



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ- REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**JESSICA MARIA TELES SOUZA**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE  
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO À BASE DE GOMA DO CAJUEIRO E  
GOMA DO CAJUEIRO CARBOXIMETILADA**

**PARNAÍBA  
MARÇO, 2018**

**JESSICA MARIA TELES SOUZA**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE  
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO À BASE DE GOMA DO CAJUEIRO E  
GOMA DO CAJUEIRO CARBOXIMETILADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Linha de Pesquisa: Nanotecnologia aplicada a biotecnologia

Orientador: Peter Eaton

**PARNAÍBA  
MARÇO, 2018**

Ficha Catalográfica elaborada pela Bibliotecária  
Christiane Maria Montenegro Sá Lins CRB/3 – 952

S729s

SOUZA, Jessica Maria Teles

Síntese, caracterização e aplicações biotecnológicas de nanopartículas de óxido de zinco à base de goma do cajueiro e goma do cajueiro carboximetilada/ Jessica Maria Teles Souza. – Parnaíba: Universidade Federal do Piauí - UFPI, 2018.

88 p. il.

Orientador: Peter Eaton

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia; Mestrado em Biotecnologia – UFPI, 2018.

1. Nanotecnologia. 2. Biotecnologia. 3. Goma do cajueiro. I. EATON, Peter. II. Universidade Federal do Piauí. III. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título. CDD  
620.8

Dedico esta dissertação à minha família e a todos os  
amigos que tanto me apoiaram!

## AGRADECIMENTOS

Os últimos dois anos foram de intenso aprendizado científico, mas a carga de amadurecimento pessoal é, também, inegável. Por esta oportunidade, devo agradecer imensamente a **Deus**, por ter orquestrado os meus caminhos e por fazer de mim uma pessoa de Fé, para não fraquejar e ser capaz de superar cada dificuldade.

Ao meu queridíssimo orientador, **Peter Eaton**, que, mesmo com um oceano de distância, me orientou com maestria e me deu o suporte que muitas vezes a mera presença física não oferece. Obrigada por me dar autonomia e confiar no meu trabalho, mas, sobretudo, por ser acessível e me ajudar ativamente sempre que precisei!

À minha **família**, que sempre esteve ao meu lado, comemorando cada pequena vitória e me dando apoio quando tudo parecia perdido. Sem este alicerce, tudo teria sido diferente.

À minha tão querida amiga **Adriany**, minha primeira mentora de laboratório, grande inspiração pessoal e profissional. Obrigada por ter trazido “a luz no fim do túnel” e por ter me explicado por várias vezes diferentes partes, antes pra mim desconhecidas, do universo da química. Às **garotas licopeno**: Raimunda, Andreeanne e Eryka, amigadas que saíram do BIOTEC para a vida. Ao **Joilson** e ao **Emanuel**, pela indispensável ajuda em questões referentes a este trabalho, seja na teoria, seja na bancada.

E por falar em BIOTEC, seria impossível não agradecer aos amados **Alyne, Ayslan, Bruno** e **Fábio**, cujas presenças tornaram-se fundamentais para experimentos mais divertidos e desabafos incessantes. Espero que os laços sigam fortes e que continuemos com este apoio mútuo ao longo não só da jornada científica, mas da vida fora dela.

Aos meus irmãos de alma **Natália** e **Deuzair**, que tanto me apoiaram, compartilharam minhas alegrias (mesmo muitas vezes não entendendo o que significavam aqueles resultados), ouviram pacientemente meus longos desabafos, me abraçaram – literal e figurativamente - nos momentos difíceis e sempre relevaram os compromissos desmarcados e as mensagens não respondidas devido aos famigerados experimentos laboratoriais, que sempre saíam mais demorados do que o planejado.

A todos aqueles que estiveram envolvidos, direta ou indiretamente, neste trabalho, serei eternamente grata!

*“A hora mais escura do dia é a que vem antes do Sol nascer”*

*Provérbio árabe*

## RESUMO

As interessantes propriedades físico-químicas e a baixa toxicidade do óxido de zinco fazem deste um interessante material, cujas aplicações estendem-se da indústria à saúde. As nanopartículas de óxido de zinco, por exemplo, têm se tornado um dos nanomateriais comercialmente mais importantes, sendo utilizadas como agentes antimicrobianos, como sistemas para entregas de fármacos e/ou na confecção de biossensores. Os métodos utilizados para a síntese destas nanopartículas, entretanto, são, em sua maioria, essencialmente químicos e, portanto, podem gerar subprodutos tóxicos. Neste sentido, metodologias com uma abordagem de síntese verde têm ganhado destaque pelo uso de produtos naturais, ecologicamente corretos, que podem minimizar a toxicidade destes produtos. A goma do cajueiro é um heteropolissacarídeo complexo, obtido a partir o exsudato do caule do cajueiro, que tem sido utilizado, nos últimos anos, como agente redutor e/ou estabilizante na síntese de nanopartículas. Algumas modificações, como a carboximetilação, por exemplo, podem ser utilizadas para melhorar a reatividade da goma, voltando seu uso para fins mais específicos. Neste trabalho, nanopartículas de óxido de zinco foram sintetizadas por uma rota de síntese verde, utilizando goma do cajueiro e goma do cajueiro carboximetilada como matrizes. As nanopartículas obtidas foram caracterizadas por espectroscopia do ultravioleta-visível, espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier, microscopia de força atômica e difração de raios-X. Todas as técnicas revelaram dados característicos para as nanopartículas de óxido de zinco, confirmando sua formação. A microscopia de força atômica mostrou partículas com tamanhos que variavam entre 35nm e 129 nm, a depender do material utilizado para a síntese. Testes antimicrobianos demonstraram que as nanopartículas sintetizadas apresentam interessante potencial contra fungos e bactérias, com destaque para as espécies *Staphylococcus epidermidis* e *Candida parapsilosis*, que apresentaram maior susceptibilidade. Além disso, todas as amostras sintetizadas mostraram-se biocompatíveis pelo teste de indução de hemólise, no qual não se observou atividade hemolítica em nenhuma das concentrações testadas. Testes eletroquímicos demonstraram, ainda, que as nanopartículas sintetizadas no presente trabalho, quando associadas ao polímero condutor Polianilina, foram capazes de detectar o hormônio neurotransmissor Dopamina no meio testado, apresentando, portanto, potencial para sensoriamento. Maiores investigações ainda se fazem necessárias, entretanto, para melhor caracterizar esse sistema.

**PALAVRAS-CHAVE:** Nanotecnologia; óxidos de metais; antimicrobiano; biossensores eletroquímicos

## ABSTRACT

The interesting physical-chemical properties and low toxicity of zinc oxide enables this material to be applied in different areas, such as industry and healthcare. Zinc oxide nanoparticles, for example, have become one of the most commercially important nanomaterials and have been used as antimicrobial agents, drug delivery systems and/or biosensors. However, most methods used for the synthesis of these nanoparticles are based on chemical processes, which can result in the formation of toxic by-products. In this regard, green synthesis approaches stand out for the use of natural products, which are environmentally friendly and may minimize the toxicity of the nanoparticles. Cashew gum is a complex heteropolysaccharide, obtained from the stem exudate of cashew tree and has been recently used as reducer and/or stabilizing agent for the synthesis of nanoparticles. Some modifications, such as carboxymethylation, for example, have also been used to improve the reactivity of the gum and tune its properties for specific purposes. In this study, zinc oxide nanoparticles were synthesized through a green synthesis route, using cashew gum and carboxymethylated cashew gum as biotemplates. The obtained nanoparticles were characterized by UV-visible spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, atomic force microscopy and X-ray diffraction. All techniques showed characteristic data for zinc oxide nanoparticles, which confirmed its synthesis. Atomic force microscopy images showed nanoparticles with sizes varying from 35 nm and 129 nm, depending on the gum used for the synthesis. Antimicrobial tests showed that the nanoparticles have an interesting potential against bacteria and yeasts, particularly *Staphylococcus epidermidis* and *Candida parapsilosis*, which showed greater susceptibility. All the samples synthesized were considered biocompatible by the absence of haemolytic activity, observed on the haemolysis assay. Furthermore, electrochemical tests showed that the synthesized nanoparticles, in association with the Polyaniline, were able to detect the neurotransmitter Dopamine, which indicates a potential for use as a biosensor. However, further investigations must be made for a better characterization of the system.

**KEYWORDS:** Nanotechnology; metal oxides; antimicrobial; electrochemical sensors



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Classificação dos métodos de síntese de nanopartículas, de acordo com as abordagens “bottom-up” e “top-down” .....	18
Figura 2- Estruturas cristalinas do ZnO: (A) Sal de rocha; (B) Blenda de Zinco; (C) Wurtzita. ....	19
Figura 3 - Etapas da síntese de ZnO-NPs pelo método de precipitação.....	22
Figura 4 - (A) Resina obtida a partir do exsudado do tronco do cajueiro. (B) Goma do cajueiro após isolamento. ....	27
Figura 5 – (A) Unidades de monossacarídeos presentes na composição da GC brasileira. (B) Representação da estrutura do polissacarídeo extraído do exsudato do cajueiro.....	28
Figura 6 - (A) Estrutura da goma do cajueiro e (B) Goma do cajueiro carboximetilada, onde R pode ser –H ou –CH <sub>2</sub> COOH.....	29
Figura 7 - Esquema simplificado do funcionamento de um sensor.....	30
Figura 8 - Representação esquemática de um sensor eletroquímico, sua interação com o substrato e a transdução destas interações em sinais mensuráveis .....	32
Figura 9 - Estrutura química da Dopamina .....	34
Figura 10 - Representação esquemática do processo de obtenção da goma do cajueiro.....	38
Figura 11 - ZnO-NPs obtidas a partir de síntese sol-gel, seguida por calcinação. (A) ZnO-NP1; (B) ZnO-NP2; (C) ZnO-NP3; (D) ZnO-NP4. ....	45
Figura 12 - Espectros de absorção UV-Visível das ZnO-NPs sintetizadas com (A) Goma do cajueiro e (B) Goma do cajueiro carboximetilada.....	46
Figura 13 - Imagens de microscopia de força atômica obtidas para (A) ZnO-NP1; (B) ZnONP2; (C) ZnO-NP3 e (D) ZnO-NP4. À esquerda, observam-se imagens de altura e, à direita, o perfis típicos, extraídos a partir das nanopartículas.....	48
Figura 14 - Monitoramento da estabilidade das ZnO-NPs em solução por espectroscopia UV-Vís. (A) ZnO-NP1; (B) ZnO-NP2; (C) ZnO-NP3; (D) ZnO-NP4. Em azul, rosa e preto, observam-se os espectros obtidos um, dois e três meses, respectivamente, após o preparo da solução.....	50
Figura 15 - Acompanhamento da estabilidade das ZnO-NPs, armazenadas em pó, à temperatura ambiente, por espectroscopia do UV-visível. Os espectros mostram em (A) ZnO-NP1, (B) ZnO-NP2, (C) ZnO-NP3 e (D) ZnO-NP4. As medidas foram realizadas logo após e três meses após a síntese das NPs. ....	51

Figura 16 - Espectros obtidos por espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier para a Goma do cajueiro (vermelho) e para a Goma do cajueiro carboximetilada (azul). .....	52
Figura 17 - Espectros obtidos por espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier para ZnO-NP1 (em azul) e ZnO-NP2 (em rosa). .....	53
Figura 18 - Espectros obtidos por espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier para ZnO-NP3 (em vermelho) e ZnO-NP4 (em verde). .....	54
Figura 19 - Padrão de Difração de Raios-X encontrado para as ZnO-NPs sintetizadas .....	55
Figura 20 - Imagens obtidas por AFM, mostrando: (A) Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 controle e (B) Staphylococcus epidermidis ATCC 12228, tratadas com ZnO-NP2, na concentração de 62,5 µg/mL (sub-MIC). .....	59
Figura 21 – Análise do perfil de superfície das bactérias, realizada a partir das imagens obtidas por microscopia de força atômica mostrando (A) Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 controle e (B) Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 controle após tratamento com ZnO-NP2 .....	61
Figura 22 - Imagens obtidas por microscopia do força atômica, mostrando: (A) Candida parapsilosis ATCC 22019 controle (sem tratamento) e (B) Candida parapsilosis ATCC 22019 após tratamento com ZnO-NP2. ....	64
Figura 23 – Curvas de corrente versus potencial, obtidas por voltametria cíclica, mostrando os perfis eletroquímicos de (A) ITO não modificado, (B) ITO modificado com ZnO-NPs à base de GC e (C) ITO modificado com ZnO-NPs à base de GCCM. Voltamogramas obtidos em PBS 0,1 M, pH 2,1, a $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . .....	69
Figura 24- Curvas de corrente versus potencial, obtidas por voltametria cíclica, mostrando filmes contendo duas bicamadas e comparando a sequência de adsorção dos materiais de interesse. Para efeitos comparativos é mostrada a resposta de um filme bicamada de apenas PANI. Voltamogramas obtidos em PBS 0,1 M, pH 2,1, a $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . ....	70
Figura 25 – Voltamogramas cíclicos mostrando a influência da composição do filme LbL na resposta eletroquímica de detecção de DA. A) mostra a resposta do filme de ITO/ZnONPs, onde o insert mostra a resposta apenas do ITO, B) ITO/PANI/PANI, C) ITO/PANI/ZnONPs e D) ITO/ZnONPs/PANI, em diferentes concentrações de DA. Voltamogramas obtidos em PBS 0,1 M, pH 2,1, a $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . .....	72
Figura 26 - Influência do número de bicamadas do filme de ITO/(ZnONPs/PANI) <sub>n</sub> na detecção de DA. A) mostra voltamogramas cíclicos comparando a corrente registrada para este filme, contendo 1, 2 ou 3 bicamadas na ausência de DA. B), C), e D) mostram, respectivamente, a resposta do filme de 1, 2 e 3 bicamadas na presença de 400 µM de DA. ....	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Período de incubação dos fungos utilizados para o teste de susceptibilidade.....	43
Tabela 2 - Tamanho médio, em nanômetros, das ZnO-NPs, calculado a partir de imagens obtidas por microscopia de força atômica. ....	49
Tabela 3 - Estimativa do tamanho do cristalito de ZnO, obtida a partir da Equação de Scherer. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão. ....	56
Tabela 4 - Atividade antimicrobiana das ZnO-NPs, obtida a partir da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Dados expressos em $\mu\text{g/mL}$ .....	58
Tabela 5 - Atividade antifúngica das ZnO-NPs sintetizadas, obtida pela determinação da concentração inibitória mínima contra fungos leveduriformes. Dados expressos em $\mu\text{g/mL}$ ..	62
Tabela 6 - Atividade antifúngica das ZnO-NPs sintetizadas contra fungos filamentosos, obtida a partir da determinação da Concentração Fungicida Mínima. Dados expressos em $\mu\text{g/mL}$ ...	62
Tabela 7 - Percentual de aumento de corrente em função do aumento de concentração de DA .....	75

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFM	Microscopia de força atômica
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CEA	Antígeno carcinoembriogênico
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DA	Dopamina
DRX	Difração de raios-X
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier
GC	Goma do Cajueiro
GCCM	Goma do Cajueiro Carboximetilada
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
ITO	Óxido de estanho dopado com índio
LbL	<i>Layer-by-layer</i>
MCA	Ácido monocloroacético
NPs	Nanopartículas
PANI	Polianilina
ZnO-NPs	Nanopartículas de óxido de zinco

## SUMÁRIO

<b>1.0 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2.0 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
<b>2.1. Considerações gerais acerca de nanotecnologia</b> .....	17
<b>2.2. O óxido de zinco</b> .....	19
2.2.1. Aspectos estruturais do óxido de zinco e suas propriedades .....	19
2.2.2. Nanopartículas de óxido de zinco: métodos de síntese e aplicações .....	21
2.2.3. Atividade antimicrobiana de ZnO-NPs: potencial frente a bactérias e fungos.....	23
<b>2.4. Gomas naturais e suas aplicações</b> .....	26
<b>2.5. A goma do cajueiro, suas modificações e aplicações</b> .....	27
<b>2.6. Sensores e biossensores</b> .....	30
<b>2.7. A dopamina, suas funções e métodos de detecção: considerações gerais</b> .....	34
<b>3.0 OBJETIVOS</b> .....	37
<b>3.1. Objetivo Geral</b> .....	37
<b>3.2. Objetivos específicos</b> .....	37
<b>4.0 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	38
<b>4.1. Isolamento da goma do cajueiro</b> .....	38
<b>4.2. Carboximetilação da goma do cajueiro</b> .....	39
<b>4.4. Síntese das ZnO-NPs</b> .....	39
<b>4.5. Caracterização das nanopartículas</b> .....	39
4.5.1. Espectroscopia de absorção do UV-Visível .....	39
4.5.2 Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	40
4.5.3. Microscopia de Força Atômica (AFM) .....	40
4.5.4 Difração de Raios-X (DRX) .....	41
<b>4.6. Avaliação da atividade antimicrobiana</b> .....	41
4.6.1. Avaliação da atividade antibacteriana <i>in vitro</i> .....	41
4.6.2. Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> .....	42
<b>4.7. Avaliação da biocompatibilidade por ensaio de hemólise</b> .....	44
<b>4.8. Preparo de filmes automontados para detecção de Dopamina</b> .....	44
4.8.1. Preparo das soluções.....	44
4.8.2. Preparo dos filmes automontados (LbL) .....	45
<b>5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	45
<b>5.1. Caracterização</b> .....	45
<b>5.2. Atividade antimicrobiana e biocompatibilidade</b> .....	57
5.3. Preparo de filmes automontados para detecção de Dopamina .....	68

<b>6.0 CONCLUSÃO.....</b>	<b>76</b>
<b>7.0 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>77</b>
<b>8.0 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>78</b>

## 1.0 INTRODUÇÃO

As recentes descobertas no campo da nanociência e da nanotecnologia têm gerado grande impacto em diferentes áreas, desde a química analítica, passando pelos setores industrial, farmacêutico e biomédico (SORIANO et al., 2017). As estruturas em nanoescala apresentam, quando comparadas a micromateriais ou aos seus materiais de origem, propriedades físico-químicas peculiares, que variam de acordo com a forma, tamanho, distribuição e estado de agregação das partículas (ELAHI, KAMALI, BAGHERSAD, 2018).

As nanopartículas de óxidos de metais estão entre as categorias de nanomateriais mais utilizadas e têm sido aplicadas em diferentes produtos comerciais e industriais, que abrangem dispositivos médicos, cosméticos e eletrônicos (KAWEETEERAWAT, et al., 2014). Dentre elas, as nanopartículas de óxido de zinco (ZnO-NPs) têm sido alvo de crescente interesse.

O óxido de zinco (ZnO) é um interessante material que apresenta boas propriedades ópticas, elétricas, catalíticas e fotoquímicas (VARAPRASAD et al., 2016). As ZnO-NPs, produzidas pelos mais diferentes métodos e nas mais variadas formas, têm sido utilizadas como fotocatalíticos (ATCHUDAN et al., 2016; GAHYEMPOUR, MONTAZER, RAD, 2016; FARDOOD et al., 2017), agentes antibacterianos (SHARMA et al., 2010; KHAN et al., 2016; ZARE et al., 2017), antifúngicos (SHARMA, GHOSE, 2015; SILVA-BAILÃO et al., 2017), como sistemas para entrega de drogas (DHIVYA et al., 2018) e biossensores (NOROUZI, et al., 2011; MOLAAKBARI, MOSTAFAVI, BEITHOLLAHI, 2015; SINGHAL, PUNDIR, NARANG, 2017; SHARMA et al., 2018). O grande interesse pelo uso das ZnO-NPs em aplicações biomédicas tem como base o fato de que este material apresenta boa estabilidade e baixa toxicidade, além de ser um mineral essencial ao organismo, sendo considerado seguro pela *Food and Drug Administration* (FDA) (21CFR182.8991) (DJURISIC; LEUNG, 2006; PREMANATHAN et al., 2011; MUÑOZ, 2013).

Apesar da grande variedade de métodos propostos, os métodos químicos costumam ser o mais utilizados para a síntese de ZnO-NPs. Entretanto, estes métodos apresentam a desvantagem de, por muitas vezes, gerar subprodutos tóxicos, o que dificulta a aplicação destes materiais em saúde (GUNALAN, SIVARAJ, RAJEDRAN, 2011). Neste sentido, os métodos com uma abordagem de síntese verde têm sido cada vez mais utilizados por serem considerados, em geral, ecologicamente corretos e capazes de gerar produtos com menor toxicidade (DARROUDI et al., 2014).

Nos últimos anos, o uso de biopolímeros como ágar, carragenina, amido, pectina e gomas em geral (tragacanto, guar, arábica, karaya, etc) como agentes redutores e/ou

estabilizantes, ou como *biotemplates* para a síntese de nanopartículas tem sido bastante investigado, devido à sua biodegradabilidade, baixo custo e fácil obtenção (PADIL, CERNIK, 2013; DARROUDI et al., 2013; DARROUDI et al., 2014; FARDOOD et al., 2017). A goma do cajueiro (GC) é um heteropolissacarídeo complexo obtido a partir do exsudato proveniente do caule ou ramos da espécie *Anacardium occidentale* L., uma árvore popularmente conhecida como Cajueiro, amplamente presente em países tropicais, como o Brasil. Sua composição constitui-se principalmente de  $\beta$ -D-galactose (72 %),  $\alpha$ -D-glicose (14%), arabinose (4.6 %), ácido glicurônico (4,6%) e ramnose (3.2 %) (QUELEMES et al., 2013; RIBEIRO et al., 2016). Algumas modificações podem ser feitas em sua estrutura, com o objetivo de melhorar sua reatividade e, conseqüentemente, sua aplicabilidade em diferentes setores. Dente estas, a Carboximetilação tem sido utilizada para melhorar sua solubilidade em água, pela adição de grupos carboxila à estrutura da goma (RIBEIRO et al., 2016).

Diversos estudos têm proposto a potencial aplicação da GC na síntese de nanomateriais (DA SILVA et al., 2009; SILVA et al., 2010; DE OLIVEIRA; QUELEMES et al., 2013; OLIVEIRA; PAULA; PAULA, 2014; PITOMBEIRA et al., 2015). Portanto, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar, caracterizar e investigar o potencial biotecnológico de ZnO-NPs, produzidas a partir de um método de síntese verde, à base de goma do cajueiro (GC) e goma do cajueiro carboximetilada (GCCM).



## 2.0 REFERENCIAL TEÓRICO

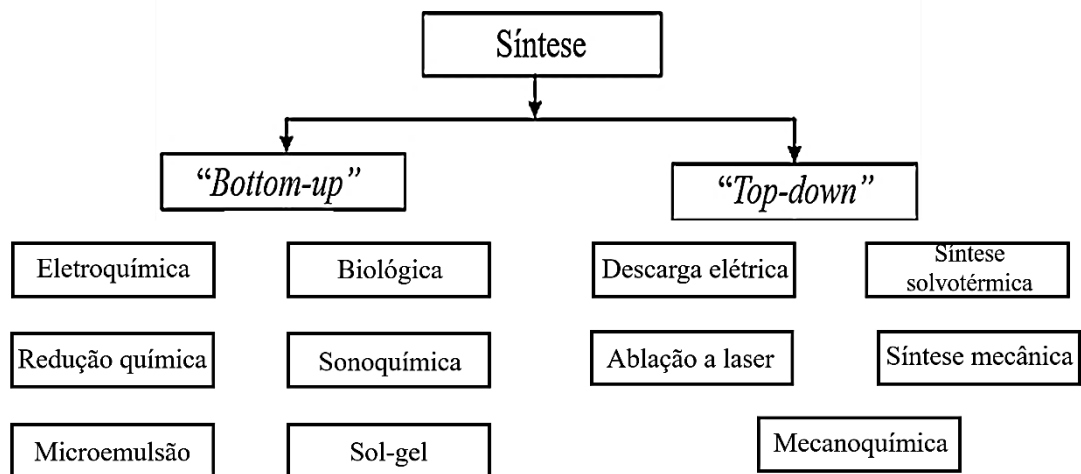
### 2.1. Considerações gerais acerca de nanotecnologia

O prefixo “nano” é derivado do Grego “*nanos*”, que significa “anão”. Este termo é popularmente utilizado para designar objetos, sistemas ou fenômenos que possuem características na escala nanométrica, unidade de medida que corresponde à bilionésima parte do metro ( $10^{-9}$  m). A “nanotecnologia” é comumente definida como o entendimento, controle e reestruturação da matéria na ordem de nanômetros, com o objetivo de criar materiais com funções e propriedades fundamentalmente novas (BUZEA, PACHECO, ROBBIE, 2007; SANCHEZ; SOBOLEV, 2010). Quando um material é redimensionado à escala nanométrica, sendo dividido em partículas de menor tamanho, com uma ou mais dimensões, exibem-se propriedades inesperadas, as quais serão totalmente diferentes daquelas apresentadas pelo material de origem (TAMILVANAN et al., 2014).

A síntese de materiais nanoestruturados requer o uso de métodos e processos que proporcionem a obtenção de estruturas com dimensões mínimas (BISWAS et al., 2012). De modo geral, estes métodos podem ser classificados em duas abordagens: *top-down* e *bottom-up*. A perspectiva *top-down*, cujos métodos podem ser também denominados “métodos físicos”, consiste na utilização do controle de parâmetros experimentais externos, de modo a formar nanomateriais com tamanhos e formas controladas a partir da redução de um material com dimensões maiores, geralmente na escala macrométrica. Em contrapartida, na abordagem *bottom-up*, os átomos ou moléculas geralmente são levados a formar nanoestruturas por meio de auto-organização. Por este motivo, os métodos *bottom-up* são também designados “nanotecnologia molecular” ou “manufatura molecular” (MIJATOVIC; EIJKEL; VAN DEN BERG, 2005; SANCHEZ; SOBOLEV, 2010; BISWAS et al., 2012; TAMILVANAN et al., 2014). A representação esquemática na Figura 1 demonstra os principais métodos de síntese, considerando ambas as abordagens.

A nanotecnologia está associada principalmente à síntese de nanopartículas (NPs) de tamanhos, formas e composição variadas, e suas potenciais aplicações. Nos últimos 20 anos, um grande número de trabalhos tem focado na produção de NPs com tamanhos e estruturas controlados, a partir dos mais diversos materiais, como semicondutores, óxidos e fulerenos, além de materiais orgânicos (LIAO; NEHL; HAFNER, 2006; VIRKUTYTE; VARMA, 2011).

Figura 1 - Classificação dos métodos de síntese de nanopartículas, de acordo com as abordagens “bottom-up” e “top-down”



Fonte: Adaptado de Tamilvanan et al., 2014

As nanopartículas metálicas, por exemplo, têm sido utilizadas pelo homem desde a idade média, com fins decorativos. Os corantes comumente utilizados à época para a personalização de vidros e porcelanas continham partículas coloidais de ouro. Este fato, evidentemente, era desconhecido até o ano de 1857, quando Michael Faraday, em seu trabalho, elucidou o mecanismo de formação de metais coloidais, preparou sóis estáveis e chamou-os de “metais divididos”. Desde então, muito se tem descoberto sobre a formação, as propriedades e as aplicações das NPs (RAO et al., 2000).

Com o aumento do número de pesquisas na área, o entendimento da natureza destes pequenos “agregados” tem progredido. Desta forma, entende-se que eles não podem ser tratados simplesmente como diminutos blocos, tal como o termo “metais divididos” sugeria. À medida que o tamanho da partícula diminui, os elétrons ficam cada mais vez mais confinados, levando a um aumento na energia de banda. Além disso, uma alta proporção de átomos estará presente na superfície das nanopartículas, conferindo-lhes alta reatividade (KLAR et al., 1998; RAO et al., 2000 EUSTIS; EL-SAYED; KASHA, 2006; SARDAR et al., 2017).

A nanotecnologia ultrapassa os limites entre as ciências biológicas e a tecnologia, sendo comumente referida como uma área multidisciplinar (WOLFSON, 2003). A prova disso é que a síntese de NPs envolve os mais diferentes métodos e objetivos, tendo elas encontrado aplicações industriais como fotocatalíticos (LINIC et al., 2015), na elaboração de embalagens inteligentes para alimentos (HAMAD et al., 2018), como peças isolantes em cerâmica (CONTRERAS, RODRÍGUEZ, 2017), entre outros. Entretanto, nos últimos anos o interesse em voltar o uso de NPs para o setor biomédico tem sido crescente. Neste caso, parecem

destacar-se as nanopartículas de prata (Ag), ouro (Au), cobre (Cu), titânio (Ti), platina (Pt) e paládio (Pd), por exibirem, além de significantes propriedades físicas e químicas, funções biológicas consideráveis (ZARE; SHABANI, 2016).

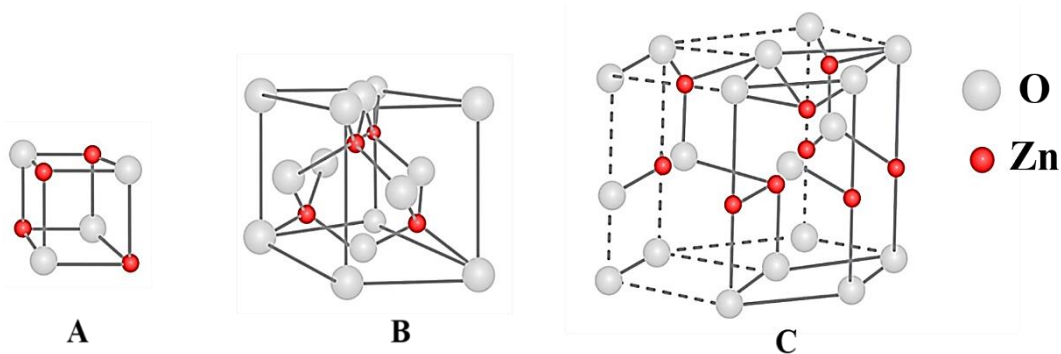
Deste modo, as propriedades únicas das NPs e dos nanomateriais em geral podem proporcionar o desenvolvimento de novas tecnologias que possam auxiliar o setor biomédico, tanto na detecção quanto no tratamento de doenças. Abordagens comuns incluem seu uso como agentes de contraste em imagiologia, veículos para entrega de fármacos e agentes terapêuticos, aplicações estas que podem ser exploradas conforme as propriedades de cada nanomaterial (LIAO; NEHL; HAFNER, 2006).

## 2.2. O óxido de zinco

### 2.2.1. Aspectos estruturais do óxido de zinco e suas propriedades

O ZnO é um semicondutor II-VI, do tipo n, que apresenta um *band gap* de 3,37 eV e alta energia de ligação (60 eV). A olho nu, apresenta-se como um pó de coloração branca, ou branco-amarelada, com boa solubilidade em ácidos e baixa solubilidade em água, álcoois ou solventes orgânicos. À temperatura e pressão ambientes, este material cristaliza na forma *wurtzita*, uma malha hexagonal pertencente ao grupo espacial 186 (P6<sub>3</sub>mc), caracterizada por duas “submalhas” interconectadas de Zn<sup>2+</sup> e O<sup>2-</sup>, de modo que cada íon de Zn está circundado por um tetraedro de íons de O e vice-versa. Além do cristal *wurtzita*, o ZnO pode formar também cristais do tipo sal de rocha e blenda de zinco. Os primeiros, entretanto, apenas possuem estabilidade caso cresçam formando estruturas cúbicas, enquanto os segundos necessitam de altas pressões para formar-se. (COLEMAN, JAGADISH, 2006; MUÑOZ, 2013; SILVA, 2015; DIMAPILIS et al., 2018). Os tipos de cristais formados pelo ZnO estão representados na Figura 2.

Figura 2- Estruturas cristalinas do ZnO: (A) Sal de rocha; (B) Blenda de Zinco; (C) *Wurtzita*.



Fonte: Próprio autor

A ausência de um centro de simetria no cristal *wurtzita*, faz do ZnO um material com fortes propriedades piezo e piezoelétricas. Estas propriedades consistem em gerar potencial elétrico em resposta a deformações e aquecimento, respectivamente. Os materiais piezoelétricos encontram vastas aplicações no setor eletrônico, como transdutores, atuadores e sensores. No setor biomédico, por sua vez, estes materiais têm se destacado principalmente na área da engenharia tecidual, devido à sua capacidade de impelir estímulos elétricos à célula, promovendo a regeneração dos tecidos. Deste modo, a estrutura do cristal de ZnO favorece sua utilização no desenvolvimento destes dispositivos (TALAM, KARUMURI, GUNNAM, 2012; BOWEN et al., 2014; RAJABI et al., 2015). Outras aplicações do ZnO incluem seu uso em células solares, fotodetectores, fotocatalíticos, cosméticos – principalmente aqueles que visam à proteção contra a radiação ultravioleta – e agentes antimicrobianos (DJURISIC; LEUNG, 2006; DARROUDI et al., 2013 KOLODZIEJCZAK-RADZIMSKA; JESIONOWSKI, 2014; SIRELKHATIM et al., 2015).

Além de quimicamente estável, o ZnO também é biocompatível, o que o torna apto não somente para o setor industrial, mas também para aplicações em saúde. A principal vantagem do uso de óxidos inorgânicos nestes casos consiste no fato de que eles, na maioria das vezes, contêm elementos minerais essenciais à saúde, que exibem excelente atividade, mesmo estando em baixas concentrações. Além disso, sua toxicidade parece ser mínima. O ZnO é um dos cinco compostos de zinco considerados seguros pela *Food and Drug Administration* (FDA) (21CFR182.8991), sendo utilizado no tratamento da deficiência de zinco, além de incorporado em pomadas e pós antissépticos devido ao seu potencial antimicrobiano (DJURISIC; LEUNG, 2006; PREMANATHAN et al., 2011; MUÑOZ, 2013).

Desde a década de 1960, as propriedades únicas do ZnO têm proporcionado um crescente interesse por seu uso em diferentes materiais. Nos últimos anos, porém, este interesse tem se concentrado na nanoestruturação de materiais à base de ZnO. Isto ocorre devido ao fato de que a redução destes materiais à escala nanométrica permite a observação de propriedades inesperadas, isto é, provoca um comportamento diferente daquele observado em seu material de origem (WANG, 2004; TAMILVANAN et al., 2014).

Como se sabe, a estrutura e morfologia do ZnO influenciam fortemente suas propriedades físicas e químicas. Deste modo, o processo de nanoestruturação deste material é capaz de alterar estas propriedades por meio da alteração do tamanho, orientação e cristalinidade do material sintetizado. Sendo assim, estas novas propriedades físico-químicas, aliadas à baixa toxicidade do ZnO e as amplas possibilidades de aplicação deste material fazem da síntese, caracterização e funcionalização de ZnO-NPs uma área promissora e desafiadora,

na qual ainda são necessários estudos que permitam um melhor conhecimento deste material e suas aplicações (MUÑOZ, 2013; SILVA 2015).

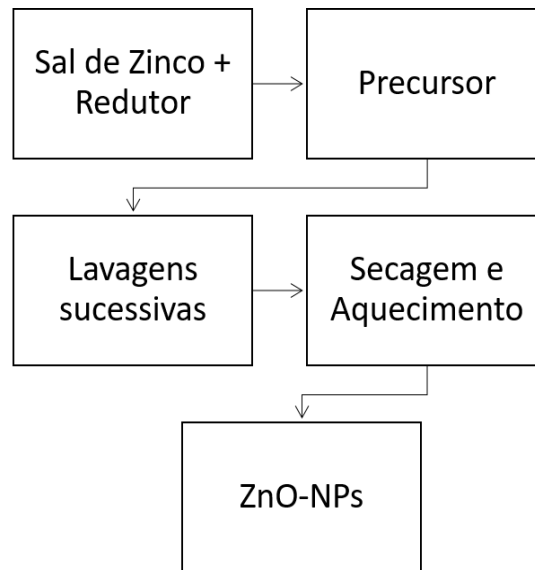
### 2.2.2. Nanopartículas de óxido de zinco: métodos de síntese e aplicações

Recentemente, as ZnO-NPs têm se tornado um dos nanomateriais comercialmente mais importantes do mundo. Esta importância deve-se, principalmente, às suas múltiplas aplicações, que incluem seu uso em fotodetectores, tinturas e biossensores, embalagens inteligentes na indústria alimentícia, ou como agentes antibacterianos e antifúngicos na indústria farmacêutica (BA-ABBAD et al., 2017).

Diferentes métodos têm sido propostos para a síntese de ZnO-NPs, como a síntese hidrotérmica, eletroquímica, por combustão, decomposição térmica, deposição eletroforética, combustão assistida por micro-ondas, spray pirólise, síntese sol-gel e precipitação. Entretanto, a necessidade de equipamentos sofisticados, uso de altas temperaturas e múltiplas etapas de síntese são fatores que dificultam a utilização da maioria dos métodos propostos. Neste aspecto, metodologias como a síntese sol-gel e a precipitação direta apresentam vantagens frente aos demais métodos. Isto se deve não somente ao fato de serem métodos econômicos, eficientes e adaptáveis, mas principalmente por serem métodos que, convencionalmente, podem fornecer um maior controle da nucleação e do crescimento dessas nanopartículas ( WANG; MUHAMMED, 1999; KUMAR et al., 2013; NAGAJYOTHI et al., 2013; RAOUFI, 2013).

O método de precipitação é um dos mais utilizados para a obtenção de ZnO-NPs. Nele, ocorre a redução rápida e espontânea de uma solução de um sal de zinco, utilizando um agente redutor, seguida da precipitação de um precursor do ZnO na solução. Este produto é, então, submetido a etapas de lavagem, para a remoção de impurezas, e ao aquecimento. Após esta etapa, obtém-se um produto sólido que é, por fim, submetido à trituração. A principal vantagem deste método está em obter partículas com propriedades reprodutivas por meio do controle de alguns parâmetros, como concentração dos reagentes, velocidade da adição dos substratos e temperatura de reação (KOŁODZIEJCZAK-RADIMSCA, JESIONOWSKI, 2014). O esquema apresentado na Figura 3 ilustra as etapas deste processo.

Figura 3 - Etapas da síntese de ZnO-NPs pelo método de precipitação



Fonte: Adaptado de Raoufi (2013).

O método Sol-gel, por sua vez, é um método químico-líquido simples, que envolve basicamente a hidrólise e condensação dos precursores, seguida de suas secagens e estabilização. O processo pode ocorrer em diferentes condições de pH e temperatura, e alterações nestes parâmetros são suficientes para alterar o formato e/ou o tamanho das partículas. Por este motivo, a síntese sol-gel tem gerado cada vez mais interesse em detrimento dos demais métodos utilizados para a síntese de ZnO-NPs, proporcionando uma síntese controlada, que resulta em partículas com tamanho e forma padronizados, sem necessidade de altas temperaturas (SAMAT, NOR, 2012; DARROUDI et al., 2013; ZHENG, BOCCACCINI, 2017).

Os métodos essencialmente químicos, entretanto, podem levar à formação de subprodutos tóxicos, que podem não só causar prejuízos ao meio-ambiente como também dificultar a aplicação destes materiais no setor médico, devido ao aumento de sua toxicidade. Com base nisso, uma grande atenção tem sido dada aos métodos de “síntese verde”, que utilizam elementos ecologicamente corretos para a síntese de nanopartículas, como extratos de plantas, bactérias, fungos, enzimas, dentre outros. Esta abordagem reduz o impacto ambiental e a toxicidade dos produtos formados, o que pode ser vantajoso desde o ponto de vista ecológico até a possibilidade de aplicação (GUNALAN, SIVARAJ, RAJEDRAN, 2011).

Além das aplicações classicamente conhecidas das ZnO-NPs no setor industrial, diversos estudos têm se concentrado na investigação do seu potencial biomédico, tendo demonstrado atividade antibacteriana (PADMAVATHY, VIJAYARAGHAVAN, 2008; PREMANATHAN et al., 2011; PATI et al., 2014), antifúngica (SHARMA et al., 2010; LIPOVSKY et al., 2011) e antitumoral (RASMUSSEN et al., 2010; PREMANATHAN et al., 2011; HASSAN et al., 2016; PANDURANGAN, ENKHTAIVAN, KIM, 2016).

No trabalho de Dhyvia e colaboradores (2018), por exemplo, as ZnO-NPs foram utilizadas como arcabouço para a Curcumina, um composto natural extraído a partir da espécie *Curcuma longa* L., com o objetivo de criar um sistema de entrega específico com aplicação voltada para o câncer gástrico. Os autores partiram do princípio de que as ZnO-NPs são insolúveis em pH 7, mas possuem boa solubilidade em ambientes com pH < 6, o que permitiria que o composto em questão fosse precisamente liberado no pH estomacal.

A funcionalização das ZnO-NPs com alguns biopolímeros pode, ainda, aprimorar sua capacidade de imobilização de algumas biomoléculas. Neste contexto, Umar e colaboradores (2009) desenvolveram um biossensor à base de ZnO-NPs funcionalizadas com quitosana, para detecção de colesterol, obtendo resultados concordantes com aqueles obtidos pelos métodos tradicionalmente utilizados. Fardood e colaboradores (2017) utilizaram a goma arábica, proveniente da espécie *Acacia senegal*, como *template* para a síntese de ZnO-NPs, com o objetivo de aplicá-las como fotocatalíticos na degradação de corantes. Outros polímeros como a goma tragacanto (DARROUDI et al., 2013), gelatina (DARROUDI et al., 2014) e alginato de sódio (VARAPRASAD et al., 2016) também já foram utilizados para a síntese e funcionalização destas NPs, com diferentes objetivos e aplicações.

As ZnO-NPs, portanto, mostram-se como um material versátil, cujos diferentes métodos de síntese e funcionalização, além de sua baixa toxicidade, tornam possível seu uso nas mais diversas aplicações.

### 2.2.3. Atividade antimicrobiana de ZnO-NPs: potencial frente a bactérias e fungos

A descoberta dos antibióticos foi considerada um dos maiores avanços científicos do século XX e, durante um determinado período, as infecções bacterianas, antes letais, tornaram-se menos ameaçadoras. Entretanto, o uso indiscriminado destes agentes favoreceu o desenvolvimento de mecanismos de resistência bacteriana. Esta característica é algo que constitui um sério problema na prática terapêutica, pois limita o arsenal de fármacos disponíveis para o tratamento de infecções bacterianas, tornando necessário o desenvolvimento de novas alternativas para combatê-las (KUMAR, SCHWEIZER, 2005; QUELEMES et al., 2013).

Segundo Tortora, Funke e Case (2012), os principais mecanismos que podem levar à resistência bacteriana, são:

- *Destruição ou inativação enzimática do fármaco*: afeta principalmente antibióticos derivados de produtos naturais, como as penicilinas e as cefalosporinas. Estes agentes antibacterianos, juntamente com os carbapenemos, apresentam em sua estrutura o anel  $\beta$ -lactâmico, alvo das enzimas  $\beta$ -lactamases, que provocam a hidrólise de sua estrutura, inativando, portanto, o fármaco.
- *Prevenção da entrada no sítio alvo, dentro do micro-organismo*: a parede celular de bactérias Gram-negativas apresenta, em sua estrutura, aberturas denominadas “porinas”, que restringem a absorção de moléculas pela bactéria. Algumas bactérias mutantes são capazes de modificar a estrutura de suas porinas, de modo que o agente antimicrobiano torna-se incapaz de atravessá-las.
- *Alterações no sítio-alvo do fármaco*: pequenas modificações no sítio-alvo do antibiótico podem levar à sua neutralização, causando, assim, a ausência de alterações significativas nas funções celulares e, conseqüentemente, sobrevivência da bactéria.
- *Efluxo rápido do fármaco*: algumas proteínas presentes na membrana plasmática da bactéria agem como bombas, “expulsando” os fármacos e impedindo que estes atinjam uma concentração ótima.

Os fungos, por sua vez, são organismos eucariotos, heterotróficos, uni ou multicelulares, que podem ser encontrados em diferentes ambientes naturais (água, solo, ar) ou em relações de comensalismo/parasitismo com animais ou plantas. Apesar de haver, aproximadamente 150 mil espécies catalogadas, apenas algumas centenas são reconhecidamente patogênicas a humanos. Esta patogenicidade depende de inúmeros fatores, uma vez que o hospedeiro fornece um ambiente dinâmico, ao qual os fungos precisam adaptar-se para sobreviver. Por outro lado, este mesmo ambiente pode favorecer a ativação de mecanismos de sinalização, que resultam na expressão de fatores de virulência, causando, então, patogenicidade. A imunidade do hospedeiro, por exemplo, é um fator decisivo para determinar se a infecção evoluirá para doença e a severidade desta manifestação (SIDRIM, ROCHA, CORDEIRO, 2004; ROMANI, 2004; DERENGOWISKI, 2011; SHERRINGTON et al., 2017).

A relevância clínica das doenças fúngicas, normalmente negligenciadas, tem aumentado de maneira significativa nas últimas décadas devido ao aumento na incidência de infecções



sistêmicas, acometendo, principalmente, pacientes imunocomprometidos, como pacientes transplantados, em tratamentos quimioterápicos ou com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Por serem organismos eucariotos, os fungos compartilham muitos processos biológicos com os humanos e, portanto, a maioria dos fármacos pode apresentar toxicidade quando usados terapêuticamente. Além disso, estas características também dificultam o desenvolvimento de novas alternativas que possam causar toxicidade seletiva aos fungos, sem afetar as células do hospedeiro. Investigações neste setor fazem-se, portanto, necessárias, de modo a contornar esta dificuldade (ROMANI, 2004; DERENGOWISKI, 2011).

O desenvolvimento de agentes antimicrobianos é de grande relevância para diferentes âmbitos industriais, incluindo os setores ambiental, alimentício, têxtil, de embalagens, de cuidados em saúde, construção e decoração. De modo geral, estes agentes podem ser classificados em orgânicos e inorgânicos. Normalmente, os agentes inorgânicos apresentam maior estabilidade quando comparados aos agentes orgânicos, principalmente quando submetidos a altas temperaturas e/ou pressão. Como consequência, materiais inorgânicos, como metais e óxidos de metais, têm atraído bastante atenção por sua capacidade de resistir a condições difíceis de síntese e armazenamento (ZHANG et al., 2007).

Neste sentido, os óxidos de metais como o  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{MgO}$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{ZnO}$ , entre outros, têm se destacado como potenciais antimicrobianos por serem considerados materiais seguros e com boa estabilidade (SHARMA et al., 2010). A redução destes materiais à escala nanométrica parece proporcionar-lhes uma atividade ainda mais pronunciada, visto que a alta proporção superfície-volume confere-lhes alta reatividade e o diminuto tamanho destas nanopartículas possibilita uma melhor interação com os micro-organismos, o que as permite apresentar toxicidade seletiva, com efeitos adversos mínimos às células de mamíferos (XIE et al., 2011).

Os mecanismos pelos quais as nanopartículas desempenham esta atividade ainda não estão totalmente elucidados, porém, algumas hipóteses têm sido propostas, como: (a) produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), (b) toxicidade de íons metálicos livres, decorrente da liberação desses metais pelas nanopartículas, (c) disfunção proteica e perda da atividade enzimática, (d) interferência na assimilação de nutrientes, (e) deficiências na função da membrana e (f) genotoxicidade (DIZAJ et al., 2014; LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013).

A atividade antimicrobiana das ZnO-NPs tem sido amplamente investigada nos últimos anos. Trabalhos relatam sua toxicidade contra bactérias como *Escherichia coli* (VARAPRASAD et al., 2016), *Pseudomonas* sp. (SHARMA et al., 2010), *Vibrio cholerae* (SARWAR et al., 2016), *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii* (GUNALAN, SIVARAJ, RAJEDRAN, 2012), além de fungos como *Candida tropicalis*

(JOTHIPRAKASAM et al., 2017), *Candida albicans* (SHARMA, GHOSE, 2015), *Sclerotinia homoeocarpa* (LI et al., 2017), *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Trichoderma harzianum* (GUNALAN, SIVARAJ, RAJEDRAN, 2012), *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *Alternaria alternata* (SARDELLA, GATT, VALDRAMIDIS, 2017), dentre outros. Estes resultados reforçam a ideia de que as ZnO-NPs, sozinhas ou funcionalizadas, apresentam potencial uso como antimicrobianos e seu mecanismo de ação contra estes micro-organismos precisa ser melhor investigado.

#### **2.4. Gomas naturais e suas aplicações**

De modo geral, o termo goma pode ser utilizado para referir-se a polímeros capazes de formar soluções ou dispersões altamente viscosas quando expostos a solventes ou agentes de inchamento. Desta forma, pode ser aplicado a inúmeras substâncias, como hidrocarbonetos, borrachas, proteínas, polissacarídeos e derivados, e também alguns polímeros sintéticos. As gomas naturais, por sua vez, consistem em polissacarídeos, cuja estrutura é formada por várias unidades de açúcares organizados em arranjos lineares ou ramificados, de modo a formar uma grande molécula. Elas ocorrem naturalmente, podendo ser obtidas a partir de sementes, algas marinhas, micro-organismos e plantas. Nestas últimas, são produzidas pelas células epiteliais e exsudadas como um mecanismo de defesa contra injúrias físicas ou ataques por organismos patogênicos (PAULA; COSTA, 1993; RANA et al., 2011 ANDRADE et al., 2013; GOSWAMI; NAIK, 2014).

No setor industrial, as gomas são geralmente utilizadas como espessantes, emulsificantes, dispersantes, ligantes e estabilizantes. O interesse no uso de gomas naturais neste setor deve-se principalmente a características como sua boa solubilidade em água, baixa toxicidade, fácil obtenção e baixo custo. Estas características favorecem o seu uso, não somente na indústria alimentícia, como também na indústria farmacêutica (PRAJAPATI et al., 2013). As estruturas poliméricas ramificadas e complexas das gomas oferecem-lhes propriedades adesivas e coesivas, desejáveis ao uso em formulações farmacêuticas, sendo utilizadas como aglutinantes para comprimidos, na microencapsulação para liberação controlada de fármacos ou como agentes de revestimento. (GOSWAMI; NAIK, 2014).

Entretanto, algumas características das gomas, como índices descontrolados de hidratação, solubilidade, espessamento, diminuição da viscosidade e risco de contaminação por micro-organismos durante o armazenamento, constituem alguns problemas que dificultam seu uso. As modificações, neste caso, funcionam como alternativas não só para minimizar estas

desvantagens, mas também para permitir o uso destas gomas para fins mais específicos (RANA et al., 2011).

Estas modificações podem ser conduzidas por métodos físicos ou químicos. Nos métodos físicos, as alterações moleculares podem ser alcançadas pela exposição ao calor seco, ao vapor saturado, à tecnologia de micro-ondas, à luz ultravioleta e à radiação gama. Já para modificar as gomas por métodos químicos, como o nome sugere, deve-se tratá-las com produtos químicos como aldeídos, epícloridrina, bórax, ou outros (PRAJAPATI et al., 2013).

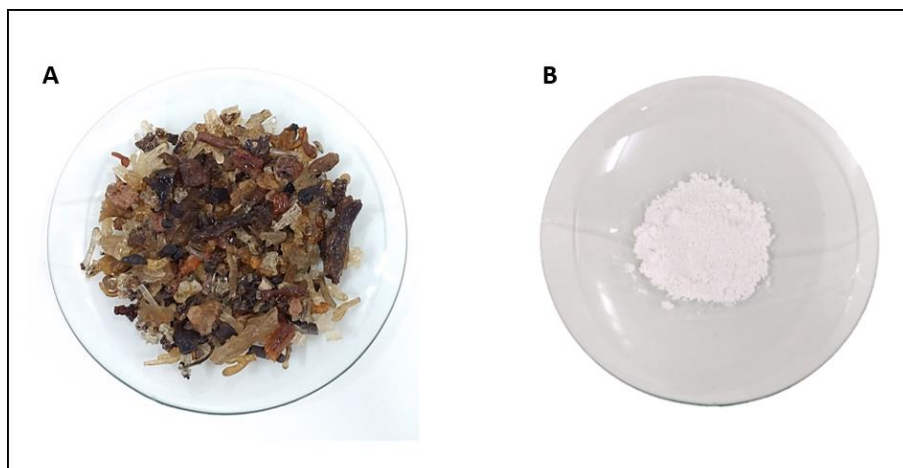
Sendo assim, o melhoramento das propriedades das gomas naturais pelos diferentes métodos de modificação tem gerado grande interesse na investigação de suas possíveis aplicações no setor biomédico.

## 2.5. A goma do cajueiro, suas modificações e aplicações

O cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) é uma árvore rústica facilmente encontrada em países tropicais e subtropicais, tais como Índia, Kenya, Moçambique e Brasil. Neste último, é amplamente cultivada nas regiões Norte e Nordeste, principalmente nos estados do Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte. É bastante popular devido às castanhas obtidas de seu fruto, o caju, muito utilizadas como ingredientes culinários (MOTHÉ; DE SOUZA; CALAZANS, 2008; RIBEIRO et al., 2016).

A goma do cajueiro (GC) é um heteropolissacarídeo complexo, obtido naturalmente ou por meio de incisões no caule do cajueiro (QUELEMES et al., 2013). Na figura 4, é possível observar o exsudato obtido a partir do caule do cajueiro e a goma, após o seu processamento.

Figura 4 - (A) Resina obtida a partir do exsudado do tronco do cajueiro. (B) Goma do cajueiro após isolamento.

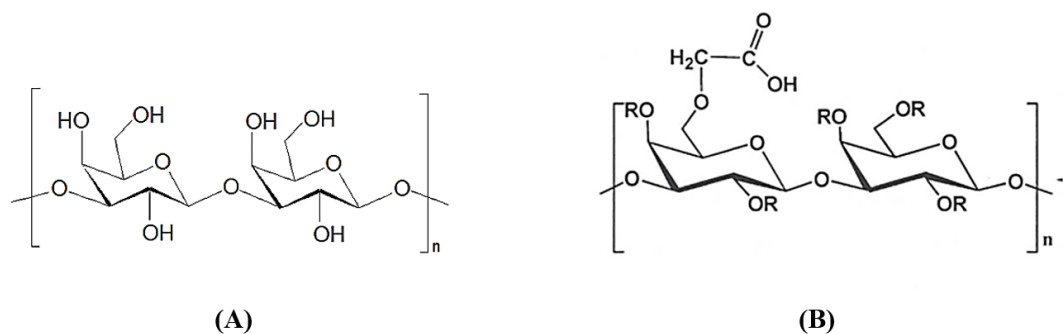




Os principais grupos reativos presentes na GC são constituídos, em sua maioria, por hidroxilas e carboxilas. Por isso, algumas modificações químicas foram propostas com o objetivo de aumentar sua reatividade. Os métodos de modificação química propostos para a GC são: oxidação, sulfatação, copolimerização com acrilamida, ligação cruzada com epiclorigrina, carboximetilação, entre outros. No geral, são métodos muito semelhantes aos utilizados para modificar outros polímeros, mas que precisam de algumas adaptações devido à hidrofília da GC (RIBEIRO et al., 2016).

A carboximetilação, por exemplo, aumenta a transparência de solução e a hidrofília das gomas, tornando-as mais solúveis em sistemas aquosos (RANA et al., 2011). Muitos derivados de polissacarídeos já foram obtidos por meio de reações de carboximetilação, utilizando substâncias como celulose, amido, quitina, goma gelana, inulina, entre outras (SILVA et al., 2004). O método de carboximetilação da GC foi proposto por Silva e colaboradores (2004). A reação é baseada na síntese de Williamson, onde o alcóxido do polissacarídeo reage com ácido monocloraacético (MCA), e os grupos alcoólicos primário e secundário são substituídos por grupos carboxila. A figura 6 ilustra as modificações ocorridas nesse processo.

Figura 6 - (A) Estrutura da goma do cajueiro e (B) Goma do cajueiro carboximetilada, onde R pode ser  $-H$  ou  $-CH_2COOH$ .



Fonte: Adaptado de Moura (2009).

Em função da melhoria em suas características físico-químicas e reológicas, o uso de gomas modificadas por carboximetilação como agentes estabilizantes e/ou redutores na síntese de nanopartículas tem sido investigado. Sendo assim, alguns estudos têm demonstrado o uso das gomas guar, catira, kondagogu e dextrana, carboximetiladas, como agentes estabilizantes, redutores, ou ambos, na síntese de nanopartículas, com os mais diversos objetivos, desde

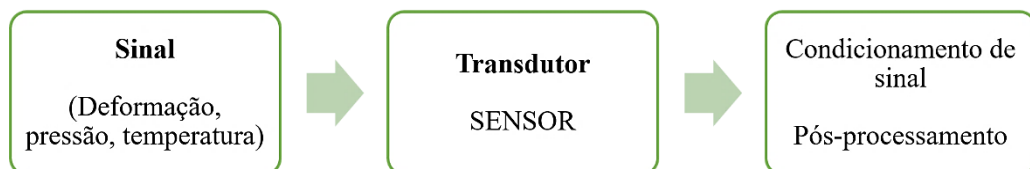
agentes antimicrobianos, até sistemas de entregas de drogas (VERMA, 2014; GLIŠIĆ et al., 2015; GUPTA; MINKAL; AHUJA; BHATT, 2015; SARDAR et al., 2017).

Silva e colaboradores (2010) propuseram a síntese de nanopartículas por complexação polieletrólítica de quitosana e GCCM, obtendo nanopartículas esféricas, com tamanhos que variavam entre 200 nm e 350 nm. Entretanto, ainda são poucos os estudos focados na investigação do potencial da GCCM na síntese de nanopartículas, fazendo-se necessárias maiores investigações acerca deste potencial.

## 2.6. Sensores e biossensores

De modo geral, define-se por sensor um dispositivo capaz de converter um estímulo físico (pressão, temperatura, luz) ou químico (reação de oxirredução) em um sinal, que será processado por um sistema. A parte ativa do sensor, responsável pelo processamento do sinal, recebe o nome de transdutor e converterá a interação entre a camada ativa do sensor e o analito de interesse em um sinal mensurável (NUNES et al., 2014). A Figura 7 ilustra esse sistema de funcionamento de maneira simplificada. Para ser considerado um bom sensor, é necessário que o dispositivo apresente características como sensibilidade e seletividade (FARIAS, 2015).

Figura 7 - Esquema simplificado do funcionamento de um sensor



FONTE: Adaptado de NUNES et al., 2014.

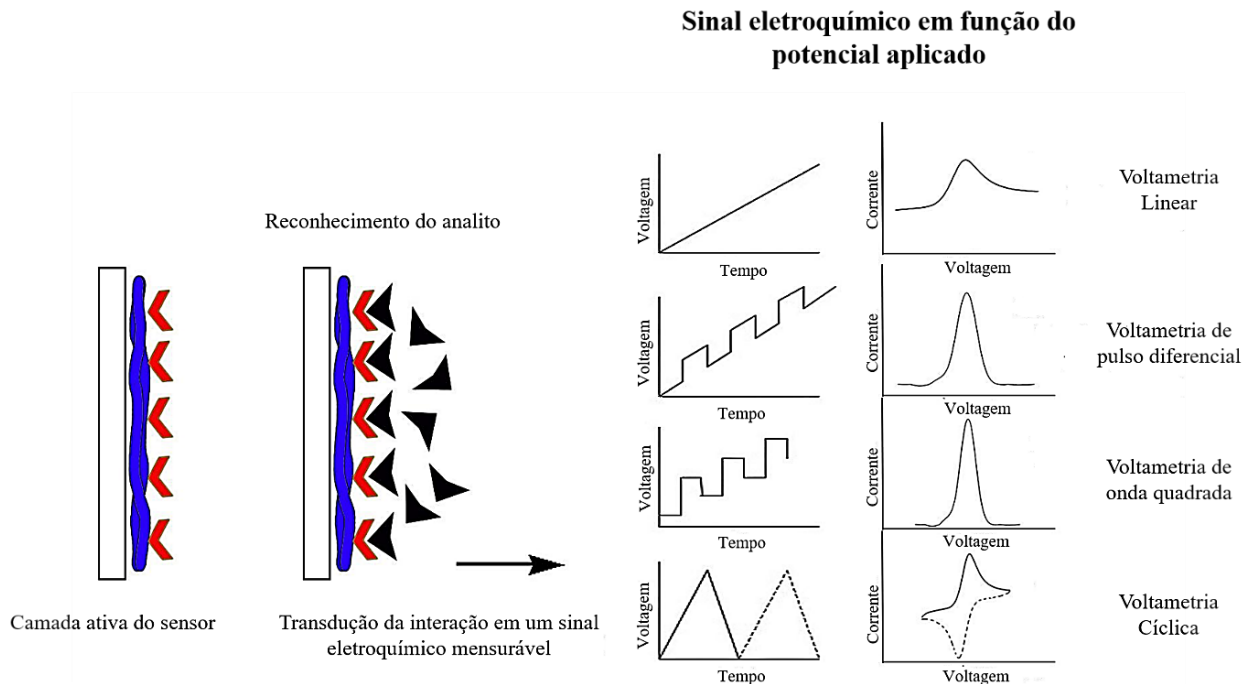
Um biossensor, por sua vez, corresponde a um dispositivo analítico projetado para detectar analitos que combinam elementos biológicos de reconhecimento com um componente de detecção físico-químico. Assim como os demais sensores, um biossensor também é composto por três partes fundamentais: o elemento biológico (sinal), um transdutor (reconhecimento do sinal) e um dispositivo de leitura (pós-processamento do sinal). De acordo com os tipos de transdutor, os biossensores podem ser classificados em: ópticos, térmicos, piezoelétricos, eletroquímicos, eletroquimioluminescentes, entre outros (XU, WANG, 2012).

No caso dos sensores eletroquímicos, ocorre o reconhecimento de sinais como voltagem, corrente ou impedância, resultantes da interação entre um analito e um eletrodo. Este

último pode estar funcionalizado com substâncias químicas, bioquímicas ou elementos biológicos em geral, visando ao aprimoramento de sua atividade, a depender do objetivo. Estes dispositivos apresentam características próprias, que os distinguem dos métodos convencionais de grande porte. Estes, apesar de sensíveis e seletivos, dificultam a obtenção de resultados *in situ*, em tempo real. Dados nessas condições, entretanto, podem ser facilmente obtidos com o uso de sensores que, mesmo não apresentando a mesma precisão e/ou exatidão, fornecem informações suficientes para tomadas de decisão urgentes, por exemplo. Soma-se a este fato a portabilidade, possibilidade de miniaturização e baixo custo, características inerentes aos sensores, que tornam seu uso ainda mais vantajoso (LOWISOHN, BERTOTTI, 2006; SANTOS, 2014).

Os sensores eletroquímicos podem ser classificados em amperométricos, potenciométricos, voltamétricos, quimiorresistivos e capacitivos, dependendo do princípio em que se baseiam (SANTOS, 2014). A técnica de voltametria corresponde a um conjunto de técnicas eletroanalíticas, que fornece respostas quali-quantitativas a respeito de espécies eletroativas com base na construção de uma curva de corrente *versus* potencial aplicado, denominado de voltamograma. Por tratar-se de um conjunto de técnicas, e não uma técnica individual, a voltametria abrange os tipos linear, cíclica, de pulso diferencial e de onda quadrada, que variam entre si com base no padrão de potencial aplicado. A voltametria cíclica e a voltametria de pulso diferencial, estão entre as técnicas eletroquímicas mais comuns utilizadas como princípio para o desenvolvimento e caracterização de sensores e biossensores (ALEIXO, 2003; XU, WANG, 2012; MENEZES, 2014). A Figura 8 representa a interação do sensor eletroquímico com o analito e como ocorre a representação do sinal gerado a partir desta interação, por cada uma das técnicas citadas.

Figura 8 - Representação esquemática de um sensor eletroquímico, sua interação com o substrato e a transdução destas interações em sinais mensuráveis



Fonte: adaptado de LIMA et al., 2018

Diante de suas vantajosas características, os sensores e biossensores eletroquímicos representam ferramentas poderosas, principalmente para aplicações biológicas e biomédicas. Uma estratégia cada vez mais comum para impulsionar estas características consiste em funcionalizar estes sensores com nanomateriais. A alta reatividade de superfície dos nanomateriais, combinada ao seu pequeno tamanho, oferece vantagens significativas aos sensores funcionalizados, incluindo o aprimoramento de suas propriedades físicas, químicas e biológicas. Deste modo, características como a composição química, textura de superfície, estrutura e orientação do cristal, entre outras, controlam o mecanismo de transporte de elétrons nos eletrodos funcionalizados, tornando possível sua utilização *in vitro* e *in vivo*, no diagnóstico de diversas enfermidades, bem como no monitoramento do estado clínico dos pacientes, em diferentes níveis (MADURAIVEERAN, SASIDHARAN, GANESAN, 2018).

Diferentes tipos de NPs, incluindo nanopartículas metálicas, de óxidos de metais, de semicondutores, dentre outras, têm sido largamente utilizadas para funcionalizar sensores e biossensores. Apesar de desempenharem diferentes papéis nos diferentes sistemas eletroquímicos propostos, as principais funções das nanopartículas nestes casos são: (1) imobilização de biomoléculas, (2) catálise de reações eletroquímicas, (3) aprimoramento do processo de transferência de elétrons, (4) como marcadores moleculares, (5) agir como reagentes (LUO et al., 2005).



No que diz respeito ao seu uso em sensores, as nanopartículas de óxidos de metais são normalmente utilizadas para imobilizar biomoléculas, devido à sua biocompatibilidade, enquanto que as nanopartículas de semicondutores são mais utilizadas como marcadores para análises eletroquímicas (LUO et al., 2005). Estas NPs podem ser adsorvidas à superfície do eletrodo por diferentes mecanismos, que podem incluir adsorção física, ligação química covalente, eletrodeposição, eletropolimerização – utilizando, por exemplo, polímeros com propriedades redox –, entre outras. Um eletrodo modificado com múltiplas camadas de nanopartículas pode resultar em um filme poroso, com superfície altamente reativa, que confere a este eletrodo uma forte capacidade de adsorção de substratos. Em outras palavras, a porosidade resultante da deposição de múltiplas camadas de nanopartículas, permite que o substrato se acumule na superfície do eletrodo por meio de reações de especificidade e seletividade entre eletrodo e substrato (WANG, HU, 2009).

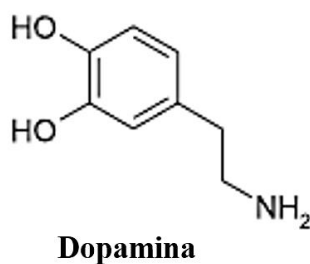
As ZnO-NPs constituem uma das nanopartículas de óxidos de metais mais interessantes para o uso em sensores eletroquímicos, tendo em vista sua biocompatibilidade, baixa toxicidade e estabilidade química. Estas nanopartículas possuem um ponto isoelétrico por volta de 9,5 (superior ao pH fisiológico) e apresentam carga de superfície positiva em pH ácido. Estas características favorecem, por exemplo, o seu uso na adsorção de algumas proteínas. Foi partindo deste princípio que Norouzi e colaboradores (2011) desenvolveram um biossensor para a detecção do antígeno carcinoembriogênico (CEA), uma glicoproteína produzida durante o desenvolvimento fetal, cuja produção é interrompida antes do nascimento, não estando presente em adultos saudáveis. Para a montagem do sensor, os autores utilizaram duas bicamadas de ZnO-NPs associadas a nanopartículas de ouro (AuNPs) como matriz de imobilização. Os anticorpos anti-CEA eram, então, imobilizados na superfície modificada com as nanopartículas e diferenças no comportamento da corrente eram observadas conforme a exposição do sensor a diferentes concentrações de CEA. Outro exemplo semelhante corresponde ao trabalho de Wahab e colaboradores (2017) que funcionalizaram ZnO-NPs com anticorpos anti-*Brucella*, para a detecção precoce e precisa de brucelose.

Outras propostas de aplicações incluem o uso das ZnO-NPs no desenvolvimento de sensores eletroquímicos para a detecção do material genético dos vírus da dengue (SINGHAL, PUNDIR, NARANG, 2017), na produção de sensores não enzimáticos para a detecção de glicose (DAYAKAR et al., 2017) e na detecção de antígenos característicos do câncer de ovário (GASPAROTTO et al., 2017).

## 2.7. A dopamina, suas funções e métodos de detecção: considerações gerais

A dopamina (DA), cuja estrutura química pode ser observada na Figura 9, é um neurotransmissor catecolaminérgico que corresponde a 80% do conteúdo de catecolaminas cerebrais (NEVES et al., 2004). Sua síntese ocorre via reações enzimáticas, onde, resumidamente, a 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) sofre descarboxilação para formar DA. Após sua síntese, ela é armazenada em vesículas sinápticas até que haja sua liberação, mediante estímulo (DAMASCENO, 2014; MONSEI, BAHRAM, 2018; KULCHAT, 2018).

Figura 9 - Estrutura química da Dopamina



Fonte: NEVES et al., 2004

Ao ser liberada, a DA atuará em receptores específicos, denominados dopaminérgicos, que estão presentes no sistema nervoso central, nos vasos mesentéricos e renais, e nas artérias coronárias. Este neurotransmissor está relacionado à regulação de uma série de atividades fisiológicas, como fatores motivacionais, cognitivos, motores e hormonais, além de ser precursor da Epinefrina e da Norepinefrina, outros dois importantes neurotransmissores (NEVES et al., 2004; MONSEI, BAHRAM, 2018).

Em um adulto saudável, os níveis de DA no sangue devem estar entre 1,3 e 2,6  $\mu\text{M}$ . Manter estes níveis normais é essencial para manter também normais a pressão arterial, atividade motora, motivação emocional, capacidade de aprendizado, estado consciente, entre outros. Níveis de DA inferiores aos considerados normais podem levar a inúmeras desordens neurológicas e têm sido associados ao surgimento de condições como Parkinson, Alzheimer, esquizofrenia, demência senil, doença de Huntington, hiperatividade e estresse psicossocial. Da mesma forma, níveis muito elevados de DA também podem levar a desordens mentais, devido ao funcionamento cerebral anormal (ZHOU et al., 2016; DEY, SATPATI, 2017; FRITEA et al., 2017; KULCHAT et al., 2018). Portanto, a determinação de DA no sangue, na urina e em outros fluidos corporais torna-se essencial para avaliar as funções metabólicas do organismo. Além disso, no Brasil, a DA é comercializada na forma de ampolas, numa concentração de 50

mg/mL, e é bastante utilizada no tratamento de diversos choques e da hipotensão grave pós-infarto agudo do miocárdio. Logo, a sua quantificação nestes medicamentos é fundamental para o controle de qualidade (LUPPETI, RAMOS, FATIBELLO-FILHO, 2003).

Os principais métodos analíticos utilizados para a determinação da DA incluem a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), espectrometria de massas, quimioluminescência, eletroforese capilar e fluorescência (MOLAAKBARI, MOSTAFAVI, BEITOLLAHI, 2015; MONSEI, BAHRAM, 2018). Entretanto, a maioria destas técnicas exige instrumentação sofisticada e de alto custo, inúmeros pré-tratamentos do analito, além de um longo tempo de análise (REDDY et al., 2015; SILVÉRIO, 2015). Portanto, a elaboração de novos métodos que possam minimizar estas dificuldades faz-se necessária.

Os métodos eletroquímicos de detecção apresentam grande significância devido às suas altas sensibilidade e seletividade, baixo custo, rapidez e precisão, além de causarem baixos impactos ao meio ambiente (REDDY et al., 2015). No corpo humano, a DA sofre oxidação pela ação da enzima mono-amina oxidase. Por outro lado, ela também pode sofrer auto-oxidação, isto é, reage com o oxigênio, produzindo radicais livres e quininas. Este comportamento pode ser observado por voltametria cíclica, onde, normalmente, a DA apresenta um perfil redox reversível, com pico de oxidação por volta de 200 mV (REDDY et al., 2015; ZHOU et al., 2016)

Os recentes avanços em química analítica demonstraram que as propriedades únicas dos materiais em escala nanométrica tornam-nos ideias para o desenvolvimento de sensores (KULCHAT et al., 2018). Diversos estudos têm investido no uso de nanomateriais para a modificação da superfície de eletrodos, com o objetivo de quantificar DA. Estes materiais incluem pontos quânticos de grafeno (ZHOU et al., 2016), nanoesferas de carbono (DEY, SATPATI, 2017), nanopartículas de ouro (MONSEI, BAHRAM, 2018), pontos quânticos de sulfeto de cádmio (KULCHAT et al., 2018), entre outros.

Neste sentido, as nanopartículas de óxidos de metais representam um ponto forte nas pesquisas recentes devido às inúmeras vantagens de seu uso. Fazio e colaboradores (2018), por exemplo, utilizaram nanopartículas de óxido de molibdênio para modificar a superfície de um eletrodo de pasta de carbono. Este, após a modificação, demonstrou um comportamento eletrocatalítico aprimorado, sendo capaz de detectar DA de maneira seletiva quando em solução de tampão fosfato (pH = 7). Semelhantemente, Molaakbari, Mostafavi e Beitollahi (2015), utilizaram um eletrodo com a mesma composição, cuja superfície foi, por sua vez, modificada pela imobilização de ZnO-NPs e ácido acrílico, com o mesmo objetivo dos autores previamente citados, também obtendo sucesso.

Estes estudos demonstram que o uso da eletroquímica associada a novos materiais, especialmente as nanopartículas de óxidos de metais, constitui uma alternativa promissora aos métodos clássicos para a detecção de DA, permitindo a elaboração de novas estratégias que incluam fácil execução e rapidez de resposta.

### **3.0 OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Sintetizar, caracterizar e avaliar as potenciais aplicações biotecnológicas de nanopartículas de óxido de zinco, sintetizadas à base de goma do cajueiro e goma do cajueiro carboximetilada.

#### **3.2. Objetivos específicos**

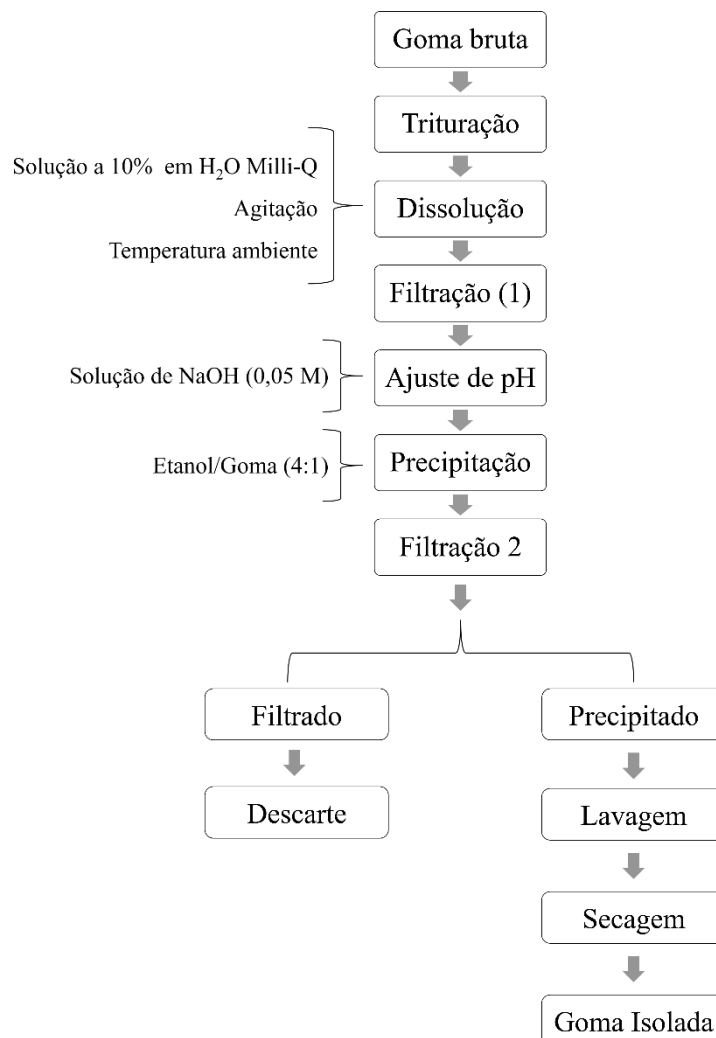
- Sintetizar nanopartículas de óxido de zinco, utilizando goma do cajueiro e goma do cajueiro carboximetilada
- Caracterizar as nanopartículas por espectroscopia de absorção do UV-visível;
- Avaliar a estabilidade das nanopartículas por monitoramento por espectroscopia do UV-visível
- Caracterizar as nanopartículas por Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier;
- Caracterizar as nanopartículas por Microscopia de Força Atômica
- Avaliar a pureza de fase dos cristais de óxido de zinco por difração de raios-X;
- Avaliar a biocompatibilidade das nanopartículas sintetizadas por ensaio de hemólise;
- Avaliar a atividade antibacteriana das nanopartículas sintetizadas;
- Avaliar a atividade antifúngica das nanopartículas sintetizadas;
- Avaliar a capacidade de detecção do hormônio neurotransmissor Dopamina pelas nanopartículas sintetizadas, em forma de filme.

## 4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Isolamento da goma do cajueiro

O isolamento da goma do cajueiro foi feito conforme a metodologia proposta por Rodrigues, Paula e Costa (1993), com adaptações. Inicialmente, preparou-se uma solução da goma bruta a 10%, onde 10 g de exsudado foram dissolvidos em 100 mL de água milli-Q e deixados sob constante agitação até que fossem totalmente dissolvidos. Em seguida, esta mistura foi filtrada, para remoção de impurezas, e o pH da solução ajustado para 7, utilizando-se uma solução de NaOH a 0,05 M. Após o ajuste do pH, 2 g de NaCl foram adicionados à solução, que foi deixada sob agitação por aproximadamente 1 hora. Posteriormente, adicionou-se etanol em uma proporção de 4:1 (etanol/goma), com o objetivo de obter-se precipitado. Esta solução foi filtrada e o precipitado lavado duas vezes com etanol e uma vez com acetona. O produto final foi seco sob fluxo de ar quente. Todos estes passos estão representados de maneira resumida na figura 10.

Figura 10 - Representação esquemática do processo de obtenção da goma do cajueiro.



Fonte: Adaptado de Rodrigues, Paula, Costa (1993)

## 4.2. Carboximetilação da goma do cajueiro

Este procedimento foi realizado segundo Silva e colaboradores (2004), com adaptações. Uma massa correspondente a 10g de goma isolada foi ressuspensa em 10mL de água ultrapura e deixada sob agitação até que a solução ficasse homogênea. Em seguida, um volume de 5,4 mL de uma solução de NaOH (10M) foi adicionado à solução, que foi agitada por mais 10 minutos. Subsequentemente, 5,4g de MCA foram adicionadas à solução e a mistura foi deixada sob agitação a 55 °C por 3 horas. O pH foi ajustado para 7 e a mistura foi submetida a precipitação com etanol, em uma razão 3:1 (etanol/goma), e acetona. O produto final obtido foi seco sob fluxo de ar quente.

## 4.4. Síntese das ZnO-NPs

As ZnO-NPs foram sintetizadas utilizando um método sol-gel, adaptado de Fardood e colaboradores (2017). Para tanto, soluções de GC e GCCM foram preparadas em diferentes concentrações (0,75% e 1,5%, cada) e submetidas a aquecimento (75°C) e constante agitação (600 rpm) por 120 minutos. Após este período, 2g  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  foram adicionados às soluções de goma e a reação permaneceu exposta às mesmas condições de temperatura e agitação por 12 horas. Posteriormente, estas soluções foram submetidas a calcinação por 4 horas, a uma temperatura de 500°C. O produto final obtido, um pó de coloração branca correspondente às ZnO-NPs, foi utilizado para os demais testes.

As nanopartículas obtidas foram designadas como segue:

- ZnO-NP1 → Síntese com GC 0,75%
- ZnO-NP2 → Síntese com GC 1,5%
- ZnO-NP3 → Síntese com GCCM 0,75%
- ZnO-NP4 → Síntese com GCCM 1,5%

## 4.5. Caracterização das nanopartículas

### 4.5.1. Espectroscopia de absorção do UV-Visível

As propriedades ópticas, bem como a estabilidade das ZnO-NPs, foram avaliadas utilizando a técnica de espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e do visível.

As nanopartículas foram ressuspensas em água destilada, a uma concentração de 0,1% (m/v). Esta solução foi sonicada por 30 minutos e, posteriormente, submetida a varredura entre os comprimentos de onda de 300 nm a 600 nm, de modo a observar a banda de absorção característica das ZnO-NPs, com o objetivo de confirmar sua formação.

Esta mesma técnica foi utilizada para monitorar a estabilidade das ZnO-NPs em solução e em pó. Para tanto, uma solução a 0,1% (m/v) de cada NP foi preparada em água destilada e mantida em geladeira, a uma temperatura de, aproximadamente, 10 °C, protegidas da luz. O pó bruto, obtido a partir da síntese foi armazenado à temperatura ambiente, protegido da luz e da umidade. Ambas as amostras foram monitoradas, com o objetivo de inferir o melhor método para seu armazenamento.

Estes procedimentos foram realizados com o auxílio de um Espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu (Kyoto-Japão), equipado com lâmpada de Deutério.

#### 4.5.2 Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de infravermelho foi utilizada para avaliar a composição das gomas, bem como das nanopartículas sintetizadas. A análise foi realizada em um espectrômetro de infravermelho Perkin-Elmer Spectrum BX, pela técnica de disco de KBr. As amostras foram “polvilhadas” em um pó seco de Brometo de Potássio (KBr), com concentração entre 0,5% e 1% (m/m). A massa total utilizada foi de, aproximadamente, 200 mg. Subsequentemente, discos com diâmetro de 12 mm foram pressionados, a uma pressão >10 toneladas, sem vácuo. Os espectros foram medidos de 4.000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , coadicionando 64 scans.

#### 4.5.3. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A morfologia e a distribuição das nanopartículas foram avaliadas por microscopia de força atômica. Preparou-se, para cada amostra, uma solução a 0,1 % (m/v), que foi sonicada por 30 minutos e depois diluída em uma proporção de 1:10. A partir da solução diluída, 10  $\mu\text{L}$  foram retirados, adicionados à uma superfície limpa de mica e levados a estufa para processo de secagem, a 35 °C.

Esta técnica também foi utilizada para observação da morfologia dos micro-organismos que apresentaram maior susceptibilidade às nanopartículas nos testes antimicrobianos, descritos no item 4.6. Para tanto, alíquotas das concentrações subinibitórias e dos micro-organismos não tratados foram retiradas, depositadas sobre uma superfície limpa de vidro e deixadas para secagem em estufa, a 35 °C por 10 minutos. Após este processo, as amostras foram cuidadosamente lavadas com água deionizada e novamente deixadas para secagem, nas condições supracitadas. Após secagem completa, as amostras foram, então, analisadas.

As imagens foram obtidas com o auxílio de um microscópio de força atômica TT-AFM, AFM Workshop (USA), em modo vibratório, utilizando-se *cantilevers* (NSG10/NT-MDT),



com uma frequência de ressonância próxima de 361 kHz. Para análise das imagens obtidas, utilizou-se o *software* Gwyddion 2.42. Múltiplos campos foram analisados e as imagens selecionadas foram aquelas consideradas representativas das amostras.

#### 4.5.4 Difração de Raios-X (DRX)

A técnica de difração de raios-X foi utilizada para caracterizar as nanopartículas de ZnO, verificar suas fases cristalinas e o tamanho dos cristais formados. As medidas foram realizadas utilizando-se radiação de cobre ( $K_{\alpha}$ ), a 1,540593 Å, num difratômetro de raios-X Rigaku Smartlab, em configuração Bragg-Brentano theta/2theta. A varredura normal 2Theta utilizada durante as medidas variou de 20° a 80°, com um incremento de 0,01° e velocidade de 20.0/min.

Para a análise do tamanho da partícula foi utilizada a largura referente à meia altura ( $\beta$ ) dos 3 picos de difração mais intensos da amostra (FWHM), em radianos. Para o cálculo do tamanho de partícula foi utilizada a equação de Scherrer, representada abaixo (Agarwal et al., 2017).

Equação 1 - Equação de Scherrer, utilizada para a determinação do tamanho do cristalito

$$\tau = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta}$$

Onde:

$\tau$  → Tamanho do cristalito

$k$  → Fator de forma, determinado pela forma do cristal.

$\lambda$  → Comprimento de onda utilizado na difração

$\beta$  → Largura na meia-altura do pico

## 4.6. Avaliação da atividade antimicrobiana

### 4.6.1. Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro*

Para avaliar o potencial antibacteriano nas ZnO-NPs sintetizadas neste trabalho, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC) foram selecionadas, sendo elas: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo *Tiphymurium* ATCC 1401, respectivamente. Os microorganismos foram previamente cultivados em ágar Muller-Hinton e incubados em estufa bacteriológica, a uma temperatura de  $35 \pm 2$  °C, em condições aeróbicas, por 24 horas. Em seguida, uma solução bacteriana foi produzida em solução isotônica estéril de cloreto de sódio

0,85%, cuja densidade óptica obedeceu à escala de 0,5 de McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). Para este fim, a solução preparada foi lida em espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu (Kyoto-Japão), no comprimento de onda de 625nm. Esta solução foi utilizada como inóculo nos experimentos seguintes.

A concentração Inibitória Mínima das ZnO-NPs em solução foi avaliada conforme as indicações do *Clinical Laboratory Standards Institute - CLSI* (2015), com algumas adaptações (QUELEMES et al., 2013). Para tanto, utilizou-se o método de diluição seriada, de razão dois, em placa de 96 poços, onde as bactérias foram expostas a concentrações de nanopartículas que variavam entre 1.000 µg/mL a 15,625 µg/mL.

Para o teste, utilizou-se caldo Muller-Hinton duplamente concentrado. Por este motivo, a concentração das cepas bacterianas, previamente preparadas, foi calculada de modo que se obtivesse um valor de  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Desta maneira, ao realizar-se a diluição, esta concentração cairia pela metade, e, portanto, haveria nos poços uma concentração de  $5 \times 10^5$  UFC/mL, como preconiza o CLSI (2015).

Inicialmente, um volume de 100 µL de ZnO-NPs foi adicionado aos poços da primeira linha da placa, enquanto os demais poços receberam 50µL de água destilada estéril. No próximo passo, realizou-se a diluição seriada, de modo que todo os poços obtivessem um volume final de 50µL. Em seguida, adicionou-se 50µL de meio de cultura inoculado e a placa foi incubada em estufa bacteriológica, a  $35 \pm 2$  °C, em condições aeróbicas, por 24 horas.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em cabine de segurança nível 2.

#### 4.6.2. Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

A atividade antifúngica das ZnO-NPs foi investigada contra nove diferentes espécies, a saber: *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46422, *Trichophyton interdigitale* 73727, *Aspergillus fumigatus* ATCC 13047, *Sporothrix brasiliensis* ATCC 16042, *Cryptococcus neoformans* ATCC 48189, *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida tropicalis* ATCC 750. Os isolados fúngicos foram inoculados em meio ágar batata dextrose e mantidos a  $35 \pm 2$  °C, pelo tempo exigido para cada fungo, conforme mostra a Tabela 1.

A partir de cada cultura, preparou-se uma suspensão de esporos em solução salina estéril (0,85%), que foi ajustada em espectrofotômetro (QUIMIS, São Paulo, Brasil), em 530 nm, com transmitância de 68 - 70% para *Fonsecaea pedrosoi*, de 80 – 82% para os demais fungos filamentosos e de 90% para leveduras. Subsequentemente, o inóculo de fungos filamentosos foi diluído a uma proporção de 1:50 em meio RPMI 1640, tamponado com 3-(N-

morfolino)propane sulfônico ácido (MOPS, Vetec, Brasil), de modo que a concentração final de micro-organismos estivesse entre  $0,4 \times 10^4$  -  $5 \times 10^4$  UFCs/mL. Para as leveduras, o inóculo foi também diluído a uma proporção de 1:50, seguida de outra diluição, a uma proporção de 1:20, em meio RPMI 1640, tamponado com MOPS, de modo que a concentração final de micro-organismos obtida estivesse entre  $5 \times 10^2$  -  $2,5 \times 10^3$  UFCs/mL.

Tabela 1- Período de incubação dos fungos utilizados para o teste de susceptibilidade

<b>Fungo</b>	<b>Período de incubação</b>
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	10 dias
<i>Trichophyton interdigitale</i>	7 dias
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5 dias
<i>Sporothrix brasiliensis</i>	4 dias
<i>Cryptococcus neoformans</i>	2 dias
<i>Candida albicans</i>	24 horas
<i>Candida krusei</i>	24 horas
<i>Candida parapsilosis</i>	24 horas
<i>Candida tropicalis</i>	24 horas

O teste foi realizado conforme o método de crescimento em microdiluição, proposto pelos documentos M27-A3 e M38-A2, do CLSI, utilizando-se placas de 96 poços estéreis, com fundo em formato 'U'. Todas as NPs produzidas (ZnO-NP1, ZnO-NP2, ZnO-NP3 e ZnO-NP4) foram preparadas igualmente. As ZnO-NPs foram dissolvidas em solução salina estéril e sonicadas por 30 minutos. Diluições posteriores foram feitas em meio RPMI 1640 (MP Biomedicals, France), tamponado com MOPS, de modo que os micro-organismos fossem expostos a concentrações de ZnO-NPs que variavam de 1.000 a 15.62  $\mu\text{g/mL}$ . As placas foram incubadas a 35 °C, pelo tempo exigido para cada tipo de fungo.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada visualmente, pela comparação com o controle de crescimento. A CIM foi definida como a menor concentração da substância capaz de inibir o crescimento visível do micro-organismo (CLSI, 2008).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em cabine de segurança nível 2.

#### 4.7. Avaliação da biocompatibilidade por ensaio de hemólise

A biocompatibilidade das ZnO-NPs foi avaliada pela observação da sua capacidade de indução de hemólise, conforme o método sugerido por Marani e colaboradores (2016), com adaptações. Eritrócitos humanos foram coletados em tubos contendo EDTA, lavados três vezes e ressuspendidos em solução salina (0,85%).

Para o teste de hemólise, 150 µL do lavado de hemácias foram adicionados a soluções de ZnO-NPs, cujas concentrações variavam de 1.000 µg/mL a 15,62 µg/mL. A solução final foi incubada em estufa, a uma temperatura de 37 °C por 30 minutos e centrifugada a 10.000 G por 1 minuto. O sobrenadante foi retirado e sua absorbância foi medida em 492 nm, com o auxílio de um leitor de placas ELISA. Solução salina estéril (0,85%) e Triton-X foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. O percentual de hemólise foi calculado segundo a equação:

Equação 2 - Equação utilizada para a determinação do percentual de hemólise

$$\%h = \frac{ABS_{amostra} - ABS_{salina}}{ABS_{triton} - ABS_{salina}} \times 100$$

#### 4.8. Preparo de filmes automontados para detecção de Dopamina

##### 4.8.1. Preparo das soluções

Para produção dos filmes automontados, utilizou-se o polímero condutor Polianilina (PANI) em associação com as ZnO-NPs. A PANI foi obtida na forma de base esmeraldina por meio de síntese química, como proposto por Mattoso (1996). A solução de PANI usada na deposição dos filmes foi preparada a partir de uma solução estoque da base esmeraldina (0.47 g), dissolvida em 25 mL de dimetilacetamida (DMAc), que foi mantida sob agitação *overnight*. Em seguida, a solução foi filtrada e diluída em HCl  $1.4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2.66), na concentração de 0,23% (v/v).

Soluções a 0,1% (m/v) de cada polímero utilizado na síntese das ZnO-NPs (GC ou GCCM) foram preparadas. Subsequentemente, 1 mg de cada amostra previamente produzida de ZnO-NPs foi dissolvido em 1 mL da solução polimérica. Esta solução foi sonicada por 30 minutos e utilizada para caracterização eletroquímica, bem como para montagem do filme.

#### 4.8.2. Preparo dos filmes automontados (LbL)

Os filmes foram preparados pela técnica *Layer-by-Layer*. Neste sentido, um substrato previamente limpo (óxido de estanho dopado com índio – ITO) foi imerso na solução de ZnO-NPs por 5 minutos e seco sob leve fluxo de gás N<sub>2</sub>. Posteriormente, o mesmo substrato foi imerso na solução de PANI, pelo mesmo tempo, e seco novamente em N<sub>2</sub>. Ao final desta etapa, monocamadas do filme de ZnO-NPs/PANI foram obtidas. Da mesma maneira, realizou-se também a montagem de filmes na ordem inversa (PANI/ZnO-NPs), com o objetivo de avaliar se a ordem de montagem interfere na eficiência de detecção.

Os filmes foram caracterizados por voltametria cíclica, utilizando-se um potenciostato Metrohm Autolab® PGSTAT 128N e uma célula eletroquímica convencional contendo três eletrodos: um eletrodo de calomelano saturado (ECS), como eletrodo de referência; uma placa de platina (A= 2,0 cm<sup>2</sup>) como contraeletrodo; e ITO (A  $\cong$  0,32 cm<sup>2</sup>) como eletrodo de trabalho. Como eletrólito suporte, utilizou-se tampão fosfato de potássio (PBS) 0,1 M, pH 2,1, ajustado com ácido fosfórico.

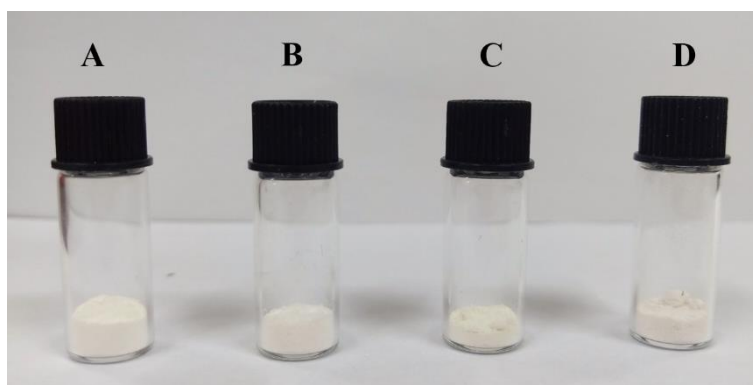
## 5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização

O uso de extratos e polissacarídeos de plantas para a síntese de nanomateriais tem sido visto, nos últimos anos, como uma abordagem economicamente rentável e ecologicamente correta, que possibilita voltar o uso destes materiais não somente para indústria, mas também para aplicações biomédicas (DARROUDI et al., 2013; BAJPAI, JADAUN, TIWARI, 2016).

Diferentes métodos têm sido propostos para a síntese de ZnO-NPs. Neste trabalho, estas NPs foram sintetizadas por um método sol-gel, utilizando GC e GCCM. Neste método, diferentes concentrações das gomas foram preparadas e misturadas com um sal de zinco, submetidas a aquecimento, agitação e calcinação, para formar as nanopartículas desejadas. O produto final da reação pode ser observado na Figura 11, que demonstra a formação de um pó de coloração branca, correspondente às ZnO-NPs.

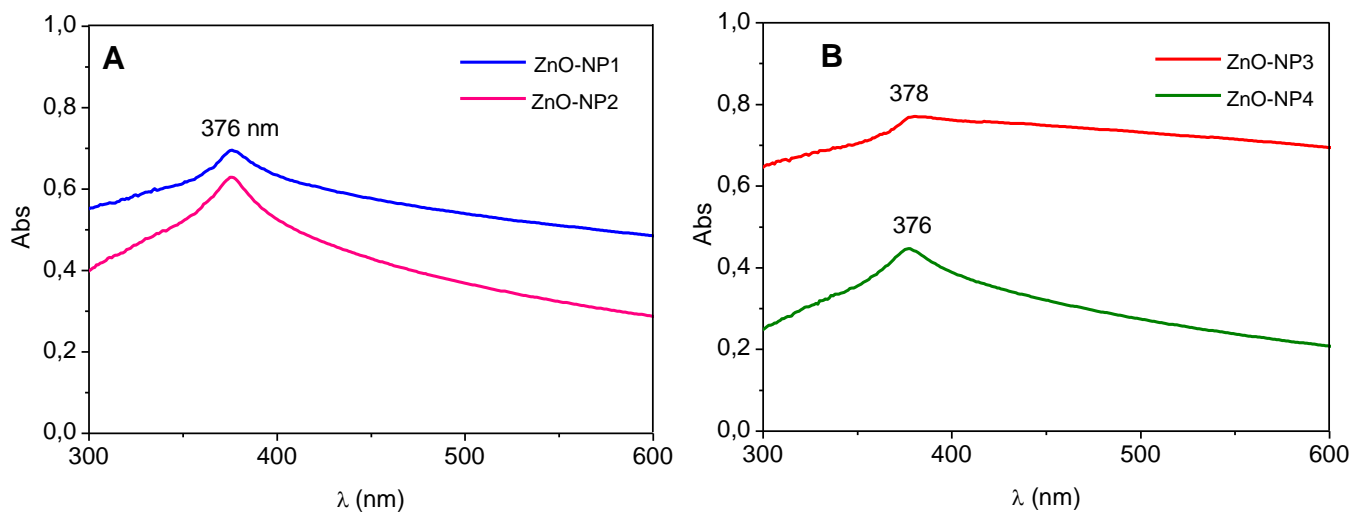
Figura 11 - ZnO-NPs obtidas a partir de síntese sol-gel, seguida por calcinação. (A) ZnO-NP1; (B) ZnO-NP2; (C) ZnO-NP3; (D) ZnO-NP4.



A espectroscopia de absorção na região do UV-Visível é uma das técnicas mais utilizadas para observar a formação e confirmar a síntese de nanopartículas, uma vez que é considerada uma técnica de simples execução e sensível o suficiente para este fim (NAGAJYOTHI et al., 2013).

Os espectros de absorção UV-visível das ZnO-NPs sintetizadas estão representados na Figura 12. É possível observar que todas as amostras apresentaram uma banda de absorção em 376 nm, com exceção da amostra ZnO-NP3, sintetizada com 0,75% de GCCM, que apresentou banda em 378 nm.

Figura 12 - Espectros de absorção UV-Visível das ZnO-NPs sintetizadas com (A) Goma do cajueiro e (B) Goma do cajueiro carboximetilada.



Em seu trabalho, Saha e colaboradores (2017) sintetizaram ZnO-NPs por três diferentes métodos, utilizando o extrato de *Terminalia arjuna* e obtiveram espectros com bandas de absorção em 380 nm, 378 nm, e 376 nm, semelhantemente ao observado neste trabalho. Geetha e colaboradores (2016), por sua vez, utilizaram a goma obtida da planta *Azadirachta indica* para sintetizar ZnO-NPs pelo método de precipitação, obtendo nanopartículas com bandas de absorção entre 351 nm e 372 nm. Um método sol-gel, utilizado por Fardood e colaboradores (2017), deu origem a ZnO-NPs à base de goma arábica, com banda de absorção 378 nm. Outros trabalhos relatam o surgimento da banda em 372 nm (BIAN et al., 2011), 374 nm (DARROUDI

et al., 2013), 370 nm (DARROUDI et al., 2014) e 325nm (MADHUMITHA; ELANGO; ROOPAN, 2016). Os espectros obtidos no presente trabalho, portanto, confirmam a formação das ZnO-NPs, o que indica que o método utilizado foi eficiente.

Segundo Darroudi e colaboradores (2013), esta banda característica para as ZnO-NPs no espectro UV-Visível pode estar associada à absorção intrínseca do *band-gap* de ZnO, devido às transições eletrônicas da banda de valência para a banda de condução ( $O_{2p} \rightarrow Zn_{3d}$ ). Além disso, os autores associam ainda a morfologia da banda ao tamanho e distribuição das partículas, alegando que quanto mais afilada a banda, menores e mais bem distribuídas encontram-se as NPs. Levando-se em consideração estes fatores, é possível inferir que, dentre as amostras obtidas a partir do método utilizado neste trabalho, as ZnO-NP3 apresentaram maior dificuldade para sua formação, haja vista o deslocamento (378 nm) e a morfologia da banda, com relação às demais. Nesta amostra, a banda apresenta-se mais larga, indicando uma maior dispersão da luz que pode estar associada à formação partículas de maior tamanho e/ou à presença de agregados.

As abordagens de síntese verde para a produção de ZnO-NPs a partir de polímeros naturais já haviam sido sugeridas previamente (DARROUDI et al., 2013; DARROUDI et al., 2014; FARDOOD et al., 2017). No trabalho de Darroudi e colaboradores (2014), a goma arábica foi utilizada como um “*biotemplate*” para a formação de ZnO-NPs, a partir de um método Sol-gel. Segundo os autores, o grande número de hidroxilas presentes na estrutura da goma facilita a complexação de cátions  $Zn^{2+}$ , em uma matriz molecular inicial. Esta estrutura permite que a goma revista e estabilize as espécies de Zn e, finalmente as ZnO-NPs formadas, enquanto inibe sua agregação excessiva e o crescimento do cristal.

A goma arábica apresenta uma estrutura muito semelhante à da GC, o que sugere que o mecanismo de formação das ZnO-NPs pela síntese realizada neste trabalho seja semelhante ao sugerido pelos autores previamente citados. Entretanto, o processo de carboximetilação remove parte das hidroxilas presentes na estrutura da GC, substituindo-as por grupos C=O. Esta característica, portanto, pode interferir na formação e na estabilidade das ZnO-NPs sintetizadas à partir de GCCM, o que explicaria a diferença nos espectros das NPs formadas a partir das diferentes gomas. A microscopia de força atômica (AFM) foi, portanto, utilizada para melhor visualização da forma, tamanho e distribuição das nanopartículas. As imagens obtidas podem ser observadas na Figura 13. A partir das imagens, realizou-se também o cálculo da média de tamanho das NPs formadas. Para tanto, imagens representativas da população de amostras foram analisadas e os perfis das NPs extraídos. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão, na tabela 2.

Figura 13 - Imagens de microscopia de força atômica obtidas para (A) ZnO-NP1; (B) ZnO-NP2; (C) ZnO-NP3 e (D) ZnO-NP4. À esquerda, observam-se imagens de altura e, à direita, o perfis típicos, extraídos a partir das nanopartículas.

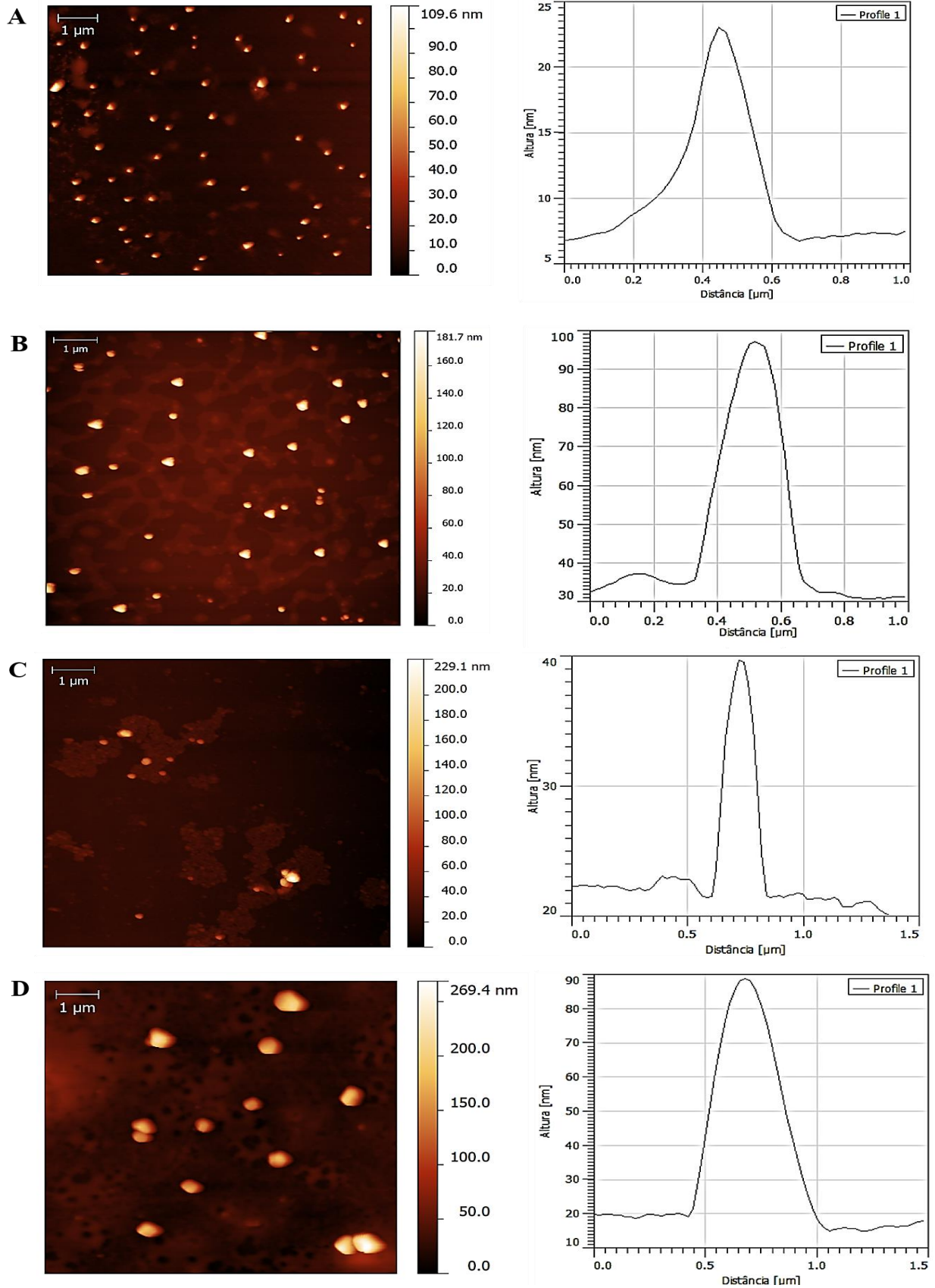




Tabela 2 - Tamanho médio, em nanômetros, das ZnO-NPs, calculado a partir de imagens obtidas por microscopia de força atômica.

<b>Nanopartícula</b>	<b>Média de tamanho <math>\pm</math> desvio padrão (nm)</b>
ZnO-NP1	54,3 $\pm$ 23
ZnO-NP2	129 $\pm$ 38,8
ZnO-NP3	35 $\pm$ 17,9
ZnO-NP4	105 $\pm$ 68,7

A tabela mostra a média de tamanho das NPs, calculada a partir de imagens obtidas por AFM. Nota-se que as NPs sintetizadas com menores proporções de goma (ZnO-NP1 e ZnO-NP3) apresentaram menor tamanho quando comparadas às amostras sintetizadas com maiores concentrações dos polímeros (ZnO-NP2 e ZnO-NP4). Entretanto, apesar do menor tamanho, o valor de desvio padrão das ZnO-NP1 e ZnO-NP3 permite inferir que a população de NPs encontra-se mais dispersa, indicando que maiores concentrações de polímero, apesar de formarem NPs de tamanho relativamente maior, contribuem para um maior controle da formação das ZnO-NPs, fornecendo uma população mais homogênea. De fato, Soluchana e colaboradores (2013) demonstraram em seu trabalho um papel fundamental da solução de goma arábica na formação de ZnO-NPs. Segundo os autores, conforme as concentrações de goma aumentavam, mais homogêneas e mais estáveis tornavam-se as ZnO-NPs.

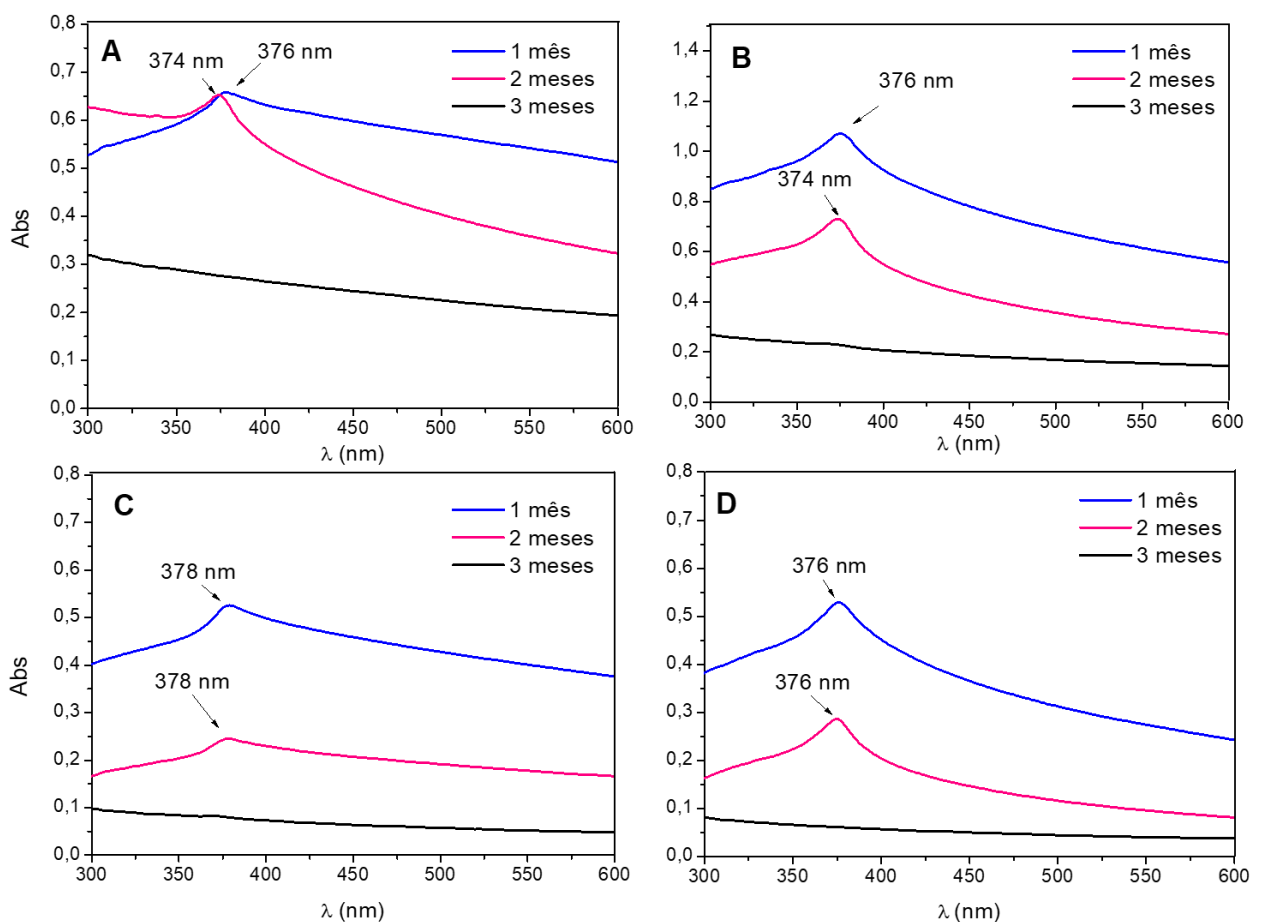
Segundo Gunalan, Sivaraj e Rejadrán (2011), o tamanho e a forma das NPs, sua constante dielétrica no meio em que estão dispersas e os elementos adsorvidos às suas superfícies determinam suas características no espectro. Variações nestas características podem levar a um deslocamento na banda de absorção, que pode variar para comprimentos de onda maiores ou menores. Neste sentido, a observação deste comportamento no espectro de absorção UV-Vís das NPs pode ser uma interessante alternativa para acompanhar sua estabilidade.

As ZnO-NPs sintetizadas no presente trabalho foram avaliadas, portanto, quanto à sua estabilidade em duas diferentes condições. A Figura 14 mostra os resultados obtidos para os espectros de absorção UV-vis das NPs quando armazenadas em solução, à uma temperatura de 10 °C e protegidas da luz.

No trabalho de Alem e colaboradores (2014), a estabilidade de ZnO-NPs em solução também foi avaliada. Para o estudo, os autores prepararam uma solução a 0,25% de ZnO-NPs estabilizadas com propilamina (2% e 4%) em clorofórmio e monitoraram seu comportamento por espectroscopia do UV-Visível. Os resultados encontrados demonstraram que suas NPs

permaneceram estáveis por, aproximadamente 30 dias. Entretanto, os autores notaram um contínuo deslocamento da banda de absorção característica das ZnO-NPs, inicialmente formada em 330 nm, para comprimentos de onda ainda maiores, o que foi associado à possível continuação do crescimento ou à agregação das NPs. Observou-se ainda que estas alterações foram mais discretas para as amostras sintetizadas com 4% de propilamina, indicando que uma maior concentração do agente de revestimento melhora a estabilidade das NPs.

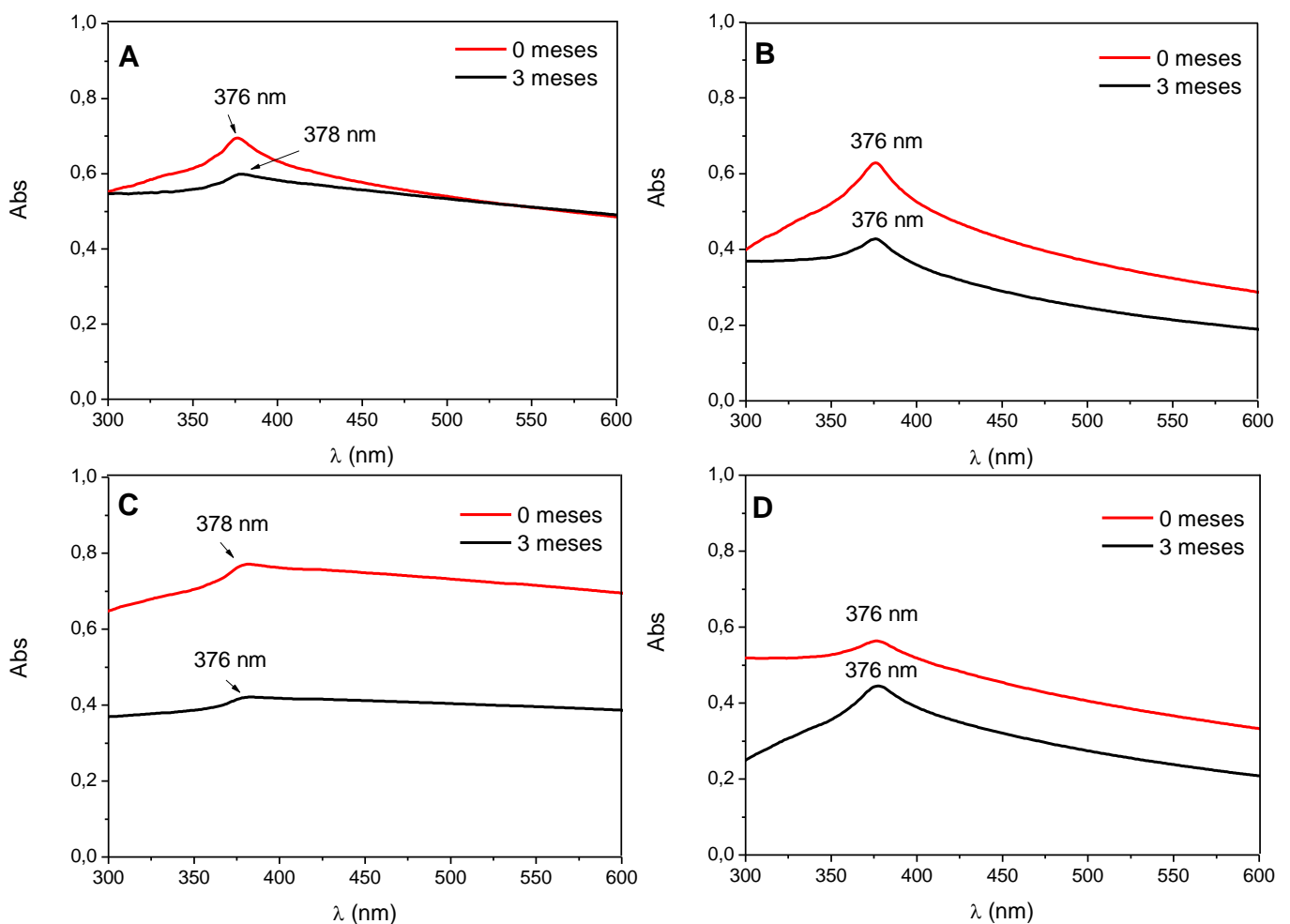
Figura 14 - Monitoramento da estabilidade das ZnO-NPs em solução por espectroscopia UV-Vís. (A) ZnO-NP1; (B) ZnO-NP2; (C) ZnO-NP3; (D) ZnO-NP4. Em azul, rosa e preto, observam-se os espectros obtidos um, dois e três meses, respectivamente, após o preparo da solução.



No presente trabalho, os resultados exibidos na Figura 14 permitem perceber que todas as NPs sintetizadas permaneceram estáveis no primeiro mês após o preparo da solução, sofrendo decaimentos de absorbância e/ou deslocamentos de banda a partir do segundo mês e total ausência da banda no terceiro mês. Estes resultados mostram-se vantajosos frente aos apresentados por Alem e colaboradores (2014), visto que a solução aquosa preparada para as ZnO-NPs neste estudo permaneceram estáveis por mais tempo do que o relatado.

Para efeito de comparação, as ZnO-NPs foram também monitoradas 3 meses após sua síntese, diretamente a partir do pó obtido na síntese, mantido à temperatura ambiente, protegido da luz e da humidade. Os resultados expressos na Figura 15 permitem perceber que, dentro do período de 3 meses, todas as NPs permaneceram estáveis, indicando que esta forma de armazenamento das ZnO-NPs apresenta-se vantajosa, do ponto de vista de estabilidade, quando comparada ao seu armazenamento em solução.

Figura 15 - Acompanhamento da estabilidade das ZnO-NPs, armazenadas em pó, à temperatura ambiente, por espectroscopia do UV-visível. Os espectros mostram em (A) ZnO-NP1, (B) ZnO-NP2, (C) ZnO-NP3 e (D) ZnO-NP4. As medidas foram realizadas logo após e três meses após a síntese das NPs.

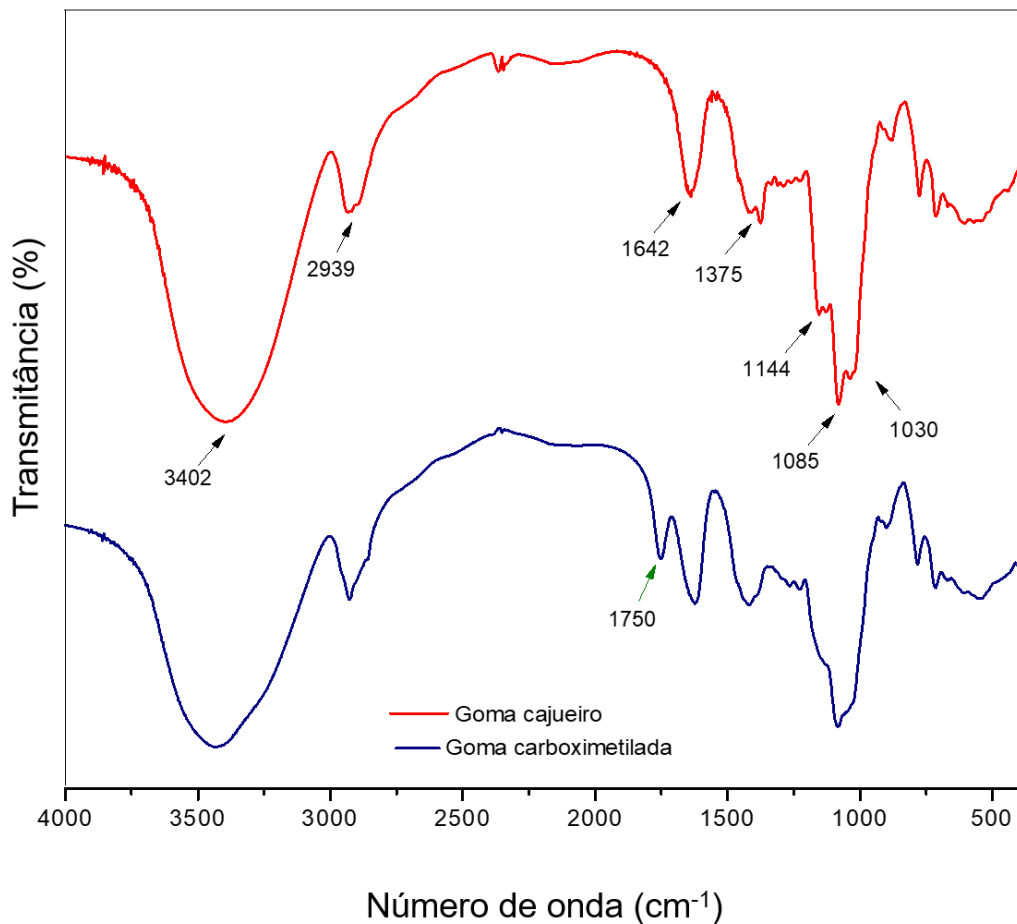


Além disso, é possível perceber também que o uso de maiores proporções de goma parece conservar a estabilidade das NPs por mais tempo, como evidenciado pela observação dos espectros referentes às ZnO-NP2 e ZnO-NP4 (17B e 17D), onde a banda não sofreu deslocamento e manteve morfologia semelhante. Estes dados corroboram as hipóteses formuladas a partir da observação dos resultados de AFM. Deste modo, pode-se concluir que o

aumento nas proporções de GC ou GCCM melhora a estabilidade das nanopartículas, por um período de pelo menos 3 meses, quando armazenadas em pó, à temperatura ambiente e protegidas da umidade.

A identificação de diferentes grupos funcionais e estruturas químicas de uma amostra pode ser realizada pela técnica de FTIR, por intermédio da análise do perfil de absorção de ondas eletromagnéticas em diferentes frequências e intensidades (KHAN et al., 2016). Deste modo, esta técnica foi utilizada para avaliar a composição química das gomas utilizadas para a síntese. Os resultados estão representados na Figura 16.

Figura 16 - Espectros obtidos por espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier para a Goma do cajueiro (vermelho) e para a Goma do cajueiro carboximetilada (azul).



O espectro encontrado para a GC mostra uma banda de absorção mais intensa na região de 3.402 cm<sup>-1</sup>, associada a vibrações de estiramento de ligações O-H, e uma de menor intensidade em 2.939 cm<sup>-1</sup>, devido à vibração de estiramento de ligações C-H. Podem-se notar também bandas nas regiões de 1.642 cm<sup>-1</sup>, relacionada a vibrações tesoura de ligações O-H,

provenientes de moléculas de água ligantes,  $1.375\text{ cm}^{-1}$  (ligações C-C),  $1.144\text{ cm}^{-1}$ ,  $1.085\text{ cm}^{-1}$ , e  $1.030\text{ cm}^{-1}$ , devido ao estiramento de ligações C-O-C (derivadas do ácido glicurônico) e O-H de álcoois ligantes (SILVA et al., 2009, PITOMBEIRA et al., 2015). O processo de Carboximetilação adicionou à estrutura da goma uma banda em  $1.750\text{ cm}^{-1}$ , associada ao estiramento das ligações C=O, adicionadas pela modificação (SILVA et al., 2010). Da mesma forma, as ZnO-NPs produzidas também foram avaliadas pela técnica e os resultados estão expressos nas figuras 17 e 18.

Figura 17 - Espectros obtidos por espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier para ZnO-NP1 (em azul) e ZnO-NP2 (em rosa).

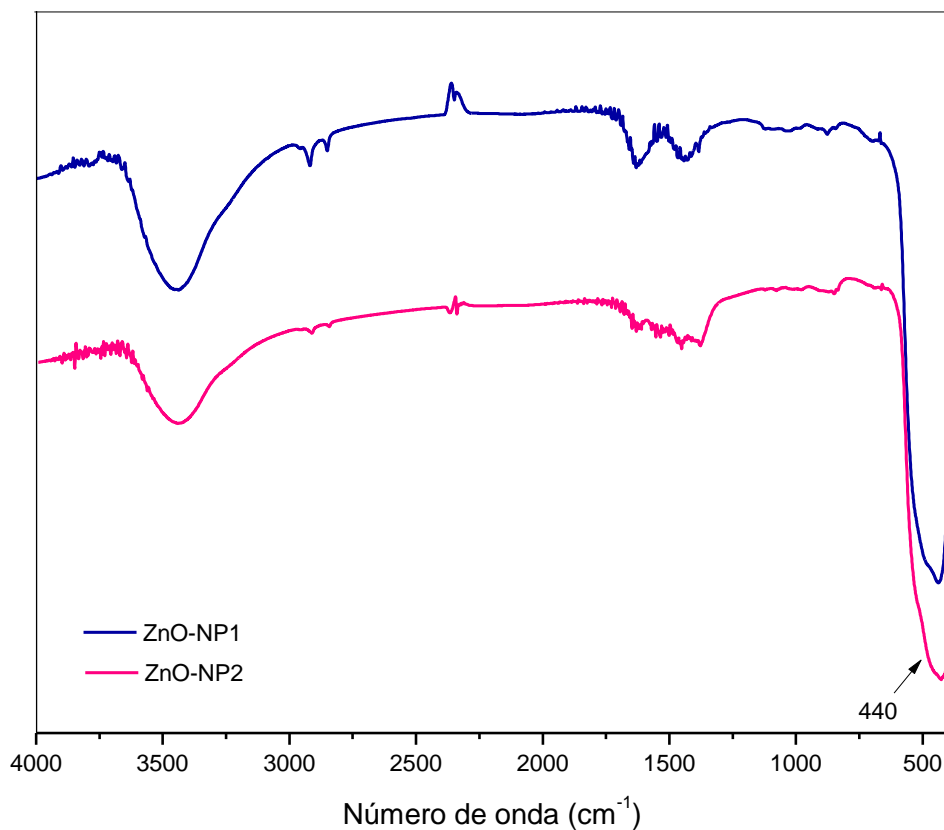
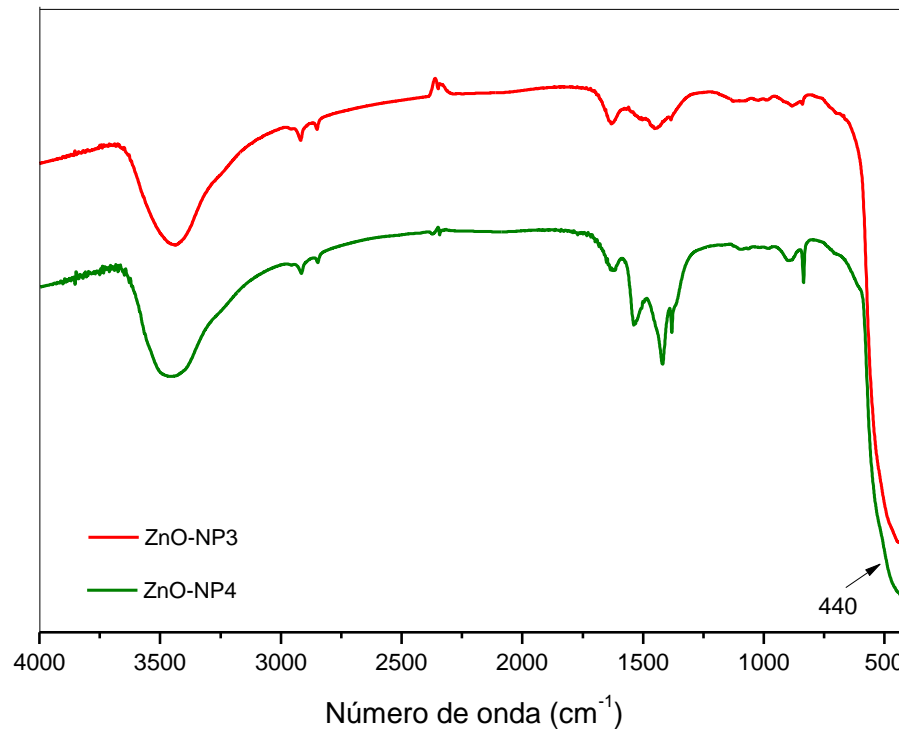


Figura 18 - Espectros obtidos por espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier para ZnO-NP3 (em vermelho) e ZnO-NP4 (em verde).



Segundo Khan e colaboradores (2016), os óxidos de metais geralmente exibem bandas de absorção na região *fingerprint* do espectro, isto é, a região abaixo de  $1.000\text{ cm}^{-1}$ , relacionada a vibrações interatômicas e que apresenta padrões variáveis de molécula para molécula. As bandas correspondentes ao estiramento Zn-O são, normalmente, encontradas nas regiões a partir de  $500\text{ cm}^{-1}$ . Este fato deve-se à representação do modo  $E_2$ , característico da estrutura hexagonal (wurtzita) do ZnO (SHI et al., 2011; KHAN et al., 2016).

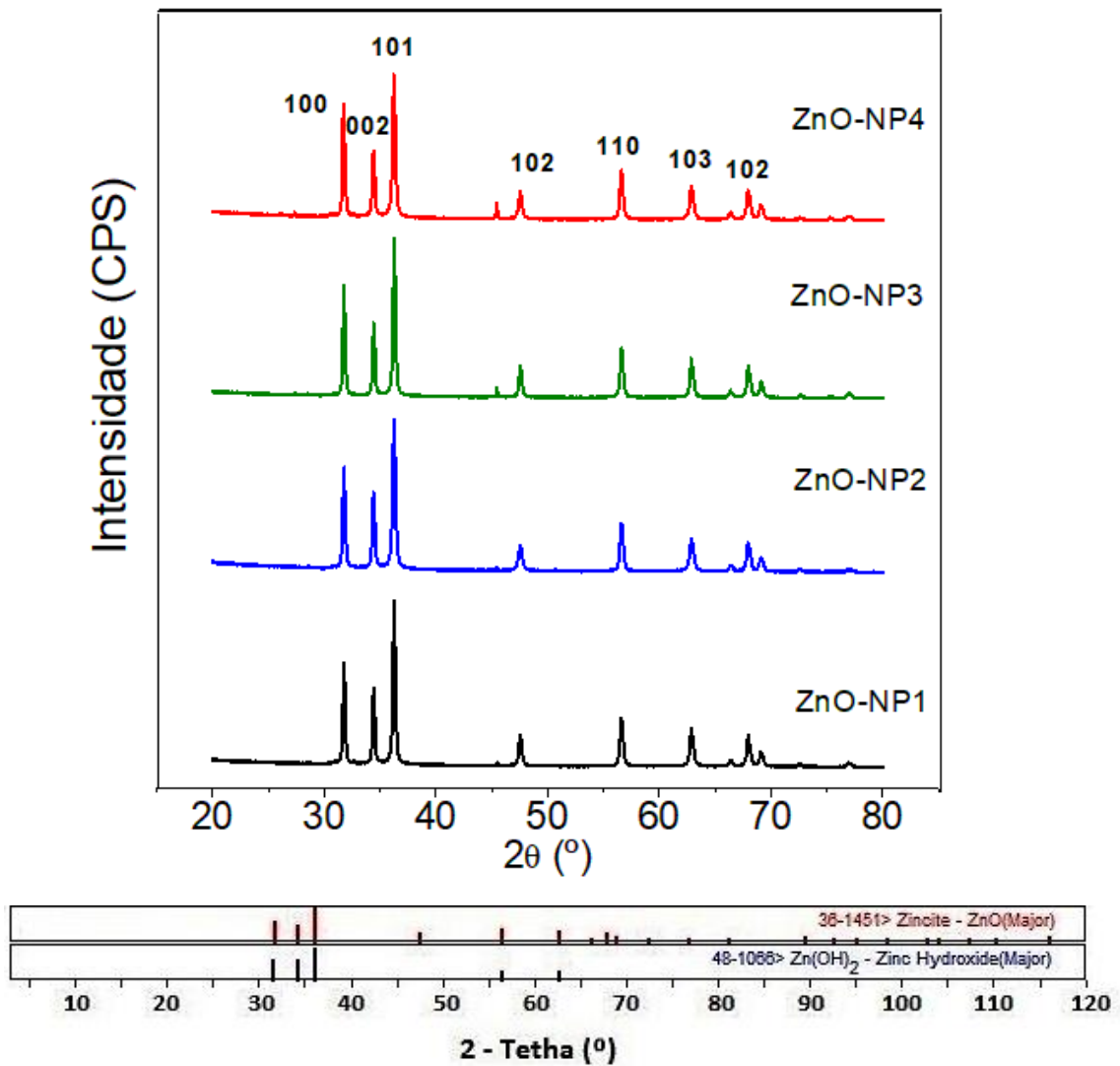
Neste trabalho, as peculiares bandas de absorção associadas ao ZnO podem ser observadas nos espectros acima, apresentando-se fortemente intensas em  $440\text{ cm}^{-1}$ . Outros trabalhos relatam a presença destas bandas em  $434\text{ cm}^{-1}$  (UMAR et al., 2009),  $528\text{ cm}^{-1}$  (GUNALAN, SIVARAJ, RAJEDRAN, 2011),  $452\text{ cm}^{-1}$  (SHI et al., 2011),  $398\text{ cm}^{-1}$  (DARROUDI et al., 2014),  $549\text{ cm}^{-1}$  (JANAKI, SAILATHA, GUNASEKARAN, 2015),  $541\text{ cm}^{-1}$  (FARDOOD et al., 2017) e  $497$  e  $423\text{ cm}^{-1}$  (SHAH, KOTNALA, 2017).

Nos espectros, é possível ainda observar, em especial nas amostras ZnO-NP3 e ZnO-NP4, a presença de algumas bandas entre  $1.400\text{ cm}^{-1}$  e  $3.500\text{ cm}^{-1}$ , que, segundo Darroudi e colaboradores (2014), podem estar associadas a resíduos de hidroxilas e carboxilato na amostra. Os autores sugerem, ainda, que estes resíduos podem ser removidos ao aumentar-se a

temperatura de calcinação. Este resultado sugere que uma temperatura superior à utilizada neste trabalho pode contribuir para a produção de amostras ainda mais puras.

Para confirmar estas informações e avaliar a pureza de fase do cristal de ZnO das NPs produzidas, utilizou-se então a técnica de Cristalografia de raios-X (DRX), cujos resultados podem ser observados na Figura 19.

Figura 19 - Padrão de Difração de Raios-X encontrado para as ZnO-NPs sintetizadas



A Figura 19 mostra, pelos resultados de  $2\theta$ , que todas as nanopartículas apresentaram estrutura *wurtzita*, com fase hexagonal. Este resultado por ser inferido a partir da presença de picos intensos e bem definidos em  $31,00^\circ$ ;  $34,08^\circ$ ;  $36,19^\circ$  e  $56,56^\circ$  no difratograma, correspondentes às fases (100), (002), (101) e (110). Isto quer dizer que todos os valores de  $2\theta$  encontrados para todas as nanopartículas foram numericamente mais semelhantes com os picos

de  $2\theta$  teóricos para os cristais de ZnO puro, que para os cristais de  $\text{Zn}(\text{OH})_2$  (BA-ABBAD et al., 2017; ZHANG et al., 2017).

Entretanto, é possível observar diferenças entre as amostras produzidas com GC (ZnO-NP1 e ZnO-NP2) e as amostras produzidas com GCCM (ZnO-NP3 e ZnO-NP4), sugerindo, pela intensidade e definição dos picos, que o processo de formação das ZnO-NPs foi mais eficiente quando usada GC (ZnO-NP1 e ZnO-NP2) como matriz. É importante ressaltar, porém, que de modo geral todos os polímeros utilizados neste trabalho foram eficientes na produção de ZnO-NPs, já que os dados revelaram a formação de cristais com uma única fase pura para todos as concentrações de goma utilizadas (SANTOS, FERREIRA, 2011).

De acordo com a função de Lorentz, um bom difratograma é caracterizado por picos com alto grau de resolução (pico afiado e estreito) e caudas estendidas. Portanto, os picos obtidos no difratograma das ZnO-NPs permitem afirmar que, morfologicamente, trata-se de um material cristalino monodisperso, estando em concordância com a cristalização no formato *wurtzita* (DOROFEEV et al., 2012; ZHANG et al., 2017) independente do polímero de goma do cajueiro utilizado.

A equação de Scherrer foi utilizada para calcular o tamanho do cristalito (Agarwal et al., 2017, Dorofeev et al., 2012, Santos, Ferreira, 2011). O valor de K usado nos cálculos de tamanho dos cristais das ZnO-NPs foi 0,9, e depende da forma dos cristais produzidos durante a preparação das nanopartículas. O  $\lambda$  usado para este teste foi 0,15406 nm, considerando a radiação  $K\alpha\text{Cu}$  utilizada. Os resultados encontrados estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3 - Estimativa do tamanho do cristalito de ZnO, obtida a partir da Equação de Scherer. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

<b>Amostra</b>	<b>Tamanho do cristalito <math>\pm</math> desvio padrão (nm)</b>
ZnO-NP1	31,5 $\pm$ 2,4
ZnO-NP2	27,7 $\pm$ 1,5
ZnO-NP3	31,7 $\pm$ 1,7
ZnO-NP4	28,8 $\pm$ 2,6

É importante ressaltar, entretanto, que esta é uma medida aproximada, e não real, dos tamanhos das ZnO-NPs, uma vez que a técnica de DRX mede o crescimento do cristalito. Zhang e colaboradores (2002), por exemplo, sintetizaram nanopartículas de óxido de cério e relataram dados concordantes entre os valores correspondentes às médias de tamanho do cristalito e a média dos tamanhos das nanopartículas obtidas por microscopia eletrônica de transmissão.



Porém, os autores comprovaram que 99% das nanopartículas sintetizadas em seu trabalho eram cristais únicos. Em contrapartida, no presente estudo, os dados obtidos para a média de tamanho do cristalito discordam daqueles antes encontrados por AFM. Diante do exposto, pode-se inferir que apenas o cristalito em si não constitui a nanopartícula como um todo. Neste caso, pode haver a presença de outros materiais (como materiais orgânicos, remanescentes dos polímeros utilizados na síntese, por exemplo), que não sofrem difração e, portanto, não apareceriam neste resultado.

## 5.2. Atividade antimicrobiana e biocompatibilidade

Agentes antimicrobianos fazem-se necessários em diferentes setores e com diferentes finalidades, seja para cuidados em saúde, seja na indústria alimentícia, têxtil ou de construção (ZHANG et al., 2006). Os agentes antimicrobianos derivados de materiais orgânicos, geralmente, são menos estáveis quando comparados àqueles derivados de materiais inorgânicos, principalmente quando submetidos a ambientes com altas temperatura e pressão (SAWAI, 2003).

Neste trabalho, o potencial antimicrobiano das ZnO-NPs sintetizadas com GC e GCCM foi avaliado contra bactérias e fungos. Para análise da atividade antibacteriana *in vitro*, utilizou-se a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para cepas Gram-positivas e Gram-negativas. Os resultados estão expressos na Tabela 4.

Pelos resultados obtidos é possível observar que as ZnO-NP1 e ZnO-NP4 inibiram o crescimento de todas as bactérias testadas. As amostras ZnO-NP2 e ZnO-NP3, por sua vez, inibiram três, das quatro cepas testadas.

Em todos os casos, entretanto, nota-se que as menores CIMs foram encontradas para bactérias Gram-positivas, indicando que as amostras produzidas neste trabalho podem ser mais efetivas contra este grupo de bactérias. Estes resultados estão em concordância com os reportados por Sirelkhatim e colaboradores (2015), que relatam valores de CIM equivalentes a 1.500 µg/mL para *S. aureus* e 3.100 µg/mL para *E. coli*, valores estes muito superiores aos encontrados neste estudo. Semelhantemente, Yousef e Danial (2012) encontraram valores de 1 µg/mL para *S. aureus* e 5 µg/mL para *K. pneumoniae*, quando investigaram a atividade antimicrobiana das ZnO-NPs sintetizadas em seu trabalho.

Vários outros estudos também corroboram estes achados. Divya e colaboradores (2017), por exemplo, testaram, por difusão em ágar, ZnO-NPs revestidas com gelatina contra *P. aeruginosa* e *E. coli*, relatando a formação de um maior halo de inibição para as primeiras, em detrimento das segundas. O mesmo foi observado por Saha e colaboradores (2017), que

relataram uma maior sensibilidade por parte de *S. aureus* às ZnO-NPs testadas, quando comparadas a *E. coli*.

Tabela 4 - Atividade antimicrobiana das ZnO-NPs, obtida a partir da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Dados expressos em µg/mL

Bactérias	CIM (µg/mL)				
	ZnO-NP1	ZnO-NP2	ZnO-NP3	ZnO-NP4	Controle
<b>Gram-positivas</b>					
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	125	62,5	> 1.000	62,5	< 0,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	62,5	31,25	125	62,5	< 0,5
<b>Gram-negativas</b>					
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	250	>1.000	250	125	< 0,5
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 1041	500	500	500	500	< 0,5

Os mecanismos pelos quais as ZnO-NPs promovem sua atividade antibacteriana ainda não estão totalmente elucidados. Entretanto, atribui-se este efeito a uma combinação de um ou mais fenômenos, que, segundo Sarwar e colaboradores (2016), podem incluir:

(a) Efeitos mecânicos, que podem ocorrer devido à interação física entre as ZnO-NPs e a membrana da bactéria, o que pode levar à sua deformação e/ou ruptura, além do bloqueio de importantes canais iônicos. Ademais, NPs com tamanhos muito pequenos podem penetrar na célula e, efetivamente, interagir com inúmeros componentes celulares, causando estresse oxidativo e, como consequência, danos proteicos e no DNA.

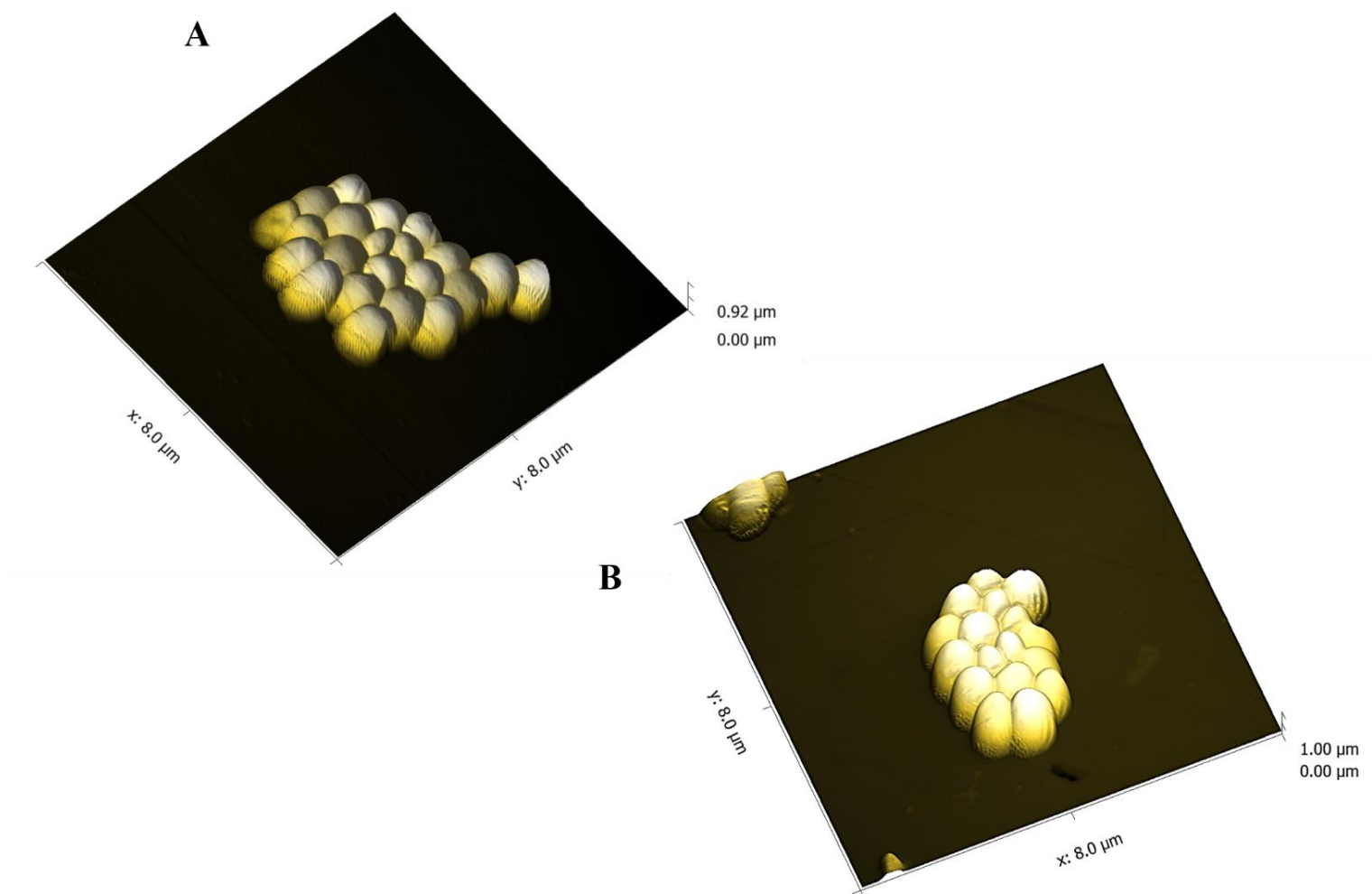
(b) Peroxidação lipídica da membrana por EROs, o que pode levar à ruptura da parede e posterior extravasamento do conteúdo celular.

(c) Dissolução das NPs, resultando na produção de elevados níveis de íons  $Zn^{2+}$  no meio de cultura, que podem apresentar efeitos tóxicos à bactéria

Além destes, outros fatores como o tamanho e a morfologia das NPs (PADMAVATHY, VIJAYARAGHAVAN, 2008; KUMAR et al., 2016) e a natureza do micro-organismo – Gram-positivo ou Gram-negativo – (DIMAPILIS et al., 2018) também parecem influenciar na ação antimicrobiana das ZnO-NPs.

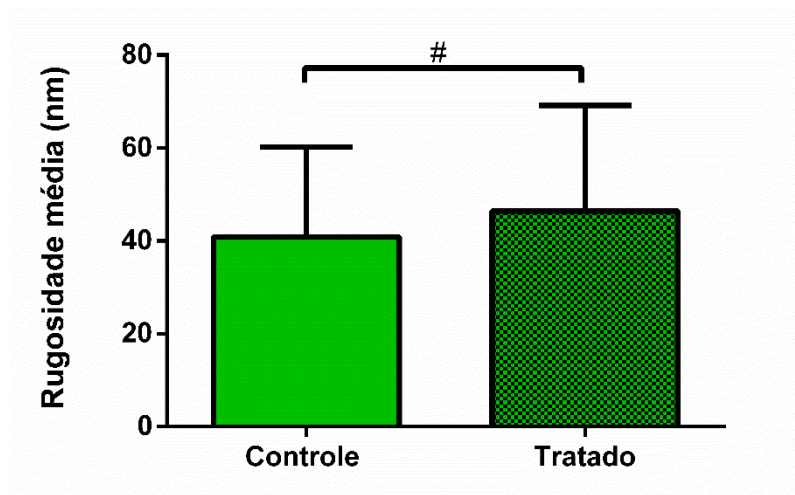
Com o objetivo de observar o efeito das NPs sintetizadas no presente estudo diante das bactérias testadas, realizaram-se imagens por AFM a partir da cepa mais afetada, que corresponde à *S. epidermidis*, exposta à ZnO-NP2. As imagens obtidas podem ser observadas na figura 20.

Figura 20 - Imagens obtidas por AFM, mostrando: (A) *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 controle e (B) *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, tratadas com ZnO-NP2, na concentração de 62,5  $\mu\text{g/mL}$  (sub-MIC).



A Figura 20A mostra a morfologia da bactéria não tratada, ao passo que se pode observar na Figura 20B a bactéria exposta às ZnO-NP2. Aparentemente, a célula não sofreu grandes alterações morfológicas após o tratamento com as NPs sintetizadas. O perfil de rugosidade das bactérias também foi investigado a partir das imagens obtidas, com o objetivo de confirmar possíveis alterações morfológicas que, eventualmente, poderiam não ser detectadas pela simples observação da imagem. Os resultados encontrados não mostram diferenças significativas na rugosidade média entre as células controle e tratadas, e podem ser melhor observados no gráfico 1.

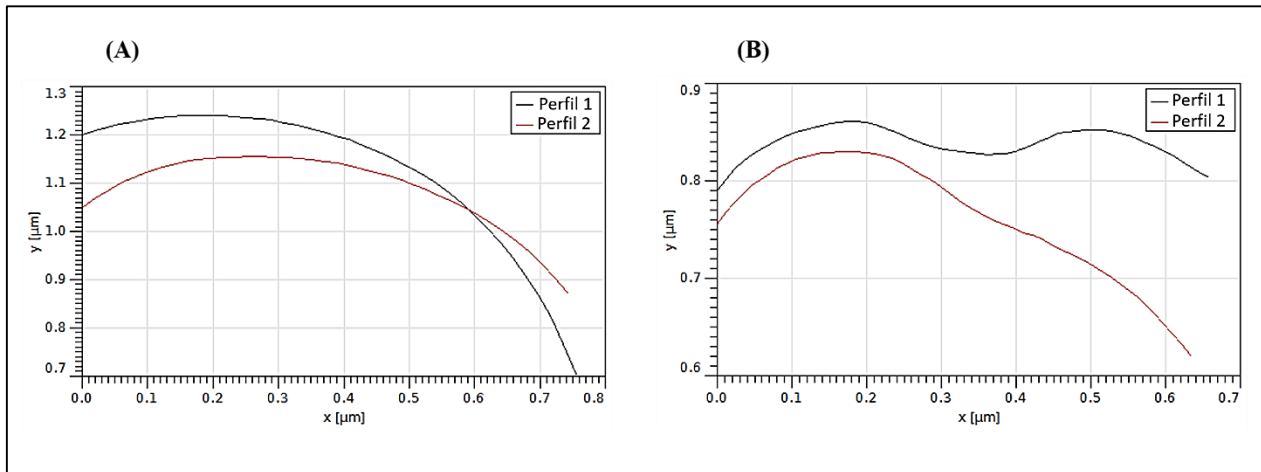
Gráfico 1 - Perfil de rugosidade média das bactérias analisadas.



As bactérias controle apresentaram um valor médio de 40,9 nm para rugosidade, ao passo que este valor para a célula tratada correspondeu a 46,4 nm, o que mostra que, neste aspecto, ambos os grupos encontram-se morfologicamente semelhantes. Estes resultados, entretanto, eram de certa forma esperados, uma vez que a espessa camada de peptidoglicano presente na parede celular de bactérias Gram-positivas fornece a este grupo uma estrutura muito mais resistente. Eaton e colaboradores (2008) relataram resultados semelhantes ao fazer um estudo dos efeitos antibacterianos da quitosana e de quitoligossacarídeos frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, onde as imagens realizadas também por AFM demonstraram poucas alterações morfológicas nas primeiras em detrimento das segundas.

Um olhar mais cuidadoso, entretanto, tornou possível observar o surgimento de pequenas depressões na superfície da bactéria tratada, possivelmente causado em decorrência de sua interação com as ZnO-NP2. Este efeito tornou-se evidente após a análise dos perfis de superfície das bactérias controle e tratadas, que estão representados na figura 21.

Figura 21 – Análise do perfil de superfície das bactérias, realizada a partir das imagens obtidas por microscopia de força atômica mostrando (A) *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 controle e (B) *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 controle após tratamento com ZnO-NP2



A figura 21A mostra o perfil de superfície do controle em contraste com a figura 21B, que mostra a mesma informação para a bactéria tratada. Os perfis demonstraram que a superfície do controle apresenta-se mais uniforme, ao passo que depressões variando de 150 nm a 250 nm de largura e 15 nm a 30 nm de profundidade surgiram após o tratamento. Além disso, os perfis também sugerem que as células tratadas apresentaram menor altura, quando comparadas ao controle. Perfis semelhantes foram observados por Stoimenov e colaboradores (2002), cujo estudo avaliou o potencial antimicrobiano de MgO-NPs contra *E. coli*, observando, por imagens de AFM, que as bactérias também apresentaram depressões em sua superfície.

Ao estudar o efeito de ZnO-NPs contra bactérias Gram-positivas, da espécie *S. aureus*, Raghupathi, Koodali e Manna (2011) sugeriram que, tanto a maior produção de EROs quanto a deposição das NPs na superfície e/ou no interior da célula são mecanismos provavelmente associados à inibição do crescimento bacteriano, bem como à morte celular.

Os resultados obtidos pela determinação da CIM e pelas imagens de AFM mostraram que as ZnO-NPs sintetizadas com GC e GCCM apresentaram potencial antibacteriano, causando perturbações na célula. Entretanto, maiores investigações fazem-se necessárias de modo que se possa desvendar o mecanismo através do qual as ZnO-NPs promovem esta atividade.

A atividade das ZnO-NPs sintetizadas no presente trabalho também foi avaliada quanto ao seu potencial antifúngico. Para acessar esta informação, realizou-se um *screening*, onde a

suscetibilidade de 9 diferentes espécies foi testada. Os resultados estão expressos nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Atividade antifúngica das ZnO-NPs sintetizadas, obtida pela determinação da concentração inibitória mínima contra fungos leveduriformes. Dados expressos em ug/mL

Fungos	CIM (µg/mL)				Controle
	ZnO-NP1	ZnO-NP2	ZnO-NP3	ZnO-NP4	
<i>Candida albicans</i> ATCC18804	500	500	500	500	0,5
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	250	500	250	62,5	0,12
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	124	15,62	62,25	62,25	0,12
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	1.000	1.000	1.000	1.000	0,5
<i>Cryptococcus</i> <i>neoformans</i> ATCC 48189	1.000	1.000	1.000	1.000	0,125

Tabela 6 - Atividade antifúngica das ZnO-NPs sintetizadas contra fungos filamentosos, obtida a partir da determinação da Concentração Fungicida Mínima. Dados expressos em ug/mL

Fungos	CIM (µg/mL)				Controle
	ZnO-NP1	ZnO-NP2	ZnO-NP3	ZnO-NP4	
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 13047	> 1.000	> 1.000	> 1.000	> 1.000	0,25
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> ATCC 46422	> 1.000	> 1.000	> 1.000	> 1.000	0,25
<i>Sporothrix brasiliensis</i> ATCC 16042	> 1.000	> 1.000	> 1.000	> 1.000	0,25
<i>Trichophyton</i> <i>interdigitale</i> 73727	> 1.000	> 1.000	> 1.000	> 1.000	0,12

Pelo teste de susceptibilidade fúngica foi possível observar que as ZnO-NPs apresentaram atividade seletiva para leveduras, com ausência de inibição de crescimento para todos os fungos filamentosos nas concentrações testadas. Este comportamento, porém, não parece ser regra para estas NPs. Jayaseelan e colaboradores (2012) estudaram a atividade de ZnO-NPs sintetizadas por um método de decomposição química e observaram a inibição do crescimento do fungo *Aspergillus flavus*, pelo método de difusão em ágar, com a formação de um halo correspondente 19 mm. Li e colaboradores (2016), por sua vez, desenvolveram ZnO-NPs para o revestimento de Bambu, com o objetivo de evitar a contaminação deste por diferentes tipos de fungos. Os autores observaram que o revestimento com as ZnO-NPs aumentou a resistência da madeira contra infecções por *Aspergillus niger* e *Trichoderma viride*.

Entretanto, muitos estudos concentram-se na investigação do potencial antifúngico de ZnO-NPs contra leveduras, particularmente as do gênero *Candida*, visto que estas são patógenos humanos importantes, principalmente por seu comportamento oportunista, muito associadas a infecções nosocomiais (JAYASEELAN, et al., 2012; SHARMA, GHOSE, 2015; DANAJAYAN et al., 2017; JOTHIPRAKASAM et al., 2017). Neste sentido, autores relatam valores de CIM equivalentes a 75 µg/mL (DANANJAYA et al., 2017) e 400 µg/mL (KARAMYIAN et al., 2015) para *Candida albicans*. Além disso, Jothiprakasam e colaboradores (2017) também relataram a capacidade das ZnO-NPs em diminuir a aderência de fungos da espécie *Candida tropicalis* a superfícies, o que indica que estas NPs apresentam também potencial antibiofilme.

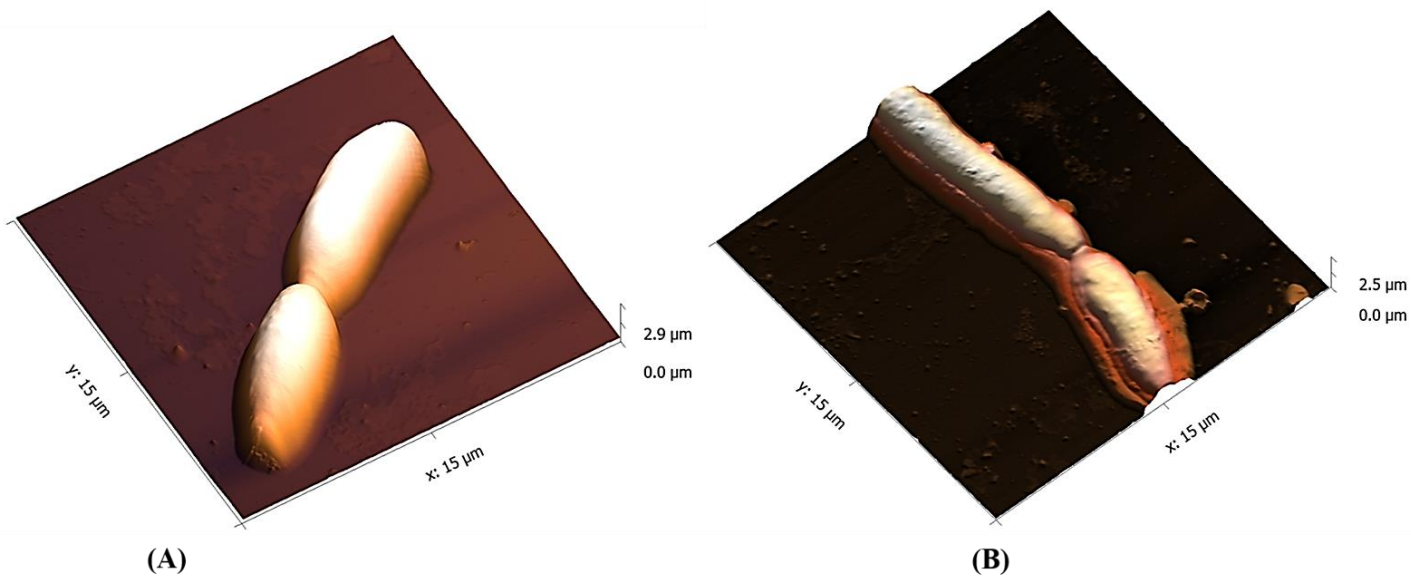
Todas as ZnO-NPs produzidas no presente estudo foram capazes de inibir o crescimento das leveduras testadas, porém, em diferentes concentrações. Embora tenha havido inibição para todas as espécies de *Candida*, a espécie mais atingida correspondeu à *C. parapsilosis*, mais precisamente quando exposta à ZnO-NP2, apresentando uma CIM de 15,62 µg/mL.

Nos últimos dez anos, tem-se observado um aumento na incidência de infecções fúngicas causadas por espécies de *Candida* não-*albicans* (ALENCAR et al., 2017; OKUNO et al., 2018). Nestes casos, as espécies do complexo *Candida parapsilosis* têm emergido como uma das mais comuns. O estudo de Pffaler e colaboradores (2012) revelou que, de 18 espécies de *Candida* identificadas a partir de isolados obtidos de um total de 3648 pacientes, 15,9% correspondiam a *C. parapsilosis*. No Brasil, uma pesquisa conduzida por Alencar e colaboradores (2017) mostrou que esta espécie prevalecia em 21,9% dos isolados clínicos obtidos. Neste sentido, os resultados encontrados no presente estudo são de grande importância,

visto que algumas cepas de *C. parapsilosis* encontradas em isolados clínicos têm apresentado resistência aos antifúngicos normalmente utilizados, o que aponta para a necessidade de novas alternativas de tratamento (BASSETTI et al., 2013; ALENCAR et al., 2017).

Por este motivo, esta espécie foi selecionada para avaliação morfológica por AFM, de forma semelhante ao que foi previamente realizado para *S. epidermidis*, com o mesmo objetivo. A figura 22 representa as diferenças morfológicas observadas entre o micro-organismo controle e o tratado, obtidas por AFM.

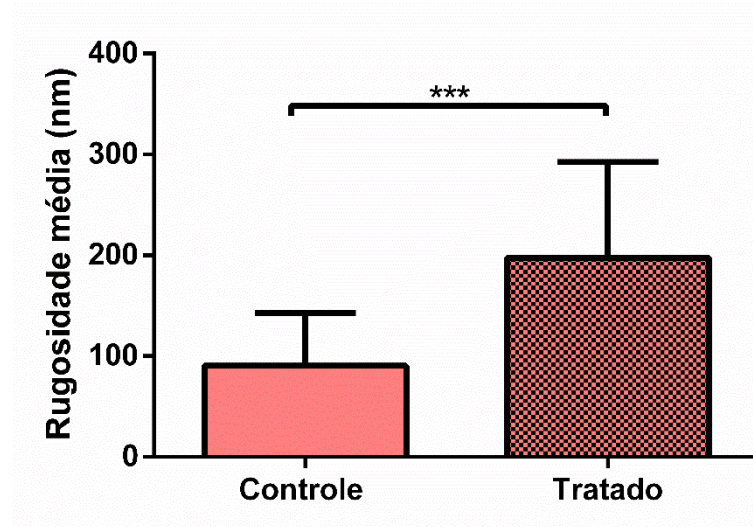
Figura 22 - Imagens obtidas por microscopia do força atômica, mostrando: (A) *Candida parapsilosis* ATCC 22019 controle (sem tratamento) e (B) *Candida parapsilosis* ATCC 22019 após tratamento com ZnO-NP2.



Ao comparar-se a imagem do controle (figura 22A) com o micro-organismo tratado (figura 22B), nota-se que a morfologia do fungo foi nitidamente afetada, apresentando desníveis na membrana, sugerindo um aumento em sua rugosidade. Estas informações foram confirmadas a partir da determinação da rugosidade média das células, cujos resultados podem ser observados no gráfico 2.



Gráfico 2 - Perfil de rugosidade média para *C. parapsilosis*, obtido a partir de imagens por AFM



Por esta análise foi possível confirmar que houve diferenças significativas entre a rugosidade média de superfície do controle (90,5 nm) e do fungo tratado (198 nm). Além disso, a imagem sugere que o fungo teve seu tamanho reduzido após exposição à ZnO-NP2. Estes dados sugerem que a interação com as NPs pode levar a perturbações de membrana, com posterior extravasamento de seu conteúdo intracelular.

Resultados semelhantes foram relatados por Sharma e colaboradores (2010), que sintetizaram ZnO-NPs por diferentes métodos e observaram sua atividade contra fungos *Fusarium* sp. Segundo os autores, o método de síntese, bem como a concentração, influenciaram na atividade antifúngica. Foi possível observar que a interação do fungo com as NPs sintetizadas em seu trabalho também promoveu perturbações na membrana do fungo, seguida de sua ruptura. Os autores associaram este efeito a uma possível deficiência na atividade enzimática fúngica, porém o mecanismo pelo qual esta atividade foi promovida não foi totalmente esclarecido.

Kasemets e colaboradores (2009) sugeriram que a rígida parede celular das leveduras poderia dificultar a captação das NPs para o interior da célula e, portanto, o mecanismo de ação das ZnO-NPs diante desta classe de fungos deveria estar relacionada à produção de EROs e à interação de íons metálicos tóxicos com a superfície celular. Entretanto, o estudo realizado por Dananjaya e colaboradores (2017), contradisse esta hipótese. No estudo, os autores relataram atividade de ZnO-NPs revestidas com quitosana contra leveduras da espécie *Candida albicans* e, para investigar seus efeitos na integridade de membrana do fungo, utilizaram ensaios com Iodeto de Propídio (IP). O IP é um corante impermeável à membrana, que apresenta

fluorescência vermelha. Ele apenas é capaz de penetrar na célula quando esta apresenta falhas na sua integridade de membrana e, ao ligar-se aos ácidos nucleicos, sua fluorescência é potencializada em cerca de 20 vezes. Como resultado, os autores observaram que as células do controle, cuja membrana apresentava-se perfeitamente viável, não apresentaram fluorescência quando expostas ao IP. As leveduras tratadas, em contrapartida, apresentaram forte fluorescência vermelha quando analisadas por microscopia confocal de varredura a laser, indicando que seu contato com as ZnO-NPs provocou, de fato, perturbações e, conseqüentemente, danos à membrana da célula.

Apesar disso, assim como ocorre com o efeito antibacteriano, os mecanismos responsáveis pela susceptibilidade de fungos às ZnO-NPs também permanecem obscuros. De modo geral, a hipótese mais aceita segue sendo a liberação de EROs, como peróxido de hidrogênio, ânion superóxido, além de radicais e íons hidroxilas (SHARMA, GHOSE, 2015). Além dos efeitos sugeridos por Sarwar e colaboradores (2016), previamente citados, Li e colaboradores (2017) sugerem que o estresse oxidativo causado pela formação de radicais livres a partir das ZnO-NPs podem causar, ainda, danos mitocondriais, principalmente por alterações no potencial de membrana mitocondrial, além de suprimir a expressão de enzimas antioxidantes, responsáveis pelo equilíbrio do estresse oxidativo na célula.

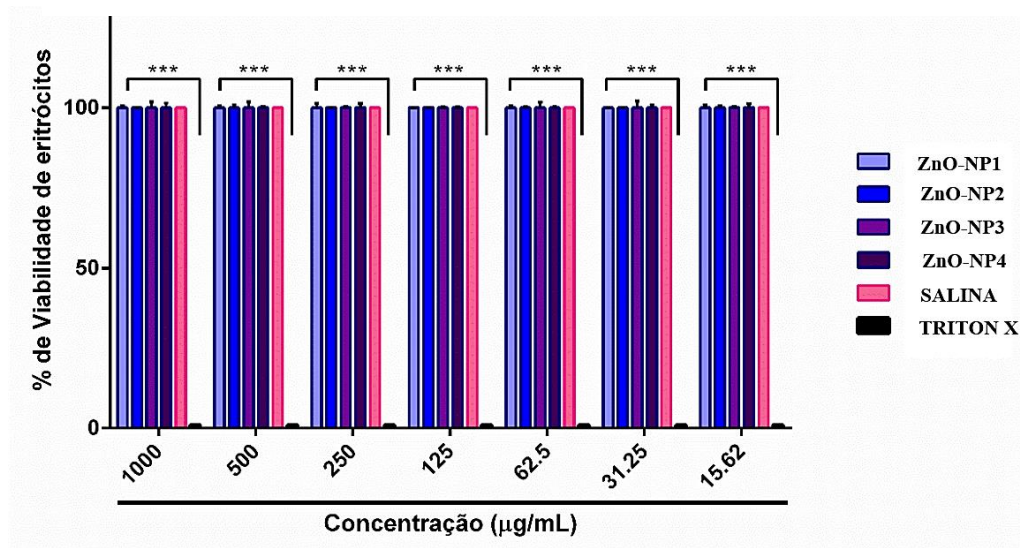
Independentemente do mecanismo, entretanto, as ZnO-NPs sintetizadas no presente estudo, seja à base de GC, seja à base de GCCM, apresentam-se efetivas contra fungos leveduriformes, e maiores investigações precisam ser feitas de modo a desvendar seu mecanismo de ação.

Apesar de inúmeros compostos, sintéticos ou naturais, apresentarem potencial antimicrobiano, apenas alguns podem efetivamente ser utilizados para desenvolver novos medicamentos. Isto se deve ao fato de que muitos destes compostos apresentam alta toxicidade a células eucarióticas, o que deixa sua atividade antimicrobiana em desvantagem. Neste sentido, o uso de ZnO-NPs apresenta inúmeras vantagens, principalmente devido ao fato de que o ZnO corresponde a um material ecologicamente correto, fonte de minerais essenciais, além de exibir alta atividade mesmo em baixas concentrações (YOUSEF, DANIAL, 2012).

Com base nos resultados previamente expostos, pode-se concluir que as ZnO-NPs sintetizadas neste trabalho apresentam potencial antimicrobiano contra bactérias e fungos. Portanto, a sua atividade hemolítica foi avaliada com o objetivo de inferir sua capacidade de causar toxicidade a células humanas. Para este fim, eritrócitos humanos foram coletados e expostos a concentrações de ZnO-NPs variando de 1.000 µg/mL a 15,62 µg/mL. Nenhuma das concentrações testadas apresentou atividade hemolítica, indicando que as células, quando

expostas às ZnO-NPs nas concentrações selecionadas, permaneceram viáveis. Estes resultados são apresentados no gráfico 3, que representa o percentual de viabilidade de eritrócitos.

Gráfico 3 - Representação do percentual de viabilidade de eritrócitos para as ZnO-NPs



No gráfico, a representação em rosa corresponde à salina, utilizada como controle negativo para hemólise. Em preto, representou-se o Triton X, utilizado como controle positivo para hemólise. Pela representação, é possível observar que todas as ZnO-NPs sintetizadas apresentaram comportamento semelhante ao da salina, indicando que não houve efeitos citotóxicos nas concentrações testadas.

No trabalho de Das e colaboradores (2013), ZnO-NPs foram sintetizadas pelo método de decomposição térmica e sua atividade hemolítica foi avaliada. Segundo os autores, as NPs apresentaram aumento do percentual de hemólise de maneira proporcional ao aumento da concentração utilizada, atingindo 8% de hemólise em uma concentração correspondente a 5mg/ml. Na concentração de 1.000 µg/mL, os autores relataram um percentual de hemólise equivalente a 2%. Neste caso, os resultados obtidos no presente trabalho apresentam-se em vantagem, visto que, na mesma concentração relatada pelos autores, as ZnO-NPs sintetizadas a partir de GC e GCCM não apresentaram citotoxicidade.

Uma comparação entre o potencial hemolítico de ZnO-NPs sem revestimento e ZnO-NPs sintetizadas com goma arábica associada a alginato de sódio (SAGA-ZnONPs), foi realizada por Raguvaran e colaboradores (2017). As concentrações testadas variaram de 2.000 µg/mL a 250 µg/mL e os resultados encontrados apontaram que as ZnO-NPs sem revestimento apresentaram atividade hemolítica apenas na maior concentração. Em contrapartida, as SAGA-ZnONPs não apresentaram atividade hemolítica em nenhuma das concentrações testadas,

indicando que a associação destas NPs a polímeros naturais pode, ainda, reduzir sua citotoxicidade.

Uma vez que o limite máximo de hemólise permitido para um material corresponde a 5% (DAS et al., 2013), é possível concluir que as ZnO-NPs sintetizadas à base de GC e GCCM apresentam-se seguras para potenciais aplicações biomédicas.

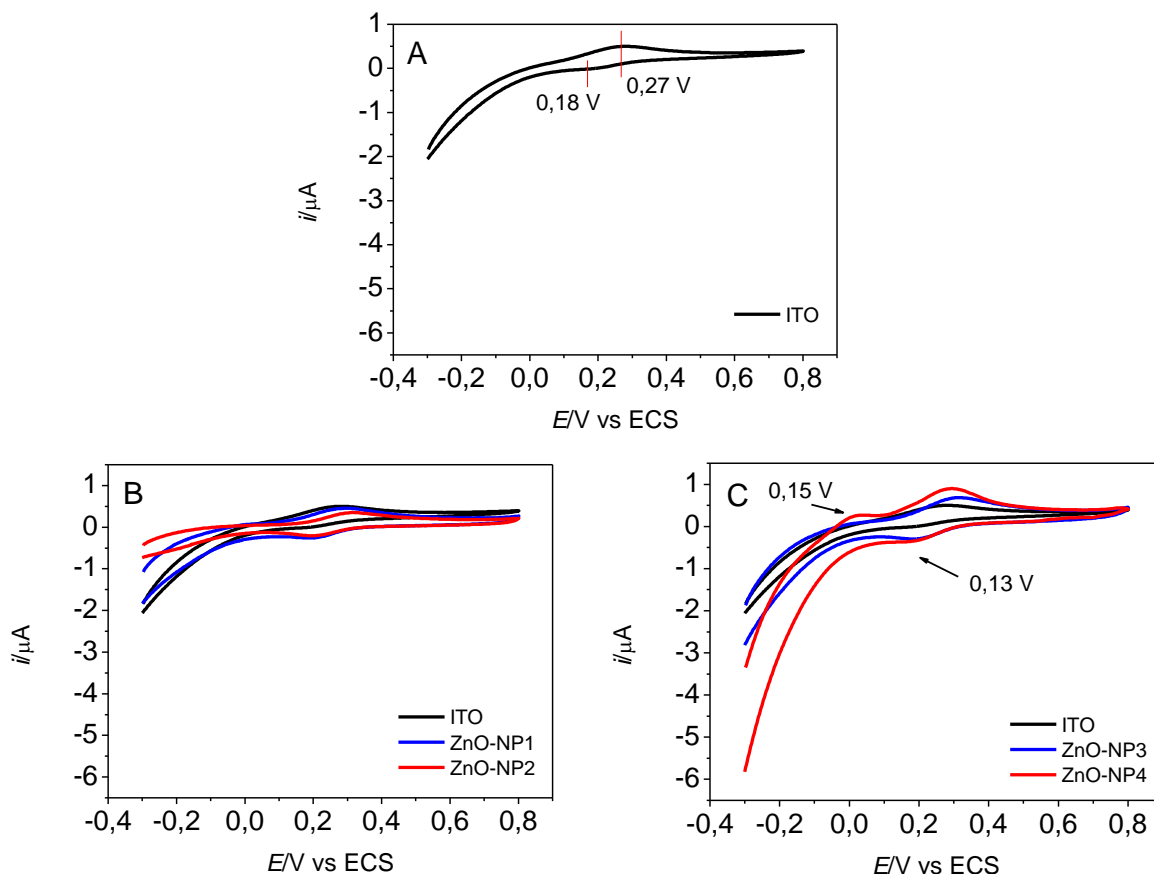
### 5.3. Preparo de filmes automontados para detecção de Dopamina

A dopamina é um dos neurotransmissores catecolaminérgicos mais relevantes, amplamente distribuída no sistema nervoso central de mamíferos e responsável por inúmeras funções motoras e cognitivas (ZHANG et al., 2009). Baixas concentrações de DA têm sido associadas ao surgimento de diversas doenças neurodegenerativas, o que tem despertado extenso interesse pela investigação de métodos sensíveis e seletivos para a sua detecção (ZHOU et al., 2016).

No presente trabalho, o potencial das ZnO-NPs na produção de filmes automontados para a detecção de DA foi avaliado. As NPs produzidas foram solubilizadas em uma solução a 0,1% de GC (ZnO-NP1 e ZnO-NP2) ou de GCCM (ZnO-NP3 e ZnO-NP4), sonicadas por 30 minutos e utilizadas para a montagem dos filmes. Inicialmente, uma monocamada de ZnO-NPs foi montada na superfície do ITO e seu comportamento eletroquímico foi avaliado por voltametria cíclica, com o objetivo de observar a imobilização e o efeito das NPs na resposta do eletrodo. Estes resultados estão expressos na figura 23.

Na figura 23A observa-se o potencial de oxirredução do ITO, no meio utilizado (PBS 0,1 M, pH 2), que se caracteriza por um processo de oxidação em 0,27 V e um processo de redução em 0,18 V. A partir do momento em que os materiais foram imobilizados no eletrodo, a resposta passa a ser característica para aqueles materiais. Como observado nas figuras 23B e 23C, as ZnO-NP1, ZnO-NP2 e ZnO-NP3 não demonstraram eletroatividade, uma vez que exibiram um perfil de resposta muito semelhante àquela demonstrada pelo substrato não modificado. Apesar de apresentarem um discreto aumento e/ou deslocamento de corrente, este comportamento pode estar atribuído não à presença de eletroatividade, mas ao aumento da área ativa na superfície do eletrodo, devido à presença das ZnO-NPs adsorvidas após a montagem do filme (FARIAS et al., 2015).

Figura 23 – Curvas de corrente *versus* potencial, obtidas por voltametria cíclica, mostrando os perfis eletroquímicos de (A) ITO não modificado, (B) ITO modificado com ZnO-NPs à base de GC e (C) ITO modificado com ZnO-NPs à base de GCCM. Voltamogramas obtidos em PBS 0,1 M, pH 2,1, a  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .



Ao mesmo tempo, ao observar-se a figura 23C, nota-se ainda que, após a imobilização da ZnO-NP4 na superfície do ITO, algumas mudanças na resposta eletroquímica foram identificadas. Estas mudanças estão representadas basicamente pelo surgimento de um processo oxidação próximo a 0,15 V e um de redução próximo a 0,13 V.

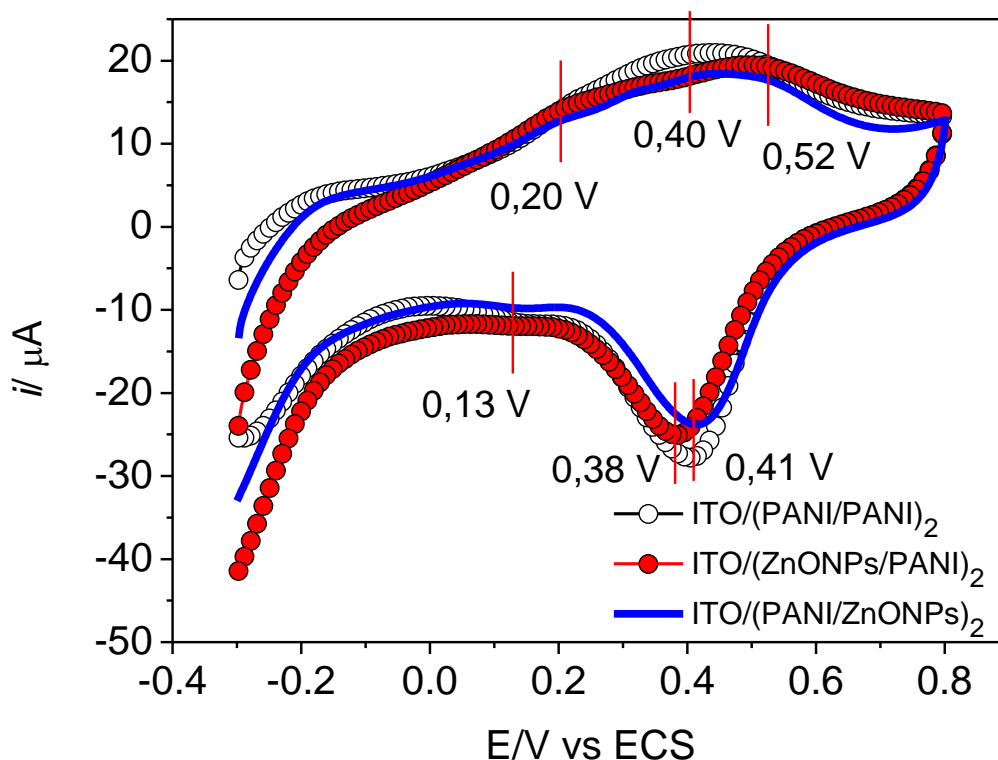
Matinise e colaboradores (2017) também relataram a presença de um forte processo redutivo ao estudar as características eletroativas de suas ZnO-NPs imobilizadas em um eletrodo de carbono vítreo. Segundo os autores, este processo pode estar associado à redução do ZnO em Zn elementar, durante a varredura catódica, visto que neste momento existe a necessidade da remoção do  $\text{O}_2$  presente nas soluções, o que resultaria em:



Estas características permitem inferir que a ZnO-NP4 apresenta-se mais reativa em relação às demais NPs testadas e, portanto, foi selecionada para a montagem e caracterização dos filmes quanto à capacidade em detectar DA.

Após esta etapa, analisou-se também a resposta da PANI immobilizada no ITO, bem como em conjunto com as ZnO-NP4, em diferentes configurações, com o objetivo de investigar se a sequência de montagem dos filmes possuiria alguma influência na resposta eletroquímica. Nestes casos, todos os filmes foram montados com duas bicamadas, para que se pudesse garantir um melhor recobrimento da superfície do substrato. Os resultados podem ser observados na figura 24.

Figura 24- Curvas de corrente *versus* potencial, obtidas por voltametria cíclica, mostrando filmes contendo duas bicamadas e comparando a sequência de adsorção dos materiais de interesse. Para efeitos comparativos é mostrada a resposta de um filme bicamada de apenas PANI. Voltamogramas obtidos em PBS 0,1 M, pH 2,1, a  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .



A PANI é um polímero condutor amplamente utilizado na montagem de filmes para sensoriamento. Ela pode ser encontrada em três diferentes formas: (i) pernigranilina base (BPG) (completamente oxidada); (ii) esmeraldina (SE) (50% oxidada, 50% reduzida) e (iii) leucoesmeraldina (SLE) (completamente reduzida) (MATTOSO, 1996).

Na imagem é possível observar, representada pela linha pontilhada preta e branca, o perfil redox do filme bicamada ITO/PANI/PANI. As demais representações correspondem às

diferentes configurações de montagem do filme, seja ITO/ZnO-NPs/PANI ou ITO/PANI/ZnO-NPs. Com base nestes dados é possível concluir que não houve diferença de resposta entre o filme ITO/PANI/PANI e os filmes montados nas diferentes configurações com ZnO-NPs.

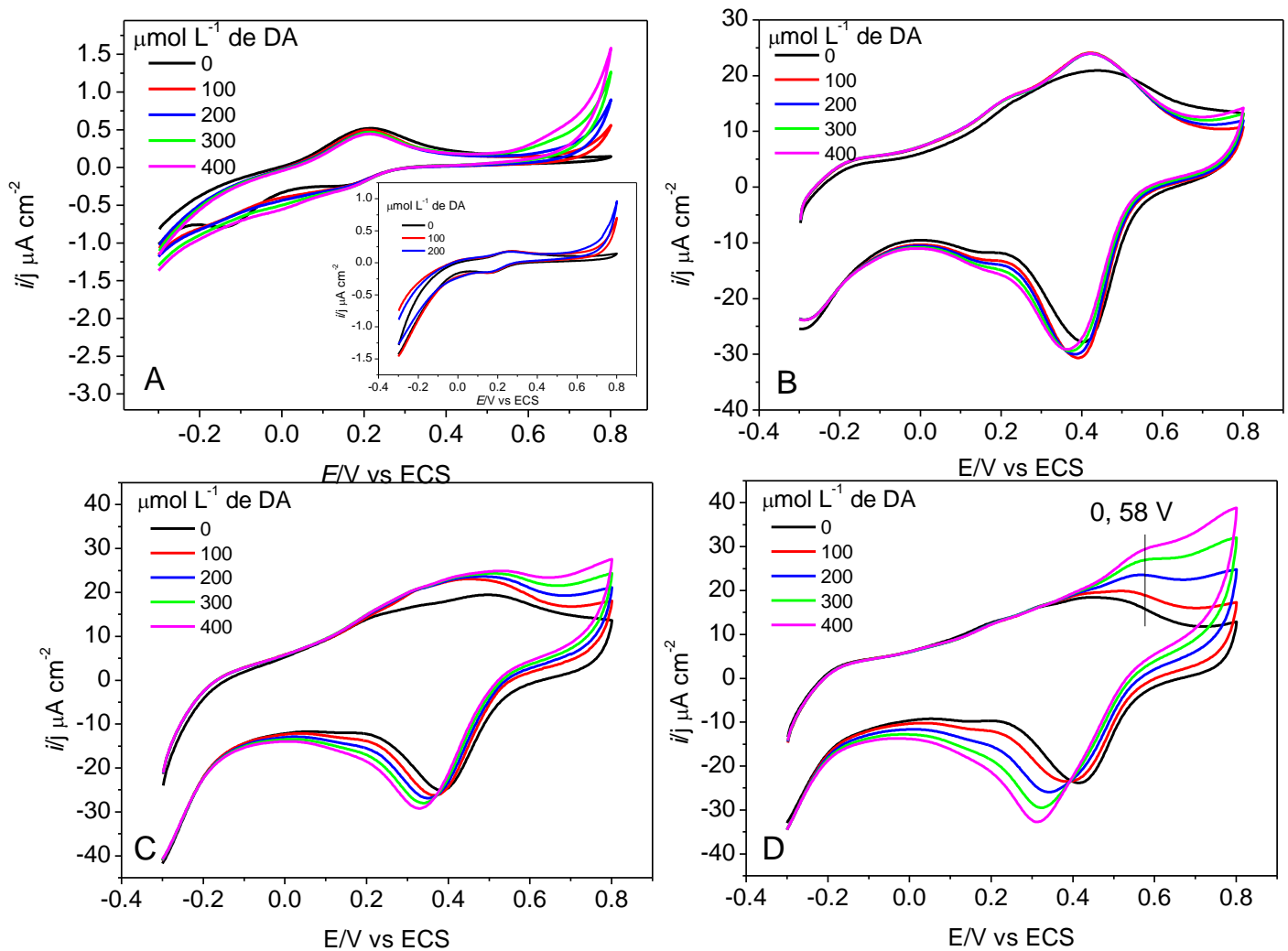
Em todas as montagens, durante a varredura direta, as interconversões da PANI puderam ser observadas: sua conversão do estado SLE para SE, representada pelo potencial aparente no gráfico em 0,20 V e, no potencial de 0,52 V, a conversão da PANI de SE para BPG. Outro efeito interessante observado na figura corresponde ao surgimento de um processo de oxidação em 0,40 V. Este processo não ocorre naturalmente durante as interconversões da PANI e, geralmente está associado à sua degradação ácida, promovida pelo eletrólito de suporte (PBS 0,1 M, Ph 2) utilizado (FARIAS et al., 2015). Após intercalar a PANI com a ZnO-NP4, observou-se que este processo em 0,4 V tornou-se menos evidente, indicando que as ZnO-NPs podem desempenhar um papel protetor contra a degradação da PANI em meio ácido.

Alguns estudos, de fato, relatam que as ZnO-NPs em geral apresentam potencial antioxidante (DAS et al., 2013; ZARE et al., 2017), porém, outras pesquisas demonstram ainda que a presença de polissacarídeos naturais também podem promover esta ação protetora. Barros e colaboradores (2012), por exemplo, relataram a redução do processo de oxidação da PANI quando esta foi associada à GC no processo de montagem dos filmes. Além desta, outros polissacarídeos como a goma do angico (*Anadenanthera macrocarpa*) e a goma chichia (*Sterculia striata*) (EIRAS et al., 2007) além de ágar e carragenana (FARIAS et al., 2015) também apresentaram comportamento semelhante. Estas informações permitem inferir que tanto as ZnO-NPs em si como os polímeros utilizados para sua síntese e/ou estabilização podem promover o efeito protetor à PANI, evitando sua degradação em meio ácido.

O próximo passo consistiu na avaliação da capacidade dos filmes montados em detectar DA. Para tanto, preparou-se uma solução mãe de DA, em uma concentração de  $1 \times 10^{-3}$  M, que serviu como solução de partida para o teste. Após cada varredura, 100  $\mu$ L desta mesma solução eram acrescentados à célula eletrolítica, de modo a aumentar gradualmente a concentração de DA e, conseqüentemente, observar as possíveis mudanças comportamentais dos filmes em sua presença. Os testes foram realizados para o ITO não modificado e para todos os filmes

produzidos (ITO/ZnO-NPs; ITO/PANI/PANI; ITO/PANI/ZnO-NPs; ITO/ZnO-NPs/PANI), montados em bicamadas. Os resultados obtidos estão expostos na figura 25.

Figura 25 – Voltamogramas cíclicos mostrando a influência da composição do filme LbL na resposta eletroquímica de detecção de DA. A) mostra a resposta do filme de ITO/ZnONPs, onde o insert mostra a resposta apenas do ITO, B) ITO/PANI/PANI, C) ITO/PANI/ZnONPs e D) ITO/ZnONPs/PANI, em diferentes concentrações de DA. Voltamogramas obtidos em PBS 0,1 M, pH 2,1, a  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .



Na figura 25A é possível observar o comportamento do filme ITO/ZnO-NPs, em contraste com o comportamento do ITO não modificado (*insert*), quando expostos a diferentes concentrações de DA. Apesar de notarem-se discretos aumentos de corrente, proporcionais ao aumento da concentração do neurotransmissor em solução, não se pode concluir que este comportamento está associado à capacidade do filme em detectar DA. Este fato pode ser concluído ao confrontar-se o comportamento do ITO não modificado quando exposto às mesmas condições, demonstrando os mesmos aumentos de corrente. Isto ocorre devido ao fato



de que a DA, por si só, possui eletroatividade e tende a sofrer oxidação em potenciais mais elevados, neste caso, mais precisamente, próximos a 0,8 V (BARROS et al., 2012).

Isto quer dizer que não há diferenças entre a detecção de dopamina pelo ITO não modificado e pelo filme ITO/ZnO-NPs, demonstrando que esta configuração não poderia ser utilizada para sensoriamento.

Semelhantemente, observam-se, na figura 25B, os resultados obtidos para o filme ITO/PANI/PANI, submetido às mesmas condições. Apesar de os aumentos de corrente apresentarem-se mais intensos do que os observados para o ITO ou para o filme ITO/ZnO-NPs, não houve mudança de comportamento por parte daquele filme conforme as concentrações de DA no meio aumentaram, o que também refuta a possibilidade do seu uso como sensor, visto que ele não foi capaz de detectar diferentes concentrações do analito.

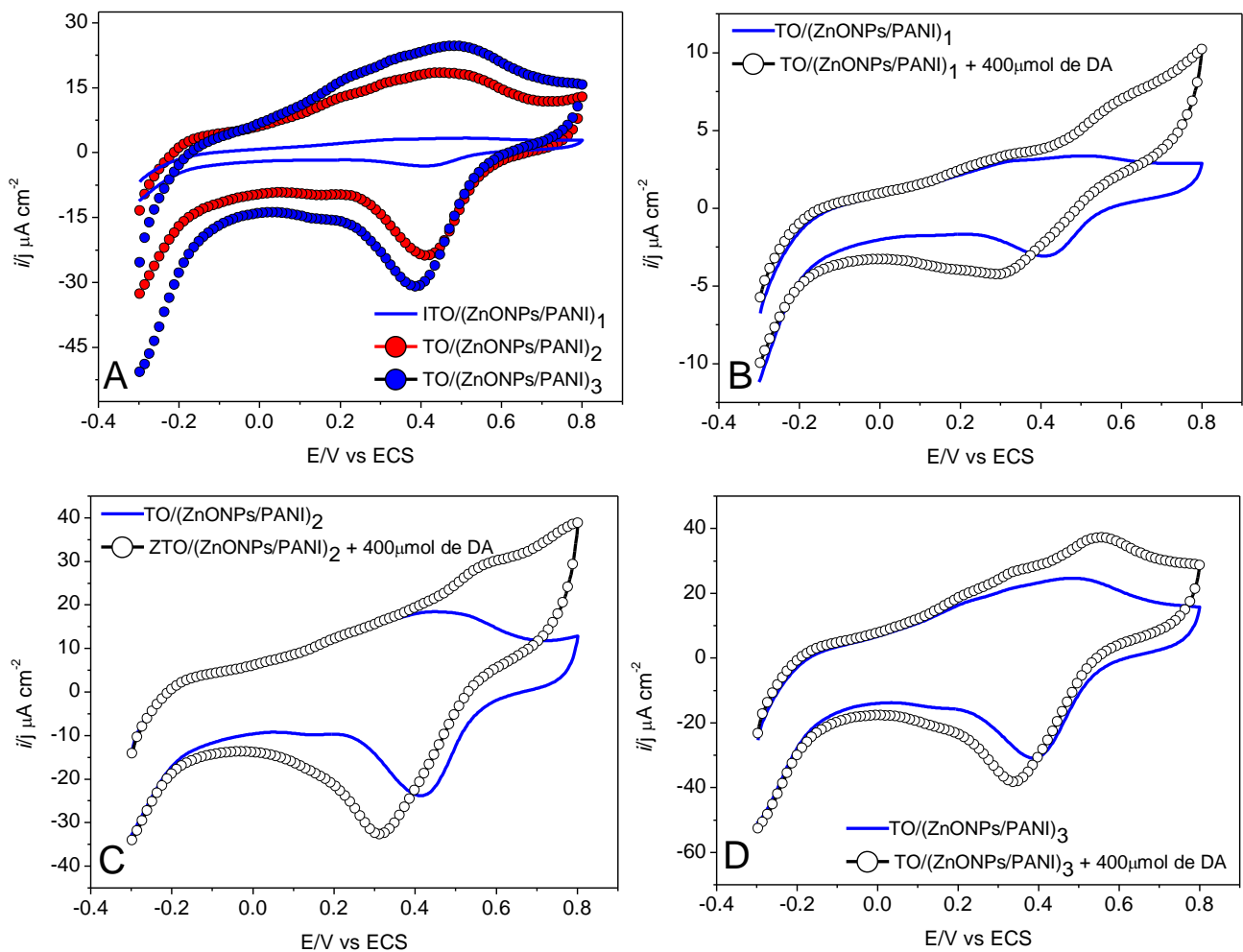
Em contrapartida, ao observar-se o comportamento dos filmes montados a partir da associação da PANI às ZnO-NPs, evidenciado na figura 25C e 25D, pode-se notar um aumento no pico de corrente em função do aumento da concentração de DA no meio. Este aumento começa a ser percebido em um potencial de, aproximadamente, 0,58 V. Este efeito se dá, provavelmente, em decorrência da interação entre a PANI e as ZnO-NPs, uma vez que, individualmente, nenhum destes itens foi capaz de detectar a DA de maneira satisfatória. Ademais, esta associação parece deslocar a detecção da DA para potenciais menores (de 0,8 V para 0,58 V), o que pode ser visto também como uma vantagem no ponto de vista do desenvolvimento de sensores.

Quando se realiza, entretanto, uma comparação entre as duas configurações, é possível notar que a ordem de montagem afeta a eficiência de detecção da DA. Pode-se chegar a esta conclusão ao observar, na figura 25D, que o filme ITO/ZnO-NPs/PANI demonstrou um aumento no pico de corrente mais nítido quando comparado ao filme ITO/PANI/ZnO-NPs, mostrado na figura 25C. Foi possível perceber que, levando-se em consideração a leitura na região de 0,58 V, o primeiro filme apresentou um aumento de corrente de cerca de 90,3% após a adição de 400  $\mu$ M de DA, ao passo que o segundo apresentou um aumento de, apenas 35,9%. Logo, a configuração ITO/ZnO-NPs/PANI mostrou-se a melhor dentre as testadas para detecção da DA e, portanto, foi selecionada para maiores caracterizações.

Todos os filmes utilizados para as investigações previamente realizadas foram confeccionados a partir da montagem de duas bicamadas, como forma de assegurar um melhor revestimento da superfície do eletrodo e, portanto, resultados mais fidedignos. Após selecionar

a melhor configuração para a detecção da DA, a influência do número de bicamadas foi, também, avaliada. Os resultados podem ser observados na figura 26.

Figura 26 - Influência do número de bicamadas do filme de ITO/(ZnONPs/PANI) $_n$  na detecção de DA. A) mostra voltamogramas cíclicos comparando a corrente registrada para este filme, contendo 1, 2 ou 3 bicamadas na ausência de DA. B), C), e D) mostram, respectivamente, a reposta do filme de 1, 2 e 3 bicamadas na presença de 400  $\mu$ M de DA.



A figura 26A mostra o comportamento eletroquímico dos filmes preparados com uma, duas e três bicamadas de ITO/ZnO-NPs/PANI. O aumento de corrente proporcional ao aumento do número de bicamadas, notado na figura, deve-se à deposição de espécies eletroativas na interface do eletrodo (PINTO, 2016). Para avaliar a influência do número de bicamadas na detecção da DA, todos os filmes (1, 2, ou 3 bicamadas) foram expostos às mesmas condições, na presença de iguais concentrações de DA (400  $\mu$ M) e o aumento de corrente em 0,58 V foi avaliado por meio da comparação entre os valores obtidos para 0 e 400  $\mu$ M de DA. O percentual correspondente ao aumento de corrente em 0,58, para os diferentes números de bicamadas estão expressos na tabela 7.

Tabela 7 - Percentual de aumento de corrente em função do aumento de concentração de DA

<b>Número de bicamadas ITO/(ZnONPs/PANI)<sub>n</sub></b>	<b>Aumento da corrente em 0,58 V (%)</b>
1	108,7
2	90,2
3	62,2

Apesar de o processo de oxidação da DA tornar-se mais evidente conforme o número de bicamadas aumenta, como pode ser observado na figura 26D, o aumento de corrente em 0,58 V é consideravelmente maior quando os filmes são montados apenas com uma bicamada, como mostra a tabela. Estas informações permitem inferir que, para a confecção de um sensor, a montagem do filme com apenas uma bicamada parece ser mais vantajosa, visto que oferece um aumento de corrente com maior intensidade, além reduzir o tempo e a quantidade de material gastos para a montagem do sensor.

Portanto, a partir dos resultados obtidos é possível concluir que uma provável interação entre a PANI e as ZnO-NP4 sintetizadas no presente estudo permite a detecção efetiva de DA. A configuração, bem como o número de bicamadas utilizadas para montagem do filme, também exercem influência na detecção do neurotransmissor, tendo sido constatado que um filme montado com 1 bicamada, na configuração ITO/ZnO-NP4/PANI apresentou maior eficiência para o sensoriamento. Logo, conclui-se que os filmes montados no presente trabalho apresentam potencial aplicação como sensor para DA. Entretanto, maiores investigações fazem-se necessárias de modo que se possa avaliar a morfologia e a seletividade dos filmes produzidos.

## 6.0 CONCLUSÃO

No presente trabalho, ZnO-NPs foram sintetizadas utilizando-se GC e GCCM como *biotemplates*. A síntese foi realizada por um método sol-gel, resultando em NPs com tamanhos variando entre 54 e 129 nm, como observado a partir das imagens obtidas por AFM. A caracterização por espectroscopia do UV-visível revelou a formação de bandas de absorção em 376 nm e 378 nm, ao passo que os resultados de FTIR demonstraram uma banda com forte absorção em  $440\text{ cm}^{-1}$ . Os resultados de DRX demonstraram que as ZnO-NPs apresentaram absorção em  $31,00^\circ$ ;  $34,08^\circ$ ;  $36,19^\circ$  e  $47,36^\circ$ , cujos cristalitos apresentaram tamanhos entre 27,7 nm e 31,7 nm, confirmando a formação de ZnO pelo método utilizado. Todas as NPs sintetizadas apresentaram potencial antimicrobiano contra bactérias e fungos, com destaque para a amostra ZnO-NP2, que apresentou CIM de  $31,25\text{ }\mu\text{g/mL}$  para *S. epidermidis* e  $15,62\text{ }\mu\text{g/mL}$  para *C. parapsilosis*. Além disso, os testes eletroquímicos apontaram que a amostra ZnO-NP4, associada ao polímero condutor PANI, é capaz de detectar o hormônio neurotransmissor DA, apresentando potencial aplicação para sensoriamento. Entretanto, maiores investigações fazem-se necessárias para que se possa descobrir o mecanismo responsável pela atividade antimicrobiana das ZnO-NPs, bem como para caracterizar e avaliar a sensibilidade e seletividade dos filmes produzidos para a detecção da DA.

## 7.0 PERSPECTIVAS

- Investigar o possível mecanismo envolvido na atividade antimicrobiana das ZnO-NPs sintetizadas;
- Caracterizar o filme ITO/ZnO-NP4/PANI por Microscopia de Força Atômica;
- Caracterizar o filme ITO/ZnO-NP4/PANI por espectroscopia do UV-Visível
- Avaliar a estabilidade do filme ITO/ZnO-NP4/PANI
- Avaliar a sensibilidade do filme ITO/ZnO-NP4/PANI;
- Avaliar a seletividade de filme ITO/ZnO-NP4/PANI à DA, em meios contendo possíveis interferentes

## 8.0 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, U. P., RALPH, S. A., BAEZ, C., REINER, R. S., VERRILL, S. P. Effect of sample moisture content on XRD-estimated cellulose crystallinity index and crystallite size. *Cellulose*, v. 24, p. 1971–1984, 2017.
- ALEIXO, L. M. Voltametria: conceitos e técnicas, **Chemkeys**, 2003.
- ALEM, Salima et al. Solution-processed annealing-free ZnO nanoparticles for stable inverted organic solar cells. **Organic Electronics**, v. 15, n. 5, p.1035-1042, maio 2014.
- ALENCAR, Débora de Souza Olartechea de et al. Candidaemia due to *Candida parapsilosis* species complex at a hospital in Brazil: Clinical characteristics and antifungal susceptibility profile. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 34, n. 2, p.106-108, abr. 2017.
- ANDRADE, K. C. S. et al. Goma de cajueiro (*Anacardium occidentale*): avaliação das modificações químicas e físicas por extrusão termoplástica. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, v. 23, n. 5, p. 667–671, 2013.
- ARAÚJO, Thiago S.L. et al. Antidiarrheal activity of cashew GUM, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 174, p.299-307, nov. 2015.
- ATCHUDAN, Raji et al. Facile synthesis of zinc oxide nanoparticles decorated graphene oxide composite via simple solvothermal route and their photocatalytic activity on methylene blue degradation. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, v. 162, p.500-510, set. 2016.
- BA-ABBAD, Muneer M. et al. Arabic gum as green agent for ZnO nanoparticles synthesis: properties, mechanism and antibacterial activity. **Journal Of Materials Science: Materials In Electronics**, v. 28, n. 16, p.12100-12107, ago. 2017.
- BAJPAI, S.k.; JADAUN, Mamta; TIWARI, Seema. Synthesis, characterization and antimicrobial applications of zinc oxide nanoparticles loaded gum acacia/poly(SA) hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p.60-65, nov. 2016.
- BASSETTI, M. et al. Epidemiology, Species Distribution, Antifungal Susceptibility, and Outcome of Candidemia across Five Sites in Italy and Spain. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 12, p.4167-4172, 9 out. 2013.
- BIAN, Shao-wei et al. Aggregation and Dissolution of 4 nm ZnO Nanoparticles in Aqueous Environments: Influence of pH, Ionic Strength, Size, and Adsorption of Humic Acid. **Langmuir**, v. 27, n. 10, p.6059-6068, maio 2011.
- BISWAS, Abhijit et al. Advances in top–down and bottom–up surface nanofabrication: Techniques, applications & future prospects. **Advances In Colloid And Interface Science**, v. 170, n. 1-2, p.2-27, jan. 2012.
- BOWEN, C. R. et al. Pyroelectric materials and devices for energy harvesting applications. **Energy And Environmental Science**, v. 7, n. 12, p.3836-3856, ago. 2014.
- BUZEA, Cristina; PACHECO, Ivan I.; ROBBIE, Kevin. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. **Biointerphases**, v. 2, n. 4, p.17-71, out. 2007.

CAMPOS, D. A. et al. Study of antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 270–274, 2012.

COLEMAN, V. A.; JAGADISH, C.. Basic Properties and Applications of ZnO. In: JAGADISH, Chennupati; PEARTON, Stephen J.. **Zinc Oxide Bulk, Thin Films and Nanostructures**. Oxford: Elsevier, 2006. Cap. 1. p. 1-20.

CONTRERAS, José E.; RODRÍGUEZ, Edén A.. Nanostructured insulators – A review of nanotechnology concepts for outdoor ceramic insulators. **Ceramics International**, v. 43, n. 12, p.8545-8550, ago. 2017.

DA SILVA, D. A. et al. Synthesis and characterization of cashew gum/acrylic acid nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 2, p. 437–441, 2009.

DAMASCENO, Manara Bezerra Barbosa Costa. **Participação da neurotransmissão dopaminérgica no efeito hiperlocomotor do neuropeptídeo S**. 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Psicobiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

DANANJAYA, S.H.S. et al. Synthesis, characterization of ZnO-chitosan nanocomposites and evaluation of its antifungal activity against pathogenic *Candida albicans*. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 108, p.1281-1288, mar. 2018.

DARROUDI, M. et al. Green chemistry approach for the synthesis of ZnO nanopowders and their cytotoxic effects. **Ceramics International**, v. 40, n. 3, p. 4827–4831, 2014.

DARROUDI, M. et al. Sol-gel synthesis, characterization, and neurotoxicity effect of zinc oxide nanoparticles using gum tragacanth. **Ceramics International**, v. 39, n. 8, p. 9195–9199, 2013.

DAS, Dhaneswar et al. Synthesis of ZnO nanoparticles and evaluation of antioxidant and cytotoxic activity. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, p.556-560, nov. 2013.

DAYAKAR, T et al. Novel synthesis and structural analysis of zinc oxide nanoparticles for the non enzymatic glucose biosensor. **Materials Science And Engineering: C**, v. 75, p.1472-1479, jun. 2017.

DE PAULA, R. C. M.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, n. 3, p. 177–181, 1995.

DERENGOWSKI, Lorena da Silveira. **Caracterização da resposta de fungos patogênicos a diferentes condições de interação intra e interreinos**. 2011. 195 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, Df, 2011.

DEY, Milan Kumar; SATPATI, Ashis Kumar. Functionalised carbon nano spheres modified electrode for simultaneous determination of dopamine and uric acid. **Journal Of Electroanalytical Chemistry**, v. 787, p.95-102, fev. 2017.

DHIVYA, Raman et al. Enhancing the anti-gastric cancer activity of curcumin with biocompatible and pH sensitive PMMA-AA/ZnO nanoparticles. **Materials Science And Engineering: C**, v. 82, p.182-189, jan. 2018.

- DIMAPILIS, Emelita Asuncion S. et al. Zinc oxide nanoparticles for water disinfection. **Sustainable Environment Research**, v. 28, n. 2, p.47-56, mar. 2018.
- DIVYA, Mani et al. Biopolymer gelatin-coated zinc oxide nanoparticles showed high antibacterial, antibiofilm and anti-angiogenic activity. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, v. 178, p.211-218, jan. 2018.
- DIZAJ, S. M. et al. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 44, p. 278–284, 2014.
- DJURISIC, A. B.; LEUNG, Y. H. Optical properties of ZnO nanostructures. **Small**, v. 2, n. 8–9, p. 944–961, 2006.
- DOROFEEV, G. A., STRELETSKII, A. N., POVSTUGAR, I. V., PROTASOV, A. V., ELSUKOV, E. P. Determination of nanoparticle sizes by X-ray diffraction. *Colloid Journal*, v. 74, n. 6, p. 675 – 685, 2012.
- EATON, Peter et al. Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Ultramicroscopy**, v. 10, n. 108, p.1128-1134, abr. 2008.
- EIRAS, Carla et al. Nanocompósitos eletroativos de poli-o-metoxianilina e polissacarídeos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p.1158-1162, jul. 2007.
- ELAHI, Narges; KAMALI, Mehdi; BAGHERSAD, Mohammad Hadi. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. **Talanta**, p.1-35, fev. 2018.
- EUSTIS, S.; EL-SAYED, M. A.; KASHA, M. 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. **Chemical Society reviews**, v. 35, p. 209–217, 2006.
- FARDOOD, Saeid Taghavi et al. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using arabic gum and photocatalytic degradation of direct blue 129 dye under visible light. **Journal Of Materials Science: Materials In Electronics**, v. 28, n. 18, p.13596-13601, set. 2017.
- FARIAS, Emanuel Airton de Oliveira et al. Layer-by-Layer films based on biopolymers extracted from red seaweeds and polyaniline for applications in electrochemical sensors of chromium VI. **Materials Science And Engineering: B**, v. 200, p.9-21, out. 2015.
- FAZIO, E. et al. Molybdenum oxide nanoparticles for the sensitive and selective detection of dopamine. **Journal Of Electroanalytical Chemistry**, p.1-15, fev. 2018.
- FRITEA, Luminița et al. Graphene-based Biosensors for Dopamine Determination. **Procedia Technology**, v. 27, p.106-107, 2017.
- GASPAROTTO, Gisane et al. Electrochemical immunosensor based on ZnO nanorods-Au nanoparticles nanohybrids for ovarian cancer antigen CA-125 detection. **Materials Science And Engineering: C**, v. 76, p.1240-1247, jul. 2017.
- GEETHA, A. et al. Green Synthesis of Antibacterial Zinc Oxide Nanoparticles Using Biopolymer *Azadirachta indica* Gum. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 32, n. 2, p. 955–963, 28 abr. 2016.



- GHAYEMPOUR, Soraya; MONTAZER, Majid; RAD, Mahnaz Mahmoudi. Tragacanth gum biopolymer as reducing and stabilizing agent in biosynthesis of urchin-like ZnO nanorod arrays: A low cytotoxic photocatalyst with antibacterial and antifungal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p.232-241, jan. 2016.
- GLIŠIĆ, S. et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of carboxymethyl dextrane stabilized silver nanoparticles. **Journal of Molecular Structure**, v. 1084, p. 345–351, mar. 2015.
- GOSWAMI, S.; NAIK, S. Natural gums and its pharmaceutical application. **Journal of Scientific and Innovative Research JSIR**, v. 3, n. 31, p. 112–121, 2014.
- GUNALAN, Sangeetha; SIVARAJ, Rajeshwari; RAJENDRAN, Venckatesh. Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens. **Progress In Natural Science: Materials International**, v. 22, n. 6, p.693-700, dez. 2012.
- GUNALAN, Sangheeta; SIVARAJ, Rajeshwari; RAJEDRAN, Venckatesh. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles by *Aloe barbadensis* miller leaf extract: Structure and optical properties. **Materials Research Bulletin**, v. 46, n. 12, p.2560-2566, dez. 2011.
- GUPTA, A. P.; VERMA, D. K. Preparation and characterization of carboxymethyl guar gum nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 68, p. 247–250, 2014.
- HAMAD, Alshammari Fanar et al. The intertwine of nanotechnology with the food industry. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, v. 25, n. 1, p.27-30, jan. 2018.
- HASSAN, Hesham Fathy Hassan et al. Zinc oxide nanoparticles as a novel anticancer approach; in vitro and in vivo evidence. **Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology**, v. 44, p.235-243, out. 2016.
- JANAKI, A. Chinnammal; SAILATHA, E.; GUNASEKARAN, S.. Synthesis, characteristics and antimicrobial activity of ZnO nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 144, p.17-22, jun. 2015.
- JAYASEELAN, C. et al. Novel microbial route to synthesize ZnO nanoparticles using *Aeromonas hydrophila* and their activity against pathogenic bacteria and fungi. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 90, p.78-84, maio 2012.
- JOTHIPRAKASAM, Vinoth et al. *Candida tropicalis* biofilm inhibition by ZnO nanoparticles and EDTA. **Archives Of Oral Biology**, v. 73, p.21-24, jan. 2017.
- KASEMETS, Kaja et al. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Toxicology In Vitro**, v. 23, n. 6, p.1116-1122, set. 2009.
- KAWEEETEERAWAT, Chitrada et al. Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles in *Escherichia coli*: Correlates with Conduction Band and Hydration Energies. **Environmental Science And Technology**, p.1-8, dez. 2014.
- KHAN, Mohd Farhan et al. Sol-gel synthesis of thorn-like ZnO nanoparticles endorsing mechanical stirring effect and their antimicrobial activities: Potential role as nano-antibiotics. **Scientific Reports**, n. 6, p.1-12, jun. 2016.

KLAR, T. et al. Surface-Plasmon Resonances in Single Metallic Nanoparticles. **Physical Review Letters**, v. 80, n. 19, p. 4249–4252, 1998.

KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA, A.; JESIONOWSKI, T. Zinc oxide—from synthesis to application: A review. **Materials**, v. 7, n. 4, p. 2833–2881, 2014.

KULCHAT, Sirinan et al. A fluorescent sensor based on thioglycolic acid capped cadmium sulfide quantum dots for the determination of dopamine. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 196, p.7-15, maio 2018.

KUMAR, S. S. et al. Synthesis, characterization and optical properties of zinc oxide nanoparticles. **International Nano Letters**, v. 3, n. 1, p. 30, 2013.

LEMIRE, J. A.; HARRISON, J. J.; TURNER, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 371–384, 2013.

LI, Junli et al. Antifungal mechanisms of ZnO and Ag nanoparticles to *Sclerotinia homoeocarpa*. **Nanotechnology**, v. 28, n. 15, p.1-12, mar. 2017.

LIAO, H.; NEHL, C. L.; HAFNER, J. H. Biomedical applications of plasmon resonant metal nanoparticles. **Nanomedicine (London, England)**, v. 1, n. 2, p. 201–208, 2006.

LIMA, Handerson Rodrigues Silva et al. Electrochemical Sensors and Biosensors for the Analysis of Antineoplastic Drugs. **Biosensors And Bioelectronics**, p.1-33, fev. 2018.

LINIC, Suljo et al. Photochemical transformations on plasmonic metal nanoparticles. **Nature Materials**, v. 14, p.567-577, jun. 2015.

LIPOVSKY, Anat et al. Antifungal activity of ZnO nanoparticles—the role of ROS mediated cell injury. **Nanotechnology**, v. 22, p.1-5, fev. 2011.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Química Nova**, v. 29, n.6, p.1318-1325, 2006.

LUO, Xiliang et al. Application of Nanoparticles in Electrochemical Sensors and Biosensors. **Electroanalysis**, v. 18, n. 4, p.319-326, fev. 2006.

LUPETTI, Karina Omuro; RAMOS, Luiz Antônio; FATIBELLO-FILHO, Orlando. Determinação enzimática de dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistema de análise por injeção em fluxo do extrato bruto de abacate (*Persea americana*). **Química Nova**, v. 26, n. 2, p.197-201, jan. 2003.

MADHUMITHA, G.; ELANGO, G.; ROOPAN, S. M. Biotechnological aspects of ZnO nanoparticles: overview on synthesis and its applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 2, p. 571–581, 2016.

MADURAIVEERAN, Govindhan; SASIDHARAN, Manickam; GANESAN, Vellaichamy. Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications. **Biosensors And Bioelectronics**, v. 103, p.113-129, abr. 2018.

MARANI, Mariela Mirta et al. Characterization and Biological Activities of Ocellatin Peptides from the Skin Secretion of the Frog *Leptodactylus pustulatus*. **Journal Of Natural Products**, v. 78, n. 7, p.1495-1504, jun. 2015.

MARQUES, M. R.; ALBUQUERQUE, L. M. B.; XAVIER-FILHO, J. Antimicrobial and insecticidal activities of cashew tree gum exudate. **Annals of Applied Biology**, v. 121, n. 2, p. 371–377, 1992.

MATINISE, N. et al. ZnO nanoparticles via *Moringa oleifera* green synthesis: Physical properties & mechanism of formation. **Applied Surface Science**, v. 406, p.339-347, jun. 2017.

MATTOSO, L. H. C. Polianilinas: Síntese, Estrutura e Propriedades. **Química nova**, v. 19, n. 4, p. 388-398, 1996.

MENEZES, Matheus Manoel Teles de. **Desenvolvimento de sensores voltamétricos e piezoelétricos modificados quimicamente com curcubitúricas para análise de cocaína em amostras de interesse forense**. 2014. 128 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

MIJATOVIC, D.; EIJKEL, J. C. T.; VAN DEN BERG, A. Technologies for nanofluidic systems: top-down vs. bottom-up—a review. **Lab on a Chip**, v. 5, n. 5, p. 492, 2005.

MINKAL, Munish Ahuja; BHATT, D.C.. Carboxymethyl gum katira: synthesis, characterization and evaluation for nanoparticulate drug delivery. **Rsc Advances**, v. 5, n. 100, p.82363-82373, set. 2015.

MOHSENI, Naimeh; BAHRAM, Morteza. Highly selective and sensitive determination of dopamine in biological samples via tuning the particle size of label-free gold nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 193, p.451-457, mar. 2018.

MOLAAKBARI, Elahe; MOSTAFAVI, Ali; BEITOLLAHI, Hadi. Simultaneous electrochemical determination of dopamine, melatonin, methionine and caffeine. **Sensors And Actuators B: Chemical**, v. 208, p.195-203, mar. 2015.

MOREIRA, B. R. et al. A bioactive film based on cashew gum polysaccharide for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 69–76, 2015.

MOTHÉ, C. G.; DE SOUZA, I. A.; CALAZANS, G. M. T. Antitumor activity of cashew gum from *Anacardium occidentale* L. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v. 19, n. 6, p. 50–52, 2008.

MUÑOZ, Marly Monteiro. **Síntese e caracterização das propriedades estruturais e morfológicas de nanopartículas de ZnO**. 2013. 129 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Física, Universidade de Brasília, Brasília, Df, 2013.

NAGAJYOTHI, P. C. et al. Green route biosynthesis: Characterization and catalytic activity of ZnO nanoparticles. **Materials Letters**, v. 108, p. 160–163, 2013.

NEVES, Gilda et al. Agentes dopaminérgicos e o tratamento da disfunção erétil. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p.949-957, ago. 2004.

NOROUZI, Parviz et al. Carcinoembryonic Antigen Admittance Biosensor Based on Au and ZnO Nanoparticles Using FFT Admittance Voltammetry. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 5, p.1564-1570, fev. 2011.

NUNES, MARCÍLIO, LARISSA, **Sensores e transdutores**. Escola politécnica – Universidade de São Paulo. Aula em PowerPoint. Disponível em:

<<http://manualzz.com/doc/21077699/sensores-e-transdutores-profs.-nunes---marc%C3%ADlio---larissa...>>. Último acesso em: 28/02/2018.

OKUNO, Erika et al. *Candida parapsilosis* isolates from burn wounds can penetrate an acellular dermal matrix. **Microbial Pathogenesis**, v. 118, p.330-335, maio 2018.

OLIVEIRA, Erick F. de; PAULA, Haroldo C. B.; PAULA, Regina C. M. de. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p.146-151, jan. 2014.

PADIL, Vinod Vellora Thekkae; ČERNÍK, Miroslav. Green synthesis of copper oxide nanoparticles using gum karaya as a biotemplate and their antibacterial application. **International Journal Of Nanomedicine**, v. 8, n. 1, p.889-898, jan. 2013.

PADMAVATHY, Nagarajan; VIJAYARAGHAVAN, Rajagopalan. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. **Science And Technology Of Advanced Materials**, v. 9, n. 3, p.1-7, set. 2008.

PANDURANGAN, Muthuraman; ENKHTAIVAN, Gansukh; KIM, Doo Hwan. Anticancer studies of synthesized ZnO nanoparticles against human cervical carcinoma cells. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, v. 158, p.206-211, maio 2016.

PATI, Rashmirekha et al. Topical application of zinc oxide nanoparticles reduces bacterial skin infection in mice and exhibits antibacterial activity by inducing oxidative stress response and cell membrane disintegration in macrophages. **Nanomedicine**, v. 10, n. 6, p.1195-1208, ago. 2014.

PFALLER, Michael et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 74, n. 4, p.323-331, dez. 2012.

PINTO, Michelle Ayres de Campos. **Estudo da utilização de filmes automontados de polianilina e nanotubos de carbono em sensores para detecção de fenóis**. 2016. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências de Materiais, Universidade Estadual Paulista, Sorocaba, 2016.

PITOMBEIRA, N. A. O. et al. Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum: Characterization and evaluation as potential drug carrier. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 610–615, 2015.

PRAJAPATI, V. D. et al. Pharmaceutical applications of various natural gums, mucilages and their modified forms. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1685–1699, 2013.

PREMANATHAN, M. et al. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 7, n. 2, p. 184–192, 2011.

PREMANATHAN, M. et al. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation.

QUELEMES, P. V. et al. Development and antibacterial activity of cashew gum-based silver nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 4969–4981, 2013.

QUELEMES, P. V. et al. Quaternized cashew gum: An anti-staphylococcal and biocompatible cationic polymer for biotechnological applications. **Carbohydrate Polymers**,

v. 157, p. 567–575, 2017.

RAGHUPATHI, Krishna R; KOODALI, Ranjit T; MANNA, Adhar C. Size-Dependent Bacterial Growth Inhibition and Mechanism of Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles. **Langmuir**, v. 27, n. 7, p.4020-4028, abr. 2011.

RAGUVARAN, R. et al. Sodium alginate and gum acacia hydrogels of zinc oxide nanoparticles reduce hemolytic and oxidative stress inflicted by zinc oxide nanoparticles on mammalian cells. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 101, p.967-972, ago. 2017.

RAJABI, Amir Hossein; JAFFE, Michael; ARINZEH, Treena Livingston. Piezoelectric materials for tissue regeneration: A review. **Acta Biomaterialia**, v. 24, p.12-23, set. 2015.

RANA, Vikas et al. Modified gums: Approaches and applications in drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 3, p.1031-1047, jan. 2011.

RAO, C. N. R. et al. Metal nanoparticles and their assemblies. **Chemical Society Reviews**, v. 29, n. 1, p. 27–35, 2000.

RAOUFI, D. Synthesis and microstructural properties of ZnO nanoparticles prepared by precipitation method. **Renewable Energy**, v. 50, p. 932–937, 2013.

RASMUSSEN, John W et al. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. **Expert Opinion On Drug Delivery**, v. 9, n. 7, p.1063-1077, ago. 2010.

REDDY, Y. Veera Manohara et al. Determination of dopamine in presence of ascorbic acid and uric acid using poly (Spands Reagent) modified carbon paste electrode. **Materials Science And Engineering: C**, v. 57, p.378-386, dez. 2015.

RIBEIRO, A. J. et al. Gums' based delivery systems: Review on cashew gum and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, p. 188–200, 2016.

RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M. DE; COSTA, S. M. O. Métodos de Isolamento de Gomas Naturais : Comparação Através da Goma do Cajueiro (*Anacardium occidentale* L ). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 16, p. 31–36, 1993.

ROMANI, Luigina. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews: Immunology**, v. 4, p.1-13, jan. 2004.

SAHA, Raunak et al. Influence of the various synthesis methods on the ZnO nanoparticles property made using the bark extract of *Terminalia arjuna*. **Materials Chemistry And Physics**, p.1-27, fev. 2018.

SAMAT, Nurul Ain; NOR, Roslan Md. Sol–gel synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Citrus aurantifolia* extracts. **Ceramics International**, v. 39, p.545-548, maio 2013.

SANCHEZ, F.; SOBOLEV, K. Nanotechnology in concrete - A review. **Construction and Building Materials**, v. 24, n. 11, p. 2060–2071, 2010.

SANTOS, D. S., FERREIRA, N. S. Caracterização por DRX de ZnO nanocristalino sintetizado através do processo sol-gel proteico. VI Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica, 2011.

SANTOS, Teresa A.P. Rocha. Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles. **Trends In Analytical Chemistry**, v. 62, p.28-36, nov. 2014.

SARDAR, D. et al. Multiple functionalities of Ni nanoparticles embedded in carboxymethyl guar gum polymer: catalytic activity and superparamagnetism. **Applied Surface Science**, v. 405, p. 231–239, 2017.

SARDELLA, Davide; GATT, Ruben; VALDRAMIDIS, Vasilis P. Physiological effects and mode of action of ZnO nanoparticles against postharvest fungal contaminants. **Food Research International**, v. 101, p.274-279, nov. 2017.

SARWAR, Shamila et al. The antimicrobial activity of ZnO nanoparticles against *Vibrio cholerae*: Variation in response depends on biotype. **Nanomedicine**, v. 12, n. 6, p.1499-1509, ago. 2016.

SAWAI, J. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. **Journal Of Microbiological Methods**, v. 54, n. 2, p.177-182, ago. 2003.

SHAH, Jyoti; KOTNALA, Ravinder Kumar. Rapid green synthesis of ZnO nanoparticles using a hydroelectric cell without an electrolyte. **Journal Of Physics And Chemistry Of Solids**, v. 108, p.15-20, set. 2017.

SHARMA, Deepali et al. Green synthesis, characterization and electrochemical sensing of silymarin by ZnO nanoparticles: Experimental and DFT studies. **Journal Of Electroanalytical Chemistry**, v. 808, p.160-172, jan. 2018.

SHARMA, Deepali et al. Synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antibacterial and antifungal properties. **Thin Solid Films**, v. 519, n. 3, p.1224-1229, nov. 2010.

SHARMA, Ravi Kant; GHOSE, Ranjana. Synthesis of zinc oxide nanoparticles by homogeneous precipitation method and its application in antifungal activity against *Candida albicans*. **Ceramics International**, v. 41, n. 1, p.967-975, jan. 2015.

SHEN, Cenchao et al. Relating Cytotoxicity, Zinc Ions, and Reactive Oxygen in ZnO Nanoparticle–Exposed Human Immune Cells. **Toxicological Sciences**, v. 136, n. 1, p.120-130, ago. 2013.

SHERRINGTON, Sarah L. et al. Adaptation of *Candida albicans* to environmental pH induces cell wall remodelling and enhances innate immune recognition. **Plos Pathogens**, p.1-28, maio 2017.

SHI, Hong-yan et al. Synthesis of zinc oxide nanoparticles with strong, tunable and stable visible light emission by solid-state transformation of Zn(ii)–organic coordination polymers. **Journal Of Materials Chemistry**, v. 21, n. 33, p.12309-12315, maio 2011.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G.; CORDEIRO, R. A. Biologia dos fungos. In: SIDRIM, José Júlio Costa; ROCHA, Marcos Fábio Gadelha. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 5. p. 41-49.

SILVA, D. A. et al. Carboxymethylation of cashew tree exudate polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, n. 2, p. 163–171, 2004.

SILVA, D. A. et al. Polysaccharide-based nanoparticles formation by polyelectrolyte complexation of carboxymethylated cashew gum and chitosan. **Journal of Materials Science**, v. 45, n. 20, p. 5605–5610, 2010.

SILVA, Marlon Nunes da. **Formação e crescimento de óxido de zinco e óxido de zinco dopado com cobre**. 2015. 147 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.

SILVA-BAILÃO, Mirelle Garcia et al. Mechanisms of copper and zinc homeostasis in pathogenic black fungi. **Fungal Biology**, p.1-12, dez. 2017.

SILVÉRIO, Lizandra Carol Barbosa Shimizu. **Desenvolvimento de um eletrodo de pasta de carbono modificado por prata eletrodepositada in situ e determinação eletroanalítica de dopamina**. 2015. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2015.

SINGHAL, Chaitali; PUNDIR, C. S.; NARANGA, Jagriti. A genosensor for detection of consensus DNA sequence of Dengue virus using ZnO/Pt-Pd nanocomposites. **Biosensors And Bioelectronics**, v. 97, p.75-82, nov. 2017.

SIRELKHATIM, Amna et al. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. **Nano-micro Letters**, v. 7, n. 3, p.219-242, abr. 2015.

SORIANO, María Laura et al. Analytical Nanoscience and Nanotechnology: Where we are and where we are heading. **Talanta**, v. 177, p.104-121, set. 2017.

STOIMENOV, Peter K. et al. Metal Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents. **Langmuir**, v. 18, p.6679-6686, abr. 2002.

SULOCHANA, M. et al. Synthesis and Characterization of Gum Acacia-Stabilized Zinc Oxide Nanoparticles: A Green Approach and Microbial Activity. **American Journal Of Materials Science**, v. 5, n. 3, p.169-177, jan. 2013.

TALAM, Satyanarayana; KARUMURI, Srinivasa Rao; GUNNAM, Nagarjuna. Synthesis, Characterization, and Spectroscopic Properties of ZnO Nanoparticles. **International Scholarly Research Notices: Nanotechnology**, v. 2012, p.1-6, mar. 2012.

TAMILVANAN, A. et al. Copper Nanoparticles: Synthetic Strategies, Properties and Multifunctional Application. **International Journal of Nanoscience**, v. 13, n. 2, p. 1430001, 2014.

TORQUATO, D. S. et al. Evaluation of antimicrobial activity of cashew tree gum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 505–507, 2004.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 967 p.

UMAR, Ahmad et al. Ultra-sensitive cholesterol biosensor based on low-temperature grown ZnO nanoparticles. **Electrochemistry Communications**, v. 11, n. 1, p.118-121, jan. 2009.

VARAPRASAD, Kokkarachedu et al. Nano zinc oxide–sodium alginate antibacterial cellulose fibres. **Carbohydrate Polymers**, v. 135, p.349-355, jan. 2016.

VIRKUTYTE, J.; VARMA, R. S. Green synthesis of metal nanoparticles: Biodegradable polymers and enzymes in stabilization and surface functionalization. **Chem. Sci.**, v. 2, n. 5, p. 837–846, 2011.

- WAHAB, Rizwan et al. Functionalization of anti- Brucella antibody on ZnO-NPs and their deposition on aluminum sheet towards developing a sensor for the detection of Brucella. **Vacuum**, v. 146, p.592-598, dez. 2017.
- WANG, Fang; HU, Shengshui. Electrochemical sensors based on metal and semiconductor nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 165, n. 1-2, p.1-22, jan. 2009.
- WANG, L.; MUHAMMED, M. Synthesis of zinc oxide nanoparticles with controlled morphology. **Journal of Materials Chemistry**, v. 9, n. 11, p. 2871–2878, 1999.
- WANG, Zhong Lin. Zinc oxide nanostructures: growth, properties and applications. **Journal Of Physics: Condensed Matter**, v. 16, n. 25, p.829-858, jun. 2004.
- WOLFSON, J.R. **Social and ethical issues in nanotechnology: lessons from biotechnology and other high technologies**. *Biotechnol. Law Rep*, v. 22, n. 4, p. 376-396, 2003.
- XIE, Yanping et al. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Zinc Oxide Nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 77, n. 7, p.2325-2331, abr. 2011.
- XU, Yuanhong; WANG, Erkang. Electrochemical biosensors based on magnetic micro/nano particles. **Electrochimica Acta**, v. 84, p.62-73, dez. 2012.
- YOUSEF, Jehad M.; DANIAL, Enas N.. In Vitro Antibacterial Activity and Minimum Inhibitory Concentration of Zinc Oxide and Nano-particle Zinc oxide Against Pathogenic Strains. **International Journal Of Health Science**, v. 2, n. 4, p.38-42, ago. 2012.
- ZARE, Mina et al. Surfactant assisted solvothermal synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antimicrobial and antioxidant properties. **Journal Of Materials Science & Technology**, v. 33, n. 9, p.1-23, set. 2017.
- ZARE, Yasser; SHABANI, Iman. Polymer/metal nanocomposites for biomedical applications. **Materials Science And Engineering: C**, v. 60, p.195-203, mar. 2016.
- ZHANG, Lingling et al. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). **Journal Of Nanoparticle Research**, v. 9, n. 3, p.479-489, jun. 2007.
- ZHANG, R., FEI, C., LI, B., FU, H., TIAN, J., CAO, G. Continuous size tuning of monodispersed zno nanoparticles and its size effect on the performance of perovskite solar cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, v. 9, p. 9785–9794, 2017.
- ZHENG, Kai; BOCCACCINI, Aldo R.. Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: A review. **Advances In Colloid And Interface Science**, v. 249, p.363-373, nov. 2017.
- ZHOU, Xi et al. A sensing approach for dopamine determination by boronic acid-functionalized molecularly imprinted graphene quantum dots composite. **Applied Surface Science**, v. 423, p.810-816, nov. 2017.