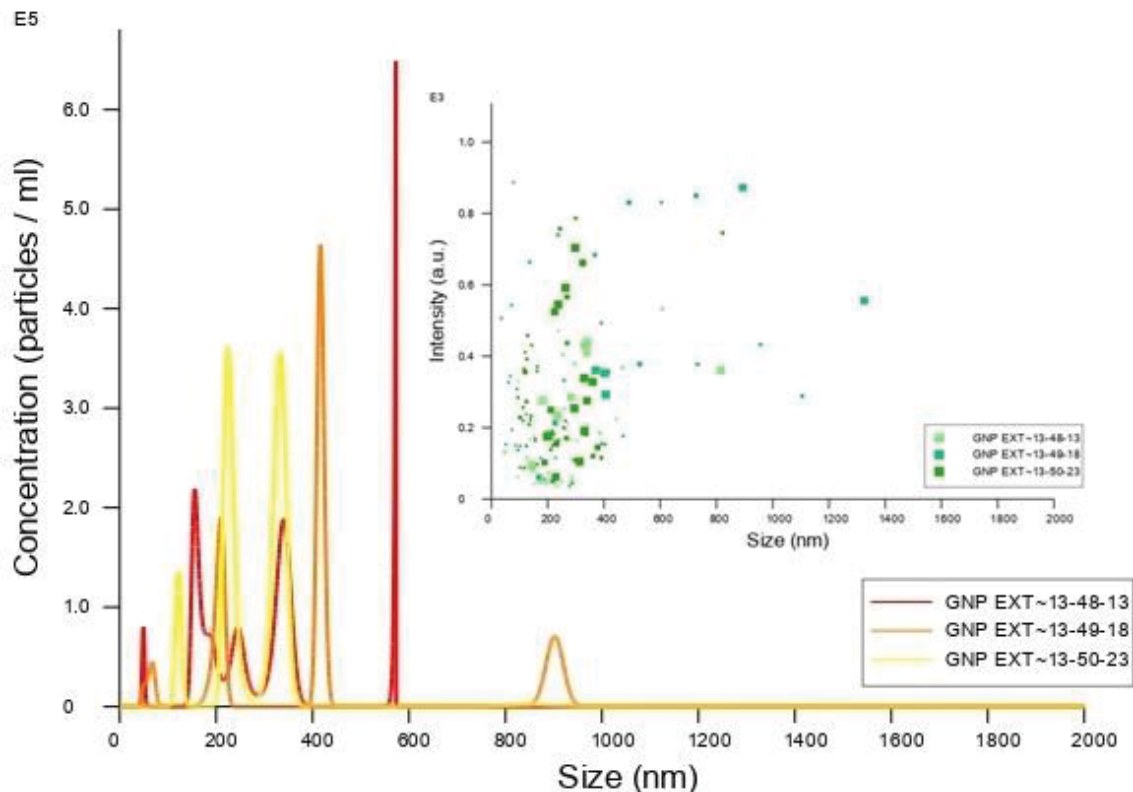
I) O fato de não ocorrer deslocamentos na banda de absorvância impacta positivamente, uma vez que mesmo após dias de armazenamento, as nanopartículas aparentam manter suas características morfológicas originais, garantindo que seja sempre o mesmo material a ser empregado;

II) Porém, se a concentração de partículas é um fator determinante na aplicação, é importante conhecer a variação da concentração do insumo perante sua estocagem e, como modo de minimizar impactos no processo, padronizar o tempo máximo de utilização destas nanopartículas após sua síntese.

2.2.3 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

Na varredura de distribuição de tamanho, em ambos os casos, a maior parte das partículas formadas foram detectadas com diâmetros inferiores a 400 nm, tanto para a biossíntese quanto para a síntese de referência (FIGURAS 13 E 14).

FIGURA 13 – DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO HIDRODINÂMICO DA BIOSÍNTESE.

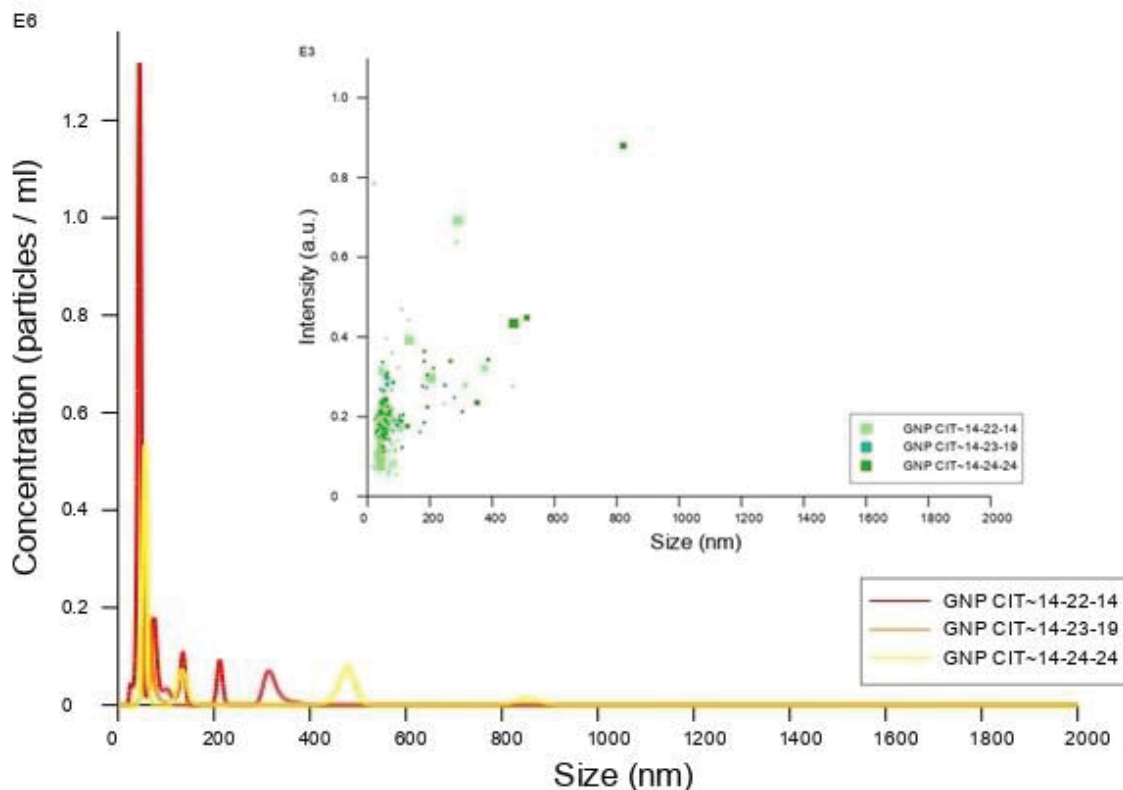


Fonte: Autor (2022).

A diferença entre ambas está na variação dentro desta faixa, visto que na síntese com citrato percebe-se uma grande formação de partículas menores, enquanto o uso do extrato como agente redutor gerou maior variação de tamanho de partícula. De certo modo, estes resultados caminham na mesma direção dos valores estimados através da técnica de UV-Vis, que também havia demonstrado a possibilidade de haver ordens diferentes de tamanhos nas partículas formadas de acordo com o agente redutor utilizado.

Técnicas como NTA realiza medições do diâmetro da partícula em meio aquoso, portanto não é surpreendente encontrar valores altos nestas análises, uma vez que a medida considera além do diâmetro real da partícula, mas também suas interações (KUMAR et al., 2019).

FIGURA 14 – DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO HIDRODINÂMICO DA SÍNTESE DE REFERÊNCIA.



Fonte: Autor (2022).

Outro resultado importante nesta análise diz respeito a concentração de partículas. Como foi apontado anteriormente nos resultados de UV-Vis, há uma questão acerca da concentração de nanopartículas que deve ser considerada na sua

posterior utilização. A TABELA 8 demonstra que foram detectadas uma concentração maior de partículas na síntese obtida com extrato em relação a síntese de referência, assim como foi verificado nos resultados de UV-Vis.

TABELA 8 – COMPARATIVO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS FORMADAS UTILIZANDO CITRATO DE SÓDIO E O EXTRATO DA SEMENTE DE MAMÃO.

Amostra	GNP citrato (partículas/ml)	GNP extrato (partículas/ml)
1	1,06.10 ⁹	9,80.10 ⁸
2	1,98.10 ⁸	8,75.10 ⁹
3	5,80.10 ⁸	1,21.10 ⁹
Valor médio	6,13.10⁸	1,02.10⁹

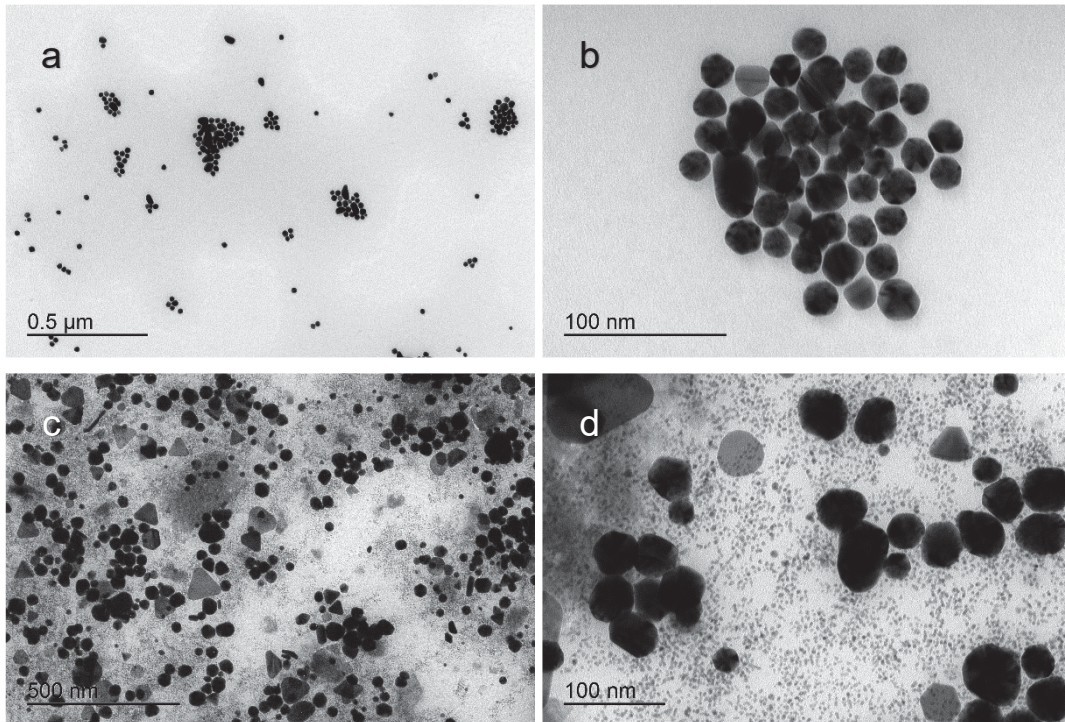
Fonte: Autor (2022).

Por último, um diferencial desta análise, é a possibilidade de visualizar durante a realização da mesma, o movimento browniano das nanopartículas, que está associado a estabilidade coloidal (BRIFFA et al., 2020). As nanopartículas de referência se apresentaram muito mais agitadas, com alguma tendência a aglomeração, enquanto as biossintetizadas possuíam movimentações mais lentas e grande distanciamento entre si.

2.2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As nanopartículas de referência apresentaram características morfológicas similares ao reportado na literatura (FIGURA 15A e 15B), com formato esférico bem definido e diâmetro em torno de 20 nm (ZHAO; LI; ASTRUC, 2013). Este tamanho diverge dos valores encontrados na análise de NTA, uma vez que as condições de avaliação são diferentes. Como mencionado anteriormente, o diâmetro hidrodinâmico engloba o tamanho da partícula e sua interação com o meio (aquoso). Na microscopia eletrônica, a análise é realizada na ausência de umidade, permitindo avaliar o tamanho da partícula sem maior interação com o meio. Neste caso, este resultado se aproxima mais da estimativa feita inicialmente através da análise de UV-Vis, que determinou tamanhos em torno de 9 nm.

FIGURA 15 – NANOPARTÍCULAS DE OURO DE REFERÊNCIA, OBTIDAS COM CITRATO DE SÓDIO (A, B) E BIOSINTETIZADAS (C, D).



Fonte: Autor (2022).

Para as nanopartículas biossintetizadas (FIGURAS 15C e 15D), esperava-se uma variedade de formatos, visto que muitos trabalhos que utilizaram outros extratos produziram coloides com mesclas de, no mínimo, dois formatos diferentes de nanopartículas de ouro (BOTTEON et al., 2021; NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2008). De fato, parte das nanopartículas formadas apresentaram formatos diversos como tetraedros, cubos e bastonetes, porém a grande maioria se apresentou no formato esférico.

Nas análises anteriores, de UV-Vis e NTA, foi detectado que esta biossíntese apresentaria tamanhos de partículas maiores que a síntese de referência, e que a variação de diâmetros também poderia ser maior. Assim sendo, na microscopia eletrônica foi possível confirmar estas informações, visto que há partículas com tamanhos desde 15 nm até 60 nm, porém como visto na distribuição de tamanho hidrodinâmico, há maior ocorrência de partículas menores em relação a partículas com diâmetros maiores e, estes valores ficam abaixo da primeira estimativa feita através da análise de UV-Vis. Uma possível explicação seria que a correlação realizada por HAISS et al. (2007) pode não se aplicar tão adequadamente em casos

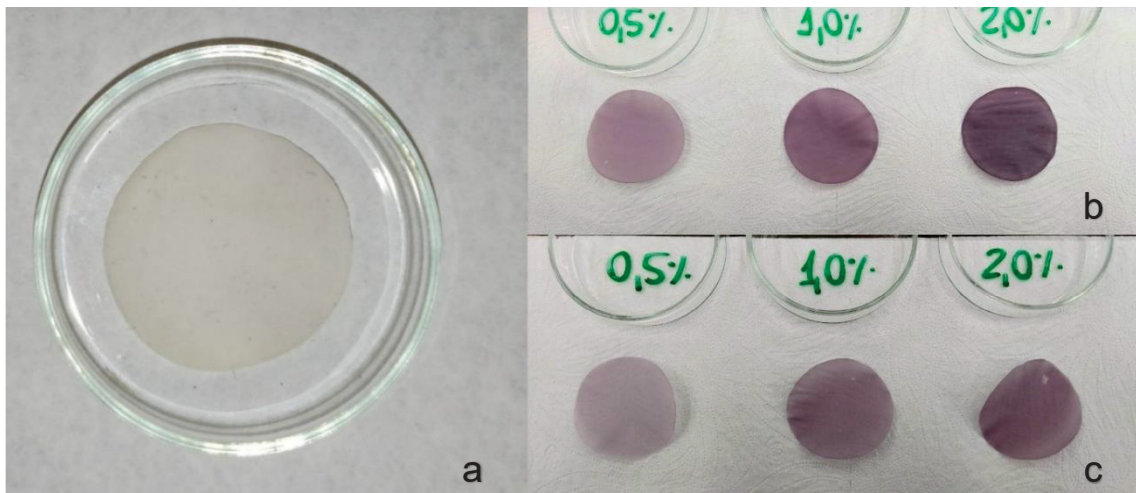
onde as nanopartículas são produzidas a partir de agentes redutores tão complexos quimicamente como um extrato orgânico.

Em resumo, verificou-se que foi possível utilizar o extrato da semente de mamão para obter nanopartículas de ouro com uma morfologia mais heterogênea em relação a síntese de referência, porém houve uma concentração maior de partículas formadas e sua resposta ao armazenamento a baixa temperatura foi melhor. Além disso, um ponto curioso foi a baixa agitação das nanopartículas na avaliação do movimento browniano.

2.3 MEMBRANAS DE NANOCELULOSE DOPADAS

Após a dopagem, as membranas apresentaram coloração em tons de roxo, com intensidades diferentes de acordo com o percentual de dopagem (FIGURA 16). Fazendo um comparativo entre cada nanopartícula, principalmente na dopagem de 2,0%, percebe-se visualmente a diferença de concentração das sínteses averiguada previamente na análise de NTA.

FIGURA 16 – MEMBRANAS DE NANOCELULOSE SEM DOPAGEM (a), DOPADAS COM AS NANOPARTÍCULAS BIOSINTETIZADAS (b) E DE REFERÊNCIA (c).



Fonte: Autor (2022).

2.3.1 Adesão das nanopartículas por espectroscopia UV-Vis

Por meio da avaliação dos valores absorvância das dispersões antes de após a produção das membranas, pode-se estimar se cada nanopartícula, nas diferentes

concentrações, apresentou ou não uma boa aderência à nanofibrilas de celulose. Deve-se frisar que este estudo teve como objetivo avaliar as nanopartículas que não ficaram nas nanofibrilas durante o processo de produção das membranas.

Conforme apresentado na TABELA 9, nas membranas dopadas com as nanopartículas de ouro sintetizadas com citrato de sódio verificou-se que as mesmas têm baixa adesão à nanocelulose. Os valores de perda neste caso ficaram próximos da totalidade, ou seja, quase todas as nanopartículas adicionadas mostraram maior afinidade pela água da dispersão que pela nanocelulose.

Já para as nanopartículas biossintetizadas, percebeu-se o oposto: houve uma boa interação entre com nanofibrilas e as perdas foram bem menores em comparação as nanopartículas de referência. Observa-se que essa perda reduziu conforme aumentou-se a quantidade de nanopartículas adicionadas.

TABELA 9 – PERCENTUAIS DE PERDA DAS NANOPARTÍCULAS DURANTE A DOPAGEM DAS MEMBRANAS DE NFC.

Amostra	% Inicial	Etapa processo	Absorbância	% Perda
NFC:GNPcit	0,50%	antes filtrar	0,039	~100%
		após filtrar	0,042	
	1,00%	antes filtrar	0,048	98%
		após filtrar	0,047	
	2,00%	antes filtrar	0,062	92%
		após filtrar	0,057	
NFC:GNPext	0,50%	antes filtrar	0,053	81%
		após filtrar	0,043	
	1,00%	antes filtrar	0,074	54%
		após filtrar	0,040	
	2,00%	antes filtrar	0,120	34%
		após filtrar	0,041	

Fonte: Autor (2022).

Existem algumas possibilidades para esta situação. Primeiro, a falta de afinidade entre a nanocelulose e as nanopartículas, por alguma questão de cargas

superficiais, uma vez que o citrato de sódio carrega negativamente a partícula, por exemplo (SLEPIČKA et al., 2020). Neste caso, considera-se que a permanência de uma pequena parcela das nanopartículas possa ocorrer por barreira física, com o entrelaçamento das fibrilas na formação da membrana dificultando a mobilidade destas.

Outra questão pode ser levantada quanto ao método de preparação das membranas implicar numa perda parcial das nanopartículas no início do processo, antes que as nanofibrilas iniciem uma barreira física suficiente para evitar que mais nanopartículas se percam. No entanto, esta questão pode ser atrelada ao movimento browniano verificado anteriormente, uma vez que mesmo havendo uma barreira física como as fibrilas, uma maior agitação das nanopartículas pode facilitar a passagem destas através da membrana e, conseqüentemente sua perda (GUSTAFSSON et al., 2018).

2.3.2 Espectroscopia por Dispersão de Elétrons (EDS)

A partir do espectro de EDS foi possível confirmar a presença das nanopartículas de ouro nas membranas de nanocelulose (FIGURA 17).

No entanto, anteriormente verificou-se que as nanopartículas de referência não haviam aderido com tanta eficácia nas membranas de NFC, mesmo que visualmente tais membranas ainda apresentassem a olho nu uma coloração arroxeada que pode ser atribuída a presença de nanopartículas de ouro.

FIGURA 17 – ESPECTRO EDS DA MEMBRANA DOPADA COM 2,0% DE NANOPARTÍCULAS BIOSINTETIZADAS (NFC:GNPext 2,0%).



Fonte: Autor (2022).

Nesse sentido, a análise de EDS também foi utilizada de forma complementar ao estudo realizado anteriormente com a técnica de UV-Vis durante a produção das membranas. Porém, os resultados são referentes as nanopartículas que permaneceram atreladas de alguma forma às nanofibrilas após a formação das membranas.

Na TABELA 10 pode-se observar a análise elementar de cada membrana e o percentual de nanopartículas perdidas. As perdas das nanopartículas biossintetizadas foram próximos aos valores detectados pela avaliação apresentada na seção 3.3.1, corroborando o que foi sugerido anteriormente, em que o aumento da quantidade de nanopartículas reduz as perdas e que esta nanopartícula parece interagir melhor com as fibrilas, seja por afinidade química ou física.

TABELA 10 – ANÁLISE ELEMENTAR POR EDS DAS MEMBRANAS DOPADAS

Amostra	C (%)	O (%)	Au (%)	% Perda
NFC:GNPext 0,5%	50,3	49,6	0,1*	80%
NFC:GNPext 1,0%	51,0	48,6	0,4	60%
NFC:GNPext 2,0%	53,4	45,2	1,4	30%
NFC:GNPcit 0,5%	50,2	49,6	0,3*	40%
NFC:GNPcit 1,0%	50,3	49,7	-	100%
NFC:GNPcit 2,0%	50,9	49,1	-	100%
NFC	50,2	49,8	-	-

*Estes valores foram detectados pelo equipamento como residuais.

Fonte: Autor (2022).

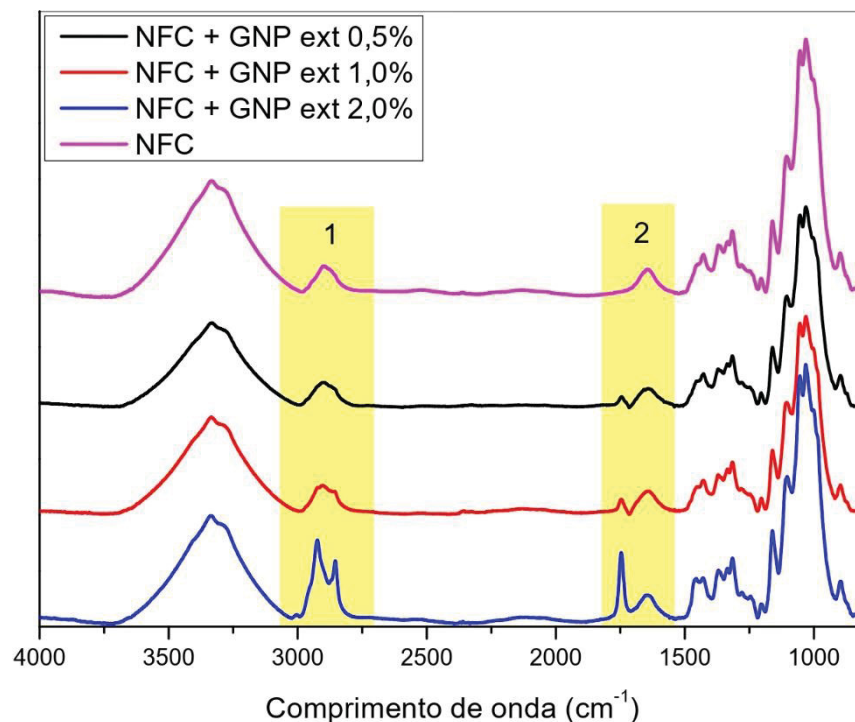
Já as nanopartículas de referência, com citrato de sódio, não foram detectadas pelo equipamento. Aqui vale ressaltar que, após não obter sucesso na identificação do ouro, foram realizadas diversas tentativas extras em várias regiões das membranas para identificação do ouro, porém sem sucesso. Como a membrana NFC:GNPcit0,5% foi a única que apresentou um valor residual da presença de nanopartículas, pode-se deduzir que as outras duas concentrações também possuam resíduos das nanopartículas de referência, até mesmo porque na avaliação do filtrado

foi detectado que as membranas NFC:GNPcit 1,0% e NFC:GNPcit 2,0% tiveram uma retenção mínima de nanopartículas.

2.3.3 Espectroscopia no Infravermelho médio (ATR-IR)

Através da análise de espectroscopia foi possível atestar a presença das nanopartículas biossintetizadas nas membranas dopadas. Na FIGURA 18 é possível visualizar que, principalmente nas regiões destacadas, conforme a concentração de GNP biossintetizada aumenta se torna mais evidente uma mudança nas bandas referentes as ligações de carbono alifático (região 1) e ligações C=O (região 2), que na NFC pura não são evidentes.

FIGURA 18 – ESPECTRO DE ATR DAS MEMBRANAS DOPADAS COM AS NANOPARTÍCULAS BIOSSINTETIZADAS.



Fonte: Autor (2022).

As demais regiões acabam por se sobrepor as bandas representadas pela própria nanocelulose. Todavia, estes resultados são bons indicativos, assim como os

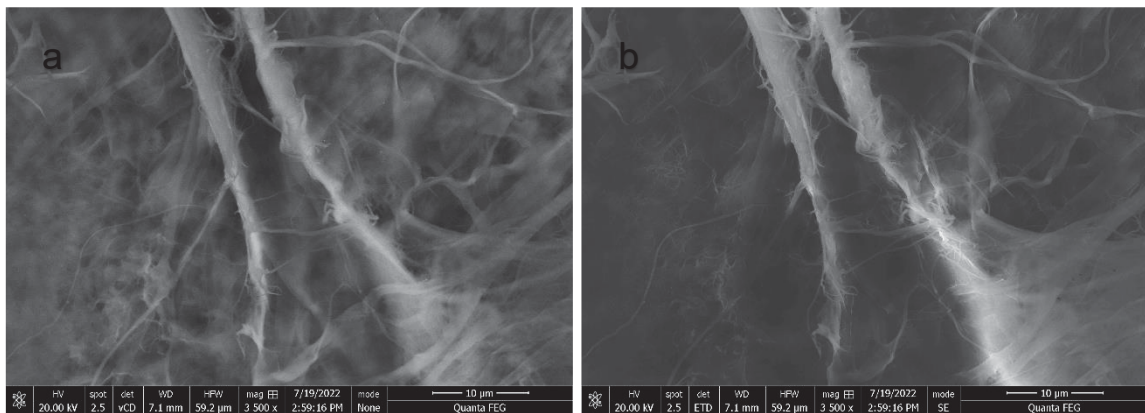
resultados preliminares de UV-Vis, que as nanopartículas biossintetizadas tiveram uma boa aderência nas membranas de nanocelulose.

2.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução (MEV-FEG)

Paralelamente a análise de EDS, inclusive para auxiliar na análise elementar das membranas dopadas com as nanopartículas de referências, as membranas foram avaliadas por Microscopia Eletrônica de Varredura quanto a sua morfologia e, principalmente, a deposição das nanopartículas de ouro nas nanofibrilas. A análise completa com todas as imagens está disponível no APÊNDICE 4.

As imagens das nanofibrilas sem dopagem podem ser vistas na FIGURA 19, com a presença de algumas fibras centrais e fibrilas de nanocelulose ramificadas ocupando seu entorno.

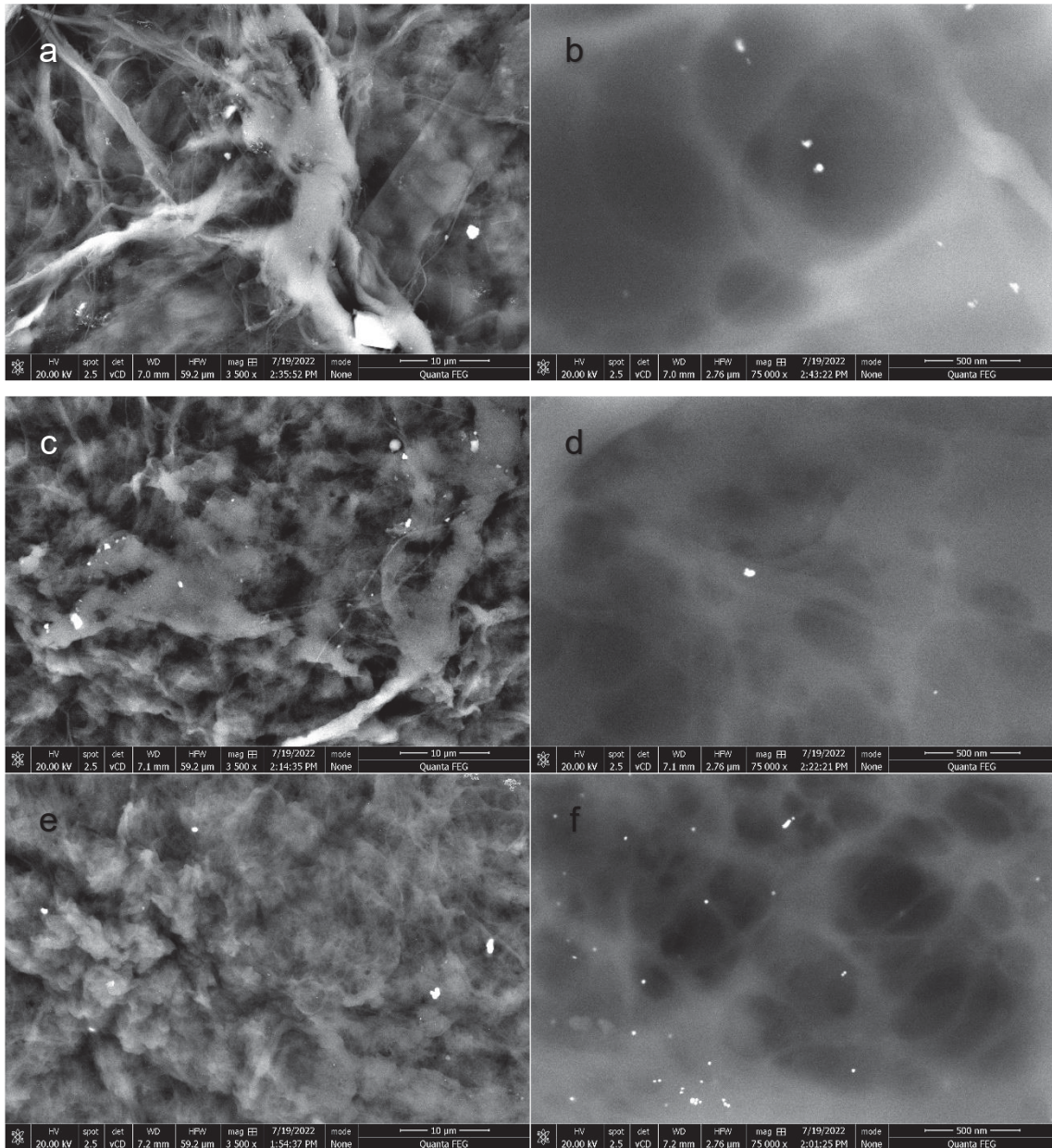
FIGURA 19 – IMAGEM DE ELÉTRONS RETROESPALHADOS (a) E SECUNDÁRIOS (b) DAS NANOFIBRILAS DE CELULOSE SEM DOPAGEM.



Fonte: Autor (2022).

Nas membranas NFC:GNPcit 0,5 e 1,0% (FIGURA 20 B e D) a presença das nanopartículas de referência foi detectada, porém de forma muito residual, com poucas regiões de maior contraste apresentando apenas uma porção pequena nanopartículas e grande parte das fibrilas não demonstrando ter ocorrido dopagem.

FIGURA 20 – IMAGEM DE ELÉTRONS RETROESPALHADOS DAS MEMBRANAS NFC:GNPcit 0,5% (a,b), NFC:GNPcit 1,0% (c,d) e NFC:GNPcit 2,0% (e,f).



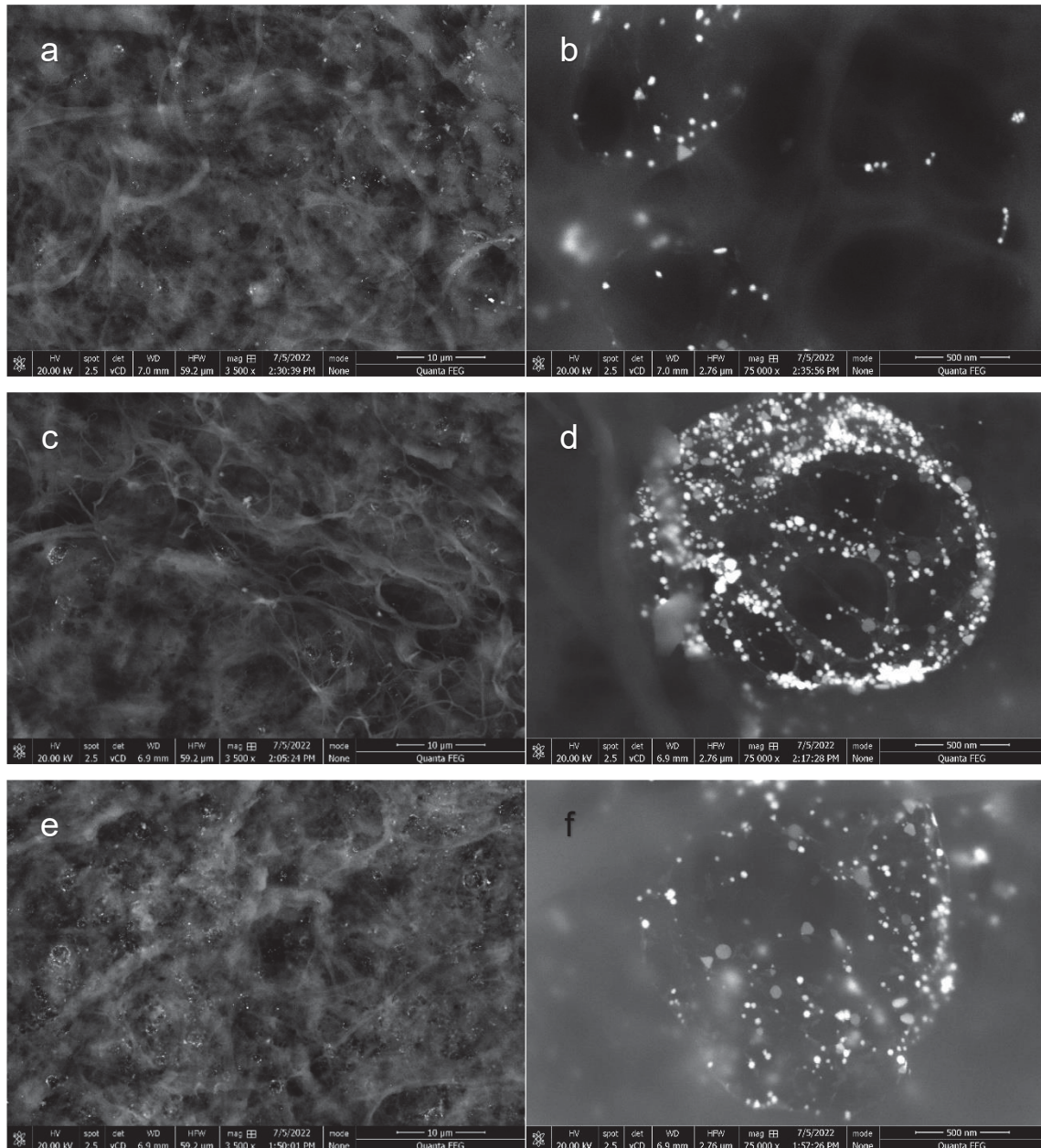
Fonte: Autor (2022).

A detecção das nanopartículas de referência foi um pouco mais notável na NFC:GNPcit 2,0% (FIGURA 20F), porém também de forma residual, reiterando o que já foi apontado anteriormente para estas membranas terem baixa interação com a síntese de referência.

A biossíntese, por outro lado, demonstra na FIGURA 21 um comportamento oposto. Durante a análise das membranas, mesmo na menor concentração, observou-se a presença das nanopartículas em diferentes regiões da superfície, talvez devido a maior concentração de nanopartículas formada na biossíntese com o extrato, como

visto na análise de NTA. Com o aumento da concentração de nanopartículas, observou-se uma maior incidência de regiões com alto brilho, com formação de pequenos aglomerados.

FIGURA 21 – IMAGEM DE ELÉTRONS RETROESPALHADOS DAS MEMBRANAS: NFC:GNPext 0,5% (a, b), NFC:GNPext1,0% (c, d) E NFC:GNPext 2,0% (e, f).



Fonte: Autor (2022).

Percebe-se que as nanopartículas biossintetizadas costumam se alojar em regiões próximas a vazios entre as nanofibrilas, especialmente em fibrilas menores. Uma distribuição similar pode ser avaliada por MOHAMMADALINEJHAD; ALMASI;

ESMAILI (2019) com nanopartículas de prata biossintetizadas distribuídas próximas a regiões vazias entre fibras de CNF.

Assim como MONIRI et al. (2018b) com suas nanopartículas de Fe_3O_4 biossintetizadas em BNC, aqui também é possível perceber que as nanopartículas de ouro biossintetizadas estão profundamente envolvidas com as fibrilas de celulose, corroborando os resultados anteriores e demonstrando uma facilidade maior que as nanopartículas de referência em formar membranas dopadas.

Considerando que outros trabalhos (MOCANU et al., 2019; MONIRI et al., 2018b) com nanopartículas biossintetizadas também apresentaram nanopartículas diversas com relativa facilidade em impregnar membranas de nanocelulose, é possível que tal característica esteja associada a composição dos extratos naturais.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A extração da semente de mamão foi realizada utilizando-se etanol, obtendo-se um rendimento de 30% com arraste de compostos de suma importância para realização da biossíntese das nanopartículas de ouro, especialmente por se tratarem de compostos com potencial antioxidante.

As nanopartículas biossintetizadas com o extrato apresentaram maior variação morfológica em relação as nanopartículas produzidas com citrato de sódio, no entanto isso pode ser compreendido pela ampla composição que extratos naturais apresentam.

Em contrapartida, ao ser impregnada nas membranas de nanocelulose as nanopartículas biossintetizadas com o extrato da semente de mamão demonstraram uma afinidade maior que as nanopartículas de citrato de sódio, impactando assim na facilidade de produção deste nanocompósito, visto que apenas a interação física entre as nanofibrilas e as nanopartículas biossintetizadas foram suficientes para permitir a produção das membranas dopadas, evitando etapas adicionais no processo de impregnação.

Os estudos de UV-Vis do filtrado, complementado pela análise de EDS, comprovaram que houveram menos perdas de nanopartículas biossintetizadas durante a produção das membranas dopadas e, posteriormente, confirmou-se pelas imagens de MEV-FEG a interação das nanopartículas com as fibrilas.

3.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Algumas sugestões de continuidade se referem acerca da biossíntese das nanopartículas de ouro com o extrato da semente de mamão, envolvendo a possibilidade de realizar uma separação dos tamanhos de partículas ou realizar alguma modificação no procedimento para reduzir a variação morfológica apresentada.

Também é desejável alguns estudos se ocorre a liberação destas partículas e, caso sim, como é o mecanismo de liberação destas das membranas. E além disso, a investigação atrelada a algumas possibilidades de aplicação, seja na área biomédica como material cicatrizante e antimicrobiano, ou em aplicações de cunho biotecnológico, como utilização em embalagens e filtração de efluentes.

REFERÊNCIAS

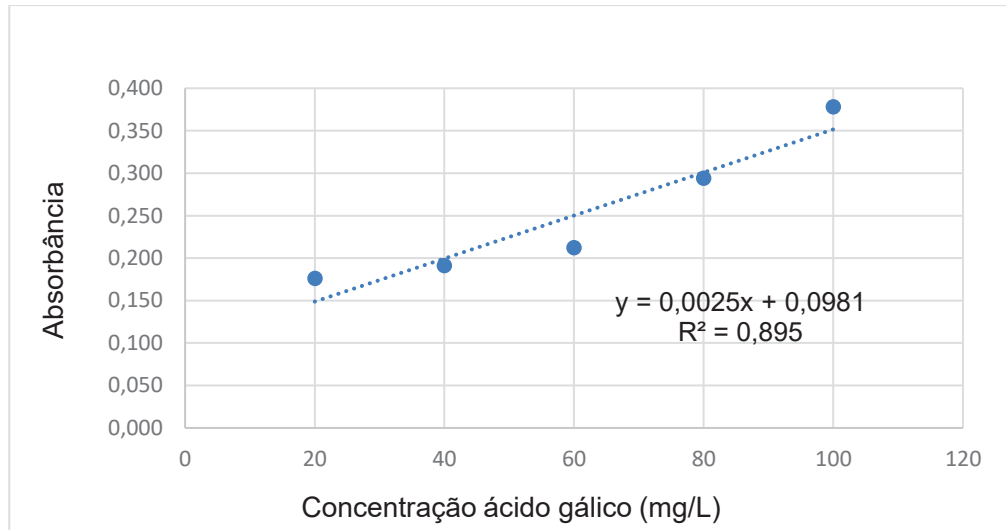
- AGADA, R. et al. Antioxidant and anti-diabetic activities of bioactive fractions of Carica papaya seeds extract. **Journal of King Saud University - Science**, v. 33, n. 2, p. 101342, 2021.
- AHMED, S. et al. **Biosynthesis of gold nanoparticles: A green approach** **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, ago. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.04.034>>. Acesso em: 1 set. 2022
- ALLE, M. et al. Shape recoverable, Au nanoparticles loaded nanocellulose foams as a recyclable catalyst for the dynamic and batch discoloration of dyes. **Carbohydrate Polymers**, v. 258, p. 117693, 15 abr. 2021.
- ANNAMALAI, A. et al. Green synthesis, characterization and antimicrobial activity of Au NPs using Euphorbia hirta L. leaf extract. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 108, p. 60–65, 1 ago. 2013.
- ÁVILA, S. et al. Carica papaya seed enhances phytochemicals and functional properties in cornmeal porridges. **Food Chemistry**, v. 323, p. 126808, 1 set. 2020.
- BALASUBRAMANIAN, S. K. et al. Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles. **Biomaterials**, v. 31, n. 34, p. 9023–9030, dez. 2010.
- BOISSELIER, E.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 6, p. 1759–1782, 27 maio 2009.
- BOTTEON, C. E. A. et al. Biosynthesis and characterization of gold nanoparticles using Brazilian red propolis and evaluation of its antimicrobial and anticancer activities. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1974, 2021.
- BRIFFA, S. M. et al. Nanoparticle tracking analysis of gold nanoparticles in aqueous media through an inter-laboratory comparison. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2020, n. 164, p. 1–12, 20 out. 2020.
- CHEN, H. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive properties of flavonoids from the fruits of black mulberry (Morus nigra L). **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0153080, 5 abr. 2016.
- DELGADO-AGUILAR, M. et al. Are Cellulose Nanofibers a Solution for a More Circular Economy of Paper Products? **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 20, p. 12206–12213, 2015.
- DESHMUKH, A. R.; DIKSHIT, P. K.; KIM, B. S. Green in situ immobilization of gold and silver nanoparticles on bacterial nanocellulose film using Punica granatum peels extract and their application as reusable catalysts. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 205, p. 169–177, 30 abr. 2022.
- DOS SANTOS HAUPENTHAL, D. P. et al. Effects of treatment with gold nanoparticles in a model of acute pulmonary inflammation induced by lipopolysaccharide. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 108, n. 1, p. 103–115, 2020.
- EDWARDS, P. P.; THOMAS, J. M. **Gold in a metallic divided state - From Faraday to present-day nanoscience** **Angewandte Chemie - International Edition**, 2007.
- EUSTIS, S.; EL-SAYED, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. **Chem. Soc. Rev.**, v. 35, n. 3, p. 209–217, 28 fev. 2006.
- GHAFFARILALEH, V.; FISHER, D.; HENKEL, R. Carica papaya seed extract slows human sperm. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 241, n. October 2018, 2019.

- GOLMOHAMMADI, H. et al. **Nanocellulose in Sensing and Biosensing Chemistry of Materials**, 2017. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>. Acesso em: 3 fev. 2022
- GUSTAFSSON, O. et al. **Significance of Brownian Motion for Nanoparticle and Virus Capture in Nanocellulose-Based Filter Paper**. [s.l.: s.n.].
- HAISS, W. et al. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 11, p. 4215–4221, 1 jun. 2007.
- HAMEED, B. H. Evaluation of papaya seeds as a novel non-conventional low-cost adsorbent for removal of methylene blue. **Journal of Hazardous Materials**, v. 162, n. 2–3, p. 939–944, 2009.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Tabela 5457 - Área plantada ou destinada à colheita, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras temporárias e permanentes**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457>>. Acesso em: 18 mar. 2022.
- IORDĂNESCU, O. A. et al. A DPPH· Kinetic Approach on the Antioxidant Activity of Various Parts and Ripening Levels of Papaya (*Carica papaya* L.) Ethanolic Extracts. **Plants**, v. 10, n. 8, p. 1679, 15 ago. 2021.
- IZADIYAN, Z. et al. Cytotoxicity assay of biosynthesis gold nanoparticles mediated by walnut (*Juglans regia*) green husk extract. **Journal of Molecular Structure**, v. 1151, p. 97–105, 2018.
- JAISWAL, P.; SINGH, D. K. Molluscicidal activity of *Carica papaya* and *Areca catechu* against the freshwater snail *Lymnaea acuminata*. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3–4, p. 264–270, 2008.
- KARGARZADEH, H. et al. **Recent developments in nanocellulose-based biodegradable polymers, thermoplastic polymers, and porous nanocomposites** *Progress in Polymer Science*, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.07.008>>
- KUMAR, A. et al. A Novel Approach towards Synthesis and Characterization of Non-Cytotoxic Gold Nanoparticles Using Taurine as Capping Agent. **Nanomaterials**, v. 10, n. 1, p. 45, 24 dez. 2019.
- LEE, W. J.; LEE, M. H.; SU, N. W. Characteristics of papaya seed oils obtained by extrusion-expelling processes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2348–2354, out. 2011.
- LIU, X. Y. et al. **Gold nanoparticles: synthesis, physiochemical properties and therapeutic applications in cancer** *Drug Discovery Today* Elsevier Current Trends, , 1 maio 2021.
- MOCANU, A. et al. Bacterial cellulose films with ZnO nanoparticles and propolis extracts: Synergistic antimicrobial effect. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 17687, 2019.
- MOHAMMADALINEJHAD, S.; ALMASI, H.; ESMAILI, M. Simultaneous green synthesis and in-situ impregnation of silver nanoparticles into organic nanofibers by *Lythrum salicaria* extract: Morphological, thermal, antimicrobial and release properties. **Materials Science and Engineering C**, v. 105, 1 dez. 2019.
- MONIRI, M. et al. Molecular study of wound healing after using biosynthesized BNC/Fe₃O₄ nanocomposites assisted with a bioinformatics approach. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 13, p. 2955–2971, 21 maio 2018a.
- MONIRI, M. et al. In vitro molecular study of wound healing using biosynthesized bacteria nanocellulose/ silver nanocomposite assisted by bioinformatics databases. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 5097–5112, 12 set. 2018b.
- NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Coriander leaf mediated biosynthesis of gold nanoparticles. **Materials Letters**, v. 62, n. 30, p. 4588–4590, dez. 2008.

- NAYAK, B. S. et al. Wound-healing potential of an ethanol extract of *Carica papaya* (Caricaceae) seeds. **International Wound Journal**, v. 9, n. 6, p. 650–655, dez. 2012.
- PATHAK, N. et al. Cancer Chemopreventive Effects of the Flavonoid-Rich Fraction Isolated from Papaya Seeds. **Nutrition and Cancer**, v. 66, n. 5, p. 857–871, 4 jul. 2014.
- RAMALINGAM, V. **Multifunctionality of gold nanoparticles: Plausible and convincing properties** *Advances in Colloid and Interface Science* Elsevier, , 1 set. 2019.
- RAZAVI, R. et al. Biosynthesis of metallic nanoparticles using mulberry fruit (*Morus alba* L.) extract for the preparation of antimicrobial nanocellulose film. **Applied Nanoscience (Switzerland)**, v. 10, n. 2, p. 465–476, 2020.
- RÍOS, J. L. **Effects of triterpenes on the immune system** *Journal of Ethnopharmacology*, mar. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874110000255>>. Acesso em: 22 mar. 2022
- SALLA, S. et al. Antioxidant activity of papaya seed extracts against H₂O₂ induced oxidative stress in HepG2 cells. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 293–297, 1 mar. 2016.
- SENAI. **Introdução a Nanociência e Nanotecnologias**. 1a edição ed. São Paulo: SENAI-SP Editora, 2014.
- SLEPIČKA, P. et al. **Methods of gold and silver nanoparticles preparation** *Materials*, 18 dez. 2020. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/materials>
- TAN, C. X.; TAN, S. T.; TAN, S. S. **An overview of papaya seed oil extraction methods** *International Journal of Food Science and Technology*, 2020.
- TAVKER, N. et al. Removal of cadmium and chromium by mixture of silver nanoparticles and nano-fibrillated cellulose isolated from waste peels of citrus sinensis. **Polymers**, v. 13, n. 2, p. 1–14, 12 jan. 2021.
- THOMAS, P. et al. Comprehensive review on nanocellulose: Recent developments, challenges and future prospects. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 110, p. 103884, out. 2020.
- TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. The Formation of Colloidal Gold. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 57, n. 7, p. 670–673, 1 jul. 1953.
- VILAHUR, G. et al. Phytosterols and Inflammation. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 37, p. 6724–6734, 17 dez. 2019.
- WOYENGO, T. A.; RAMPRASATH, V. R.; JONES, P. J. H. **Anticancer effects of phytosterols** *European Journal of Clinical Nutrition*, 3 jul. 2009. Disponível em: <<https://link.gale.com/apps/doc/A203273300/AONE?u=capes&sid=bookmark-AONE&xid=63752958>>
- WU, Z. et al. Multifunctional nano-cellulose composite films with grape seed extracts and immobilized silver nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 205, p. 447–455, 1 fev. 2019.
- ZALESKA-MEDYNSKA, A. et al. Noble metal-based bimetallic nanoparticles: The effect of the structure on the optical, catalytic and photocatalytic properties. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 229, p. 80–107, 1 mar. 2016.
- ZHAO, P.; LI, N.; ASTRUC, D. **State of the art in gold nanoparticle synthesis** *Coordination Chemistry Reviews*, fev. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.09.002>>. Acesso em: 1 set. 2022
- ZHOU, K. et al. Antioxidant Activity of Papaya Seed Extracts. **Molecules**, v. 16, n. 8, p. 6179–6192, 25 jul. 2011.

APÊNDICE 1 – CURVA ÁCIDO GÁLICO.

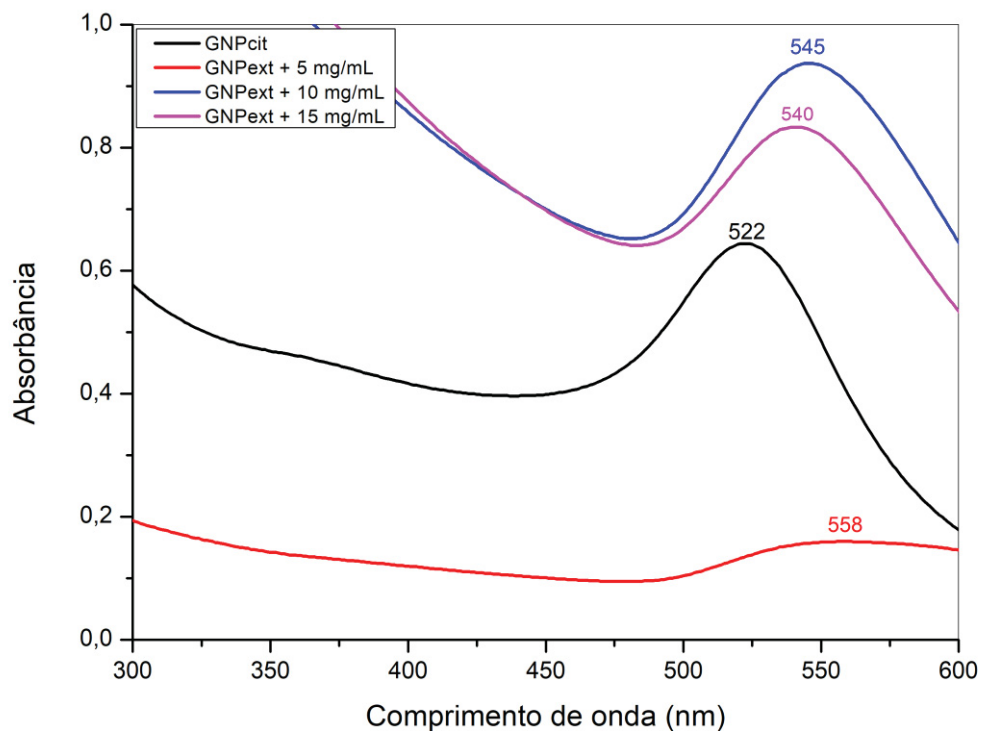
FIGURA 22 – CURVA CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO.



APÊNDICE 2 – DADOS BIOSÍNTESES

Três concentrações do extrato foram utilizadas para preparação das nanopartículas de ouro: 5, 10 e 15 mg/ml. A partir das análises de UV-Vis (FIGURA 23) verificou-se que a síntese com 5 mg/ml não resultou na formação adequada das partículas, visto que bandas baixas e largas são indicativas de grandes variações na morfologia. As concentrações de 10 e 15 mg/ml apresentaram resultados mais adequados, com ressonância plasmon mais próximas do perfil esperado para nanopartículas de ouro (ZALESKA-MEDYNSKA et al., 2016).

FIGURA 23 – ESPECTRO DE UV-VIS DAS BIOSÍNTESES UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO.



Na sequência, realizou-se a análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão, na qual percebeu-se que a síntese de 5 mg/ml (FIGURA 24) apresentou desproporcionalidade nas partículas formadas, com alguns formatos indefinidos e uma disparidade muito grande nos tamanhos, chegando a formar muitas partículas fora da escala nanométrica.

Nas sínteses de 10 e 15 mg/ml (FIGURA 25 e 26) observou-se melhor distribuição morfológica, com formação de partículas em formatos variados, porém majoritariamente esférico, ainda com uma faixa de tamanho ampla, porém com partículas nanométricas e, especialmente, na síntese com 10 mg/ml um melhor aproveitamento do extrato, visto que foi notória a maior formação de partículas nesta síntese, inclusive corroborados pelos dados de absorbância na análise de UV-Vis.

FIGURA 24 – BIOSSÍNTESE REALIZADA COM EXTRATO 5 mg/ml.

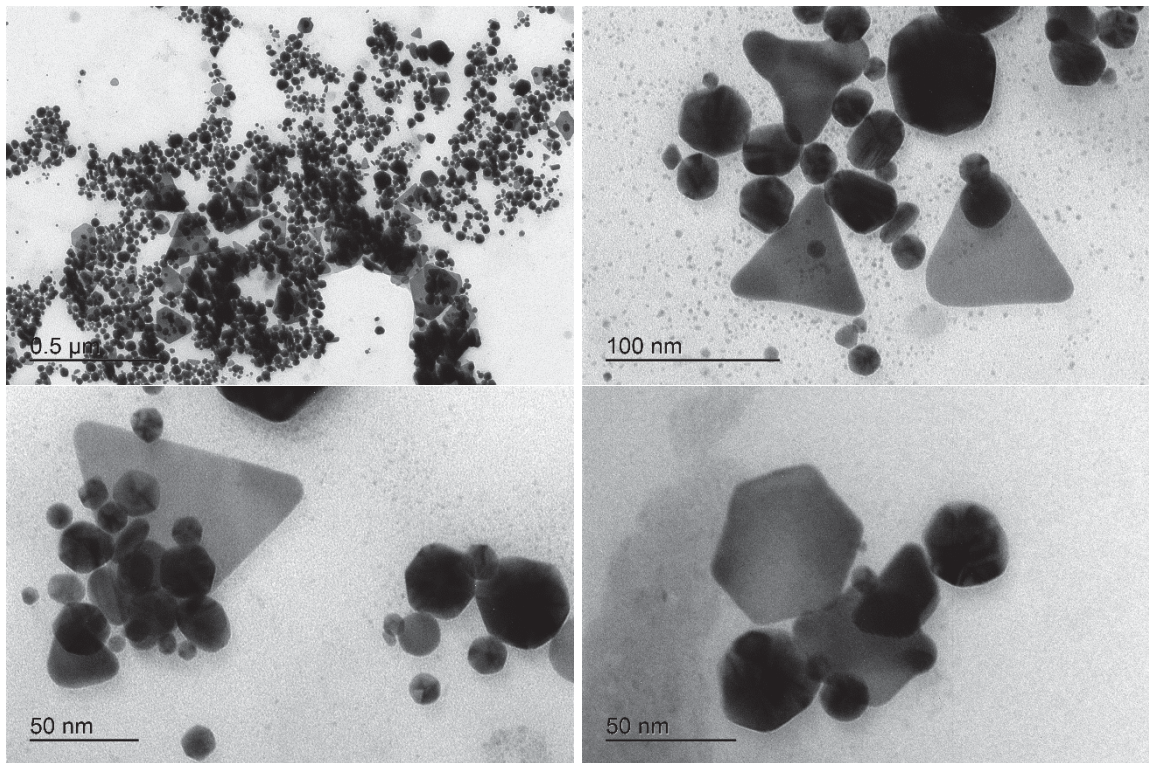


FIGURA 25 – BIOSÍNTESE REALIZADA COM EXTRATO 10 mg/ml.

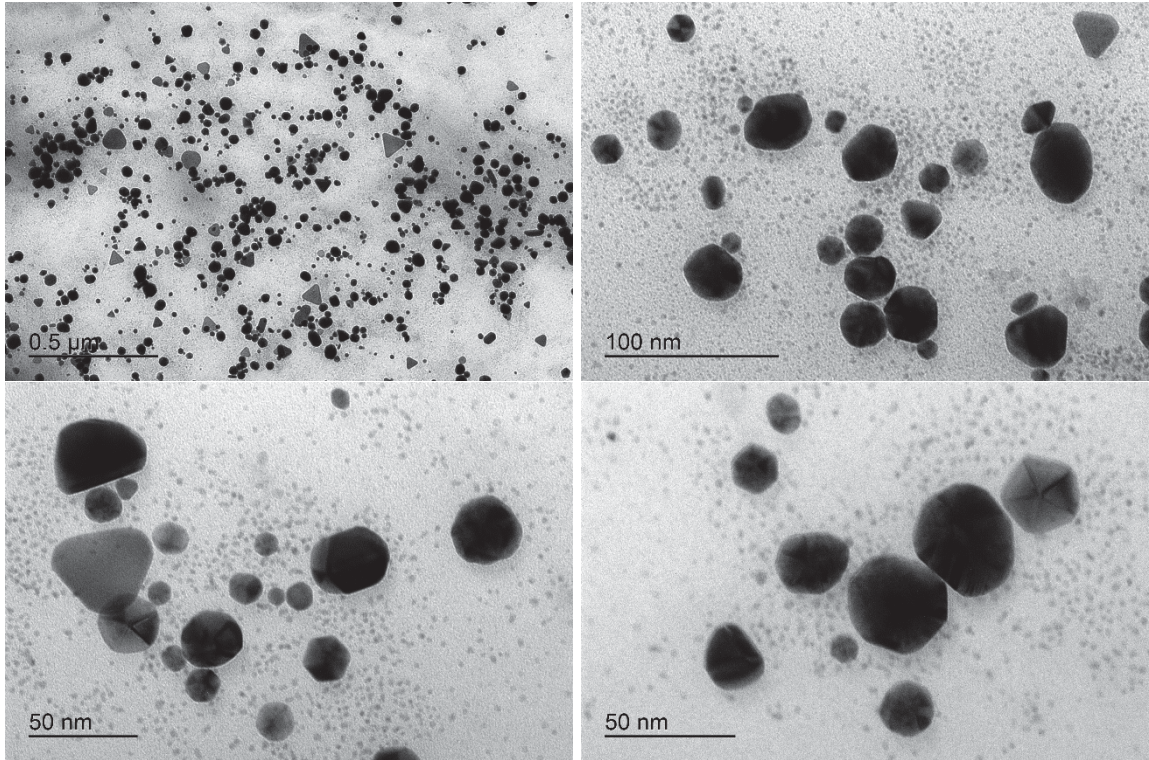
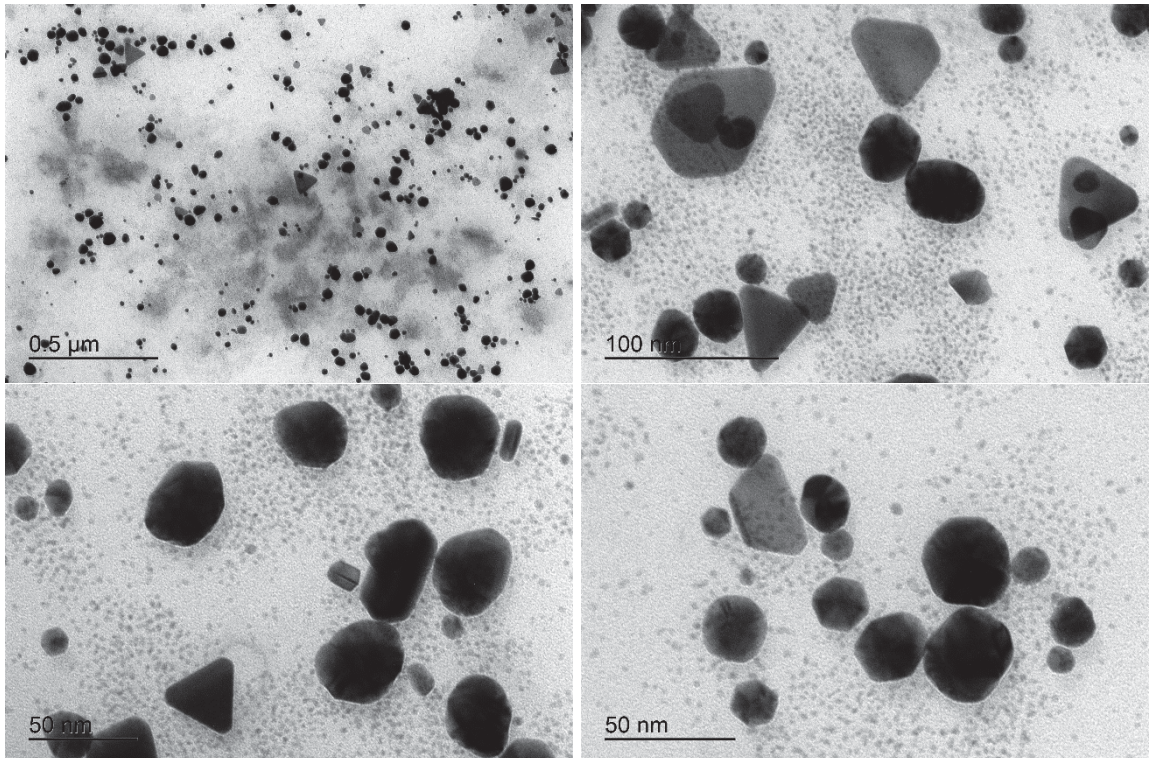


FIGURA 26 – BIOSÍNTESE REALIZADA COM EXTRATO 15 mg/ml.



APÊNDICE 3 – ANÁLISE COMPLETA DE CG-MS.

TABELA 11 – RELATÓRIO COMPLETO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO EXTRATO DA SEMENTE DE MAMÃO.

	TEMPO DE RETENÇÃO	ÁREA (%)	COMPOSTO
1	36,575	17,14	Oleic Acid
2	42,137	15,28	Glycidyl oleate
3	56,475	7,26	.gamma.-Sitosterol
4	45,405	6,70	9-Octadecenoic acid (Z)-, 2,3-dihydr
5	33,195	5,72	n-Hexadecanoic acid
6	86,802	4,47	9-Octadecenoic acid (Z)-, 2-hydroxy-
7	64,784	3,92	E,E,Z-1,3,12-Nonadecatriene-5,14-d
8	39,184	3,73	Glycidyl palmitate
9	27,799	2,89	Dibenzylamine
10	41,989	2,10	Bicyclo[10.1.0]tridec-1-ene
11	44,749	2,06	3-Ethoxy-1-(2-methyl-cyclohexyl)-bu
12	36,908	1,71	Octadecanoic acid
13	60,433	1,68	Z,Z-6,28-Heptatriactontadien-2-one
14	56,760	1,52	Stigmastanol
15	42,645	1,44	Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hy
16	13,170	1,38	Benzyl nitrile
17	54,134	1,37	Campesterol
18	58,576	1,20	9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol, (3.beta.
19	59,461	1,19	.gamma.-Sitostenone
20	42,500	1,11	Glycidyl palmitate
21	19,669	1,00	m-Tolyl isothiocyanate
22	48,949	0,94	Diethyl n-hexadecylmalonate
23	42,323	0,88	Glycidyl oleate
24	54,781	0,76	Stigmasterol
25	43,615	0,68	5-Benzyloxy-2,4-dimethyl-6-methox

26	41,312	0,62	Oleoyl chloride
27	52,107	0,50	.alpha.-Tocopherol-.beta.-D-mannosi
28	15,041	0,49	Dodecane
29	47,114	0,48	Squalene
30	45,758	0,45	Octadecanoic acid, 2,3-dihydroxypro
31	19,481	0,43	Benzene, (isothiocyanatomethyl)-
32	57,474	0,42	4-Campestene-3-one
33	54,411	0,42	Cholestanol
34	65,359	0,41	Z,Z-6,28-Heptatriactontadien-2-one
35	46,100	0,40	Cyclodecasiloxane, eicosamethyl-
36	40,386	0,37	Urea, N,N'-bis(phenylmethyl)-
37	8,440	0,35	Phenol
38	45,132	0,32	Cyclopropanetetradecanoic acid, 2-o
39	20,533	0,32	Tetradecane
40	45,021	0,30	9-Octadecenoic acid (Z)-, 2,3-dihydr
41	28,967	0,27	Tetradecanoic acid
42	32,675	0,25	Palmitoleic acid
43	15,922	0,25	Propyl 2,7-dihydroxy-4,6,9-trioxodec
44	44,190	0,24	Tetracosamethyl-cyclododecasiloxan
45	49,769	0,23	Tetracosamethyl-cyclododecasiloxan
46	47,889	0,23	Tetracosamethyl-cyclododecasiloxan
47	35,327	0,22	Z,Z-6,28-Heptatriactontadien-2-one
48	46,319	0,21	Decyl sulfide
49	55,080	0,20	Tetracosamethyl-cyclododecasiloxan
50	40,205	0,20	9-Octadecenamide, (Z)-
51	51,803	0,19	Cholesterol
52	40,994	0,18	Phenol, 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dim
53	31,043	0,18	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-
54	11,562	0,17	Pyrazine, tetramethyl-

55	10,073	0,17	Benzyl alcohol
56	38,811	0,16	Glycidyl oleate
57	38,387	0,16	Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hy
58	17,922	0,16	4H-1,2,4-triazole-3-carboxylic acid,
59	51,281	0,14	Stigmast-5-en-3-ol, oleate
60	25,454	0,13	Heptadecane
61	14,902	0,12	4-Methyl-2-pentyl acetate
62	62,777	0,11	Stigmastane-3,6-dione, (5.alpha.)-
63	39,983	0,11	Cyclodecasiloxane, eicosamethyl-
64	39,553	0,11	Palmidrol
65	41,199	0,10	Tricyclo[20.8.0.0(7,16)]triacontane,
66	40,637	0,10	2-Benzylsulfanylmethyl-3,3,3-trifluo
67	46,763	0,09	Glycidyl oleate
68	37,690	0,09	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-
69	12,409	0,09	Phenylethyl Alcohol
70	15,589	0,08	4H-1,2,4-triazole-3-carboxylic acid,
71	35,207	0,07	Cyclooctasiloxane, hexadecamethyl-
72	19,840	0,07	Molybdenum, (acetato-O,O')tris(.eta.
73	9,007	0,07	Silane, diethoxydimethoxy-
74	49,321	0,06	Decyl sulfide
75	42,960	0,06	Bis(2-ethylhexyl) phthalate
76	35,556	0,06	Glycidyl palmitate
77	33,742	0,06	Hexadecanoic acid, ethyl ester
78	9,110	0,06	Decane
79	8,602	0,06	Cyclotetrasiloxane, octamethyl-
80	22,253	0,05	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl

APÊNDICE 4 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE ALTA RESOLUÇÃO

FIGURA 27 – ANÁLISE COMPLETA DAS MEMBRANAS NFC:GNPcit 0,5%.

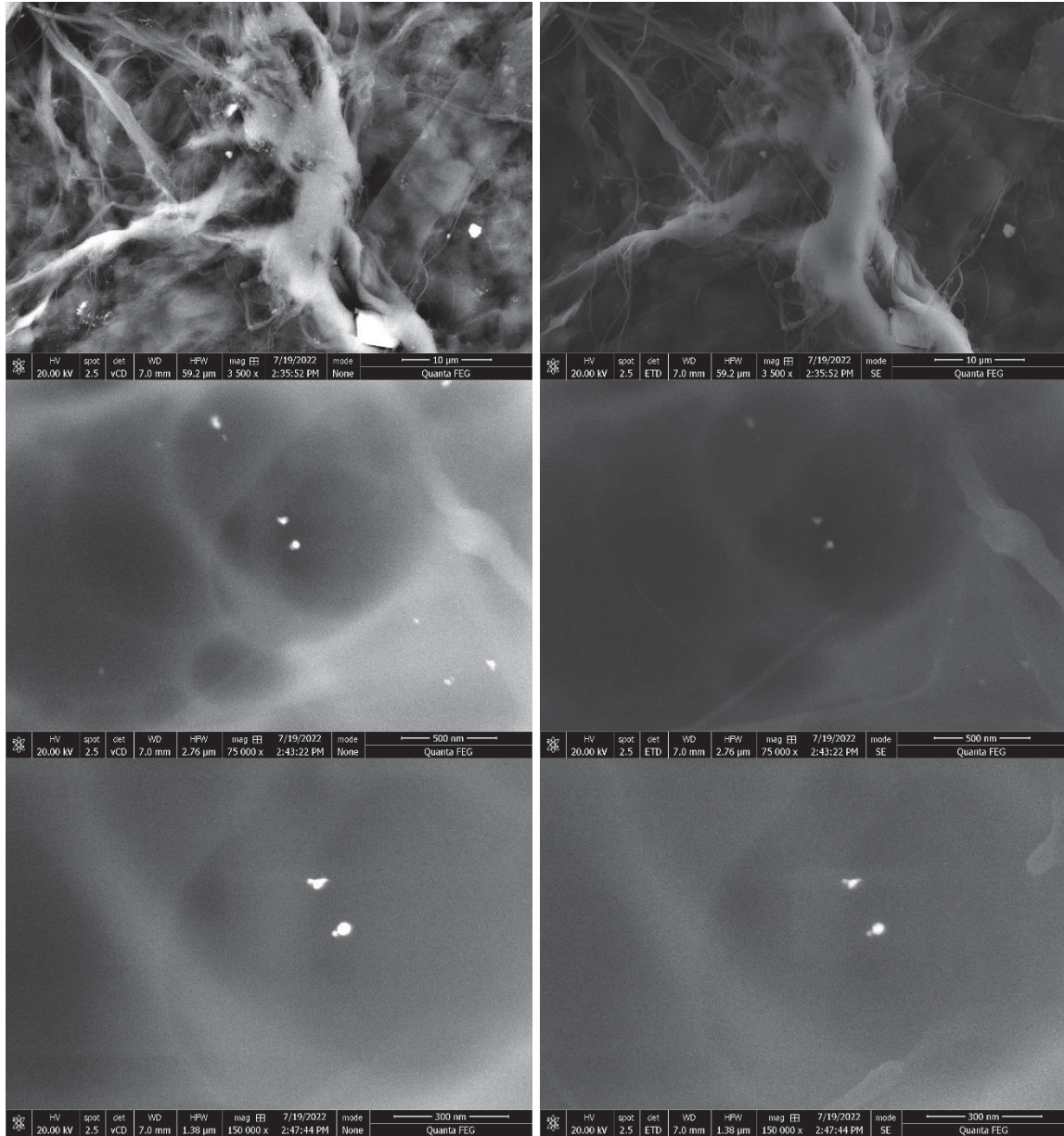


FIGURA 28 – ANÁLISE COMPLETA DAS MEMBRANAS NFC:GNPcit 1,0%.

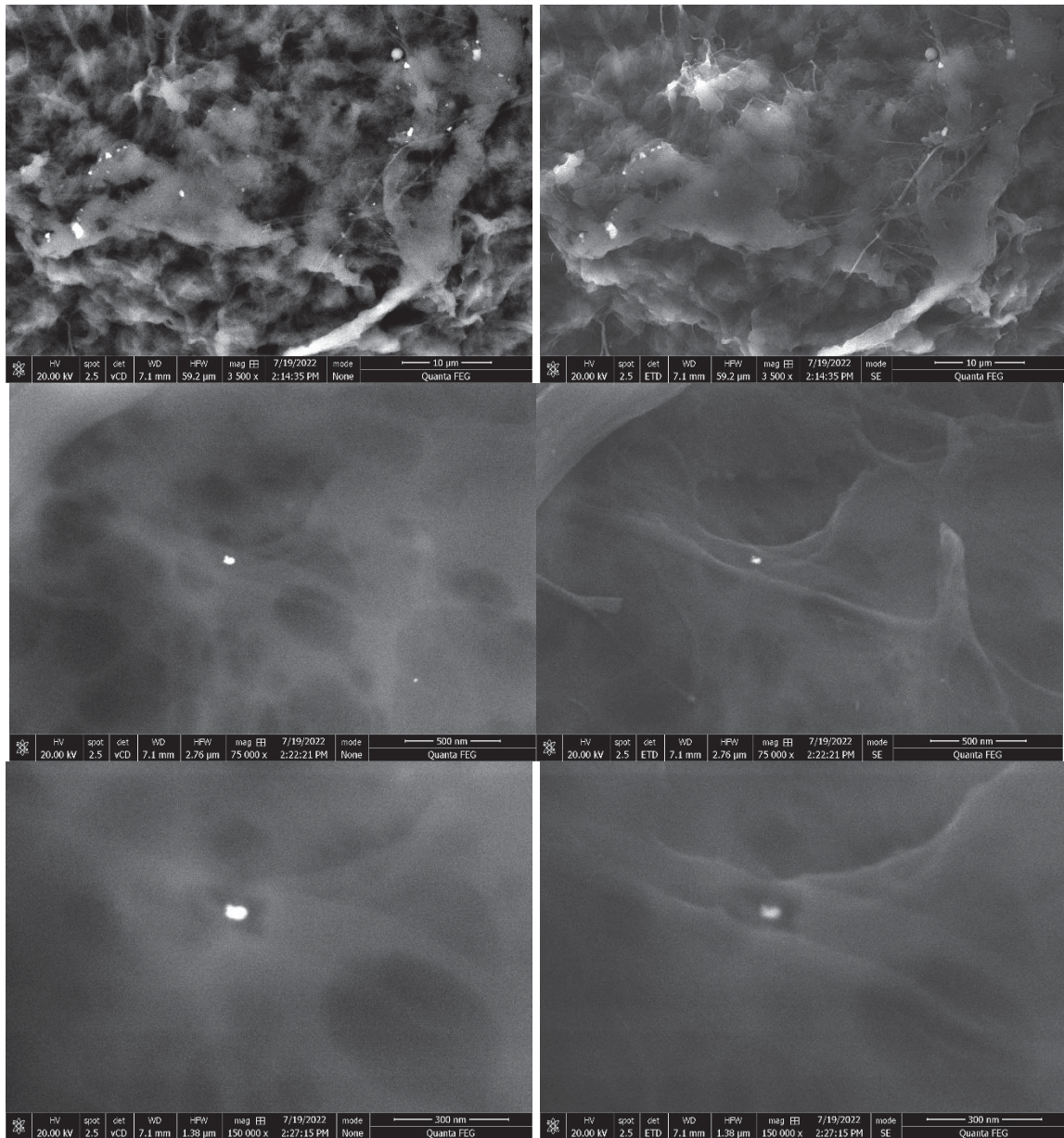


FIGURA 29 – ANÁLISE COMPLETA DAS MEMBRANAS NFC:GNPcit 2,0%.

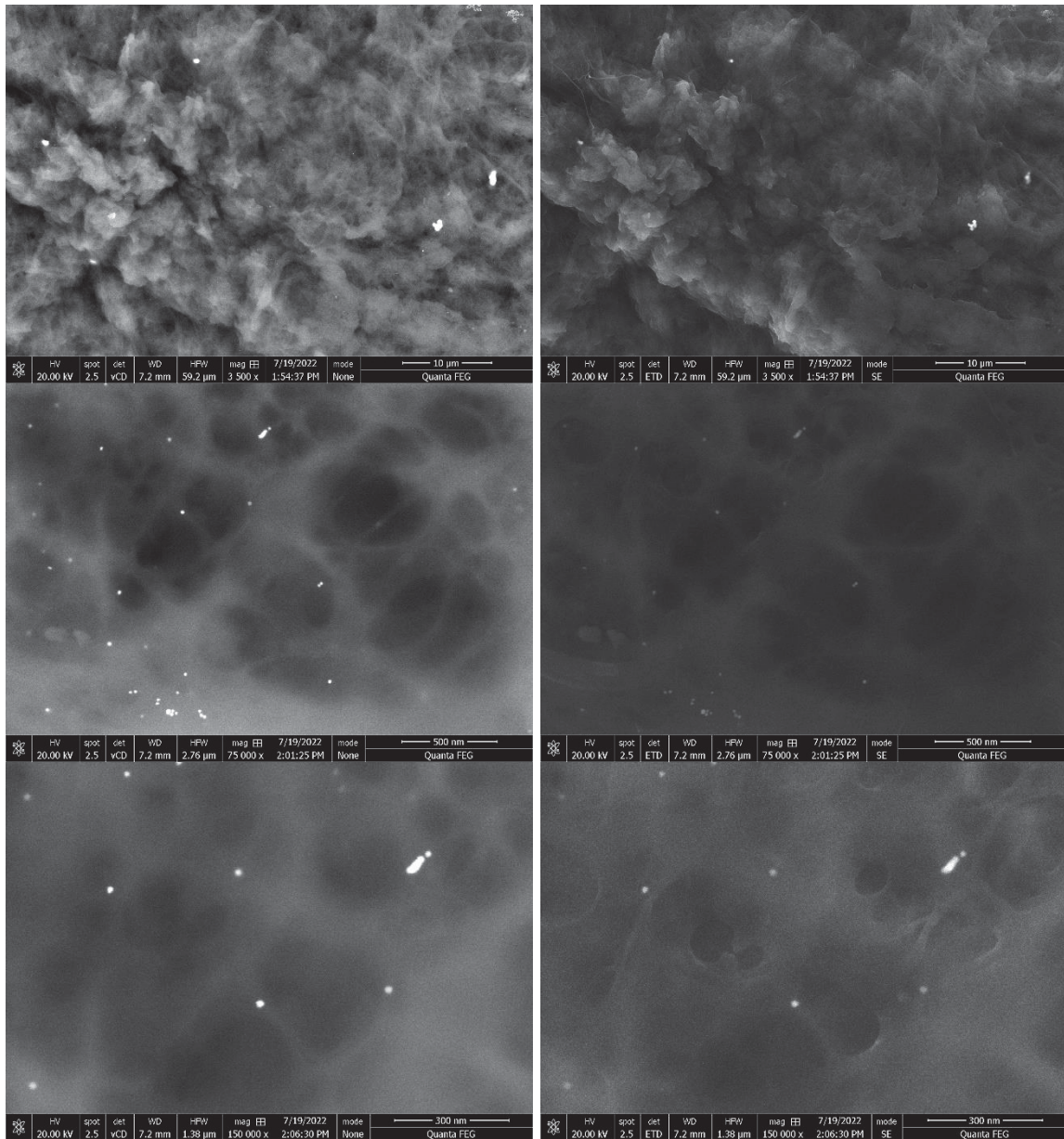


FIGURA 30 – ANÁLISE COMPLETA DAS MEMBRANAS NFC:GNPext 0,5%.

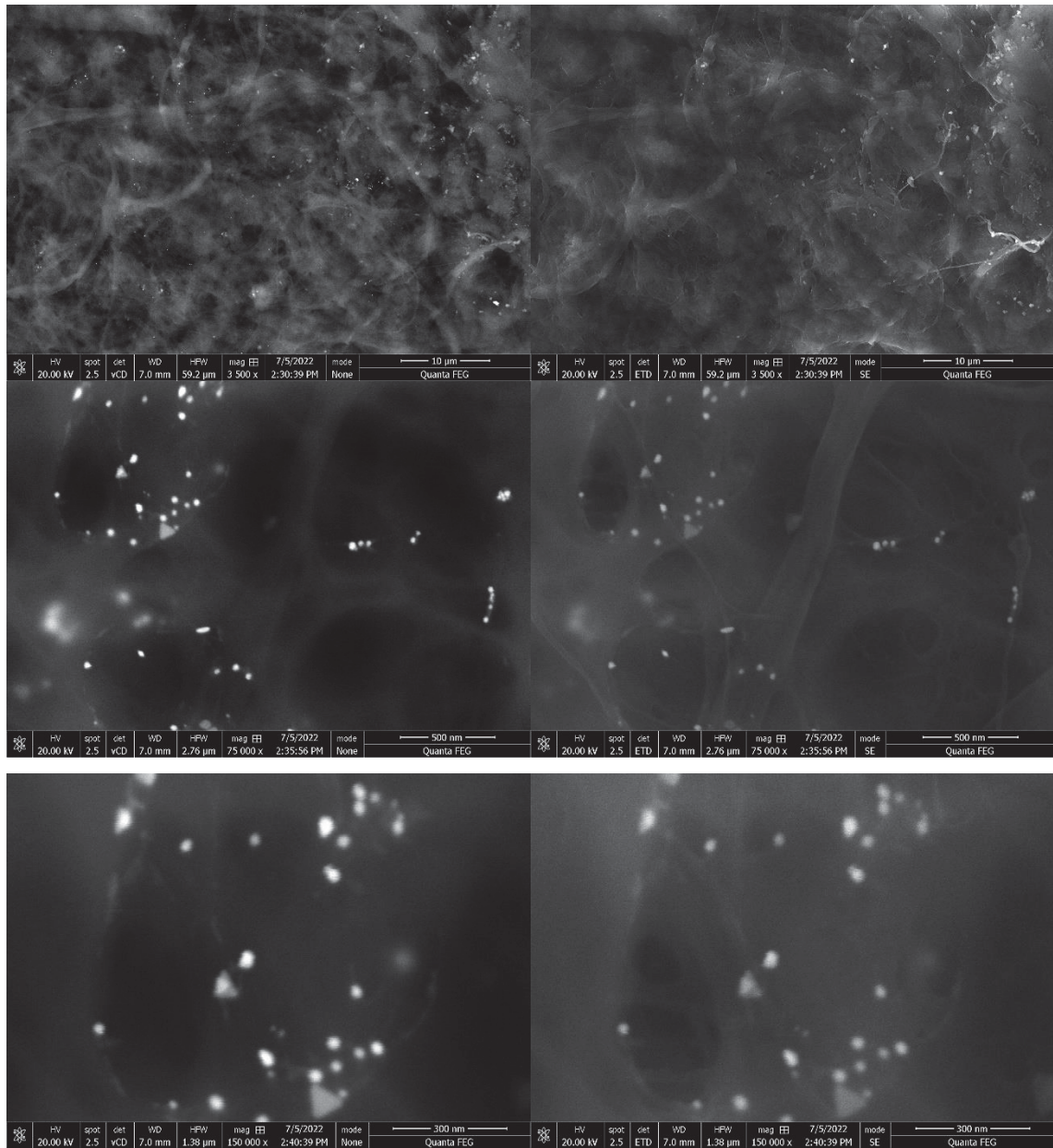


FIGURA 31 – ANÁLISE COMPLETA DAS MEMBRANAS NFC:GNPext 1,0%.

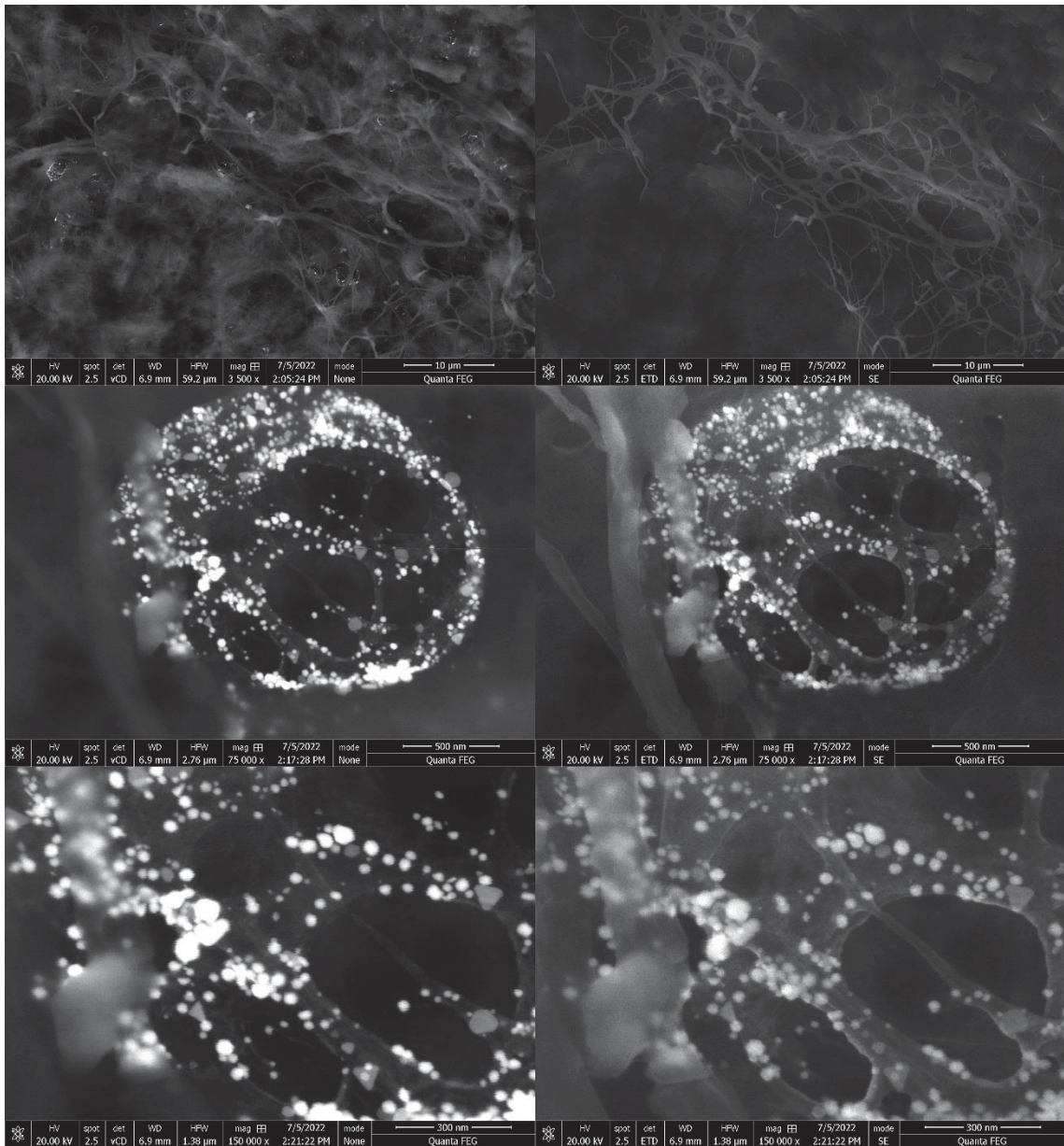


FIGURA 32 – ANÁLISE COMPLETA DAS MEMBRANAS NFC:GNPext 2,0%.

