

COMUNICADO  
TÉCNICO

208

Brasília DF  
Novembro, 2021

## Detecção de nanopartículas de prata (AgNPs) e determinação de íons prata ( $\text{Ag}^+$ ) por técnicas voltamétricas

Gabriella Magarelli

Júlia Moreira Pupe

Luciano Paulino da Silva

<sup>1</sup>Gabriella Magarelli, química, doutora em Ciências/Química, analista na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

<sup>2</sup>Júlia Moreira Pupe, bióloga, mestre em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), analista na Confederação Nacional da Indústria, Brasília, DF.

<sup>3</sup>Luciano Paulino da Silva, biólogo, doutor em Biologia Animal, pesquisador na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

## Introdução

Nanopartículas de prata (AgNPs) são nanomateriais com diâmetros da ordem de 1 a 100 nm, contendo de 15 a 20.000 átomos de prata, conferindo-lhes uma grande área superficial e resultando em propriedades ópticas, químicas e biológicas únicas, que diferem das propriedades de partículas maiores (Anjum et al., 2013). Além do uso tradicional em aplicações como catálise, dispositivos ópticos, biossensores, diagnósticos e detecção biomolecular, suas propriedades antimicrobianas tornam as AgNPs populares em uma ampla gama de aplicações que envolvam controle de microrganismos (incorporação em tecidos, cosméticos, tintas, desinfetantes, dispositivos médicos, purificação de água, entre outros) (Rai et al., 2013).

A síntese de AgNPs pode ser realizada tanto por métodos químicos tradicionais quanto por métodos mais eco sustentáveis denominados de síntese verde. Em todos os métodos, AgNPs estabilizadas são formadas pela redução de íons  $\text{Ag}^+$  e subsequentes processos de nucleação e crescimento. Os métodos químicos convencionais para síntese de AgNPs geralmente utilizam sais precursores de prata, como o nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) e agentes redutores e estabilizantes para evitar a aglomeração das nanopartículas, como o borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) e o citrato de sódio, respectivamente (Iravani et al., 2014). Os métodos baseados na síntese verde de AgNPs se pautam na chamada Química Verde, que possui como um dos princípios a elaboração de métodos que utilizam reagentes menos tóxicos ou atóxicos ao meio ambiente e ao ser humano (Anastas; Eghbali, 2010). Na síntese verde de AgNPs, em substituição aos agentes redutores e estabilizantes químicos, são utilizados extratos de plantas ou microrganismos. Vários metabólitos presentes em plantas, que incluem açúcares, alcaloides, ácidos fenólicos, terpenoides, polifenóis e proteínas desempenham um papel importante na biorredução de íons prata à AgNPs e na sua estabilização. Microrganismos como bactérias e fungos também apresentam um grande potencial na produção de nanopartículas metálicas decorrente sobretudo de suas enzimas redutoras (Mohammadlou et al., 2016; Silva et al., 2017; Pereira et al., 2020).

Após a síntese das AgNPs, os próximos passos envolvem a caracterização, cujas análises confirmam a formação e investigam as propriedades ópticas, o tamanho, a forma, a morfologia, a área de superfície, a cristalinidade, a composição e a estabilidade. Algumas técnicas que são comumente utilizadas para essa finalidade são: espalhamento de luz dinâmico (DLS), microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de transmissão (TEM), difração de raio-X (XRD), espectrofotometria UV-Vis, Raman, espectroscopia de infravermelho próximo (FT-IR), espectroscopia de plasma indutivamente acoplado (ICP) e voltametria (Zhang et al., 2016; Gamboa et al., 2019). As condições da reação de síntese de AgNPs, como temperatura, agitação, pH, tempo de reação, concentração inicial dos provedores de íons prata, a composição e concentração dos agentes redutores e estabilizantes de origem biológica (extrato de plantas, por exemplo) podem influenciar na eficácia da síntese, no rendimento das reações e também nas características físico-químicas das nanopartículas formadas. Uma forma de estudar a eficácia e o rendimento das reações é utilizar métodos analíticos para a detecção e determinação da concentração de AgNPs formadas após a síntese. Dentre as técnicas comumente utilizadas, a voltametria constitui uma boa alternativa para a detecção de AgNPs, devido à sua seletividade, sensibilidade e simplicidade. No que se refere à avaliação do rendimento das reações de síntese, a voltametria pode ser utilizada para a determinação indireta da concentração de AgNPs por meio da determinação voltamétrica de íons prata ( $\text{Ag}^+$ ), que não sofreram biorredução. Neste contexto, as técnicas voltamétricas podem ser utilizadas como alternativas aos métodos espectrométricos como ICP para a determinação de AgNPs, devido às suas vantagens como: menor custo, não são destrutivas, demandam equipamentos de porte pequeno, utilizam quantidades de amostras na ordem de microlitros e não há necessidade da utilização de grandes quantidades de gases puros como o que ocorre com a técnica de ICP.

A voltametria é uma técnica eletroquímica na qual as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química são obtidas a partir do registro de curvas de corrente versus potencial, coletadas durante a eletrólise dessa espécie em uma célula eletroquímica. A célula eletroquímica é constituída pelo eletrodo de trabalho (composto de material inerte como ouro, platina, carbono e mercúrio), eletrodo de referência (podendo ser de calomelano saturado ou de prata/cloreto de prata) e eletrodo auxiliar (podendo ser de platina, ouro, carbono vítreo). Na voltametria, o potencial ( $E$ ) é o parâmetro que se ajusta e a corrente resultante ( $i$ ) é o parâmetro que é medido, ou seja,  $i = f(E)$ . As informações sobre as espécies de interesse são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica que surge entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar ao se aplicar uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência. O registro da corrente em função do potencial é denominado voltamograma. A magnitude da corrente obtida pela transferência de elétrons durante um processo de oxirredução é proporcional à quantidade da espécie química de interesse presente na interface do eletrodo e, conseqüentemente, na solução. A forma na qual o potencial é aplicado, e, por conseqüência, a forma como a corrente é adquirida determina o tipo de técnica voltamétrica em questão (Bard; Faulkner, 2001; Skoog et al., 2002; Pacheco et al., 2013).

Na voltametria cíclica, o potencial (sinal de excitação) é aplicado na forma triangular, no qual um potencial varia de forma linear numa determinada direção (anódica-catódica ou catódica-anódica) e, então, a direção de varredura é invertida e o potencial volta ao seu valor original. Uma velocidade de varredura é estabelecida para qualquer direção. Esse ciclo de excitação, que pode durar de 1 a 100 s pode ser repetido várias vezes. Como resposta ao sinal de excitação, pode-se obter dependendo da espécie química de interesse, a visualização no voltamograma de picos de correntes de oxidação e picos de corrente de redução. Os parâmetros importantes em um voltamograma cíclico são: o potencial do pico catódico,  $E_{pc}$ , o potencial do pico anódico,  $E_{pa}$ , a corrente de pico catódico,  $i_{pc}$ , e a corrente de pico anódico,  $i_{pa}$ . O principal uso da voltametria cíclica é como ferramentas para estudos fundamentais e de diagnóstico, que fornecem informações qualitativas sobre processos eletroquímicos em várias condições (Bard; Faulkner, 2001; Skoog et al., 2002; Pacheco et al., 2013).

Na voltametria de pulso diferencial, o sinal de excitação é aplicado na forma de degraus. Pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente são aplicados ao eletrodo de trabalho. A corrente é medida duas vezes, uma antes da aplicação do pulso ( $S_1$ ) e outra ao final do pulso ( $S_2$ ). A primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda e a diferença das correntes é plotada versus o potencial aplicado. O voltamograma resultante consiste em picos de corrente de forma gaussiana, cuja área deste pico é diretamente proporcional à concentração da espécie química de interesse. O objetivo de se fazer duas medidas da corrente e trabalhar com a diferença entre elas é minimizar o efeito da corrente de fundo, aumentando assim a sensibilidade da técnica. Esta correção de correntes, possibilitada pelo modo de pulso diferencial, permite obter limites de detecção da ordem de  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. A varredura de potencial ocorre num sentido específico, sem inversão. Desta forma, se o sentido for o catódico (em direção a potenciais mais negativos) os parâmetros visualizados nos voltamogramas são o potencial do pico catódico,  $E_{pc}$ , e a corrente de pico catódico,  $i_{pc}$ . Se o sentido for o anódico (para potenciais mais positivos) os parâmetros visualizados são o potencial do pico anódico,  $E_{pa}$ , e a corrente de pico anódico,  $i_{pa}$ . A varredura do potencial ocorre numa determinada velocidade, e outros parâmetros relativos ao pulso são também importantes como a amplitude de pulso e o tempo de pulso (Bard; Faulkner, 2001; Skoog et al., 2002; Pacheco et al., 2013).

Os métodos de redissolução apresentam processos eletroquímicos nos quais a espécie química de interesse é depositada na superfície do eletrodo de trabalho a partir de uma solução sob agitação. Depois de um determinado tempo, denominado tempo de deposição,  $t_d$ , a eletrólise é interrompida, cessa-se a agitação adotando-se um pequeno tempo de equilíbrio ou repouso, e a espécie química depositada é redissolvida ou retirada da superfície do eletrodo. Nos métodos de redissolução anódica, o eletrodo é inicialmente polarizado negativamente (se comportando como um cátodo) fazendo com que as espécies químicas de interesse de carga positiva na solução se reduzam e pré-concentrem na superfície do eletrodo. Posteriormente, é realizada uma varredura à potenciais mais positivos (sentido anódico), fazendo com que as espécies reduzidas na superfície do eletrodo oxidem de volta para a solução (redissolução). Na etapa de deposição, a concentração da espécie química de interesse na superfície do eletrodo de trabalho é muito maior que no restante da solução. Devido a esta etapa de pré-concentração, os métodos de redissolução produzem limites de detecção muito mais baixos que as outras técnicas voltamétricas. Na etapa de redissolução, o modo como

o potencial é aplicado, definirá a técnica que se pretende utilizar (preferencialmente pulso diferencial) (Bard; Faulkner, 2001; Skoog et al., 2002; Pacheco et al., 2013).

Para que as técnicas voltamétricas possam ser aplicadas, a espécie química de interesse tem que ser eletroativa, isto é, ser capaz de sofrer a reação redox na janela de potencial estudada. Geralmente, eletrólitos suporte consistindo em soluções com concentrações relativamente elevadas de sais inertes são escolhidos visando assegurar adequada condutividade elétrica ao sistema, além de garantir força iônica adequada e constante e controle de pH.

Na voltametria, a quantificação de espécies químicas de interesse geralmente é realizada por meio do método de adição padrão, que é usado com o objetivo de minimizar-se o problema de efeito de matriz. Nesse procedimento, a amostra é adicionada à célula eletroquímica juntamente com o eletrólito suporte e a corrente referente à espécie de interesse (analito) é registrada. A seguir, adiciona-se sobre a solução da amostra volumes definidos do padrão do analito de concentração conhecida. Como as medidas com os padrões são feitas em condições muito próximas das condições da amostra, o efeito de matriz é significativamente minimizado, ou seja, as interferências que afetam as medidas da corrente referente ao analito presente na amostra, afetarão da mesma maneira as medidas das correntes referentes ao analito mais as alíquotas da solução padrão sucessivamente adicionadas sobre a amostra. O método da curva de adição padrão é considerado mais exato. Assim, se as características da matriz forem reprodutíveis e conhecidas, então o método da curva de adição padrão é melhor e deve ser preferido (Aleixo, 2003).

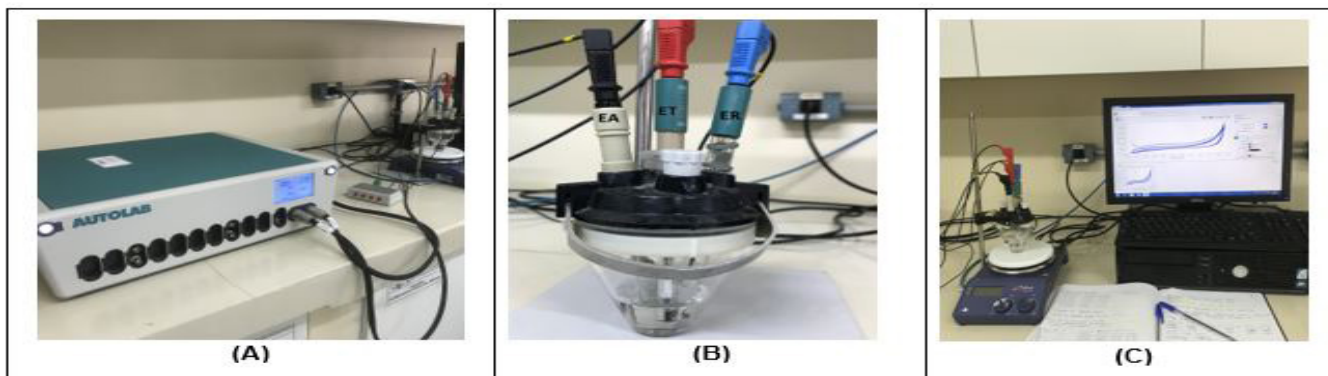
A interação da eletroquímica com a nanotecnologia tem duas vertentes: a nanotecnologia pode ser aplicada à voltametria, quando sensores eletroquímicos nanoestruturados são utilizados como eletrodos de trabalho para a detecção de diferentes moléculas e íons; e a eletroquímica pode ser aplicada à nanotecnologia quando é utilizada, por exemplo, para a síntese e caracterização de nanopartículas metálicas, além de ser aplicada para estudar processos de funcionalização e eletrooxidação de nanopartículas (Brainina et al., 2011).

É objetivo deste comunicado técnico: 1) apresentar as técnicas voltamétricas, como a voltametria cíclica, a voltametria de redissolução anódica e a voltametria de pulso diferencial como técnicas alternativas para a detecção de AgNPs e determinação da concentração de íons  $\text{Ag}^+$ ; 2) determinar o rendimento de reações de síntese verde de AgNPs por técnicas voltamétricas.

## Protocolo para a detecção voltamétrica de nanopartículas de prata (AgNPs) e para a determinação voltamétrica de íons prata ( $\text{Ag}^+$ )

### 1) Aparato instrumental:

O principal aparato instrumental é o potenciostato/galvanostato, que é responsável pela aplicação do potencial à célula eletroquímica e pelas medidas das correntes resultantes dos processos redox envolvendo as espécies de prata. O equipamento utilizado para o desenvolvimento dos protocolos é um potenciostato/galvanostato modelo Autolab PGSTAT 128N (Metrohm®), acoplado a uma célula eletroquímica composta pelos eletrodos: carbono vítreo ( $\Phi = 2 \text{ mm}$ ) (eletrodo de trabalho),  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  ( $\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$ ) (eletrodo de referência) e platina (eletrodo auxiliar). Todos os eletrodos são da marca Metrohm. Os eletrodos são conectados ao potenciostato por meio dos conectores elétricos próprios do equipamento (Figura 1). A interface computacional, na qual se inserem os comandos e possibilita a aquisição dos voltamogramas, opera por meio do software NOVA 2.0, próprio do equipamento. O equipamento está disponível no Laboratórios de Tecnologias para a Segurança Alimentar (Sala de Eletroquímica e Eletroanalítica) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.



**Figura 1:** Aparato instrumental utilizado para as análises voltamétricas constituído por um potenciostato/galvanostato (A) conectado à célula eletroquímica, composta pelos eletrodos de carbono vítreo (eletrodo de trabalho- ET), Ag/AgCl (KCl 3 mol L<sup>-1</sup>) (eletrodo de referência- ER) e platina (eletrodo auxiliar- EA) (B) e conectado ao computador (C). Fotos de Gabriella Magarelli.

## 2) Limpeza do eletrodo de trabalho

A superfície do eletrodo de trabalho deve passar por limpeza e tratamento eletroquímico com o objetivo de tornar a superfície livre de interferentes e ativa para os processos eletroquímicos. Para isso, antes do início de cada medida voltamétrica, o eletrodo de carbono vítreo é polido em suspensão de alumina (óxido de alumínio com partículas <10 µm) por 2 minutos sob um disco de feltro e lavado com água ultrapura (Figura 2). Posteriormente, o eletrodo de carbono vítreo tem sua superfície mergulhada em ácido nítrico 20% por 1 minuto e, em seguida, lavado com água ultrapura (tipo I). Após estas etapas de limpeza, é realizado o tratamento eletroquímico do eletrodo aplicando-se 10 ciclos de varredura por voltametria cíclica em potenciais de -1,5 a 1.5 V a uma velocidade de varredura de 50 mV s<sup>-1</sup> em tampão fosfato, pH 7,0. Os eletrodos de referência e auxiliar são lavados antes de cada análise com água ultrapura.



**Figura 2:** Eletrodo comercial de carbono vítreo utilizado como eletrodo de trabalho nas análises voltamétricas (A) e o processo de limpeza mecânica de sua superfície (B). Fotos de Gabriella Magarelli e Caroline Matos Ribeiro

## 3) Obtenção das amostras

A síntese verde de AgNPs utiliza em seu sistema reacional extratos aquosos de plantas e nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) sob condições otimizadas de reação envolvendo concentrações de precursores, aeração, agitação, luminosidade e pH. Os extratos vegetais, com concentrações finais de 100 mg mL<sup>-1</sup> (matéria seca) foram obtidos por decoção de 3 g de fragmentos de folhas em 30 mL de água ultrapura por 2 min. Em seguida, 10 mL do extrato filtrado é utilizado na reação de síntese juntamente com 990 mL of AgNO<sub>3</sub> 1 mmol/L. O protocolo voltamétrico descrito neste comunicado pode ser aplicado em suspensões de AgNPs sintetizadas a partir de qualquer espécie vegetal, de preferência utilizando as folhas. Seguindo este protocolo de extração, não foram verificados sinais interferentes de resíduos de extratos vegetais sobre os perfis voltamétricos de Ag<sup>+</sup> e AgNPs.

Amostras homogêneas de 2 mL de suspensão contendo as AgNPs são coletadas em microtubos após a síntese verde das AgNPs. Os microtubos com as suspensões são colocados em microcentrífuga e centrifugados por 30 minutos

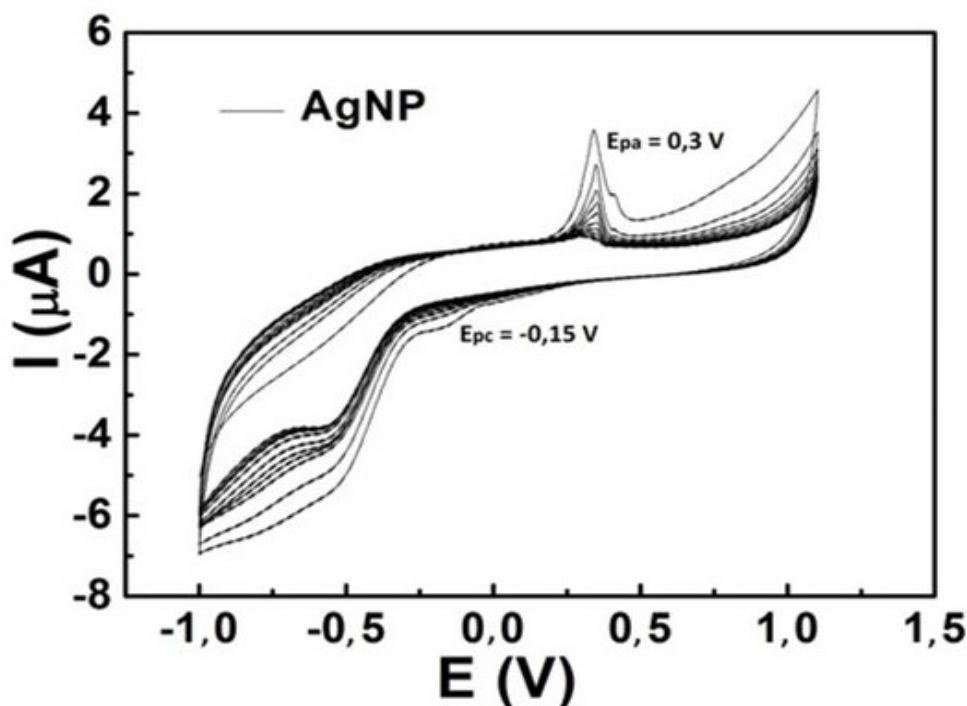
a  $15339 \times g$ . O sobrenadante é separado por pipetagem e armazenado para as análises voltamétricas de íons prata ( $Ag^+$ ). O centrifugado (*pellet*) é ressuspensionado em  $500 \mu L$  de água ultrapura e armazenado no próprio microtubo para as análises voltamétricas de AgNPs. A concentração teórica de AgNPs ressuspensionado dependerá da concentração inicial da solução de  $AgNO_3$  utilizada na reação de síntese. Para uma concentração de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $AgNO_3$ , a concentração teórica de AgNPs é igual a  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ . A concentração teórica de AgNPs ressuspensionados em  $500 \mu L$  de água é de  $4 \text{ mmol L}^{-1}$ . Partículas sólidas de AgNPs não são observáveis a olho nu nos microtubos após a ressuspensão com água e, antes das análises voltamétricas, o microtubo é agitado utilizando um vórtex para homogeneização da suspensão. Todas as amostras são identificadas e armazenadas em geladeira à temperatura de  $4^\circ C$  por no máximo 3 dias até as análises voltamétricas serem efetivadas.

#### 4) Detecção de nanopartículas de prata (AgNPs) por voltametria cíclica

Para a análise voltamétrica das AgNPs,  $2 \mu L$  da suspensão do pellet ressuspensionado de AgNPs é pipetado na superfície do eletrodo de trabalho. O eletrodo é deixado em repouso e em temperatura ambiente até toda evaporação do solvente e adsorção das AgNPs na superfície do eletrodo de carbono vítreo (Figura 3). Após esta etapa, o eletrodo é conectado à célula eletroquímica contendo  $10 \text{ mL}$  de tampão fosfato,  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH } 7,0$ . Os eletrodos de referência e eletrodo auxiliar também são conectados à célula. A técnica de voltametria cíclica é utilizada para a detecção após a seleção dos parâmetros eletroquímicos descritos na Tabela 1. A metodologia foi baseada em artigo de Giovanni; Pumera, 2012.

**Tabela 1:** Parâmetros eletroquímicos para a análise voltamétrica das AgNPs.

Parâmetros eletroquímicos	Valor
Potencial inicial ( $E_i$ )	$-1,0 \text{ V}$
Potencial de inversão ( $E_{inv}$ )	$1,0 \text{ V}$
Potencial final ( $E_f$ )	$-0,9 \text{ V}$
Velocidade de varredura	$0,1 \text{ V s}^{-1}$



**Figura 3:** Voltamograma cíclico de amostra de  $2 \mu L$  de suspensão de AgNP  $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Eletrodo de trabalho: carbono vítreo; Eletrodo de referência:  $Ag/AgCl$ ; Eletrodo auxiliar: platina. Eletrólito suporte: Tampão fosfato,  $\text{pH } = 7,0$ . Parâmetros eletroquímicos: Tabela 1.

Como resposta ao sinal de excitação característico da voltametria cíclica, e adotando-se os parâmetros eletroquímicos da Tabela 1, obtêm-se voltamogramas com os seguintes resultados: a) um pico de corrente,  $I_a$ , da ordem de  $10^{-6}$  ampere (A) em potenciais anódicos,  $E_{pa}$ , de 0,2 a 0,3V, decorrente da oxidação de  $Ag^0$  (AgNPs) a  $Ag^+$ ; b) um pico de corrente,  $I_c$ , da ordem de  $10^{-7}$  A em potencial catódico,  $E_{pc}$ , de -0,15 V, decorrente da redução de  $Ag^+$  eletrogerado a  $Ag^0$  (Figura 3). O potencial de oxidação pode variar de 0,2 a 0,3 V dependendo do tipo de extrato vegetal utilizado. Em trabalho de Ndikau et al. (2016), o perfil voltamétrico de AgNPs sintetizadas a partir de extrato de melão apresentou pico de corrente de oxidação em  $E_{pa} = 0,29$  V. O perfil voltamétrico pode variar também se as condições de análise e eletroquímicas envolvendo a técnica, o volume de suspensão adicionado no eletrodo, os eletrodos, a área de trabalho do eletrodo de carbono vítreo, o eletrólito e o pH forem diferentes. Nas condições experimentais apresentadas neste trabalho, a identificação de AgNPs por voltametria pode ser confirmada utilizando-se como parâmetros indicadores, os potenciais redox obtidos e apresentados neste Comunicado Técnico.

Para a determinação direta de AgNPs por voltametria haveria necessidade de uma solução padrão de AgNPs, entretanto, não há padrões comerciais de AgNPs que sejam similares às AgNPs obtidas por síntese verde, que possuem suas propriedades físico-químicas, como diâmetro hidrodinâmico, morfologia e potencial-Zeta dependentes do extrato vegetal utilizado e das condições de reação. Neste comunicado, é proposto um protocolo para a determinação indireta da concentração experimental de AgNPs por voltametria.

## 5) Determinação da concentração de íons prata ( $Ag^+$ ) por voltametria de redissolução anódica e pulso diferencial

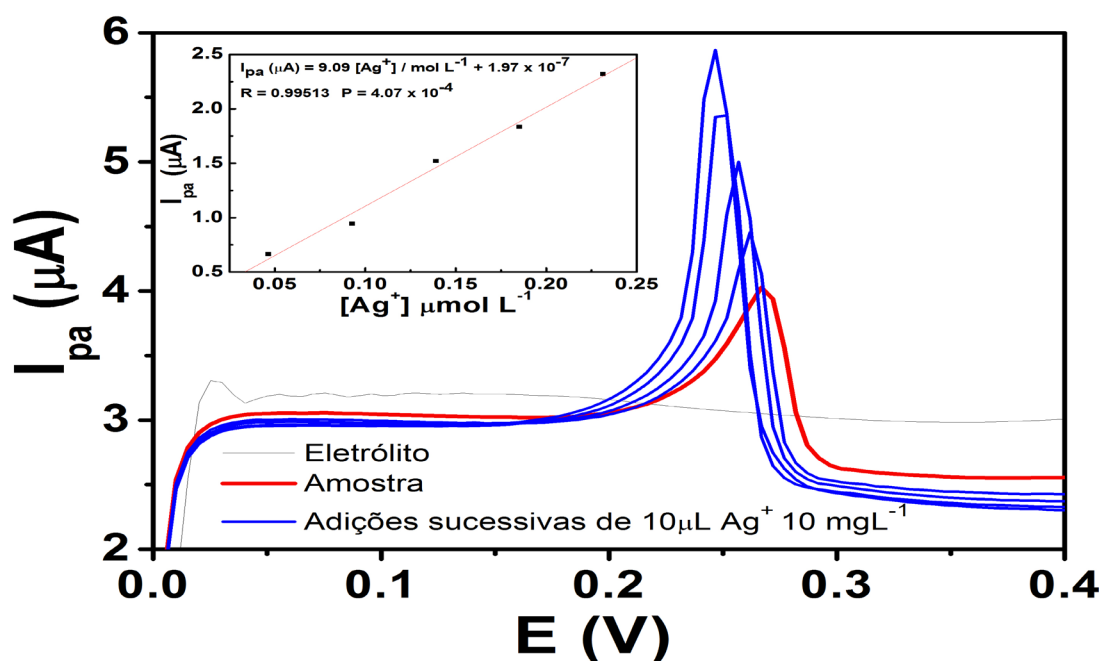
Adiciona-se uma alíquota de 5-10  $\mu$ L do sobrenadante das suspensões de AgNPs centrifugadas na célula eletroquímica contendo 10 mL do eletrólito suporte constituído de  $KNO_3$  0,2 mol  $L^{-1}$  e EDTA 0,004 mol  $L^{-1}$  (pH = 4,48). Os eletrodos são conectados à célula e ao potenciostato para as medidas voltamétricas utilizando a técnica de voltametria de redissolução anódica e pulso diferencial. Os parâmetros eletroquímicos adotados estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2:** Parâmetros eletroquímicos para a determinação voltamétrica de  $Ag^+$ .

Parâmetro eletroquímico	Descriminação
<b>Etapa de pré concentração</b>	
Potencial de deposição ( $E_d$ )	-0,4 V
Tempo de deposição ( $t_d$ )	120 s
Agitação	1 min (agitador magnético adotando-se 600 rpm)
Tempo de equilíbrio	5 s
<b>Etapa de redissolução</b>	
Técnica	Pulso diferencial
Potencial inicial ( $E_i$ )	0 V
Potencial final ( $E_f$ )	0,5 V
Degrau de potencial	0,004 V
Tempo do degrau de potencial	0,1 s
Velocidade de varredura	0,05 $V s^{-1}$
Amplitude de pulso	0,05 V

Após o eletrodo sofrer uma polarização negativa ao se aplicar um potencial de -0,4 V ( $E_d$ ), os íons  $Ag^+$  presentes na interface solução-eletrodo são reduzidos a  $Ag^0$  (prata metálica) e se pré concentraram na superfície do eletrodo. Ao fim do tempo de deposição ( $t_d$ ) de 120 s, a eletrólise é cessada e uma varredura para potenciais mais positivos (até 0,5 V) resulta na reoxidação das espécies  $Ag^0$  pré-concentradas em  $Ag^+$  de volta para a solução. Esta etapa é denominada de redissolução. A varredura anódica de potenciais de 0 a 0,5 V, aplicada ao eletrodo na forma de pulso,

sob parâmetros descritos na Tabela 2, resulta em um pico de corrente de oxidação da ordem de  $10^{-7}$  -  $10^{-6}$  A, no potencial de 0,25 - 0,30 V (Figura 4).



**Figura 4:** Voltamograma de redissolução anódica e pulso diferencial de 10  $\mu L$  de amostra do sobrenadante em 10 mL de eletrólito ( $KNO_3/EDTA$ ), com adições sucessivas de 10  $\mu L$  de  $Ag^+$ ,  $10 mg L^{-1}$ . Eletrodo de trabalho: carbono vítreo; Eletrodo de referência:  $Ag/AgCl$ ; Eletrodo auxiliar: platina. Parâmetros eletroquímicos: Tabela 2. Gráfico inserido corresponde à curva da concentração de  $Ag^+$  correspondente de cada adição sobre a amostra versus o valor do pico de corrente de oxidação.

Para a quantificação da concentração de  $Ag^+$  em solução, foi realizado o método de adição de padrão seguindo-se os seguintes passos: 1) 10 -20  $\mu L$  de amostra de sobrenadante é adicionada à célula eletroquímica contendo 10 mL  $KNO_3$   $0,2 mol L^{-1}$  e  $EDTA$   $0,004 mol L^{-1}$  ( $pH = 4,48$ ) e a corrente referente à espécie de interesse ( $Ag^+$ ) é registrada; 2) adiciona-se sobre a solução da amostra quatro adições de 5-10  $\mu L$  de padrão de  $Ag^+$  na concentração de  $10 mg L^{-1}$ , registrando-se a corrente após cada adição. As soluções de padrão de  $Ag^+$   $10 mg L^{-1}$  são obtidas por diluição da solução estoque de  $1000 mg L^{-1}$  do padrão de  $Ag^+$ , da marca Merck/Supelco; 3) É construída uma curva da concentração de  $Ag^+$  adicionada sobre a amostra (eixo x da curva) versus o sinal do pico de corrente de oxidação ( $I_a$ ) de  $Ag^+$  (eixo y da curva), sendo que o primeiro ponto da curva representa o sinal de corrente de oxidação da amostra, com valor zero de concentração; 4) O gráfico resultante deve dar uma reta. Essa reta é extrapolada até cortar o eixo da concentração (eixo «x») no lado negativo das coordenadas. O módulo do valor negativo obtido é o valor da concentração de  $Ag^+$  na solução da célula eletroquímica. Sabendo-se o volume total da solução na célula (10,01-10,02 mL) e o volume da amostra original adicionado a ela (10 -20  $\mu L$ ), calcula-se então a concentração do analito na solução da amostra (sobrenadante) original. A metodologia de determinação voltamétrica de  $Ag^+$  foi baseada em publicações de Metrohm (2020) e Radulescu et al. (2016).

## 6) Limpeza da vidraria e descarte dos resíduos

A vidraria utilizada nos experimentos foi submetida à lavagem com água potável e sabão, seguida por lavagem com água destilada, imersão em solução  $HNO_3$  20% por 12 horas seguida de imersão em água ultrapura por mais 12 horas. A secagem foi realizada em temperatura ambiente. Os resíduos contendo prata (na forma iônica e como  $AgNPs$ ) foram descartados em frascos de vidro escuro e os compostos fenólicos foram descartados em reservatórios plásticos a base de polietileno de alta densidade. Todos os reservatórios de resíduos foram lacrados, rotulados e armazenados em local mais arejado do laboratório para posterior recolhimento, em conformidade com as orientações do Setor de Gestão de Laboratórios da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – SGLA.



# Determinação do rendimento da reação de síntese: concentração experimental das AgNPs formadas

A concentração teórica de AgNPs, considerando 100% da biorredução de íons prata ( $\text{Ag}^+$ ) em  $\text{Ag}^0$  é determinada pela concentração inicial da solução de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) utilizada na síntese. A concentração experimental de AgNPs, determinada após a reação de síntese, é um parâmetro útil para acompanhar o rendimento da reação de síntese verde de AgNPs. Esse dado adicional pode ser correlacionado com outros dados experimentais para a obtenção de AgNPs em condições ótimas e com características desejáveis. A determinação voltamétrica da concentração de AgNPs exige a adição de um padrão de AgNPs comercial de concentração conhecida. Os padrões comerciais de AgNPs são nanopartículas obtidas por síntese química com uso de estabilizantes químicos que diferem das biomoléculas dos extratos vegetais utilizados na síntese verde. Na ausência do padrão de AgNPs, uma alternativa é determinar a concentração de espécies  $\text{Ag}^+$  que não sofreram biorredução por voltametria, e por diferença da concentração teórica, estimar a concentração de AgNPs efetivamente formadas. A determinação da concentração de íons prata ( $\text{Ag}^+$ ) já foi descrita na seção anterior.

A concentração de AgNPs é determinada pela fórmula:

$$[\text{AgNP}] = [\text{Ag}^+]_{\text{teórica}} - [\text{Ag}^+]_{\text{pós síntese}} \quad \text{Fórmula 1}$$

sendo que,  $[\text{Ag}^+]_{\text{teórica}} = [\text{AgNO}_3]$

$[\text{Ag}^+]_{\text{pós síntese}} = [\text{Ag}^+]_{\text{sobrenadante}}$

## Considerações finais

A síntese verde de nanopartículas metálicas, como as nanopartículas de prata (AgNPs), constitui um campo de pesquisa concreto e promissor, que alia práticas mais eco-amigáveis, valoração de recursos genéticos e geração de produtos com alto valor agregado. A caracterização das AgNPs é uma etapa obrigatória e de grande relevância para a validação e controle de qualidade das nanopartículas produzidas. Diante das diversas técnicas de caracterização existentes, a voltametria constitui uma boa alternativa para ser aplicada como técnica complementar às técnicas tradicionais para detecção de nanopartículas de prata (AgNPs), devido às suas vantagens como seletividade, sensibilidade, rapidez e menor custo. Os resultados dos perfis voltamétricos de AgNPs utilizando o eletrodo de carbono vítreo, o eletrodo de  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  e o eletrodo de platina podem ser utilizados como indicadores da presença efetiva de AgNPs, confirmando a ocorrência da síntese.

Pode-se observar que não houve efeito matriz por parte dos extratos das plantas sobre os perfis voltamétricos de  $\text{Ag}^+$  e AgNPs. Os picos de correntes de oxidação de AgNPs e de  $\text{Ag}^+$  apresentaram-se livres de ombros e deformações, evidenciando que as condições eletroquímicas e de análise foram satisfatórias. Observando as condições analíticas adotadas, a metodologia aqui descrita pode ser facilmente aplicada à análise de outras suspensões de AgNPs sintetizadas por meio de diferentes tipos de extratos vegetais. A concentração final do extrato vegetal no sistema reacional para síntese verde de AgNPs ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ), a etapa de centrifugação, a quantidade pequena de sobrenadante adicionadas à célula eletroquímica ( $10 - 20 \text{ } \mu\text{L}^{-1}$ ) contendo 10 mL de eletrólito suporte, o pH das análises e as condições eletroquímicas adotadas, resultaram em boa resposta analítica e são essenciais para o sucesso das análises.

O estudo do rendimento da reação de síntese verde de AgNPs por meio da determinação voltamétrica de Ag<sup>+</sup> que não sofreu biorredução é um método indireto, mas eficiente e alternativo a outros métodos envolvendo técnicas de espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e espectroscopia de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), que possuem custo mais elevado. Dentre essas técnicas, a técnica de menor limite de detecção (LD) é a de ICP-MS com LD da ordem de 0,02 ppb ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Tolessa et al., 2017), em comparação à ICP-OES com LD da ordem de 4,6 ppb (Anekthirakun; Imyim, 2019) e à voltametria com LD da ordem de 5,0-10 ppb Metrohm (2020) e Radulescu et al. (2016).

## Referências bibliográficas

- ALEIXO, L. M. Voltametria: conceitos e técnicas. **Revista Chemkeys**, v. 3, 2003. DOI: 10.20396/chemkeys.v0i3.9609.
- ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green chemistry: principles and practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, p. 301-312, 2010. DOI: 10.1039/B918763B.
- ANEKTHIRAKUN, P.; IMYIM, A. Separation of silver ions and silver nanoparticles by silica based-solid phase extraction prior to ICP-OES determination. **Microchemical Journal**, v. 145, p. 470-475, 2019. DOI: 10.1016/j.microc.2018.11.008.
- ANJUM, N.A.; GILL, S.S.; DUARTE, A.C.; PEREIRA, E.; AHMAD, I. Silver nanoparticles in soil–plant systems. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, p. 1896, 2013. DOI: 10.1007/s11051-013-1896-7.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamental and applications**. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, c2001. 833 p.
- BRAININA, Kh. Z.; GALPERIN, L. G.; KIRYUHINA, T. YU.; GALPERIN, A. L.; STOZHKO, N. YU.; MURZAKAEV, A. M.; TIMOSHENKOVA, O. R. Silver nanoparticles electrooxidation: theory and experiment. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 16, n. 7, 2011. DOI: 10.1007/s10008-011-1583-5.
- GAMBOA, S. M.; ROJAS, E. R.; MARTÍNEZ, V. V.; VEGA-BAUDRIT, J. Synthesis and characterization of silver nanoparticles and their application as an antibacterial agent. **International Journal of Biosensors & Bioelectronics**, v. 5, n. 5, p.166-173, 2019. DOI: 10.15406/ijbsbe.2019.05.00172.
- GIOVANNI, M.; PUMERA, M. Size dependant electrochemical behavior of silver nanoparticles with sizes of 10, 20, 40, 80 and 107 nm. **Electroanalysis**, v. 24, n. 3, p. 615-617, 2012. DOI: 10.1155/2017/8108504.
- IRAVANI, S.; KORBKANDI, H.; MIRMOHAMMADI, S. V.; ZOLFAGHARI, B. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. **Research in Pharmaceutical Science**, v. 9, n. 6, p. 385-406, 2014.
- MARCATO, P. D.; DURAN, M.; HUBER, S.; RAI, M.; MELO, P.S.; ALVES, O.L.; DURAN, N. Biogenic silver nanoparticles and its antifungal activity as a new topical transungual drug delivery. **Journal of Nano Research**, v.20, p. 99-107, 2012.
- METROHM. **Determination of silver by anodic stripping voltammetry at the carbon RDE**. Application Bulletin 207/3. Disponível em: <<https://www.metrohm.com/en/applications/AB-207>>. Acesso em: 26 jul. 2020.
- MOHAMMADLOU, M.; MAGHSOUDI, H.; JAFARIZADEH-MALMIRI, H. A review on green silver nanoparticles based on plants: Synthesis, potential applications and eco-friendly approach. **International Food Research Journal**, v.23, n. 2, p. 446-463, 2016.

