

## EFEITO ANTIFÚNGICO E VIABILIDADE CELULAR DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS COM EXTRATO AQUOSO DE ERVA MATE (*Ilex paraguariensis*)

Recebido em: 12/10/2024

Aceito em: 02/09/2025

DOI: 10.25110/arqsaude.v29i3.2025-11639



Talita Mendes dos Santos<sup>1</sup>  
Carine Teles Sangaleti<sup>2</sup>  
Patricia de Souza Bonfim Mendonça<sup>3</sup>  
Juliana Rodrigues Hamm<sup>4</sup>  
Carlos Eduardo dos Santos<sup>5</sup>  
Cristiano Walter de Farias<sup>6</sup>  
Kelly Cristina Michalczyzyn<sup>7</sup>  
Iria barbara de Oliveira<sup>8</sup>

**RESUMO:** As nanopartículas de Prata (AgNPs) vem ganhando destaque na indústria devido ao seu amplo espectro de atividade antimicrobiana e antifúngica, paralelamente, o extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) apresenta propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas, evidenciando seu potencial terapêutico. A síntese verde de nanopartículas, utilizando o extrato vegetal, tem se consolidado como uma abordagem promissora e sustentável, combinando a eficácia das AgNPs com os benefícios bioativos da erva-mate. Objetivo: formar AgNPs através da rota verde utilizando a *Ilex paraguariensis* para avaliar a viabilidade celular e atividade antifúngica desta solução visando sua aplicabilidade para uso terapêutico no processo de cicatrização de feridas de extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* com AgNPs. Método: O potencial foi analisado a partir da avaliação da viabilidade celular de fibroblastos humanos expostos ao extrato com as AgNPs, bem como o potencial antifúngico do mesmo contra a *candida albicans*. As amostras foram analisadas quanto à caracterização do extrato de *Ilex paraguariensis* com AgNPs através do espalhamento dinâmico de luz, estabilidade da solução pelo potencial Zeta, em diferentes formas de armazenamento e no tempo de até 258 dias, pela análise dos teores fenólicos, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

<sup>1</sup> Mestre em Nanociências e Biociências - Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO).

E-mail: [thallymendes@gmail.com](mailto:thallymendes@gmail.com), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8217-1238>

<sup>2</sup> Doutora em Ciências com ênfase em Cardiologia pelo Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Incor - FMUSP).

E-mail: [carineteles@unicentro.br](mailto:carineteles@unicentro.br), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0696-325X>

<sup>3</sup> Doutora em Ciências da Saúde - Universidade Estadual de Maringá (UEM).

E-mail: [psbmendonca@gmail.com](mailto:psbmendonca@gmail.com), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0116-2189>

<sup>4</sup> Doutora em Ciências - Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo (USP).

E-mail: [junurse2005@yahoo.com.br](mailto:junurse2005@yahoo.com.br), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9386-0744>

<sup>5</sup> Especialista em Urgência e Emergência pela Universidade Estadual de Londrina (UEL).

E-mail: [cedsantos@unicentro.br](mailto:cedsantos@unicentro.br), ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-3075-8714>

<sup>6</sup> Especialista em Gestão de Saúde - Faculdade Holística (FAHOL).

E-mail: [cristianowalter1@gmail.com](mailto:cristianowalter1@gmail.com), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6705-413X>

<sup>7</sup> Mestre em Enfermagem - Universidade Estadual de Maringá (UEM).

E-mail: [kellymichalcris@gmail.com](mailto:kellymichalcris@gmail.com), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2010-7302>

<sup>8</sup> Mestre em Enfermagem - Universidade Federal do Paraná (UFPR).

E-mail: [iria@unicentro.br](mailto:iria@unicentro.br), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4783-3523>

(FTIR). Resultados: A análise do FTIR revelou bandas características tanto no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* quanto nas AgNPs. Quanto à viabilidade fibroblástica não se mostrou tóxico aos fibroblastos humano e com ação antifúngica, essa atividade manteve-se após 258 dias de armazenamento, se mostrando estável quanto ao potencial zeta, tamanho e Índice de polidispersão (PDI). Conclusão: A solução de *Ilex paraguariensis* com AgNPs apresentou-se viável para utilização em fibroblastos humanos e com ação fungicida, se mostrando uma solução possível para ser utilizado com ação biológica, porém que requer maior estudos e testes para sua aplicabilidade.

**PALAVRAS-CHAVE:** Nanopartículas de prata; *Ilex paraguariensis*; Antifúngicos; Sobrevivência celular; Cicatrização.

## **ANTIFUNGAL EFFECT AND CELL VIABILITY OF SILVER NANOPARTICLES SYNTHESIZED WITH AQUEOUS EXTRACT OF YERBA MATE (*Ilex paraguariensis*)**

**ABSTRACT:** Silver nanoparticles (AgNPs) have been gaining prominence in industry due to their broad-spectrum antimicrobial and antifungal activity. In parallel, yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) exhibits anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial properties, highlighting its therapeutic potential. The plant-based green synthesis of nanoparticles has emerged as a promising and sustainable approach, combining the efficacy of AgNPs with the bioactive benefits of yerba mate. Objective: To synthesize AgNPs via a green route using *Ilex paraguariensis* and to evaluate the cell viability and antifungal activity of the resulting solution, with the aim of assessing its therapeutic potential in wound healing. Method: The potential was analyzed by evaluating the cell viability of human fibroblasts exposed to the extract with AgNPs, as well as its antifungal potential against *Candida albicans*. The samples of *Ilex paraguariensis* extract with AgNPs was characterized through dynamic light scattering, solution stability by zeta potential, in different storage conditions and for up to 258 days, and by analyzing phenolic content and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). Results: Analysis revealed characteristic bands in both the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* and the AgNPs. Also, the solution was non-toxic to human fibroblasts and demonstrated antifungal activity, which was preserved after 258 days of storage, maintaining stability in zeta potential, size, and polydispersity index (PDI). Conclusion: The *Ilex paraguariensis* solution, combined with AgNPs, showed viability in human fibroblasts and demonstrated antifungal activity, indicating potential as a biological treatment. However, further studies are required to confirm its applicability.

**KEYWORDS:** Silver nanoparticles; *Ilex paraguariensis*; Antifungal Agents; Cell Survival; Wound Healing.

## **EFFECTO ANTIFÚNGICO Y VIABILIDAD CELULAR DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SINTETIZADAS CON EXTRACTO ACUOSO DE YERBA MATE (*Ilex paraguariensis*)**

**RESUMEN:** Las nanopartículas de plata (AgNPs) han ganado protagonismo en la industria debido a su amplio espectro de actividad antimicrobiana y antifúngica. Al mismo tiempo, el extracto de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) presenta propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas, lo que resalta su potencial terapéutico. La síntesis verde de nanopartículas, utilizando extractos vegetales, se ha consolidado como un enfoque prometedor y sostenible, combinando la efectividad de las AgNPs con

los beneficios bioactivos de la yerba mate. Objetivo: Formar AgNPs por vía verde utilizando *Ilex paraguariensis* para evaluar la viabilidad celular y la actividad antifúngica de esta solución, con miras a su aplicabilidad para uso terapéutico en el proceso de cicatrización de heridas utilizando el extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* con AgNPs. Método: Se evaluó el potencial mediante la viabilidad celular de fibroblastos humanos expuestos al extracto con AgNPs, así como su potencial antifúngico frente a *Candida albicans*. Las muestras se analizaron para la caracterización del extracto de *Ilex paraguariensis* con AgNPs mediante dispersión dinámica de luz, estabilidad de la solución por potencial Zeta, en diferentes formas de almacenamiento y durante un período de hasta 258 días. También se realizó el análisis de contenidos fenólicos y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Resultados El análisis FTIR reveló bandas características tanto en el extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* como en las AgNPs. Respecto a la viabilidad de los fibroblastos, no fue tóxico para los fibroblastos humanos y mostró acción antifúngica, actividad que se mantuvo tras 258 días de almacenamiento, manteniéndose estable en términos de potencial Zeta, tamaño e índice de polidispersidad (PDI). Conclusión: La solución de *Ilex paraguariensis* con AgNPs fue viable para su uso en fibroblastos humanos y mostró acción fungicida, demostrando ser una posible solución con acción biológica, aunque se requieren más estudios y pruebas para su aplicabilidad. **PALABRAS CLAVE:** Nanopartículas de plata; *Ilex paraguariensis*; Antifúngicos; Supervivencia celular; Cicatrización de Heridas.

## 1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é definida como um campo de pesquisa e desenvolvimento em escalas atômicas, moleculares ou macromoleculares (Khan, 2019). As nanopartículas, consideradas blocos fundamentais da nanotecnologia, referem-se a partículas com dimensão no intervalo entre um e 100 nanômetros (nm) (Uskokovi, 2007). Atualmente, materiais em escala nanométrica vêm sendo aplicados em diversas áreas, como eletrônica, magnética, optoeletrônica, biomédica, farmacêutica, cosmética e em diversas outras aplicações de materiais (Khan, 2019).

As nanopartículas de prata (AgNPs) vem ganhando destaque na indústria devido ao seu amplo espectro de atividade antimicrobiana e antifúngica, no campo da saúde, é aplicada extensivamente em cateteres impregnados com prata, bandagens e coberturas para feridas, amplamente utilizados em aplicações terapêuticas (Dias *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2023). No estudo de Jalal, (2019) as AgNPs são menos tóxicas para células de mamíferos em comparação com outras nanopartículas metálicas e, devido ao seu tamanho relativamente pequeno, penetram facilmente na membrana celular, potencializando o efeito antimicrobiano da prata. Outra vantagem relacionada ao uso de nanopartículas é o aumento da superfície de contato, a melhoria da disponibilidade, direcionamento de entrega e controle de liberação (Silva, 2016).

A síntese verde de nanopartículas tem se destacado como uma abordagem promissora e sustentável. A partir de componentes orgânicos, a síntese verde reduz o custo do processo, eliminando a necessidade de estabilizadores químicos e agentes redutores externos (Sena *et al.*, 2021). Esse método promove a redução de metais através de agentes redutores de baixa ou nenhuma toxicidade, substituindo os reagentes químicos convencionais e minimizando os impactos ambientais (Albernaz, 2014).

Nessa perspectiva a erva mate (*Ilex paraguariensis*) emerge como uma boa rota verde de formação de nanopartículas. Planta originária da região subtropical da América do Sul, apresenta características físico-químicas que favorecem a obtenção de AgNPs pela rota verde. Além disso, estudos destacam propriedades anti-inflamatórias, anti diabéticas, antifúngicas, cardioprotetoras e quimiopreventivas relacionadas a planta e suas formulações medicinais, bem como sua potente capacidade de inibir o estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio (EROs), entre outras potencialidades (Boaventura *et al.*, 2013).

Recentemente, grande atenção tem sido dada à produção de nanopartículas como um fármaco antimicrobiano para ser usado sozinho ou em combinação com os medicamentos tradicionais atuais. Nesse contexto, a ação antimicrobiana de AgNPs biofatoradas com efeitos terapêuticos promissores foi relatada em estudos (Jalal *et al.*, 2019). Contudo, pouco se sabe das utilizações de AgNPs com extratos aquosos quanto ao potencial antifúngico frente a *Candida Albicans*, o que se tem em estudo é a inibição da eficaz da candidíase usando a folha de *Calotropis gigantea*, com as AgNPS (Ali; Abdallah, 2020).

Portanto, o desenvolvimento de um estudo focado na aplicação de nanopartículas de prata sintetizadas com *Ilex paraguariensis* justifica-se pela inovação tecnológica, sustentabilidade e potencial impacto positivo na saúde pública.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta de amostras da erva mate e preparação do extrato**

As folhas da *Ilex paraguariensis* foram coletadas nas proximidades de Guarapuava, município brasileiro localizado na região centro-sul do estado do Paraná. O processo de lavagem para remoção de partículas indesejadas foi realizado com água destilada. Para obtenção do extrato aquoso, concentrações de 10 e 30 gramas de *Ilex paraguariensis* foram mantidas em 100 mililitros (ml) de água ultrapura, a ponto de

ebulição, pelo tempo de 30 minutos. O conteúdo foi submetido à filtração à vácuo e, posteriormente, ajustado em balão volumétrico para 100 ml, com água ultrapura. Assim, obteve-se um extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* 10% (10g) e 30% (30g) o método realizado se assemelha ao estudo de Wolff (2019).

## **2.2 Síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) por extratos aquosos**

A obtenção do extrato com nanopartículas de prata se deu através do gotejamento da solução de nitrato de prata  $\text{AgNO}_3$  (1 mmol ou 2 mmol) de 50 ml sob 5 ml do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (10g ou 30g) em temperatura ambiente. O processo levou em média 150 minutos, permanecendo em agitação magnética a 300 rpm durante a execução. Posteriormente, as amostras foram caracterizadas por: espalhamento dinâmico da Luz (DLS); potencial Zeta; determinação dos teores de fenólicos; espectroscopia de infravermelho (FTIR) e; viabilidade celular e possível atividade antimicrobiana. No estudo de Melo (2015) foi caracterizado o extrato de *Ilex paraguariensis* utilizando os mesmos referenciais com exceção do zeta que o estudo não avaliou e a atividade antimicrobiana que foi avaliado frente a bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*).

## **2.3. Espalhamento Dinâmico da Luz – (DLS)**

O tamanho de partícula, distribuição de tamanho e índice de polidispersidade de nanopartículas foram determinados pelo DLS, através do analisador de tamanho de partículas *BIC-90 Plus*, fabricado pela *Brookhaven Instruments*. Antes de realizar a leitura, os valores de pH foram ajustados com o auxílio de um pHmetro digital (Kasvi). Em seguida, foi utilizado 20  $\mu\text{L}$  de cada extrato com AgNPs, com adição de água ultrapura até completar a dose correta na cubeta. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente, a um ângulo de espalhamento de  $90^\circ$ .

## **2.4 Potencial Zeta**

Em uma solução iônica, nanopartículas com carga líquida formam uma camada de íons opostos fortemente ligados à sua superfície, conhecida como camada de Stern, seguida por uma camada difusa de íons mais fracamente associados. O potencial eletrostático na fronteira entre essas camadas, chamado de potencial zeta, está relacionado à carga superficial das nanopartículas. nanopartículas com potencial zeta entre -10 e +10

mV são consideradas aproximadamente neutras, enquanto nanopartículas com potenciais superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV são consideradas fortemente catiônicas e aniônicas, respectivamente. Pelo fato da maioria das membranas celulares terem carga negativa, o potencial zeta pode influenciar a tendência de uma nanopartícula a permear essas membranas, com partículas catiônicas tendendo a exibir maior toxicidade, associada à ruptura da parede celular. Para análise, foi utilizado 10  $\mu\text{m}$  de cada amostra e adicionado 990  $\mu\text{m}$  de cloreto de potássio. O equipamento utilizado para avaliar esse índice foi o Zetasizer Nanoseries da Malvern Instruments, capaz de determinar tamanhos de 0,6 nm até 6  $\mu\text{m}$ .

## 2.5 Determinação dos teores de fenólicos

Os teores de fenólicos foram calculados através dos métodos espectroscópicos (Uv-Vis) de Folin-Ciocalteu (Elbaz *et al.*, 2016). Para tal, foram construídas curvas analíticas de soluções diluídas de concentrações conhecidas de ácido gálico, para determinação do teor de fenóis misturou-se 800  $\mu\text{L}$  de extrato aquoso a 5 mL de água ultrapura, 1,5 mL de carbonato de sódio (20%) e 0,500 mL do reagente Folin-Ciocalteu, após adicionado 2,7 de água miliQ para a solução ficar com o total de 10 mL. A solução foi homogeneizada e permaneceu em repouso por meia hora ao abrigo da luz. Procedeu-se a leitura em espectrofotômetro de Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível (UV-Vis) ( $\lambda = 765 \text{ nm}$ ).

## 2.6 Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus objetivos principais a identificação das moléculas (Mercê, 2001). A análise foi realizada com um espectrômetro de 6700 FTIR (Thermo Scientific, Waltham, MA), com o acessório de refletância total atenuado Smart iTR (ATR, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Amostras líquidas do extrato foram colocadas diretamente no cristal de reflectância total atenuada (ATR) para aquisição dos espectros. Os espectros foram coletados ao longo da faixa de 4000-650  $\text{cm}^{-1}$ . Foram realizadas três medidas sob as mesmas condições, para cada amostra, 200 varreduras em uma resolução espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Para um determinado material, o espectro médio final foi então obtido.



## 2.7 Avaliação da viabilidade celular

### 2.7.1 Cultivo celular

Os fibroblastos, de linhagem L929, foram cultivados no meio de cultura de Eagle, modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma Chemical Company, St Louis MO, USA), contendo 10% de soro fetal bovino e 1% Penicilina-streptomicina e 1% de anfotericina B (Sigma). As células foram mantidas em estufa a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> (Forma Scientific). A monitorização do crescimento celular foi feita a cada 24 horas, utilizando-se microscópio invertido de fase (Axiovert 25 – ZEIS), com a avaliação da morfologia e taxa de confluência das células. Uma vez que as células estavam em no mínimo 80% de confluência, fez-se a tripsinização (0,25%) e subcultivo em placas de 96 poços, a uma concentração celular de  $1 \times 10^5$  células/mL.

### 2.7.2 Ensaios de citotoxicidade e análise de crescimento celular (viabilidade fibroblástica)

Para os ensaios de citotoxicidade, as células L929 foram incubadas em placas de cultura, de fundo chato com 96 poços (Costar). As células foram mantidas em DMEM (Meio Dulbecco Modificado por Eagle), com 5% de soro fetal bovino completo, durante 24h, em estufa a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> (Forma Scientific).

Os extratos de *Ilex paraguariensis* se encontravam em diferentes concentrações, com 10% e 30 % de extrato com 1 ou 2 mmol de AgNO<sub>3</sub> (AgNP) e com ou sem NaOH. Além disso, os extratos variaram quanto ao tempo de armazenamento: 10 amostras com 9 meses de armazenamento e 10 amostras com 2 dias (as amostras foram diluídas em razão 1:2 em DMEM em concentrações que variaram de 0,09% a 50%). Após a diluição, os extratos foram adicionados as placas de 96 poços com as células previamente cultivadas.

Após 24 horas, os extratos foram removidos, as células lavadas 2x com PBS e posteriormente foi adicionado um revelador de metabolismo, MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt. O MTS foi mantido em contato com as células durante 3h em estufa a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> (Forma Scientific). Após esse período, foi determinada a densidade óptica (DO) em espectrofotômetro com filtro de 492 nm. A viabilidade celular foi avaliada pela fórmula ( $VC\% = 100\% \times DO \text{ Teste} / DO \text{ C}$ ).

## 2.8 Ensaio para a atividade antifúngica

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da determinação da menor concentração da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste; esse valor é conhecido como Concentração Mínima Inibitória (CMI). Foi utilizado a cepa padrão de *cândida albicans* ATCC90029 através do método da microdiluição em placas de 96 poços, a preparação do inóculo ocorreu em 3 ml de salina na concentração  $10^5$ , baseado no Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2005. Para a análise foram utilizadas diferentes concentrações do extrato de *Ilex paraguariensis* 10% e 30%, com nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) (1mmol ou 2mmol) e alguns com correção de pH com hidróxido de sódio (NaOH). Quanto ao tempo de armazenamento as soluções variaram com 2 dias após síntese e outras com 9 meses, cada poço contendo 100  $\mu\text{L}$  do inóculo no meio RPMI (1640) e 200  $\mu\text{L}$  do extrato no primeiro poço. Nos poços subsequentes foram transferidos 100  $\mu\text{L}$ , até o poço 10. O poço 11 foi controle positivo com 100  $\mu\text{L}$  RPMI + 100  $\mu\text{L}$  do inóculo e no poço 12 o controle negativo com apenas 200  $\mu\text{L}$  de RPMI. As placas de microdiluição foram incubadas na estufa a  $35^\circ\text{C}$ , sendo realizada a leitura das placas em espectrofotômetro a 405 nm e a concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada quando observou-se uma redução em 24h e 48h.

Após a determinação da CIM, determinação da concentração fungicida mínima (CFM), foram retiradas alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  de todos os poços e foram depositadas na superfície do Agar Sabouraud. As placas foram incubadas por 24h a  $35^\circ\text{C}$ , protocolo seguido de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2005.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Síntese e Caracterização do extrato de erva mate

As características da solução estão apresentadas na Tabela 1, como a presença de partículas com tamanho inferior a 40 nm e um índice de polidispersividade (PDI) variando entre 0,344 e 0,399. De acordo com Silveira (2019), valores menores de PDI indicam uma maior homogeneidade na suspensão de AgNPs. Em relação ao pH, a literatura indica que condições ácidas suprimem a formação de nanopartículas de prata, enquanto condições básicas favorecem sua formação, e com relação a esse dado obtivemos que as amostras corrigidas com NaOH atingiram os valores de neutralidade, entre 7 e 8, conforme esperado. Veerasamy *et al.* (2011) relatam que grandes nanopartículas são formadas em pH baixo (pH 4), enquanto nanopartículas menores e altamente dispersas são produzidas



em pH elevado (pH 8). No entanto, outro estudo observou a formação de nanopartículas apenas em pHs superiores a 6,0, reforçando a dificuldade de formação em pHs 4,0 e 5,0 (Bavaresco *et al.*, 2020; Albernaz, 2014).

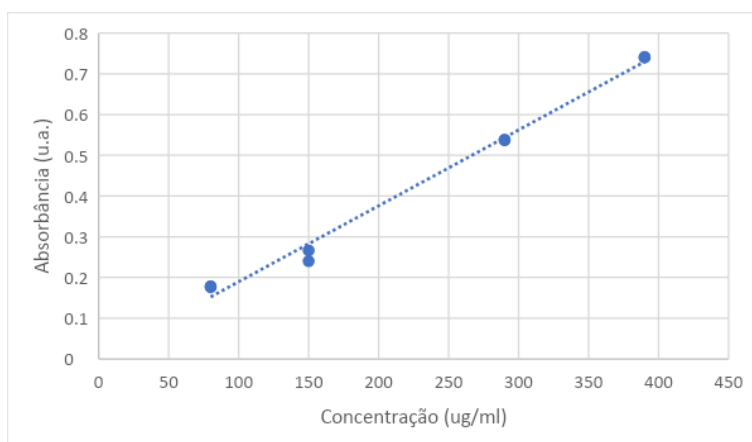
Quanto à concentração de compostos fenólicos, notamos uma maior quantidade nas amostras com extrato puro de *Ilex paraguariensis* e progressivamente menor à medida que o AgNO<sub>3</sub> é adicionado, o que sugere uma incorporação dos compostos fenólicos do extrato de *Ilex paraguariensis* pelas AgNPs, diretamente influenciado pela quantidade de prata, pois nas soluções a 30% os valores de concentração de fenólicos diminuí, mostrando que quanto maior a quantidade de AgNO<sub>3</sub> maior a incorporação. De acordo com Fernandes (2016) e Boaventura (2013), o extrato de *Ilex paraguariensis* é rico em compostos fenólicos, que são metabólitos secundários produzidos pelas plantas, que tem sua importância relacionada ao seu potencial vantagem competitiva como ação antimicrobiana (Canhoto, 2010).

**Tabela 1:** Análises físico-químicas realizadas para formulações contendo diferentes concentrações de extrato de *Ilex paraguariensis* com AgNPs.

Formulação (% de extrato e AgNO <sub>3</sub> )	Tamanho (nm)	PDI	pH	Teor total de fenólicos
Extrato 10%	-	-	6,3	338,368 ± 1,052
Extrato <i>Ilex paraguariensis</i> 10% 1 mmol	32.8 ± 0.5	0.379 ± 0.004	4,3	272,403 ± 7,145
Extrato <i>Ilex paraguariensis</i> 10% 1 mmol + NaOH	38.0 ± 0.6	0.399 ± 0.013	7,4	308,543 ± 21,613
Extrato <i>Ilex paraguariensis</i> 10% 2 mmol	28.3 ± 2.3	0.396 ± 0.003	5,8	253,456 ± 41,974
Extrato <i>Ilex paraguariensis</i> 10% 2mmol + NaOH	32.0 ± 0.4	0.371 ± 0.001	7,7	279,421 ± 79,047
<i>Ilex paraguariensis</i> 30 %	-	-	6,5	369,070 ± 13,987
Extrato <i>Ilex paraguariensis</i> 30% 1 mmol	33.2 ± 1.7	0.344 ± 0.019	4,7	196,964 ± 8,827
Extrato <i>Ilex paraguariensis</i> 30% 1 mmol + NaOH	34,1 ± 0.8	0.352 ± 0.004	7,2	204,684 ± 23,259
Extrato <i>Ilex paraguariensis</i> 30% 2 mmol	36.4 ± 0.7	0.373 ± 0.013	5,1	162,754 ± 0,803
Extrato <i>Ilex paraguariensis</i> 30% 2 mmol + NaOH	28.2 ± 0.4	0.347 ± 0.001	7,6	164,333 ± 0,303

Para determinação dos teores de fenólicos totais, foram construídas curvas analíticas de soluções diluídas de concentrações de ácido gálico (Figura 1) evidenciando que os padrões analisados ficaram de acordo com o que traz a literatura (Kolc, 2014). Um ácido fenólico amplamente disponível que possui, entre seus benefícios, uma significativa atividade antimicrobiana (Chanwitheesuk *et al.*, 2007). Esse composto pode ser encontrado em uvas, mangas, nozes, chá verde e outras frutas, além de estar presente no vinho (Korani *et al.*, 2014). Além disso, o ácido gálico demonstra potencial antioxidante

e possui propriedades anti-inflamatórias, antialérgicas, anticarcinogênicas e antivirais (LI et al., 2011).



**Figura 1:** Curva padrão do ácido gálico com leitura espectrofotométrica a 765 nm, utilizada para quantificação de fenóis totais

### 3.2 Análise da estabilidade da solução pelo potencial Zeta

Os valores do potencial Zeta para extratos frescos de *Ilex paraguariensis* (após a síntese) variaram de  $-20,1 \text{ mV} \pm 1,62 \text{ mV}$  a  $-27,2 \text{ mV} \pm 2,21 \text{ mV}$ , conforme descrito na Tabela 2. Esses valores sugerem boa estabilidade coloidal, independentemente da concentração do extrato de *Ilex paraguariensis* ou nitrato de prata utilizado, semelhantes aos estudos de Arreche et al. (2020) e Rolim et al. (2019). De acordo com a literatura, quanto maior o valor absoluto do potencial Zeta, mais estável é a suspensão, pois um valor maior do potencial Zeta corresponde a uma repulsão eletrostática mais forte entre as partículas, aumentando a estabilidade (Haider; Mehdi, 2014).

As propriedades dimensionais e elétricas das AgNPs obtidas a partir das concentrações mostradas na tabela 2, foram avaliadas quanto a magnitude do potencial Zeta, após a síntese e re-avaliadas após um período de 258 dias. O Objetivo foi avaliar a variação da estabilidade dos extratos em razão do tempo de armazenamento, bem como, tipo de frasco utilizado para esse fim, que são parâmetros fundamentais de avaliação para produtos que se destinam ao uso comercial, a medida do potencial Zeta e valores de Pdl foram obtidos de amostras com ou sem AgNPs armazenadas em frasco de vidro âmbar ou plástico transparente, após 258 dias (tabela 2). Esses dados mostram que independente do tempo de armazenamento e tipo de frasco as soluções se mostram estáveis caracterizando o grande potencial comercial do produto.

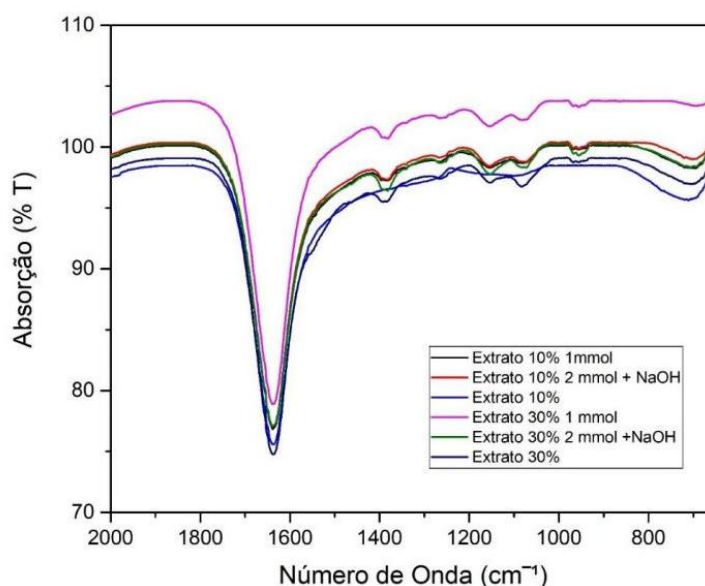
**Tabela 2:** Análise Potencial Zeta das amostras sintetizadas após 258 dias com armazenamento em frasco de vidro X, frasco de plástico em temperatura entre 18°C e 22°C.

Amostras	Potencial Zeta (mV) Vidro	PDI	Potencial Zeta (mV) Plástico	PDI
Extrato <i>Ilex paraguariensis</i> 10%	-26,5 ± 2,15	-	-23,7 ± 1,92	-
Extrato <i>Ilex paraguariensis</i> 30%	-26,5 ± 2,15	-	-25,7 ± 2,08	-
Extrato <i>Ilex paraguariensis</i> 10% + 1 mmol (AgNPs)	-20,3 ± 1,64	0,355 ± 0,014	-27,2 ± 2,21	0,367 ± 0,008
Extrato <i>Ilex paraguariensis</i> 10% + 1 mmol (AgNPs)+ NaOH	-22,4 ± 1,81	0,345 ± 0,002	-26,7 ± 2,17	0,350 ± 0,010
Extrato <i>Ilex paraguariensis</i> 10% + 2 mmol (AgNPs)	-26,1 ± 2,11	0,371 ± 0,010	-23,8 ± 1,93	0,378 ± 0,002
Extrato <i>Ilex paraguariensis</i> 10% + 2mmol (AgNPs)+ NaOH	-24,1 ± 1,95	0,330 ± 0,008	-22,0 ± 1,79	0,325 ± 0,028
Extrato <i>Ilex paraguariensis</i> 30% + 1 mmol (AgNPs)	-21,4 ± 1,74	0,435 ± 0,022	-20,1 ± 1,62	0,460 ± 0,015
Extrato <i>Ilex paraguariensis</i> 30% + 1 mmol (AgNPs) + NaOH	-26,7 ± 2,17	0,370 ± 0,012	-21,5 ± 1,75	0,388 ± 0,012
Extrato <i>Ilex paraguariensis</i> 30% + 2 mmol (AgNPs)	-26,2 ± 2,13	0,402 ± 0,015	-26,8 ± 2,17	0,430 ± 0,006
Extrato <i>Ilex paraguariensis</i> 30% + 2 mmol (AgNPs) + NaOH	-26,5 ± 2,15	0,399 ± 0,007	-26,7 ± 2,16	0,392 ± 0,001

### 3.3 FTIR

A espectroscopia no FTIR foi utilizada para identificar os possíveis grupos funcionais relacionados às biomoléculas constituintes do extrato de *Ilex paraguariensis* com AgNPs. Após 30 dias da síntese das amostras, encontrou-se que as bandas equivalentes a 1650 (cm<sup>-1</sup>) são atribuídas aos grupos carbonil de ésteres, aminas presentes na *Ilex paraguariensis* (Figura 2) em consonância aos achados de Areche *et al.*, (2020). Relacionado as intensidades referentes às vibrações das bandas de 1000 a 1400 mostradas quando as três concentrações são comparadas, possivelmente relaciona-se em função da quantidade de moléculas.

Todas as assinaturas identificadas foram relatadas como grupos químicos presentes em moléculas da *Ilex paraguariensis* (Silveira, 2019). O AgNO<sub>3</sub> apresentou banda característica próximo a 1,310 cm<sup>-1</sup>, referente ao estiramento do grupo nitro residual (NO<sub>3</sub>) conforme ilustrado na figura 2, o pico em 800 cm<sup>-1</sup> representa as vibrações de C-H em anéis aromáticos, aparecendo com menor intensidade nas AgNPs, podendo ser o resultado da interação destes compostos com as AgNPs ou com outro componente do próprio extrato. As bandas entre 1070-1118 cm<sup>-1</sup> podem ser atribuídas ao estiramento vibracional de C-O-C e C-O em compostos fenólicos que vão ao encontro dos achados de Silveira (2019).

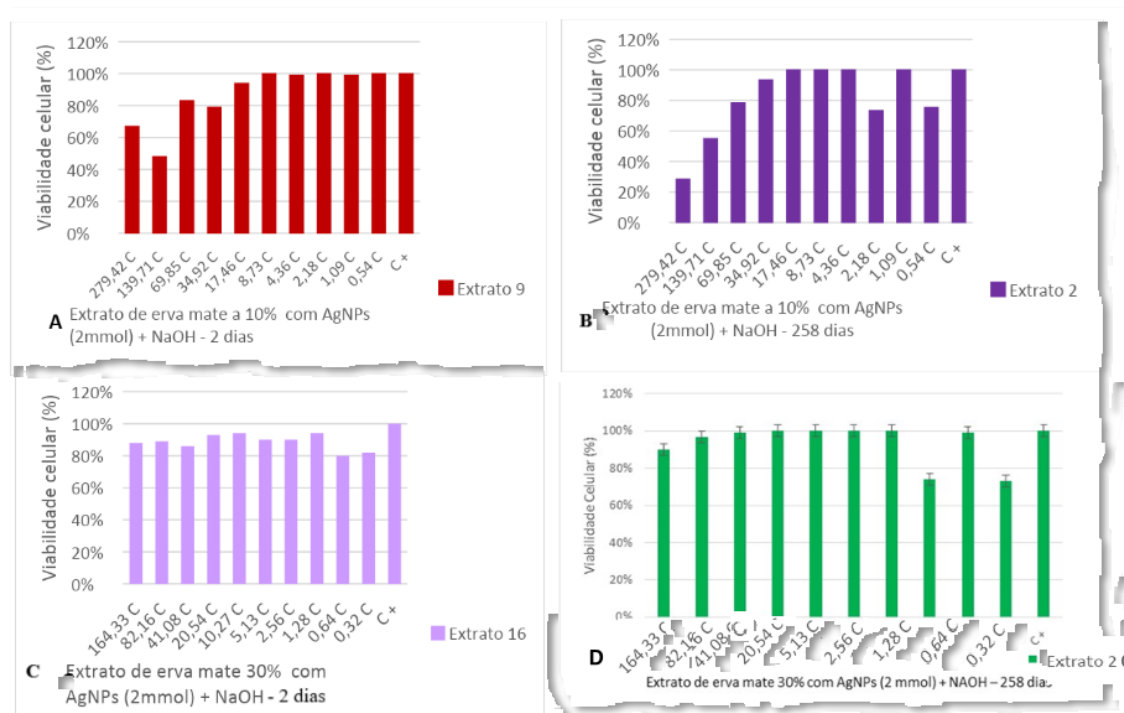


**Figura 2:** Análise no FTIR de todas as concentrações do extrato de *Ilex paraguariensis* (azul claro e azul marinho) e das concentrações de extrato de *Ilex paraguariensis* com AgNPs (preto, laranja, rosa e verde).

### 3.4 Resultado da viabilidade celular de fibroblastos humanos frente aos extratos de erva mate

Quanto ao resultado da viabilidade celular de fibroblastos humanos frente aos extratos de *Ilex paraguariensis*, na nanotecnologia, especificamente na produção de AgNPs, os compostos advindos de extratos vegetais podem conferir bioatividades às mesmas. Segundo a literatura, o tamanho da nanopartícula pode facilitar ou impedir sua absorção, internalização e distribuição nas células (Shang *et al.*, 2014) o que foi demonstrado com AgNPs de 20 nm encontradas no citoplasma, mitocôndrias e núcleo de linhagens celulares humanas avaliadas *in vitro* (Kruszewski *et al.*, 2011). Ainda relacionado ao tamanho, autores relatam que AgNPs menores entram mais facilmente nas células, diferentemente de AgNPs com 100 nm ou mais de diâmetro (Cho *et al.*, 2018; Zapór, 2016; Akter *et al.*, 2018), o que em nosso estudo encontramos, como demonstrado no gráfico A e no gráfico B, que a viabilidade celular é maior quando o extrato é recém sintetizado, porém ambos não apresentam toxicidade ao fibroblasto humano, quanto a melhor concentração da solução pensando em fins comerciais, como o apresentado no gráfico C e D que a viabilidade celular é acima de 80% em todas as concentrações independente do tempo de armazenamento. Contudo, a dependência do tamanho das AgNPs pode variar de acordo com o organismo avaliado, pois cada um apresenta seu

próprio limiar de toxicidade, ou ainda não haver qualquer correlação (Akter *et al.*, 2018; Bartłomiejczyk, 2013).



**Figura 3:** Viabilidade celular (%) de fibroblastos humanos sob extrato de *Ilex paraguariensis* com AgNPs com 2mmol AgNO<sub>3</sub> e NaOH, na figura A extrato à 10% após 2 dias de síntese, na figura B extrato à 10% com 258 dias de síntese, na figura C extrato à 30% com 2 dias de síntese e na figura D extrato à 30% com 258 dias de síntese.

A figura 3 descortina a viabilidade celular, mostrando-se presente em todas as concentrações independente do tempo de armazenamento. Ademais, notou-se uma possível relação com a concentração de fenólicos presentes em cada concentração, o que pode ser visualizado no eixo x de cada gráfico e hipotetiza-se uma relação entre os compostos fenólicos da *Ilex paraguariensis* com benefícios a saúde humana, por sua capacidade de modulação do estresse oxidativo (Pereira *et al.*, 2017) o que reduz o risco de desenvolvimento de patologias cuja etiologia envolve estresse oxidativo (Bracesco *et al.*, 2011; Mao *et al.*, 2017). Ainda relacionado a viabilidade, este resultado evidencia que o valor do pH da amostra possa ter maior impacto sobre a citotoxicidade celular que a prata em si, este resultando demonstra que na presença de maior concentração de prata, a correção do pH possa ter efeito positivo na viabilidade celular, dado este apresentados na tabela 1 que demonstram os valores de pH.

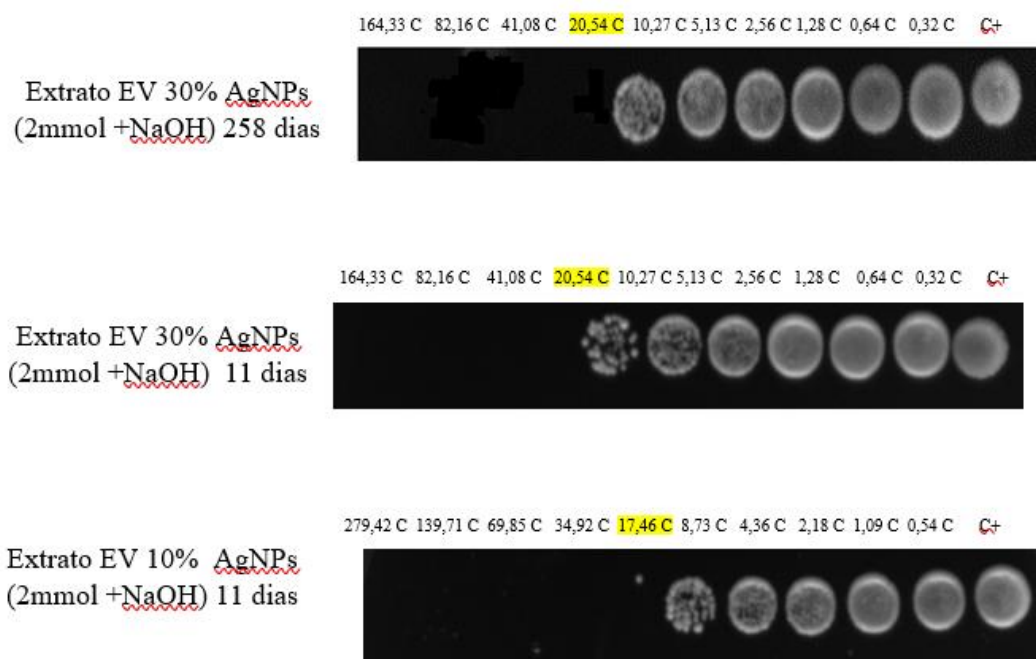
### 3.5 Atividade biológica de AgNPs com extrato de erva mate (*Ilex paraguariensis*) o potencial antifúngico

Quanto ao potencial antifúngico, a atividade biológica de AgNPs com extrato *Ilex paraguariensis*, nossos achados identificam que a concentração inibitória mínima (CIM) das AgNPs apresenta bom potencial antifúngico com 24h de incubação, contudo os resultados são satisfatórios nas composto com nº 2,3,7,8, 11 e 12 que ficam com a CIM em 0,001 após 24h de incubação, o que aponta que por mais diluído que o extrato *Ilex paraguariensis* com AgNPs se apresente, ainda apresenta atividade contra a *Candida Albicans*. Quantos aos mecanismos que proporcionam e explicam a atividade anti *cândida* das AgNPs, relata-se a capacidade de danificar a barreira de permeabilidade da membrana e destruir as bicamadas lipídicas resultando no vazamento de íons formando poros que dissipam o potencial elétrico da membrana (Kim *et al.*, 2009), somado a isso as AgNPs ainda agem no bloqueiam o ciclo celular na fase G2/M em *C. albicans* (KIM *et al.*, 2009), o que reafirma nosso achado de atividade e ainda indica que, por mais diluído que o extrato de *Ilex paraguariensis* com AgNPs ainda apresenta alta atividade contra a *Candida Albicans*.

**Tabela 3:** Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de *Ilex paraguariensis*, com as AgNPS em diferentes concentrações em mmol (AgNO<sub>3</sub>) e fenólicos contra *Candida albicans* ATCC 90028.

Extrato armazenado 11 dias		C (mmol)/ Fenólicos) Após 24h	C (mmol/ Fenólicos) Após 48h
1	Extrato de <i>Ilex paraguariensis</i> 10% 2 mmol Ag + NaOH	0,003 / 4,36	0,25 / 34,92 C
2	Extrato de <i>Ilex paraguariensis</i> 30% 2mmol Ag + NaOH	0,03 / 2,56	0,125 / 10,27 C
Extrato armazenado 4 meses			
3	Extrato 30% 2mmol Ag + NaOH	0,06 / 5,13 C	0,07 / 0,64C





**Figura 4:** Resultado da CFM dos extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* com AgNPS em diferentes concentrações de fenólicos contra *Candida albicans*.

Quanto à concentração fungicida mínima (CFM) encontramos que as concentrações do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* com as AgNPs apresentaram potencial antifúngico, tanto do extrato recém-sintetizado quanto com 258 dias de armazenamento, o que demonstra que nas mesmas concentrações do extrato de erva mate com AgNPs apresentam viabilidade celular e potencial antifúngico tanto em CIM quanto em CFM. Tal achado, em nossa amostra aponta que o tempo de armazenamento das amostras não interferiu no potencial antimicrobiano, dado que fortalece os indícios de estabilidade das AgNps em meio aquoso como também mencionado em outros estudos (Sharmila *et al.*, 2017, Balasubramanian; Kala; Pushparaj, 2020; Ren *et al.*, 2016, Bavaresco *et al.*, 2020).

## CONCLUSÃO

O tamanho das AgNPs obtidas e verificadas por DSL foi satisfatório para demais análises, assim como o potencial zeta mostrando a capacidade de estabilização das AgNPs através da rota verde utilizando o extrato aquoso de erva mate, mesmo após 258 dias de armazenamento. Quanto a concentrações dos compostos fenólicos foi possível concluir que provavelmente existe uma incorporação destes fenóis presentes no extrato de erva mate, através das AgNPs o que também ressalta os resultados do FTIR, onde existem bandas características onde tem o  $\text{AgNO}_3$ . Os resultados de maneira geral da CIM e CFM

apresentados neste estudo confirmaram que as AgNPs com o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* têm efeitos inibitórios significativos de atividade antifúngica ressaltando a importância desse estudo.

Concluimos que existem concentrações do *Ilex paraguariensis* com AgNPs, após um tempo de armazenamento que apresenta viabilidade celular para o fibroblastos humano e um potencial antifúngico frente a *cândida albicans*. Os achados indicam que a formulação com *Ilex paraguariensis* e AgNPs mantém estabilidade e viabilidade celular mesmo após longo armazenamento, destacando-se como candidata promissora para aplicações antimicrobianas, ainda que exija validação em modelos *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

AKTER, M. *et al.* A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. **Journal of advanced research**, v. 9, p. 1-16, 2018.

ALBERNAZ, V. L. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de Brosimum gaudichaudii, caracterização fisicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico**. 2014. 122 f. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

ALI, E. M.; ABDALLAH, B. M. Effective inhibition of candidiasis using an ecofriendly leaf extract of calotropis-gigantean-mediated silver nanoparticles. **Nanomaterials**, v. 10, n. 3, p. 422, 2020.

ARRECHE, R. A. *et al.* Synthesis of silver nanoparticles using extracts from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) wastes. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 1, p. 245-253, 2020.

BALASUBRAMANIAN, S.; KALA, S. M. J.; PUSHPARAJ, T. L. Biogenic synthesis of gold nanoparticles using Jasminum auriculatum leaf extract and their catalytic, antimicrobial and anticancer activities. **Journal Of Drug Delivery Science And Technology**, [s. l.], v. 57, p. 101620, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101620>.

BARTLOMIEJCZYK, T. *et al.* Silver nanoparticles—allies or adversaries? **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 20, n. 1, p. 48-54, 2013.

BAVARESCO, J. B. *et al.* Síntese verde de nanopartículas de prata a partir do extrato de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Scientia Cum Industria**, [s. l.], v. 8, n. 1, p.

39-45, 3 ago. 2020. Universidade Caxias do Sul. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.18226/23185279.v8iss1p39>.

BOAVENTURA, B. C. B. *et al.* Antioxidant potential of mate tea (*Ilex paraguariensis*) in type 2 diabetic mellitus and pre-diabetic individuals. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 3, p. 1057-1064, 2013.

BRACESCO, N. *et al.* Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **Journal of ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 378-384, 2011.

CANHOTO, M. J. **Biotecnologia vegetal de clonagem de plantas à transformação genética**. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2010.

CHANWITHEESUK, A. *et al.* Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice. **Journal of toxicologic pathology**, v. 31, n. 1, p. 73-80, 2018.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fifteenth informational supplement**. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005. (Document M100-S15).

DIAS, D. V. S. *et al.* Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extrato metanólico de *Podocarpus lambertii* Klotzch ex Endl / Green synthesis of silver nanoparticles using methanol extract of *Podocarpus lambertii* Klotzch ex Endl. **Brazilian Journal Of Development**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 42062-42072, 26 abr. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv7n4-595>.

ELBAZ, N. M. *et al.* Chitosan-based nano-in-microparticle carriers for enhanced oral delivery and anticancer activity of propolis. **International journal of biological macromolecules**, v. 92, p. 254-269, 2016.

FERNANDES, C. E. F. *et al.* Phytochemical profile, antioxidant and hypolipemiant potential of *Ilex paraguariensis* fruit extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 81, p. 139-146, 2016.

HAIDER, M. J.; MEHDI, M. S. Study of morphology and zeta potential analyzer for the silver nanoparticles. **International Journal of Scientific Engineering and Research**, v. 5, n. 7, p. 381-387, 2014.

JALAL, M. *et al.* Anticandidal activity of biosynthesized silver nanoparticles: effect on growth, cell morphology, and key virulence attributes of *Candida* species. **International journal of nanomedicine**, v. 14, p. 4667-4679, 2019.

KHAN, S. T.; MALIK, A. Engineered nanomaterials for water decontamination and purification: from lab to products. **Journal of Hazardous Materials**, v. 363, p. 295-308, 2019.

KIM, S. *et al.* Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. **Toxicology in vitro**, v. 23, n. 6, p. 1076-1084, 2009.

KOLC, C. S. M. **Composição química de própolis amarela do mato grosso do sul: Comparação com os tipo de própolis verde, vermelha e marrom.** Dissertação – Universidade estadual do centro oeste, Guarapuava, 2014.

KORANI, M. S. *et al.* Protective effects of gallic acid against chronic cerebral hypoperfusion-induced cognitive deficit and brain oxidative damage in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 733, p. 62-67, 2014.

KRUSZEWSKI, M. *et al.* Toxicity of silver nanomaterials in higher eukaryotes. **Advances in molecular toxicology**, v. 5, p. 179-218, 2011.

LI, D. *et al.* A straightforward method to determine the cytocidal and cytopathic effects of the functional groups of gallic acid. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 2210-2214, 2011

MAO, X. *et al.* Oxidative stress-induced diseases and tea polyphenols. **Oncotarget**, v. 8, n. 46, p. 81649, 2017.

MELO, G. B. **Síntese verde e caracterização de nanopartículas de prata usando extrato aquoso de erva mate (*Ilex paraguariensis*).** 2015. 39f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2015.

MERCÊ, A. L. R. *et al.* Fe (III) - Galactomannan Solid and Aqueous Complexes. Potentiometric, EPR. Spectroscopy and Thermal, p. 791–798. 2001.

PEREIRA, C. S. *et al.* *Ilex paraguariensis* decreases oxidative stress in bone and mitigates the damage in rats during perimenopause. **Experimental gerontology**, v. 98, p. 148-152, 2017.

RAKARIYATHAM, N. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 1044-1048, 2007

ROLIM, W. R. *et al.* Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: Characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity. **Applied Surface Science**, v. 463, p. 66-74, 2019.

SENA, A. E. C. *et al.* Síntese, caracterização e análise antimicrobiana de nanopartículas de prata utilizando extrato de humirianthera ampla como agente redutor. **SAJEETT**, Rio Branco, v. 8 n. 2, 2021.

SHANG, L.; NIENHAUS, K.; NIENHAUS, G. U. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. **Journal of nanobiotechnology**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2014.

SHARMILA, G. *et al.* Green synthesis, characterization and antibacterial efficacy of palladium nanoparticles synthesized using *Filicium decipiens* leaf extract. **Journal Of Molecular Structure**, [s. l.], v. 1138, p. 35-40, jun. 2017.

SILVA, A. M. **Filmes biodegradáveis de amido contendo compostos ativos encapsulados e nanopartículas**: uma revisão. 2016. 40f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

SILVA, M. T. *et al.* Os desafios na conduta terapêutica em pacientes acometidos com feridas crônicas. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, Umuarama, v. 27, n. 3, p. 1242 -1268, 2023.

SILVEIRA, A. P. **Fitossíntese de nanopartículas de prata por *Ilex paraguariensis*: propriedades físico-químicas e bioatividades**. 2019. 107 f., il. Tese (Doutorado em Nanociência e Nanobiotecnologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

USKOKOVI, V. Technology in Society. **Technology in Society**, 29, 43, 2007.

VEERASAMY, R. *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles using mangosteen leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. **Journal Of Saudi Chemical Society**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 113-120, abr. 2011.

WOLFF, S. M.; SILVIERA, A. C.; LAZZAROTTO, M. Metodologia para extração de fenólicos totais e antioxidantes da erva-mate. **Iniciação Científica CESUMAR**, v. 21, n. 1, p. 45-54, 2019.

ZAPÓR, L. Effects of silver nanoparticles of different sizes on cytotoxicity and oxygen metabolism disorders in both reproductive and respiratory system cells. **Archives of Environmental Protection**, v. 42, n. 4, p. 32-47, 2016.

## CONTRIBUIÇÕES DE AUTORIA

Talita Mendes dos Santos: Administração do projeto, metodologia, curadoria de dados, Redação do manuscrito original.

Carine Teles Sangaleti: Conceituação, metodologia.

Patricia de Souza Bonfim Mendonça: Metodologia e análise formal, Validação de dados e experimentos.

Juliana Rodrigues Hamm: Redação - revisão e edição.

Carlos Eduardo dos Santos: Redação - revisão e edição.

Cristiano Walter de Farias: Redação - revisão e edição.

Kelly Cristina Michalczyzyn: Redação - revisão e edição.

Iria barbara de Oliveira: Redação - revisão e edição.