



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

KESSIA DA COSTA SILVA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
ESTABILIZADAS COM GOMA DO CAJUEIRO: ATIVIDADE CATALÍTICA,
ANTIBACTERIANA E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE**

PARNAÍBA-PI

2019

KESSIA DA COSTA SILVA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
ESTABILIZADAS COM GOMA DO CAJUEIRO: ATIVIDADE CATALÍTICA,
ANTIBACTERIANA E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE**

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: Química e Bioquímica aplicada à Biotecnologia

Orientador: Durcilene Alves da Silva

PARNAÍBA-PI

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

S586s Silva, Kessia da Costa.
Síntese e caracterização de nanopartículas de prata estabilizadas com goma do cajueiro: atividade catalítica, antibacteriana e avaliação da toxicidade [manuscrito] / Kessia da Costa Silva. – 2019.
61 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, 2019.
Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Durcilene Alves da Silva.

1. Biotecnologia. 2. Polissacarídeos. 3. Nanopartículas. 4. Catálise. 5. Goma do Cajueiro. I. Título.

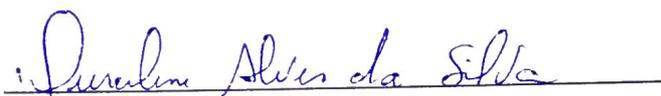
CDD: 660.6

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
ESTABILIZADAS COM GOMA DO CAJUEIRO: ATIVIDADE CATALÍTICA,
ANTIBACTERIANA E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE**

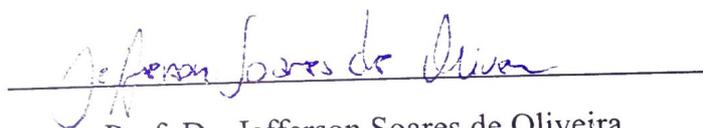
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: 26 / 04 / 2019

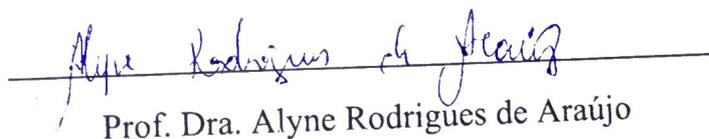
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Durcilene Alves da Silva
Universidade Federal do Piauí (Orientadora)



Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira
Universidade Federal do Piauí (Membro Interno)



Prof. Dra. Alyne Rodrigues de Araújo
Universidade Federal do Piauí (Membro Externo)

*Dedico este trabalho à minha família:
Minha mãe Cleres, meu pai Sebastião,
meu marido Itamar e ao meu filho Erick.
Obrigada por todo carinho, dedicação e amor.*

Agradecimentos

À Deus, por todas as bênçãos recebidas.

Ao Programa de pós-graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) e à Universidade Federal do Piauí (UFPI) pelo apoio e subsídio estrutural durante os dois anos de curso. Agradeço a Capes/CNPq pelo auxílio financeiro concedido.

À minha orientadora Durcilene Alves da Silva por ter me auxiliado durante o mestrado.

À minha família, que sempre esteve ao meu lado, especialmente meu esposo, Itamar, sem sua imensa contribuição este trabalho não seria o mesmo.

À minha querida amiga Flaviane de França Dourado, por todo o apoio durante esses dois anos, sempre me auxiliando no laboratório, sendo minha parceira nas disciplinas, me ajudando no que fosse necessário.

À todos os meus amigos do BIOTEC, em especial à Taiane, Fábio Ribeiro, Alyne Rodrigues, Thaís Araújo, Joilson Ramos e Raí Emanuel pela contribuição com os experimentos.

Ao Jhonny da Universidade de Brasília por me auxiliar com experimentos que não poderiam ser feitos aqui.

À todos os professores que eu tive durante essa jornada por terem contribuído com meu progresso pessoal.

À querida Márcia Valéria Silva Lima, que foi minha professora na graduação e continuou me auxiliando durante o mestrado.

E a todos aqueles que estiveram envolvidos, direta ou indiretamente, neste trabalho, muito obrigada!

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.

Simone de Beauvoir

Resumo

Em todo o planeta, grandes quantidades de efluentes são descartadas diariamente em águas naturais. Dentre os principais resíduos gerados destacam-se os corantes, compostos tóxicos e de difícil degradação, que podem ocasionar graves problemas a fauna e a flora devido à natureza mutagênica de seus constituintes. Nanopartículas estabilizadas com produtos naturais e seus derivados, apresentam-se como uma alternativa no tratamento desses efluentes devido às suas propriedades físicas e químicas, podendo atuar como material de suporte na transformação de vários poluentes. Neste trabalho foram sintetizadas nanopartículas de prata (AgNPs) estabilizadas com os polissacarídeos goma do cajueiro (GC-AgNPs), goma do cajueiro acetilada (GCA-AgNPs) e goma do cajueiro carboximetilada (GCC-AgNPs), para a utilização como catalisadores do borohidreto de sódio ($NaBH_4$) na reação de redução do vermelho congo, um corante tóxico e carcinogênico, amplamente utilizado em diferentes indústrias. As AgNPs foram caracterizadas através de espectroscopia de uv-visível, espalhamento dinâmico da luz, potencial zeta, espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier, microscopia de força atômica e análise de rastreamento de nanopartículas, os dados indicaram o sucesso da síntese e foi possível verificar quais parâmetros eram determinantes para o tamanho e estabilidade das AgNPs. As nanopartículas mostraram-se eficientes catalisadores na degradação do vermelho congo, diminuindo consideravelmente o tempo de reação para apenas 25 minutos. Avaliou-se também o potencial antimicrobiano das partículas, indicando que GCA-AgNPs e GCC-AgNPs apresentaram efeito bacteriostático contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* MRSA 43300 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Ao analisar a toxicidade das substâncias utilizadas neste trabalho através do modelo *Galleria mellonella*, GC-AgNPs e GCC-AgNPs apresentaram uma porcentagem de sobrevivência de 93,7% da população de larvas testadas e GCA-AgNPs apresentou 81,2%, não sendo consideradas tóxicas. Já o vermelho congo mostrou-se tóxico, induzindo a morte de 62,5% das larvas testadas, enquanto o resíduo proveniente da sua degradação induziu a morte de apenas 6,7% da população, indicando uma diminuição da toxicidade do sistema após a reação de redução catalisada pelas AgNPs.

Palavras-chave: Polissacarídeos, nanopartículas, corantes, catálise

Abstract

Across the globe, large amounts of effluent are disposed off daily in natural waters. Among the main residues generated are dyes, toxic compounds with difficult degradation, which can cause serious problems to fauna and flora due to the mutagenic nature of their constituents. Nanoparticles stabilized with natural products and their derivatives, are an alternative in the treatment of these effluents due to their physical and chemical properties, and can act as support material in the transformation of several pollutants. In this work, silver nanoparticles (AgNPs) stabilized with the polysaccharides cashew gum (GC-AgNPs), acetylated cashew gum (GCA-AgNPs) and carboxymethylated cashew gum (GCC-AgNPs) were synthesized for use as catalysts of the Sodium borohydride ($NaBH_4$) the reduction reaction of Congo red, a toxic and carcinogenic dye, widely used in different industries. The AgNPs were characterized by uv-visible spectroscopy, dynamic scattering of light, zeta potential, Fourier transform infrared spectroscopy, atomic force microscopy and nanoparticle tracking analysis. The data indicated the success of the synthesis and it was possible to verify which parameters were determinant for the size and stability of the AgNPs. The nanoparticles showed efficient catalysts in the degradation of the Congo red, considerably reducing the reaction time to only 25 minutes. The antimicrobial potential of the particles was also evaluated, indicating that GCA-AgNPs and GCC-AgNPs presented bacteriostatic effect against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* MRSA 43300 and *Escherichia coli* ATCC 25922. In analyzing the toxicity of the substances used in this work through the *Galleria mellonella* model, GC-AgNPs and GCC-AgNPs showed a percentage survival of 93.7 % of the population of larvae tested and GCA-AgNPs presented 81.2 %, not being considered toxic. Congo red was toxic, inducing the death of 62.5 % of the larvae tested, while the residue from its degradation induced the death of only 6.7 % of the population, indicating a decrease in the toxicity of the system after the reduction reaction catalyzed by AgNPs.

Key-Words: Polysaccharides, nanoparticles, dyes, catalysis

Lista de ilustrações

Figura 1 – Estrutura química de um corante	16
Figura 2 – Soluções do corante vermelho congo em pH=2 (azul) e pH=10 (vermelho)	20
Figura 3 – Estrutura química do corante Vermelho Congo	21
Figura 4 – Unidades de monossacarídeos presentes na composição da Goma do Cajueiro.	24
Figura 5 – Estrutura da goma de cajueiro. GAL (galactose); GLI (glicose); ÁC. GLIC (ácido glicurônico). R representa: D-manose, D-xilose, L-ramnose ou L-arabinose. R” representa: D-glicose ou ácido D-glicurônico. (Fonte: Quelemes et al, 2013)	25
Figura 6 – Fragmento da estrutura da goma do cajueiro modificada pelo processo de Carboximetilação e pelo processo de Acetilação.	26
Figura 7 – Espectro de UV-Visível das nanopartículas GC-AgNPs, GCA-AgNPs e GCC-AgNPs, os números indicam a concentração de borohidreto utilizada em cada síntese (1)= 0,001 M, (2)= 0,01M, (3)= 0,1 M e (4)= 1 M.	37
Figura 8 – Soluções de nanopartículas de prata sintetizadas, a leve diferença entre a tonalidade das amostras se deve às diferentes concentrações de $NaBH_4$ (descritas nos frascos) que foram utilizadas durante o processo de síntese.	38
Figura 9 – Imagens obtidas através de microscopia de força atômica para CG-AgNPs (A); GCC-AgNPs (B); GCA-AgNPs (C), e Média de tamanho das nanopartículas (D). Para obter a média de tamanho foi aplicado o teste ANOVA e os resultados expressos como média \pm desvio padrão. As imagens se encontram com barras de escala de 9 μ m e com resolução de 512 pixels.	40
Figura 10 – Análise do tamanho de partícula por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) para (A) GC-AgNPs, (B) GCA-AgNPs e (C) GCC-AgNPs todas com $[NaBH_4]= 1M$	41
Figura 11 – Espectros obtidos por FT-IR para a Goma do cajueiro (GC) e para a Nanopartícula de Prata estabilizada com Goma do cajueiro (GC-AgNP).	42
Figura 12 – Espectros obtidos por FT-IR para a Goma do cajueiro Acetilada (GCA) e para a Nanopartícula de Prata estabilizada com Goma do Cajueiro Acetilada (GCA-AgNP).	43
Figura 13 – Espectros obtidos por FT-IR para a Goma do cajueiro Carboximetilada (GCC) e para a Nanopartícula de Prata estabilizada com Goma do Cajueiro Carboximetilada (GCC-AgNP).	43

Figura 14 – (A) Teste de degradação do corante vermelho congo em solução aquosa com $NaBH_4$ registrada a cada 2 horas de reação (B) $\ln (A_t/A_0)$ versus tempo de reação para o teste de degradação do corante	44
Figura 15 – Soluções do corante vermelho congo antes (A) e após 12 horas de reação com o $NaBH_4$ (B).	44
Figura 16 – (A) Teste de degradação do corante vermelho congo em solução aquosa utilizando as GC-AgNPs como catalisador do $NaBH_4$, registrada a cada 5 min de reação. (B) $\ln (A_t/A_0)$ versus tempo de reação para o teste de degradação do corante	45
Figura 17 – (A) Teste de degradação do corante vermelho congo em solução aquosa utilizando as GCA-AgNPs como catalisador do $NaBH_4$, registrada a cada 5 min de reação. (B) $\ln (A_t/A_0)$ versus tempo de reação para o teste de degradação do corante	45
Figura 18 – (A) Teste de degradação do corante vermelho congo em solução aquosa utilizando as GCC-AgNPs como catalisador do $NaBH_4$, registrada a cada 5 min de reação. (B) $\ln (A_t/A_0)$ versus tempo de reação para o teste de degradação do corante	46
Figura 19 – Soluções do corante vermelho congo antes (Vermelho) e após o teste de descoloração utilizando as nanopartículas GC-AgNPs como catalisador do $NaBH_4$ (Incolor).	46
Figura 20 – (A) Curva de sobrevivência de <i>Galleria mellonella</i> inoculadas com diferentes formulações após 7 dias de teste. (B) Número total de hemócitos de <i>G mellonella</i> tratado com diferentes formulações após 24 horas de teste. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre grupos. Ensaio realizado em triplicata biológica e utilizando ANOVA one way e teste de tukey para comparações múltiplas ($p < 0.05$). (Controle = PBS; Corante = Vermelho congo).	49
Figura 21 – Grupo de larvas <i>Galleria mellonella</i> utilizadas para o teste de toxicidade <i>in vivo</i> inoculadas com solução salina (PBS) como controle da reação.	59
Figura 22 – Grupo de larvas <i>Galleria mellonella</i> utilizadas para o teste de toxicidade <i>in vivo</i> inoculadas com GC-AgNPs.	59
Figura 23 – Grupo de larvas <i>Galleria mellonella</i> utilizadas para o teste de toxicidade <i>in vivo</i> inoculadas com GCA-AgNPs.	60
Figura 24 – Grupo de larvas <i>Galleria mellonella</i> utilizadas para o teste de toxicidade <i>in vivo</i> inoculadas com GCC-AgNPs.	60
Figura 25 – Grupo de larvas <i>Galleria mellonella</i> utilizadas para o teste de toxicidade <i>in vivo</i> inoculadas com a solução do corante vermelho congo.	61

Figura 26 – Grupo de larvas *Galleria mellonella* utilizadas para o teste de toxicidade *in vivo* inoculadas com a solução resultante da degradação do vermelho congo utilizando as AgNPs como catalisador. 61

Lista de símbolos

AFM	(<i>Atomic Force Microscopy</i>) - Microscopia de força atômica
AgNPs	Nanopartículas de prata
FTIR	(<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>) - Espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier
GC	Goma do cajueiro
GCA	Goma do cajueiro acetilada
GCC	Goma do cajueiro carboximetilada
GC-AgNPs	Nanopartículas de prata estabilizadas com goma do cajueiro
GCA-AgNPs	Nanopartículas de prata estabilizadas com goma do cajueiro acetilada
GCC-AgNPs	Nanopartículas de prata estabilizadas com goma do cajueiro carboximetilada
MBC	(<i>Minimum Bactericidal Concentration</i>) - Concentração bactericida mínima
MIC	(<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>) - Concentração inibitória mínima
NTA	(<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>) - Análise de Rastreamento de Nanopartículas
NPs	Nanopartículas
VC	Vermelho Congo

Sumário

1	INTRODUÇÃO	13
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1	A Química e o meio ambiente	15
2.2	Corantes	16
2.2.1	Corantes têxteis	17
2.2.2	Azocorantes	19
2.2.3	O Vermelho Congo	20
2.3	Nanopartículas (NPs)	21
2.3.1	Síntese e estabilização de Nanopartículas	22
2.4	Goma do Cajueiro	23
2.5	Atividade catalítica	26
2.6	Atividade antimicrobiana	27
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo Geral	28
3.2	Objetivos Específicos	28
4	MÉTODOS	29
4.1	Exsudato do Cajueiro	29
4.2	Isolamento da Goma	29
4.3	Carboximetilação da goma do cajueiro	29
4.4	Acetilação da goma do cajueiro	29
4.5	Preparo de Soluções	30
4.6	Síntese de AgNPs	30
4.7	Caracterização de AgNPs	31
4.7.1	Espectroscopia de UV-Visível	31
4.7.2	Potencial Zeta e Espalhamento Dinâmico da Luz	31
4.7.3	Microscopia de Força Atômica	31
4.7.4	Análise de Rastreamento de Nanopartículas	32
4.7.5	Espectroscopia na Região do Infravermelho	32
4.8	Avaliação da Atividade Catalítica das Nanopartículas	33
4.9	Atividade Antimicrobiana das AgNPs	33
4.9.1	Análise de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima	34
4.10	Avaliação da toxicidade do sistema	34

4.10.1	Toxicidade em larvas de <i>Galleria mellonella</i>	34
4.10.2	Contagem de hemócitos totais	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Síntese de AgNPs	36
5.2	Caracterização de AgNPs	36
5.2.1	Espectroscopia de Uv-Visível	36
5.2.2	Potencial Zeta e Espalhamento Dinâmico da Luz	38
5.2.3	Microscopia de Força Atômica	39
5.2.4	Análise por rastreamento de nanopartículas	40
5.2.5	Espectroscopia na Região do Infravermelho	42
5.3	Avaliação da Atividade Catalítica das Nanopartículas	44
5.4	Atividade Antimicrobiana das AgNPs	47
5.5	Ensaio de Toxicidade	48
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	51
	REFERÊNCIAS	52
A	APÊNDICE-A	59

1 INTRODUÇÃO

Os corantes são substâncias amplamente utilizadas pelo homem no decorrer da história. Existem relatos do uso de corantes em períodos superiores a 30 mil anos, geralmente associadas a pinturas rupestres.

Com o passar dos anos, diversas civilizações desenvolveram as mais variadas aplicações para corantes. Chineses e Egípcios começaram a utilizá-los como maquiagem, decoração de templos, palácios e tumbas. Os Greco-romanos e Bizantinos se tornaram grandes extratores de corantes e desenvolveram técnicas de tingimento de tecidos (MELLO; SUAREZ, 2012).

Até o século XIX, todos os corantes utilizados eram de origem natural, derivados de moluscos, insetos, vegetais e outros tipos de matéria orgânica. A gama de cores era bastante limitada, assim como a utilidade dos corantes e a disponibilidade comercial das fontes de suprimento, fato que encorajou a busca por corantes com propriedades superiores – os corantes sintéticos. O primeiro corante sintético foi descoberto em 1856 pelo químico inglês William H. Perkin, revolucionando a formulação e fabricação de corantes, permitindo sintetizá-los em escala industrial, com diferentes fórmulas e tonalidades (BAFANA; DEVI; CHAKRABARTI, 2011).

Atualmente, a maioria dos corantes e pigmentos comerciais disponíveis são substâncias sintéticas amplamente utilizadas em diversos setores, como por exemplo, nas indústrias de plásticos, têxtil, gráfica, de fotografia, farmacêutica, alimentícia, de cosméticos, entre outras (BAFANA; DEVI; CHAKRABARTI, 2011).

Apesar de sua importância econômica nos mais variados ramos da indústria, algumas dessas substâncias representam grande perigo ao meio ambiente por serem tóxicas e de difícil degradação. O descarte de efluentes contendo corantes sem tratamento adequado nos ambientes aquáticos pode levar rapidamente ao esgotamento do oxigênio dissolvido, tendo como consequência o desequilíbrio de ecossistemas. Além disso, estes compostos são suscetíveis à acumulação em plantas e outros organismos vivos e impedem a penetração da luz solar nas camadas mais profundas, alterando a atividade fotossintética do meio, resultando em deterioração da qualidade dessa água, diminuição da solubilidade de oxigênio, ocasionando por consequência, efeitos tóxicos sobre a fauna e flora aquática (LALNUNHLIMI; KRISHNASWAMY, 2016; ARAVIND et al., 2016).

A fiscalização e monitoramento ineficientes destes resíduos pelos órgãos competentes, em conjunto a uma legislação ainda incompleta e com pouco debate público são silenciosos fatores de risco para o ambiente. Algumas empresas investem somente o básico no tratamento de seus resíduos (apenas o suficiente para escapar das multas), sem se preo-

cupar com os impactos sociais e ambientais (ABREU et al., 2008). Entretanto, em virtude do maior acesso a informação, a sociedade tem se tornado mais consciente e preocupada com a preservação dos recursos naturais, e com isso as leis ambientais estão cada vez mais rígidas demandando métodos ambientalmente adequados e economicamente viáveis para o tratamento de efluentes contendo corantes.

Dentre as técnicas utilizadas para o tratamento e remoção de corantes, a redução catalítica tem se mostrado promissora, pois nesse método as moléculas são transformadas em produtos menos tóxicos para o meio ambiente, além de promover sua descoloração (NASEEM; BEGUM; FAROOQI, 2017; NASEEM et al., 2018).

Nanopartículas metálicas apresentam-se como uma alternativa promissora no tratamento destes efluentes, principalmente por suas propriedades catalíticas que as tornam materiais de suporte na transformação de vários poluentes orgânicos. Este trabalho objetivou a síntese de Nanopartículas de Prata (AgNPs), estabilizadas com os polissacarídeos Goma do Cajueiro, Goma do Cajueiro Acetilada e Goma do Cajueiro Carboximetilada para a utilização como catalisadores do borohidreto de sódio ($NaBH_4$) no processo de redução do corante Vermelho Congo, que é uma substância tóxica e carcinogênica vastamente utilizada em diversos segmentos da indústria, gerando grande quantidade de efluentes, representando um risco para todo o ecossistema. Sua atividade antimicrobiana também foi avaliada, bem como a toxicidade do resíduo proveniente do processo de descoloração do corante frente ao modelo *Galleria mellonella*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo serão apresentados os principais conceitos que embasam este trabalho, falaremos sobre os impactos ocasionados pelo descarte inadequado de corantes e sobre o risco que eles representam para todo o ecossistema, além disso abordaremos também importante papel das nanopartículas como uma alternativa para o tratamento dessas substâncias.

2.1 A Química e o meio ambiente

O crescimento populacional aliado a um consumo exacerbado tem como consequência o aumento das atividades industriais e da retirada de matéria-prima do meio ambiente. Este processo produtivo gera grandes quantidades de poluentes, tornando os problemas ambientais cada vez mais críticos, acarretando no esgotamento dos recursos naturais, fato que pode ser observado através de alterações na qualidade do solo, ar e principalmente da água.

Os poluentes industriais constituem-se de resíduos gerados na indústria de uma maneira geral, onde a maior parte dos problemas ambientais é ocasionada pela ampla produção dessas substâncias. São inúmeras as fontes poluidoras, indo desde remédios e produtos de higiene que consumimos diariamente, até os pesticidas utilizados nas lavouras. Dentre as principais produtoras de resíduos, temos a indústria têxtil, pois as atividades empregadas nos processos de tingimento envolvem elevado consumo de água e baixo aproveitamento de insumos, o que acaba gerando problemas devido à eliminação de rejeitos tóxicos provenientes dos subprodutos gerados, o que torna seu potencial poluente bastante significativo.

Grandes quantidades de efluentes têxteis são descartadas diariamente no mundo todo em águas naturais. Os corantes são os principais resíduos desses efluentes, sendo estes compostos de difícil degradação e altamente tóxicos para o meio ambiente (ALMEIDA, 2016). O descarte destas substâncias nos corpos hídricos sem um tratamento adequado pode ocasionar problemas graves em diversos organismos vivos por conta da natureza tóxica e mutagênica de seus constituintes.

O desenvolvimento de processos biotecnológicos para tratamento de efluentes tem sido objeto de grande interesse nos últimos tempos devido ao aumento da fiscalização e rigidez das regras ambientais, além da preocupação com a estética e qualidade do meio ambiente. O Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA, órgão máximo que rege a legislação ambiental brasileira, estabelece na Resolução 430, de 2011 os padrões de lança-

mento para efluentes líquidos. A legislação brasileira institui que os estados e municípios também possam ter suas próprias legislações, desde que não conflitem com a federal, mesmo sendo mais restritivas (CONAMA, 2011), entretanto esta ainda não cita parâmetros para o descarte de efluentes contendo corantes, o que muitas vezes fica a cargo das legislações estaduais e municipais como por exemplo o Decreto nº 14.250, de 5 de junho de 1981 do estado de Santa Catarina que proíbe o lançamento de efluentes contendo corantes artificiais que não sejam removíveis por processos de coagulação, sedimentação e filtração convencionais (BRASIL, 1980).

2.2 Corantes

De maneira geral podemos dizer que os corantes são compostos orgânicos intencionalmente coloridos ou fluorescentes que possuem afinidade com o substrato ao qual estão sendo aplicados e lhes conferem cor através da absorção seletiva da luz. O substrato geralmente é uma fibra têxtil, mas pode ser papel, couro, cabelo, pele, materiais plásticos, drogas farmacológicas, ceras, cosméticos ou alimento (SUÁREZ, 2017).

A determinação da cor de um corante depende da sua estrutura química, na qual a distribuição eletrônica entre os grupos funcionais e cadeia de átomos determina a emissão de uma determinada faixa de cor proveniente da reflexão da radiação visível (luz) (BAFANA; DEVI; CHAKRABARTI, 2011).

Os corantes são, em geral, moléculas que possuem três grupos principais: Cromóforo, Auxocromo e Cromógeno, conforme ilustrado na figura 1.

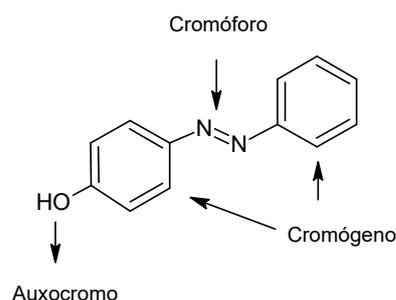


Figura 1 – Estrutura química de um corante

O cromóforo - É um grupo de átomos com uma ou mais ligações insaturadas, sendo o principal responsável por determinar a cor da substância, pois absorve a luz em um determinado comprimento de onda. Sua estrutura química pode conter grupos aminas, azos, sulfônicos e íons metálicos, o que os torna moléculas de difícil remoção, permanecendo no ambiente por um longo período de tempo (MORAES; FREIRE; DURAN, 2000; ALMEIDA, 2016).

Auxocromo - São substituintes doadores ou aceptores de elétrons que determinam a solubilidade da substância e intensificam a ação do cromóforo e conseqüentemente a coloração do produto; Os auxocromos por si só não produzem cor em uma molécula, no entanto, quando estão ligados a um cromóforo, eles aumentam a intensidade da cor e mudam a absorção de luz para comprimentos de ondas maiores (SUÁREZ, 2017).

Cromógeno - É um composto químico que pode ser colorido ou que pode apresentar cor caso seja substituído de maneira adequada. Geralmente caracteriza-se por anéis aromáticos onde o cromóforo e o auxocromo estarão presentes (BELTRAN, 2015)

A classificação detalhada dos corantes é feita no Índice Internacional de Cores, também conhecido como Color Index (C.I.), um sistema de classificação único e definitivo para corantes e pigmentos que divide os corantes de acordo com as principais classes químicas (INDEX, 2018). Descrever cada um foge aos objetivos deste trabalho, tendo em vista o impacto ambiental imediato iremos descrever apenas os corantes utilizados na indústria têxtil.

2.2.1 Corantes têxteis

Corantes têxteis são compostos orgânicos cuja função é conferir cor à fibra do tecido (substrato) em condições previamente estabelecidas. Existem vários tipos de corantes têxteis diferentes, que podem ser classificados através de sua estrutura química ou pelo método de fixação nas fibras dos tecidos. De acordo com (ALMEIDA, 2016; REIS, 2009; GUARATINI; ZANONI, 2000), dividem-se em:

- **Corantes Ácidos:** Correspondem a um grande grupo de corantes aniônicos que possuem pelo menos um grupo sulfônico em sua estrutura química. A presença desses grupos ionizáveis torna o corante mais solúvel em água e são de grande importância na interação com a fibra do tecido, pois no processo de fixação o corante se liga à fibra através de uma troca iônica com os grupos amino e carboxilato das fibras protéicas.
- **Corantes Básicos:** Também conhecidos como corantes catiônicos, são solúveis em água, empregados no tingimento de papel e fibras acrílicas. Dividem-se em diversas classes químicas como Azo, Antraquinona, Oxima, entre outras.
- **Corantes Branqueadores:** São empregados para diminuir a tonalidade amarelada que as fibras têxteis no estado bruto possuem. Apresentam grupos carboxílicos azometino ($-N=CH-$) ou etilênicos ($-CH=CH-$) ligados a anéis aromáticos em suas estruturas químicas.
- **Corantes a Cuba:** São praticamente insolúveis em água e apresentam mais de um anel aromático em sua estrutura química. São aplicados na forma solúvel reduzida

e então oxidados para sua forma original, insolúvel. A maior aplicação deste tipo de corante tem sido a tintura de algodão, embora devido às suas excelentes propriedades de fixação, outros materiais também têm sido utilizados.

- **Corantes Diretos:** São corantes solúveis em água, que possuem um ou mais grupos azo na molécula. Interagem com as fibras de celulose através de forças de van der Waals e a afinidade do corante pelo substrato pode ser aumentada utilizando um eletrólito, pela planaridade na configuração da molécula do corante ou a dupla ligação conjugada que favorece o aumento da adsorção do corante sobre a fibra. Possui um alto grau de exaustão durante sua aplicação e conseqüentemente diminuição da quantidade de corante nas águas de rejeito.
- **Corantes Dispersivos:** Esta classe de corantes tem sido utilizada principalmente para tinturas de fibras sintéticas, como: acetato de celulose, nylon, poliéster e poliacrilonitrila. São insolúveis em água, e aplicados através de suspensão. Geralmente o processo de fixação ocorre na presença de agentes dispersantes com longas cadeias que possuem a função de estabilizar a suspensão do corante, facilitando o contato com a fibra hidrofóbica.
- **Corantes de Enxofre:** Também conhecidos como corantes sulfurosos, a principal característica dessa classe é a presença de átomos de enxofre a molécula. São insolúveis em água e apresentam resíduos tóxicos. Estes compostos têm sido utilizados principalmente na tintura de fibras celulósicas, entretanto, estes corantes apresentam resíduos altamente tóxicos.
- **Corantes Pré-Metalizados:** Utilizados principalmente no tingimento de fibras protéicas e poliamidas. Explora-se a capacidade de interação entre o metal e os grupos funcionais portadores de pares de elétrons livres, como aqueles presentes nas fibras protéicas. Possui desvantagem ecológica, pois gera efluentes com altos níveis de metais.
- **Corantes Reativos:** Possuem uma alta solubilidade em água e são utilizados principalmente em fibras celulósicas. Possuem um grupo eletrofílico capaz de formar ligações covalentes como grupos hidroxila das fibras de celulósicas, com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras protéicas e também com os grupos amino das poliamidas, o que confere grande estabilidade na cor do tecido tingido quando comparado a outros tipos de corantes onde o processo de coloração se opera através de outros mecanismos.
- **Corantes Azoicos:** São corantes de difícil biodegradabilidade, e constituem a maior e mais importante classe de corantes orgânicos sintéticos utilizados na indústria têxtil. Dentre as classes de corantes citadas anteriormente, esta é que apresenta

maior relevância em função da grande quantidade de aplicações que estas substâncias têm na sociedade, indo desde alimentos até aplicações medicinais. Dedicaremos uma parte deste trabalho para abordarmos as características desta classe de corantes.

2.2.2 Azocorantes

Azocorantes são substâncias orgânicas caracterizadas pela ligação dupla entre dois átomos de nitrogênio ($-N=N-$), arranjo ao qual se dá o nome de grupamento azo (cromóforo), que se apresenta ligado a anéis aromáticos (cromógeno), na presença de estruturas funcionais (auxocromos), como o grupamento amino (NH_2) ou sulfônico (SO_3H) (CAMARA, 2017). Correspondem à maior e mais diversificada classe de corantes sintéticos utilizados na indústria em diversas aplicações, uma vez que são facilmente sintetizados, de custo acessível e possuem amplo espectro de cores.

O processo de síntese deste tipo de corante teve início em 1858 quando um cientista chamado Peter Griess, desenvolveu o processo de produção de íons que contém o grupo diazônio ($-N_2^+$), que posteriormente se acoplam ao anel aromático para formar uma dupla ligação entre nitrogênios na cadeia orgânica, técnica conhecida como reação diazo ou de diazotação. Posteriormente, em 1864, Carl Alexander Martius, um pesquisador alemão, descobriu como sintetizar os primeiros azocorantes a partir do uso de anilina e outras aminas aromáticas (BAFANA; DEVI; CHAKRABARTI, 2011).

Estima-se que a produção mundial de azocorantes esteja em cerca de um milhão de toneladas por ano, havendo mais de 2000 tipos diferentes dessas substâncias em uso, o que determina que mais da metade de todos os corantes no mundo seja dessa classe química (ELBANNA et al., 2017). Entretanto, vários azocorantes, especialmente os corantes à base de benzidina foram proibidos em muitos países devido a sua toxicidade e persistência no meio ambiente, pois os efluentes contendo esses corantes são normalmente descarregados em corpos d'água e seus efeitos adversos contra os organismos aquáticos foram estudados, revelando toxicidade para muitas algas, peixes e crustáceos (BAFANA; DEVI; CHAKRABARTI, 2011).

A toxicidade dos azocorantes em humanos e demais seres vivos vêm sendo bastante estudada. Diversos efeitos negativos relacionados ao contato com essas substâncias em trabalhadores da indústria têxtil e outras atividades que envolvem o uso de corantes azo foram relatados, podemos citar: tumores na bexiga, rins e fígado, surgimento de asma, eczema, dermatite de contato e irritação dos olhos, evidenciando o potencial tóxico destas substâncias até mesmo quando não há consumo direto (CHUNG, 2016).

Apesar de representarem um grande risco para a saúde e meio ambiente, vários países menos desenvolvidos como o Brasil, ainda possuem uma legislação ineficiente que não define parâmetros para o descarte de tais substâncias. Além disso, muitos países

ainda não cessaram a produção de corantes considerados tóxicos, onde podemos citar o azocorante vermelho congo por este apresentar grande potencialidade econômica.

2.2.3 O Vermelho Congo

Na seção anterior discutimos a classe dos azocorantes. Em função do grande uso e do seu potencial econômico vamos aprofundar um pouco mais um deles: O Vermelho Congo (Congo Red). Ele foi sintetizado pela primeira vez em 1883 por Paul Böttiger que vendeu sua patente para a empresa Alemã Agfa-Gevaert N.V. (AGFA). Em 1884, em homenagem a um evento importante sobre a colonização da África o produto foi batizado comercialmente com o nome conhecido até hoje (STEENSMA, 2001).

Seu nome IUPAC é 3,3'-(4,'-Bifenildiilbisazo)bis-4amino-1-naftalinsulfonato)-de disódio, com fórmula $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$ e peso molecular: 696.66 g/mol, trata-se de sal de sódio solúvel em água que forma uma solução coloidal vermelha. Consiste em um corante aniônico altamente tóxico e carcinogênico, no entanto, amplamente utilizado em diferentes indústrias tais como: a têxtil, de couro, de papel e celulose, onde uma quantidade significativa dessa substância é liberada como efluente no sistema aquático.

Em histologia e microscopia, o vermelho congo é utilizado para coloração de amiloidose, para as paredes celulares de fungos e plantas, além da membrana externa de bactérias Gram-negativas. Também pode ser utilizado como indicador de pH devido a uma mudança de coloração de azul pra vermelho em pH 3.0-5.2 (Figura 2) (STEENSMA, 2001).



Figura 2 – Soluções do corante vermelho congo em pH=2 (azul) e pH=10 (vermelho)

Sua estrutura química contém anéis de benzeno e naftaleno que não podem ser degradados por métodos convencionais (Figura 3). Além disso, possui alta estabilidade óptica, térmica e físico-química devido à presença de estrutura aromática (KAMAL; KHAN; ASIRI, 2016)

Diversos métodos para o tratamento e remoção de corantes têm sido relatados na literatura, como: adsorção, coagulação/floculação, biodegradação e tratamentos biológicos,

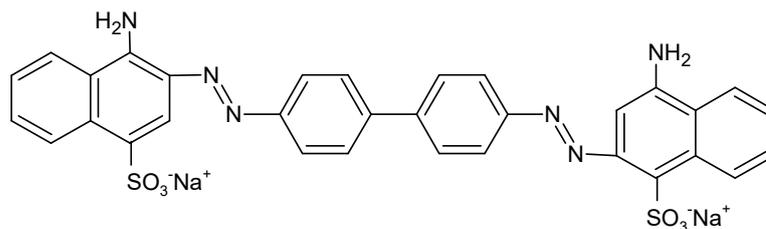


Figura 3 – Estrutura química do corante Vermelho Congo

entretanto a técnica de redução catalítica tem se mostrado promissora, pois, enquanto os outros métodos apresentam desvantagens como alto custo, problemas de despejo de resíduos após o tratamento, transferência de corantes penas de um meio para o outro, processamento lento e produção de subprodutos tóxicos, na redução catalítica as moléculas de vermelho congo sofrem clivagem na ligação azo durante a reação e são convertidas em produtos menos tóxicos para o meio ambiente (NASEEM; BEGUM; FAROOQI, 2017; NASEEM et al., 2018).

2.3 Nanopartículas (NPs)

As nanopartículas tem despertado o interesse da comunidade científica devido a suas propriedades físicas, químicas e biológicas, além de sua reatividade, atributos que permitem o emprego destas nas mais diversas áreas, podendo ser utilizadas da fabricação de cosméticos até a remediação ambiental.

As propriedades destas substâncias dependem de fatores como composição química, concentração, estado de agregação, tamanho e forma da partícula, que estão diretamente ligadas à reatividade e condutividade das mesmas e do recobrimento que vai moldar sua interação com o meio (GRASSIAN, 2008).

Nanopartículas de metais nobres como ouro, prata, platina e paládio têm sido amplamente empregadas devido às suas características únicas, pois além das citadas anteriormente, ainda podem apresentar comportamentos eletrônicos e ópticos diferenciados, característicos de NPs metálicas, o que as direcionam para potenciais aplicações em medicina, materiais biomédicos, armazenamento de informações, dispositivos ópticos, eletrônicos, magnéticos, fotônicos, tratamento de água e catálise (ALBERNAZ, 2014).

Muitos estudos têm se voltado para as Nanopartículas de Prata (AgNPs) motivados por suas propriedades como boa condutividade elétrica, atividades fotoeletroquímica e antimicrobiana além do forte poder de redução (ANDRADE, 2013). As AgNPs também possuem atividade antimicrobiana, ocorrendo efeito sinérgico quando essas partículas estão combinadas com outras substâncias (DURAN et al., 2016).

Neste trabalho foram utilizadas nanopartículas metálicas, mais especificamente as

Nanopartículas de Prata e cujo o processo de síntese será detalhado na próxima seção.

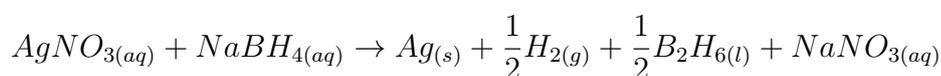
2.3.1 Síntese e estabilização de Nanopartículas

A síntese de nanopartículas metálicas é baseada em técnicas físicas ou químicas. Os processos físicos geralmente envolvem a deposição do metal, que é evaporado e depositado em um substrato apropriado, ou então a subdivisão de aglomerados metálicos através de processos mecânicos (TOSHIMA, 2007). Já os métodos químicos comumente envolvem redução de um sal metálico ou íons metálicos por um agente redutor em meio líquido (ZHANG; NOGUEZ, 2008). A síntese de M-NPs em solução necessita de três componentes principais: o precursor do metal, agentes redutores e agentes estabilizantes, sendo que propriedades como tamanho uniforme e partículas monodispersas podem ser conseguidos controlando as fases de nucleação e empilhamento dos núcleos alterando parâmetros experimentais como o precursor, pH, temperatura e agentes redutores (HAIDER; KANG, 2015).

Para evitar a agregação e aglomeração das nanopartículas, utilizam-se agentes estabilizadores, que pode ser um polímero, tiocompostos, e o encapsulamento em microemulsões (NAIR; LAURENCIN, 2007). Estes componentes são essenciais para o controle do crescimento das NPs, uma vez que, se o estabilizante estiver fracamente associado ao metal, haverá pouca ou nenhuma proteção e as nanopartículas continuarão agregando-se, mas, se o estabilizante estiver intensamente ligado à superfície das NPs ele pode limitar ou até mesmo cessar seu crescimento (ZHANG; NOGUEZ, 2008). Além disso, os agentes estabilizantes também são capazes de compensar as forças atrativas de Van der Waals através de forças de repulsão estéricas e eletrostáticas entre íons adsorvidos e contra-íons associados (GENTRY; FREDERICKS; KRCHNAVEK, 2009).

A estabilização eletrostática acontece quando as forças eletrostáticas repulsivas superam as forças atrativas de Van der Waals entre as partículas. Há uma adsorção de íons à superfície metálica, resultando em multi-camadas as quais criam uma força de repulsão entre as partículas individuais (AIKEN; FINKE, 1999). Já a estabilização estérica é obtida envolvendo o centro metálico por uma camada de um material que é estericamente volumoso, tal como polímero e surfactante, que promovem uma barreira estérica prevenindo a aproximação dos centros metálicos (PATAKFALVI; PAPP; DÉKÁNY, 2007).

No presente trabalho foram sintetizadas nanopartículas de prata através da redução do metal na presença do agente redutor borohidreto de sódio ($NaBH_4$) como descrito na reação a seguir:



Nesta reação, parte do borohidreto de sódio é consumida na redução de prata iônica à prata metálica, enquanto o $NaBH_4$ excedente adsorve-se à superfície das nano-

partículas da prata reduzida, fornecendo uma camada elétrica carregada negativamente e como consequência ocorre uma repulsão eletrostática que evita a agregação das estruturas (MULFINGER *et al.*, 2007). Entretanto, apenas a interação eletrostática como mecanismo de inibição do processo de agregação das NPs não é muito eficiente uma vez que esse artifício não apresenta resistência a mudanças em ampla faixa de pH, sendo necessária a adição de um agente estabilizante no sistema (NETO, 2010). Neste trabalho, utilizamos os polissacarídeos goma do cajueiro (GC), goma do cajueiro acetilada (GCA) e goma do cajueiro carboximetilada (GCC) como agente estabilizantes.

A goma do cajueiro possui grupos carregados que promovem uma repulsão eletrostática e também apresenta cadeias longas que envolvem a superfície das nanopartículas, sendo estas estruturas responsáveis por outro mecanismo de estabilização de nanopartículas, o impedimento estérico, que minimiza ou evita a agregação (JR. *et al.*, 2012).

Nesse mecanismo, quanto mais próxima uma superfície da outra, menor será o espaço para a acomodação das macromoléculas, diminuindo o número e conformações possíveis para cada uma. À medida que essas moléculas se aproximam, ocorre uma diminuição da entropia, aumentando a energia livre, o que torna a aproximação termodinamicamente desfavorável, promovendo estabilidade ao sistema. Esses dois efeitos, em conjunto, constituem a estabilização eletrostérica, que ocorre, por exemplo, em nanopartículas estabilizadas com polissacarídeos extraídos da goma do cajueiro (SCHUE, 2004).

O processo inicial de caracterização de nanopartículas metálicas é realizado, em geral, através da banda SPR (ressonância de plásmons de superfície) e assim sua microestrutura pode ser investigada por espectroscopia de UV-Visível. Este método é bastante utilizado para a confirmação da formação de tais substâncias por ser de baixo custo e fácil manuseamento (LIU *et al.*, 2012). Outras técnicas como espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy - FTIR), Espalhamento dinâmico da luz (Dynamic Light Scattering - DLS), Microscopia de força atômica (Atomic Force Microscopy - AFM), Análise de rastreamento de nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis - NTA) e potencial ZETA podem ser utilizadas em complemento para a caracterização das NPs, a escolha depende da natureza do material e das informações que se deseja obter.

2.4 Goma do Cajueiro

Gomas são polímeros naturais formados por unidades de monossacarídeos que unidos através de ligações glicosídicas dão origem a estruturas maiores – os polissacarídeos. Atualmente são muito empregadas e exercem variadas funções na indústria de alimentos, cosméticos, química e farmacêutica (ZAMPA *et al.*, 2007; PRAJAPATI *et al.*, 2013). As mais utilizadas são: amido, gomar guar, goma arábica, tragacanto, gelana e ágar.

A busca por gomas com novas propriedades tem atraído a atenção de pesquisadores pelos exsudatos¹ de árvores de clima tropical, onde podemos citar a goma do cajueiro. O estudo de suas características tem despertado o interesse científico por possuir propriedades semelhantes às da goma arábica que já é amplamente utilizada, podendo substituí-la na indústria farmacêutica como aglutinante de cápsulas e comprimidos, na indústria alimentícia como estabilizante de cerveja, sucos e sorvetes, entres outros, o que reduziria o custo de importação da Goma Arábica para o Brasil (MOTHE; CORREIA, 2002; T NESTOR J, 2007). Outra vantagem da utilização da Goma do Cajueiro é sua abundância no território nacional, o que torna sua utilização de baixo custo e fácil obtenção.

Goma do cajueiro (GC) trata-se de um heteropolissacarídeo ácido, ramificado, de cadeia longa e de elevado peso molecular, extraído do exsudato do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), árvore vastamente encontrada na região nordeste do país, principalmente nos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte (CAMPOS et al., 2012). É apontada como um promissor biomaterial, pois apresenta características emulsionantes (PORTO; CRISTIANINI, 2014), cicatrizantes (PORTO, 2006), antioxidante (OLIVEIRA et al., 2011) e antitumoral (FLORÊNCIO, 2007), além de possuir baixa toxicidade (PORTO, 2006). Apresenta constituição variável de acordo com a região de cultivo, sendo a goma do cajueiro originária do nordeste brasileiro composta por: ramnose (3,2%), arabinose (4,6%), galactose (72%), glicose (14%), ácido glicurônico (4,5%) (QUELEMES et al., 2013). (Figura 4).

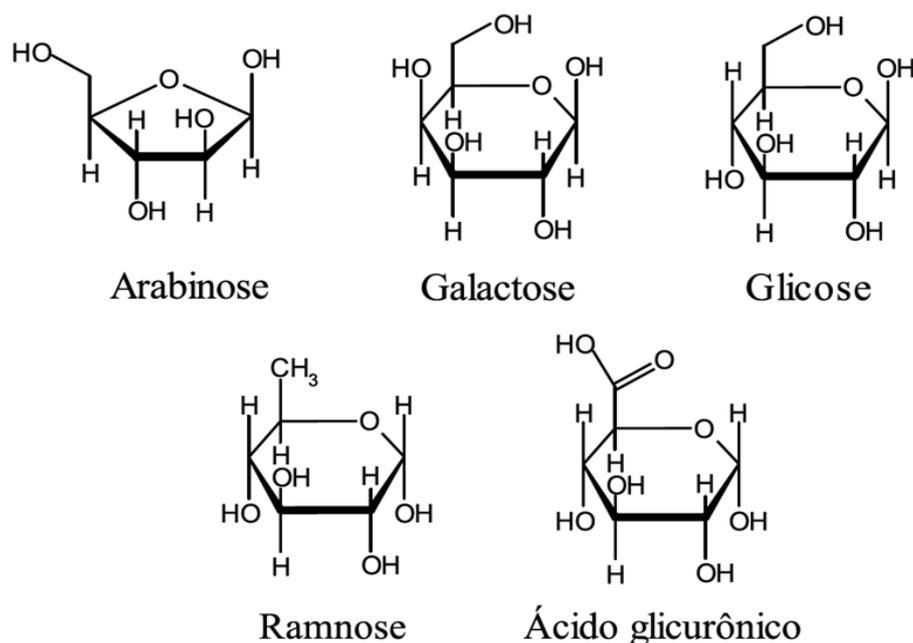


Figura 4 – Unidades de monossacarídeos presentes na composição da Goma do Cajueiro.

¹ Resina de coloração amarelada, solúvel em água, obtida naturalmente em resposta a agressões microbianas, intempéries físicas, ou também, por incisões feitas no tronco e ramos da árvore.

A GC possui uma estrutura de galactose ramificada, sendo constituída por uma cadeia principal com ligações $\beta - (1 \rightarrow 3)$ e, de cadeias laterais, com ligações $\beta - (1 \rightarrow 6)$, substituídas por cadeias laterais compostas por α -L-Ramnose, β -D-Galactose e α -L-Arabinose (Figura 5) (QUELEMES et al., 2013).

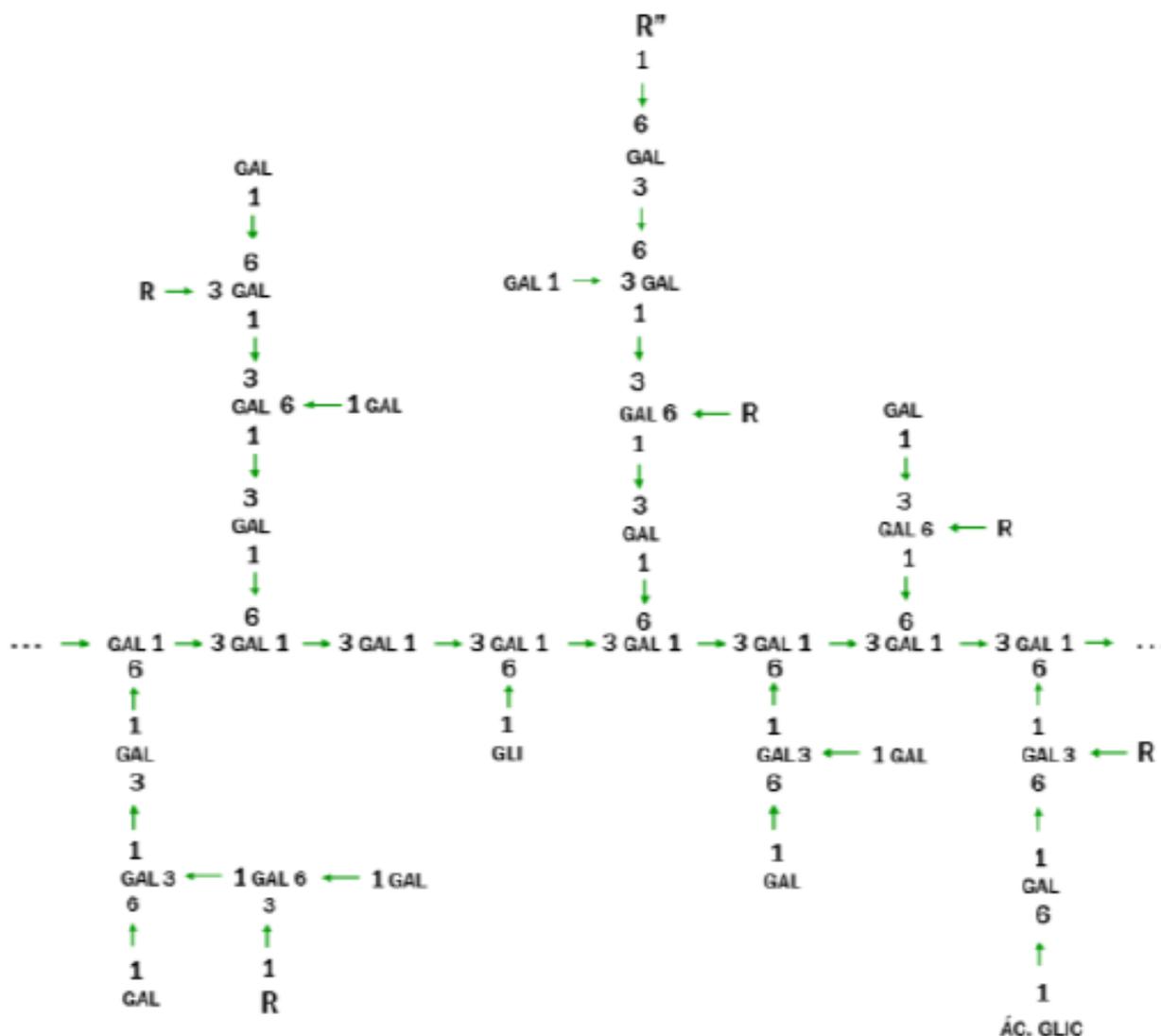


Figura 5 – Estrutura da goma de cajueiro. GAL (galactose); GLI (glicose); ÁC. GLIC (ácido glicurônico). R representa: D-manose, D-xilose, L-ramnose ou L-arabinose. R' representa: D-glicose ou ácido D-glicurônico. (Fonte: Quelemes et al, 2013)

Modificações na estrutura dessas gomas surgem como proposta de melhorar suas propriedades e, assim, ampliar suas aplicações, na literatura são relatados vários estudos que propuseram modificações de sua estrutura através de reações de funcionalização polimérica, como podemos citar carboximetilação (SILVA et al., 2004) e acetilação (PITOMBEIRA et al., 2015) para o aumento e redução da hidroflicidade respectivamente (Figura 6).

A goma do cajueiro tem sido empregada na síntese de inúmeras nanopartículas, sendo direcionadas para as mais variadas funções como: Utilização na liberação de fármacos (MOTHE; CORREIA, 2002), avaliação das atividades antibacteriana e citotóxica (QUELEMES et al., 2013), em papiloscopia forense na revelação de impressões digitais latentes (FARIA, 2016), entre outras aplicações.

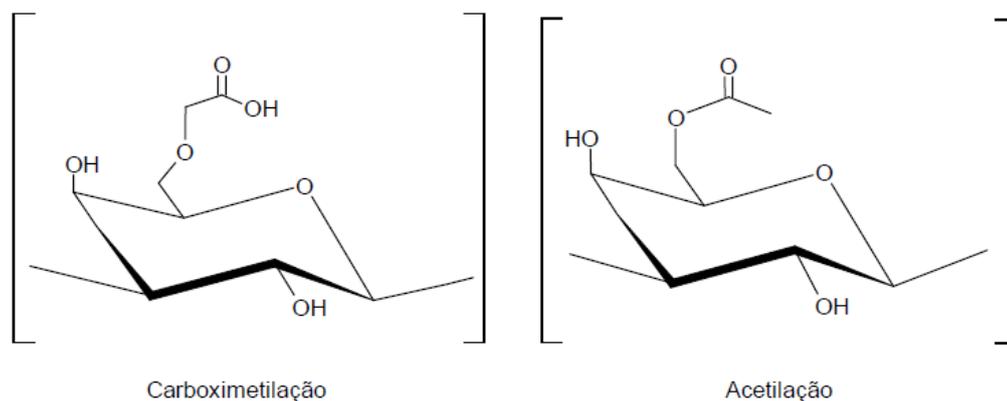


Figura 6 – Fragmento da estrutura da goma do cajueiro modificada pelo processo de Carboximetilação e pelo processo de Acetilação.

2.5 Atividade catalítica

Catalisadores são substâncias que aceleram a velocidade de uma reação química, diminuindo sua energia de ativação, ou seja, promovem um caminho alternativo dos reagentes até os produtos sem serem consumidos durante a reação. Estas substâncias são bem comuns e desempenham um papel importante na realização de várias reações químicas, sejam no nosso organismo (enzimas) ou âmbito industrial. Sua relevância também é refletida na proteção ambiental e saúde pública.

Existem dois tipos de catálise: A homogênea (catalisador presente na mesma fase que as moléculas de reagentes) e a heterogênea (catalisador em fase diferente das moléculas de reagentes), onde esta última é bastante utilizada pela indústria, geralmente como um sólido em contato com os reagentes na fase gasosa ou como solução líquida (BROWN THEODORE; LEMAY, 2005).

A catálise através de nanopartículas metálicas tem se mostrado promissora, pois sua eficiência se sobressai aos demais catalisadores devido a grande porcentagem de átomos em sua superfície, neste sentido, menores partículas resultam numa maior atividade catalítica por unidade de metal (SIGNORI, 2010).

2.6 Atividade antimicrobiana

O efeito antimicrobiano da prata é bastante conhecido na literatura. No passado, esta era utilizada no tratamento contra patologias provocadas por bactérias, como a *Staphylococcus aureus* e também no tratamento de queimaduras. Com a descoberta dos antibióticos, houve uma redução considerável na utilização dessa substância como agente bactericida. Porém, com a seleção de cepas resistentes a antibióticos, provocado pelo seu uso excessivo, a investigação da prata e de seus compostos como, por exemplo, as nanopartículas, contra diversos micro-organismos voltaram a despertar interesse de pesquisadores para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (CHOPRA, 2007).

Um aspecto importante da atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata é o efeito sinérgico que ocorre quando essas partículas são combinadas a outros compostos naturais e sintéticos (MORAES; FREIRE; DURAN, 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Sintetizar, caracterizar, avaliar o potencial catalítico, antimicrobiano e a toxicidade de nanopartículas de prata, estabilizadas com goma do cajueiro, goma do cajueiro acetilada e goma do cajueiro carboximetilada.

3.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar nanopartículas de prata, utilizando como estabilizantes goma do cajueiro, goma do cajueiro acetilada e goma do cajueiro carboximetilada;
- Confirmar, utilizando espectroscopia de UV-Visível, a formação das nanopartículas;
- Utilizar o método de Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier para auxiliar na identificação das nanopartículas formadas;
- Avaliar a estabilidade e tamanho das nanopartículas sintetizadas por meio das técnicas de Espalhamento de Luz Dinâmico e Potencial Zeta;
- Conhecer a morfologia e tamanho das nanopartículas através da Microscopia de força atômica e Análise de rastreamento de nanopartículas;
- Verificar o potencial catalítico das nanopartículas através da reação de redução do corante vermelho congo;
- Avaliar a reciclabilidade das nanopartículas sintetizadas neste trabalho.
- Investigar o potencial antimicrobiano das nanopartículas frente à cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.
- Verificar a toxicidade em sistema *in vivo* frente ao modelo de larvas de *Galleria mellonella*.

4 MÉTODOS

4.1 Exsudato do Cajueiro

O exsudato do cajueiro (*Anacardium occidentale*) utilizado neste trabalho é proveniente do município de Ilha Grande do Piauí, localizado na planície litorânea piauiense.

4.2 Isolamento da Goma

O isolamento da goma do cajueiro ocorreu adaptando-se a metodologia proposta por Rodrigues e Paula (1993). Inicialmente, preparou-se uma solução da goma bruta a 1 %, onde 10 g de exsudado foram dissolvidos em 100 mL de água ultrapura e deixados sob constante agitação até que fossem totalmente dissolvidos. Posteriormente, esta mistura foi filtrada, para remoção de impurezas, e o pH da solução ajustado para 7, utilizando-se uma solução de NaOH (0,01 M). Após o ajuste do pH para 7, 2 g de NaCl foram adicionados à solução, que foi deixada sob agitação por aproximadamente 1 hora. Em seguida, objetivando obter o precipitado, adicionou-se etanol em uma proporção de 4:1 (etanol/goma). 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.

4.3 Carboximetilação da goma do cajueiro

Este procedimento foi realizado segundo Silva e colaboradores (2004), com adaptações. Uma massa de 10 g de goma isolada foi ressuspensa em 10 mL de água ultrapura e deixada sob agitação até que a solução ficasse homogênea. Em seguida, 5,4 mL de uma solução de NaOH (10 M) foi adicionado à solução homogeneizada, que foi agitada por mais 10 minutos. Posteriormente, 5,4 mL de ácido monocloroacético foi adicionado 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 Acetilação da goma do cajueiro

A goma de caju acetilada foi obtida a partir do método proposto por Motozato (1986), com adaptações, como descrito por Pitombeira, et al (2015). Neste processo, 1 g de goma de caju foi suspensa em 20 mL de formamida sob agitação vigorosa. Adicionou-se 3 g de piridina e 7 g de anidrido acético e a mistura foi deixada sob agitação a 50°C por 24

h. O produto final foi obtido por precipitação com 400 mL de água. O sólido foi filtrado, lavado com água destilada e seco sob fluxo de ar quente.

4.5 Preparo de Soluções

A solução de vermelho congo $3 \cdot 10^{-5}$ M foi preparada utilizando água destilada. Em seguida esta solução foi dividida em 3 alíquotas e seu pH foi ajustado utilizando hidróxido de sódio (NaOH-0,5 M) e Ácido clorídrico (HCl-0,5 M) obtendo-se ao final amostras com pH=2, pH=7 e pH=10.

4.6 Síntese de AgNPs

Sintetizou-se 3 tipos de NPs: Nanopartícula de Prata estabilizada com Goma do Cajueiro (GC-AgNPs), Nanopartícula de Prata estabilizada com Goma do Cajueiro Acetilada (GCA-AgNPs) e Nanopartícula de Prata estabilizada com Goma do Cajueiro Carboximetilada (GCC-AgNPs). Todas as sínteses seguiram o mesmo procedimento, ou seja, para um volume final de 5 mL, solubilizou-se 0,015 g do polissacarídeo (0,3 %) em água (2,5 mL) com o auxílio do agitador magnético a 900 rpm durante 24 horas, em seguida adicionou-se 2,5 mL de solução de nitrato de prata ($AgNO_3$) 1 mM e 180 μL de solução de borohidreto de sódio ($NaBH_4$), mantendo a mistura sob agitação durante 20 minutos. Foram preparadas 4 amostras de cada tipo de nanopartícula produzida. A cada síntese, a concentração de $NaBH_4$ foi alterada, como segue:

- GC-AgNPs (1) \rightarrow Síntese utilizando $NaBH_4(10^{-3}M)$
- GC-AgNPs (2) \rightarrow Síntese utilizando $NaBH_4(10^{-2}M)$
- GC-AgNPs (3) \rightarrow Síntese utilizando $NaBH_4(10^{-1}M)$
- GC-AgNPs (4) \rightarrow Síntese utilizando $NaBH_4(1M)$
- GCA-AgNPs (1) \rightarrow Síntese utilizando $NaBH_4(10^{-3}M)$
- GCA-AgNPs (2) \rightarrow Síntese utilizando $NaBH_4(10^{-2}M)$
- GCA-AgNPs (3) \rightarrow Síntese utilizando $NaBH_4(10^{-1}M)$
- GCA-AgNPs (4) \rightarrow Síntese utilizando $NaBH_4(1M)$
- GCC-AgNPs (1) \rightarrow Síntese utilizando $NaBH_4(10^{-3}M)$
- GCC-AgNPs (2) \rightarrow Síntese utilizando $NaBH_4(10^{-2}M)$
- GCC-AgNPs (3) \rightarrow Síntese utilizando $NaBH_4(10^{-1}M)$

- GCC-AgNPs (4) → Síntese utilizando $\text{NaBH}_4(1M)$

4.7 Caracterização de AgNPs

Nesta parte do trabalho serão abordadas as técnicas de caracterização empregadas no estudo das nanopartículas.

4.7.1 Espectroscopia de UV-Visível

A formação e estabilidade das nanopartículas de prata, foram investigadas através da espectroscopia de UV- Visível na faixa de 300 a 700 nm observando-se a formação da banda plasmônica características de AgNPs com o objetivo de confirmar sua formação. Esta técnica ainda pode apresentar-se como uma alternativa para acompanhar a estabilidade das substâncias formadas. Para tanto, as soluções de AgNPs foram armazenadas protegidas da luz, a uma temperatura de 10 °C, e foram monitoradas a cada 30 dias.

O ensaio de descoloração do corante vermelho congo na presença do agente redutor também foi acompanhada através dos espectros UV-Vis a partir da sequência de leituras ao longo do tempo com intervalos de 5 minutos entre cada leitura. Em todo o processo utilizou-se um espectrofotômetro UV-Visível - UV-1800 Shimadzu (Kyoto-Japão).

4.7.2 Potencial Zeta e Espalhamento Dinâmico da Luz

A sigla DLS é acrônimo de Dynamic Light Scattering ou Espalhamento Dinâmico da Luz. Este é um método que permite determinar o diâmetro hidrodinâmico das partículas em suspensão num fluido a partir de propriedades advindas do espalhamento de luz decorrido do movimento Browniano das partículas (ALBERNAZ, 2014).

Já o Potencial Zeta consiste num método utilizado na investigação da estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais, refletindo a carga efetiva nas partículas, que se correlacionam com a repulsão eletrostática entre elas e com a estabilidade da suspensão (CASANOVA, 2010).

As medidas de DLS e potencial zeta foram realizadas no instrumento HORIBA Scientific Nanoparticle Analyzer SZ-100 no Laboratório de Automontagem Supramolecular (LAS) As amostras foram diluídas na proporção de 1: 5 e analisadas em triplicata, com número de medidas no automático, utilizando ângulo de 90° e temperatura a 25°C.

4.7.3 Microscopia de Força Atômica

As amostras GC-AgNPs, GCA-AgNPS e GCC-AgNPs foram diluídas na proporção de 1: 10, em água ultrapura e deixadas no ultrassom durante 15 minutos, posteriormente

retirou-se uma alíquota de 10 μL de cada amostra, que foram depositadas individualmente em uma superfície de mica limpa e permaneceram por 15 minutos a temperatura ambiente para a secagem e realização da análise.

A Microscopia de Força Atômica foi realizada utilizando o equipamento TT-AFM (AFM Workshop - EUA) no modo contato intermitente, usando pontas APPNano-ACT50 em uma frequência de amplitude aproximadamente 362,02 kHz. O programa Gwyddion 2.45, foi utilizado para tratar as imagens e obter o tamanho (nanômetros) das nanopartículas. A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada com o uso do programa GraphPad Prism 7.01. Para obter a média de tamanho foi aplicado o teste ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. Os resultados expressos como média \pm desvio padrão (DP) e um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.7.4 Análise de Rastreamento de Nanopartículas

As nanopartículas foram analisadas utilizando o equipamento Malvern Panalytical NanoSight NS300, equipado com um módulo de laser de 642 nm (Malvern, UK) e software NTA 3.3 para obtenção dados sobre o tamanho e concentração de partículas suspensas no meio. As amostras foram diluídas utilizando água ultrapura, e uma alíquota da suspensão diluída foi retirada com uma seringa de plástico e injetada na célula de fluxo do equipamento.

Para obter uma melhor visão das partículas, o foco e o nível da câmera foram ajustados após conferir que não havia bolhas de ar e nenhuma partícula aderida às paredes das células. Cinco vídeos de 1 minuto cada, foram capturados, enquanto a amostra avançava através da célula de fluxo a uma taxa de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$, permitindo a medição de um número maior de partículas de tamanhos variados através da alíquota.

As configurações de análise, em particular o limiar de detecção, foram definidas dependendo da intensidade de luz dispersa que foi observada nos vídeos capturados. As medidas foram realizadas a 25 °C, e para análise dos dados, o valor de viscosidade considerado foi o da água. Cada vídeo foi analisado independentemente e os resultados foram automaticamente mesclados em um gráfico de distribuição de tamanho de partícula.

4.7.5 Espectroscopia na Região do Infravermelho

A Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) - FTIR apresenta-se como uma poderosa ferramenta na identificação de compostos orgânicos e inorgânicos puros, pois é capaz de identificar diferentes ligações químicas entre átomos pelas deformações rotacionais e vibracionais, as quais absorvem energia em determinada frequência de ressonância, de acordo com as características químicas dos átomos envolvidos (SKOOG D. A.; WEST, 2010).

Neste trabalho, os espectros foram obtidos em espectrofotômetro SHIMADZU IRAffinity-1S no modo transmitância, e utilizadas para investigar a formação interação das AgNPs com suas respectivas gomas.

4.8 Avaliação da Atividade Catalítica das Nanopartículas

A atividade catalítica das AgNPs sintetizadas foi testada para o teste de descoloração de soluções aquosas do corante Vermelho Congo $3,0 \cdot 10^{-5} M$ na presença de $NaBH_4$ $1 \cdot 10^{-3} M$ (VEISI; AZIZI; MOHAMMADI, 2018). Um ensaio controle foi realizado sem a presença das AgNPs para verificar o tempo de reação na ausência do catalisador. O λ_{max} para o corante foi monitorado em 498 nm .

Nesta reação, 2 mL de AgNPs (pH = 7) diluídas na proporção de 1:10 foram adicionados a solução de 5,0 mL de corante e 12,5 mL de $NaBH_4$ em seguida transferidas para a cubeta de quartzo. A reação ocorreu à temperatura ambiente ($\pm 20^\circ C$) sendo monitorada via UV-Visível, com leituras no intervalo de 5 minutos cada, na faixa de 300 a 700 nm. A progressão da reação foi observada pela diminuição da intensidade da banda de absorvância máxima do corante vermelho congo na região de 498 nm. A reação foi repetida utilizando soluções do corante com pH = 2 e pH = 10.

Para avaliar a eficiência de reciclagem dos nanocatalisadores, as amostras de GC-AgNPs, GCA-AgNPs e GCC-AgNPs utilizadas nos teste de descoloração descrito anteriormente foram reaplicadas em novas soluções contendo o vermelho congo e o agente redutor, e seu tempo de reação foi observado.

4.9 Atividade Antimicrobiana das AgNPs

A atividade antibacteriana das AgNPs sobre bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* MRSA 43300) e Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922) foi avaliada seguindo a metodologia proposta por CLSI(2012).

As bactérias foram previamente semeadas em placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton, incubadas a $35^\circ C \pm 2$ por 24h, em condições aeróbicas. Após 24 horas, colônias isoladas foram suspensas em solução salina estéril (NaCl 0,85% (p/v)), até que se obtivesse uma absorvância entre o intervalo de 0,08 a 0,1 sob um comprimento de onda de 625 nm, o que corresponde a aproximadamente $1-2 \cdot 10^8$ UFC/mL na escala de McFarland. Em seguida, esta suspensão foi diluída na proporção de 1:10 em solução salina estéril, sendo que, desta diluição foram retiradas as alíquotas que constituíram o inóculo para a realização dos experimentos de Concentração Inibitória Mínima (Minimum Inhibitory Concentration - MIC) e Concentração Bactericida Mínima (Minimum Bactericidal Concentration - MBC) descritos a seguir.

4.9.1 Análise de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima

Pelo método de determinação da concentração inibitória mínima foi utilizada placa de microdiluição de 96 poços, no qual foi realizada uma diluição seriada de razão 2 com concentrações de nanopartícula variando de 54 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0,052 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em caldo de Mueller-Hinton, inoculado com $5 \cdot 10^6$ UFC/mL para cada bactéria (CLSI, 2012). As placas foram incubadas a $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$ por 24 h, em condições aeróbicas.

Como controle positivo determinou-se a concentração inibitória mínima dos antibióticos padrão efetivos contra as bactérias testadas: Oxacilina para *S. aureus*; Vancomicina para *S. aureus* resistente a metilicina e Meropenem para *E. coli*. A MIC foi definida como a menor concentração que inibiu o crescimento visual bacteriano.

Para a determinação da concentração bactericida mínima, alíquotas (10) de todos os poços com concentrações iguais ou superiores à MIC foram subcultivadas em ágar Mueller-Hinton. O MBC foi definido como a menor concentração que não permitiu crescimento no ágar. Em ambos os testes, os micro-organismos foram incubados durante 24 h em temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$, em condições aeróbicas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.10 Avaliação da toxicidade do sistema

4.10.1 Toxicidade em larvas de *Galleria mellonella*

Para a avaliação da toxicidade das substâncias utilizadas neste trabalho GC-AgNPs, GCC-AgNPs, GCA-AgNPs, solução de corante vermelho congo $3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ e resíduo do teste de redução do vermelho congo, que chamaremos de (nano + corante), utilizou-se o modelo *Galleria mellonella*, no qual foram selecionadas, aleatoriamente, larvas do sexto instar (250-300 mg). As larvas foram cultivadas a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ no biotério do Instituto de biologia da Universidade de Brasília e a avaliação da toxicidade foi realizada como descrito por Ignasiak and Maxwell, 2017. Inicialmente, 10 μL de cada amostra a ser analisada foi injetada em grupos contendo dezesseis larvas mantendo as concentrações empregadas nos testes anteriores. Todas as inoculações foram realizadas no último proleg de cada larva com o auxílio de uma seringa (seringa Hamilton). Um grupo inoculado com apenas PBS (solução salina) foi usado como controle. As larvas foram então incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e a sobrevivência foi monitorada diariamente por sete dias considerando as larvas mortas àquelas que não apresentavam movimento quando estimuladas ao toque. Cada grupo foi testado duas vezes e uma curva de sobrevivência foi gerada usando o software Graphpad Prism 6.0.

4.10.2 Contagem de hemócitos totais

A contagem de hemócitos¹ totais foi realizada como descrito por Tomiotto-Pellissier, 2016. Cada amostra a ser analisada foi injetada em cinco larvas no último estágio larval que permaneceram incubadas por 24 horas a 37 °C. De cada grupo, 100 μL de hemolinfa foram retirados e transferidos para um tubo contendo 900 μL de IPS gelado (salina fisiológica de insetos: cloreto de sódio 150 mM, cloreto de potássio 5 mM, 10 mM tris HCl pH 6,9, 10 mM EDTA e 30 citrato de sódio mM). Os tubos foram centrifugados (2000 rpm e a 4°C por 5 minutos), o sobrenadante removido e lavado com IPS. Uma nova centrifugação foi realizada e após a remoção do sobrenadante, 1000 μL de IPS foram adicionados e os hemócitos contados em uma câmara Neubauer utilizando azul de tripan. Foram realizados três réplicas biológicas de cada tratamento e os dados estatísticos realizados no GraphPad Prism 6.0.

¹ Células encontradas nos sistemas circulatórios de diversos animais invertebrados, que atuam como células de defesa do sistema imune.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese de AgNPs

A síntese ocorreu a partir da redução do sal $AgNO_3$ utilizando o $NaBH_4$ como agente redutor, o excesso deste reagente auxilia na estabilização da dispersão, além de conferir carga negativa às nanopartículas, fato que ocorre devido a adsorção dos íons BH_4^- na superfície das mesmas (OLIVEIRA, 2014). A escolha pelo borohidreto de sódio ocorreu por ele ser um forte agente redutor, o que favorece a velocidade da reação, tornando-a mais veloz, obtendo assim partículas menores em comparação com as partículas formadas utilizando redutores mais fracos (GARCIA, 2011). Entretanto, as nanopartículas ainda podem formar aglomerados, e para evitar esse processo é necessária a utilização de estabilizantes tais como os polissacarídeos goma do cajueiro, goma do cajueiro carboximetilada e goma do cajueiro acetilada que foram utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

Durante o processo de síntese das nanopartículas, ocorreu mudança na coloração das soluções após a adição do $NaBH_4$, que inicialmente eram incolores, tornando-se amareladas, indicando a formação de AgNPs.

As AgNPs foram produzidas variando a concentração de $NaBH_4$ com objetivo de obter partículas com menores diâmetros e maior estabilidade, sendo possível constatar com o auxílio do UV-Visível que houve formação de AgNPs com todas as concentrações de $NaBH_4$ testadas, porém, havendo variações na intensidade do banda plasmônica e na tonalidade da coloração de cada solução, como será relatado adiante.

5.2 Caracterização de AgNPs

5.2.1 Espectroscopia de Uv-Visível

Através da espectroscopia UV-Vis observa-se que todas as amostras exibiram banda de absorção entre 380 e 450nm, região característica de nanopartículas de prata, indicando que houve formação de NPs em todas as concentrações de borohidreto de sódio utilizadas (Figura 7). As amostras que contém maior concentração do agente redutor (1M) exibiram os picos mais estreitos, o que indica menor dispersão das nanopartículas, enquanto os picos mais largos sugerem agregação das mesmas (SONG et al., 2009). Garcia (2011), ao sintetizar nanopartículas de prata através do método de redução química para a aplicações bactericidas em têxteis, destaca o excesso de borohidreto de sódio como necessário para a formação de partículas menores e mais estáveis.

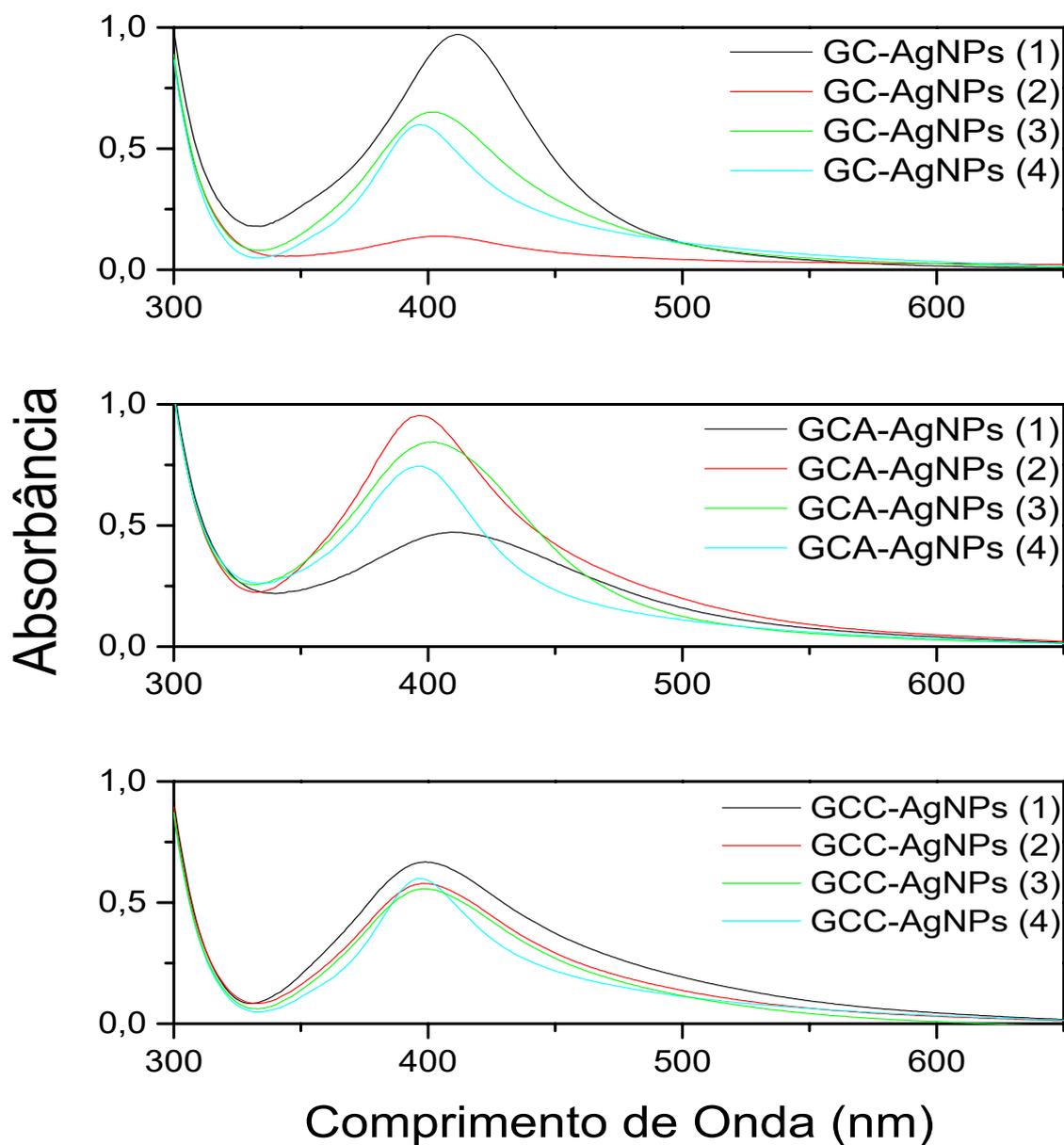


Figura 7 – Espectro de UV-Visível das nanopartículas GC-AgNPs, GCA-AgNPs e GCC-AgNPs, os números indicam a concentração de borohidreto utilizada em cada síntese (1)= 0,001 M, (2)= 0,01M, (3)= 0,1 M e (4)= 1 M.

Também é possível notar que ao aumentar a concentração de $NaBH_4$ nas soluções, a coloração amarela característica das AgNPs se tornou mais intensa, como mostrado na figura 8:

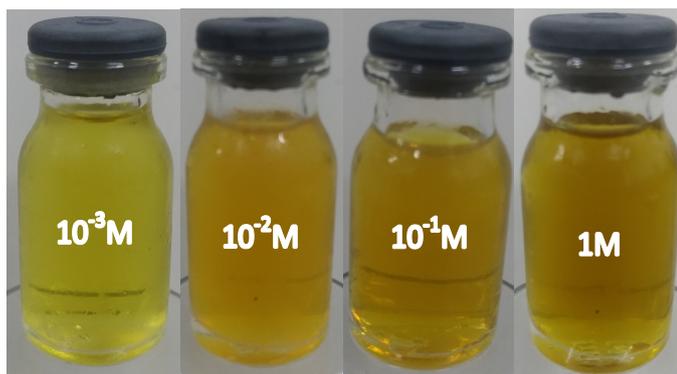


Figura 8 – Soluções de nanopartículas de prata sintetizadas, a leve diferença entre a tonalidade das amostras se deve às diferentes concentrações de $NaBH_4$ (descritas nos frascos) que foram utilizadas durante o processo de síntese.

5.2.2 Potencial Zeta e Espalhamento Dinâmico da Luz

O valor absoluto do potencial zeta é utilizado como parâmetro indicativo da estabilidade do sistema coloidal. Valores mais elevados representam uma maior concentração de carga na superfície da partícula e conseqüentemente uma maior repulsão eletrostática entre elas, o que favorece a formação de uma suspensão coloidal estável (ANDRADE, 2013). Um alto potencial zeta (negativo ou positivo) significa que as partículas tendem a se repelir. O limite teórico de estabilidade é $|30| mV$, ou seja, um sistema coloidal será estável se seu potencial zeta for maior que 30 mV ou menor que -30 mV (VERTELOV et al., 2008).

Todas as nanopartículas sintetizadas neste trabalho apresentaram carga superficial negativa conforme a tabela 1. Comparando-se as amostras de AgNPs que apresentam diferentes concentrações de $NaBH_4$, temos que os valores do potencial zeta não apresentam grandes alterações. Entretanto, ao confrontar as amostras com mesma concentração de $NaBH_4$, variando-se apenas o agente estabilizante, nota-se uma maior diferença nesses valores, obtendo-se os valores mais negativos para as AgNPs do tipo GCA.

Já o tamanho hidrodinâmico das partículas foi acompanhado pela técnica de Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS), pois embora a espectroscopia de UV-Vis identifique a formação de AgNPs, a técnica de DLS apresenta dados mais específicos em relação ao tamanho das nanopartículas. As vantagens da utilização deste método para analisar o tamanho das partículas inclui a capacidade de fornecer informações sobre a estimativa média do conjunto de nanopartículas em suspensão, além de apresentar sensibilidade suficiente para detectar uma ampla gama de tamanhos de partículas e ser um procedimento de análise rápida.

Nas amostras que apresentam mesma concentração de borohidreto de sódio modificando o agente estabilizante é possível observar que houve grandes variações nos valores do tamanho das partículas (Tabela 1). Através destes resultados percebemos que a con-

centração do agente redutor e do estabilizante são fatores importantes no controle do tamanho e estabilidade das nanopartículas.

Amostra	ZETA (mV)	Tamanho médio (nm)
GC-AgNP (1)	-39,5 ± 4,6	69,5 ± 7,0
GC-AgNP (2)	-23,1 ± 3,1	135,7 ± **
GC-AgNP (3)	-35,4 ± 5,0	93,9 ± 38,3
GC-AgNP (4)	-30,6 ± 2,5	25,1 ± 20,3
GCA-AgNP (1)	-65,3 ± 2,9	80,0 ± 8,9
GCA-AgNP (2)	-65,2 ± 0,5	67,0 ± 11,3
GCA-AgNP (3)	-69,6 ± 1,6	136,5 ± **
GCA-AgNP (4)	-51,3 ± 1,4	43,1 ± 9,1
GCC-AgNP (1)	-21,46 ± 2,3	244,7 ± **
GCC-AgNP (2)	-12,5 ± 5,3	140,5 ± 32,8
GCC-AgNP (3)	-24,7 ± 2,8	55,2 ± 2,3
GCC-AgNP (4)	-33,5 ± 1,7	55,0 ± 5,1

Tabela 1 – Valores de DLS e Potencial Zeta obtidos para os três grupos de nanopartículas sintetizadas (GC-AgNPs, GCA-AgNPs e GCC-AgNPs), os números indicam a concentração de $NaBH_4$ utilizada em cada síntese (1)= 0,001 M, (2)= 0,01 M, (3)= 0,1 M e (4)= 1 M.

A partir o valores obtidos para tamanho e carga das nanopartículas apresentadas, selecionamos uma amostra de cada grupo para as análises posteriores. Serão utilizadas as soluções GC-AgNPs(4), GCA-AgNPs(4) e GCC-AgNPs(4), ou seja as amostras com $NaBH_4$ 1M, pois estas apresentaram os menores tamanhos de partícula quando comparadas às outras amostras de seus respectivos grupos, além disso, os valores de potencial zeta indicam a estabilidade dos sistemas.

5.2.3 Microscopia de Força Atômica

A microscopia de força atômica foi empregada para obter informações sobre tamanho, forma e também distribuição das nanopartículas. Sua capacidade para caracterizar objetos em escala nanométrica o torna ideal para determinar a distribuição de tamanho das nanopartículas (HOO et al., 2008).

Na figura 9 temos imagens representativas de GC-AgNPs (A), GCC-AgNPs (B) e GCA-AgNPs (C), que apresentaram-se esféricas e heterogêneas. A amostra (B) exibiu a população com maior tamanho de partículas se comparada com as amostras (A) e (C). Tal característica pode ter ocorrido devido à aglomeração das nanopartículas na amostra (B), pois como foi observado, GCC-AgNPs apresenta uma maior concentração de nanopartículas, o que pode ocasionar a sobreposição das mesmas e como resultado, a escala de altura (eixo Z) nas imagens podem representar a partícula de maior tamanho

analisada. Entretanto, para avaliar o tamanho real das nanopartículas, o substrato é descontado da altura apresentada pelas mesmas, exibindo na forma de gráfico o tamanho médio (nm) das populações analisadas (D). Para GC-AgNPs e CCA-AgNPs, a média de tamanho observada foi entre 30-40 nm. Já para as nanopartículas GCC-AgNPs, o tamanho médio observado foi de 40 nm, com um desvio padrão um pouco maior que as populações anteriores, devido a uma maior heterogeneidade de tamanho apresentada nessa população.

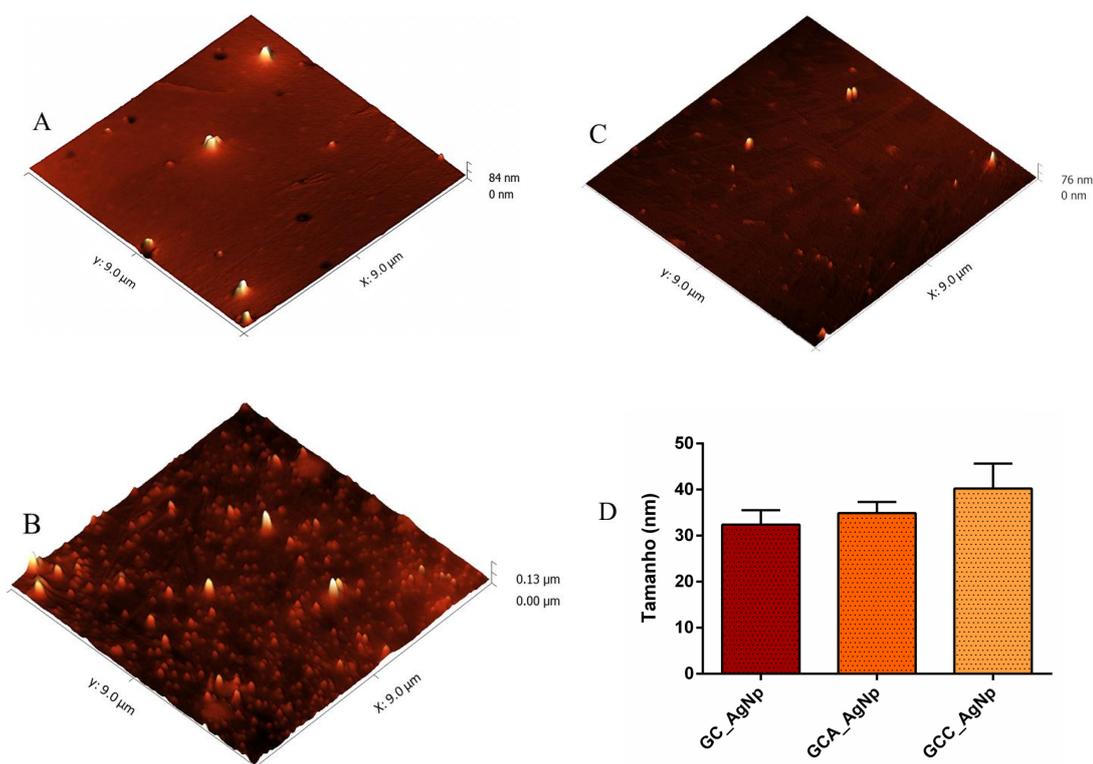


Figura 9 – Imagens obtidas através de microscopia de força atômica para CG-AgNPs (A); GCC-AgNPs (B); GCA-AgNPs (C), e Média de tamanho das nanopartículas (D). Para obter a média de tamanho foi aplicado o teste ANOVA e os resultados expressos como média \pm desvio padrão. As imagens se encontram com barras de escala de 9 μm e com resolução de 512 pixels.

5.2.4 Análise por rastreamento de nanopartículas

A análise de rastreamento de nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis - NTA) trata-se de um método empregado para análise e visualização direta de nanopartículas que utiliza as propriedades de espalhamento dinâmico da luz e movimentos Brownianos para obter a distribuição de tamanho das partículas em suspensão (HOLE et al., 2013). Por ser uma técnica de alta resolução, o NTA fornece ainda a concentração aproximada de partículas presentes na solução.

Através da figura 10, verifica-se que as amostras GC-AgNPs e GCC-AgNPs apresentam população com distribuição de tamanho unimodal, enquanto GCA-AgNPs exibe uma distribuição multimodal, com diferentes tamanhos de nanopartículas.

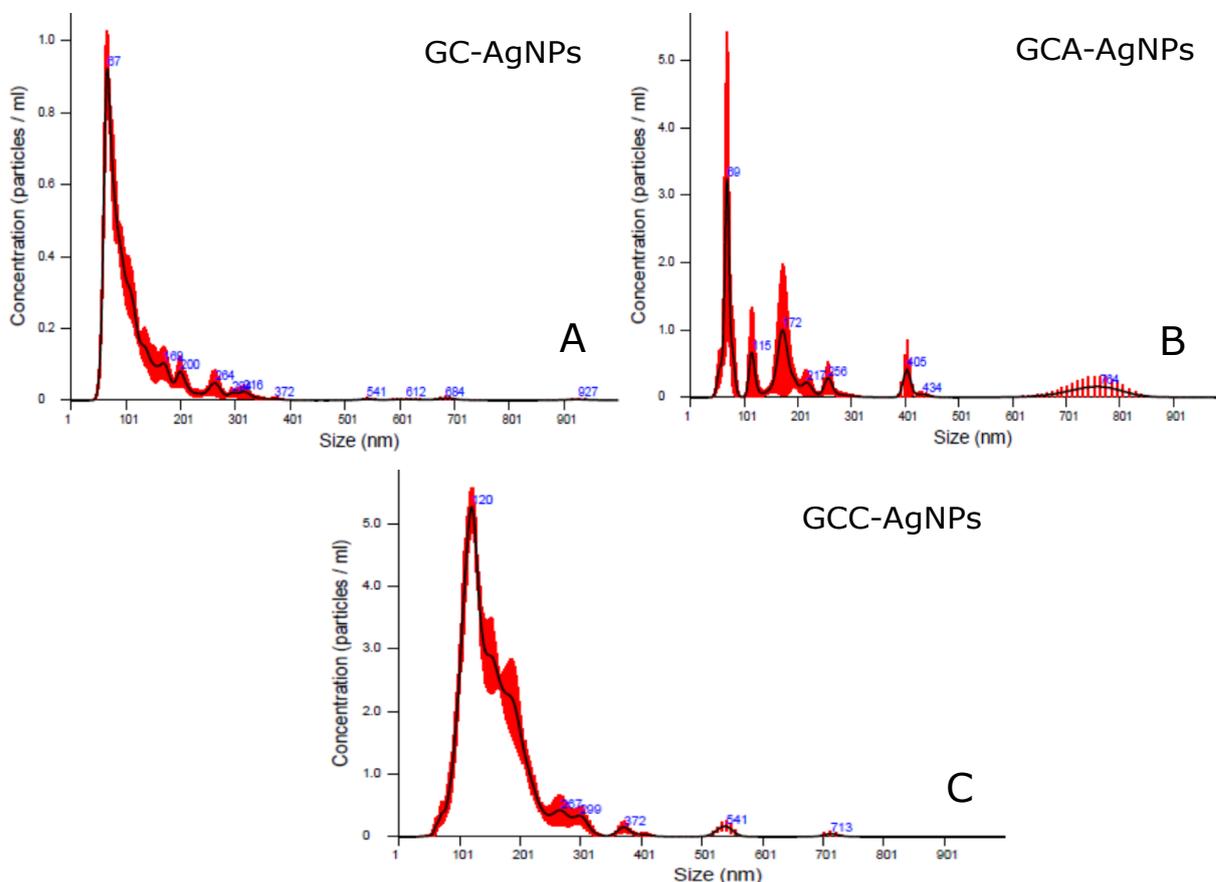


Figura 10 – Análise do tamanho de partícula por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) para (A) GC-AgNPs, (B) GCA-AgNPs e (C) GCC-AgNPs todas com $[NaBH_4] = 1M$

O tamanho médio e a concentração encontrada para as nanopartículas estão apresentados na tabela 2. As nanopartículas do tipo GCC-AgNPs apresentaram o maior valor de tamanho e as do tipo GC-AgNPs apresentaram o menor valor, corroborando com os resultados obtidos nas análises de espalhamento dinâmico da luz e microscopia de força atômica, onde o mesmo padrão de tamanho foi observado.

Amostra	Tamanho médio (nm)	Concentração de partículas/ml
GC-AgNPs	93,3 ± 2,1	3,50.10 ⁹
GCA-AgNPs	122,4 ± 16,3	7,21.10 ⁷
GCC-AgNPs	142,6 ± 2,1	2,16.10 ⁹

Tabela 2 – Valores de tamanho médio (nm) ± desvio padrão e concentração de partículas por ml de amostra obtidos através da técnica de análise de rastreamento de nanopartículas (NTA).

5.2.5 Espectroscopia na Região do Infravermelho

A interação do polissacarídeo com as AgNPs foi confirmada por análise espectral de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) da Goma do cajueiro (GC), Goma do cajueiro acetilada (GCA), Goma do cajueiro carboximetilada (GCC) e suas NPs.

O espectro de GC (Figura 11) apresenta banda de absorção larga na região de 3304 cm^{-1} atribuída às vibrações de estiramento O-H e uma de menor intensidade em 2918 cm^{-1} , associada a vibrações de estiramento C-H. A absorção em 1646 cm^{-1} ocorre devido a vibração O-H (BUENO, 1990). Já as bandas em 1148 , 1074 e 1030 cm^{-1} são referentes ao estiramento de C-O-C e dos grupos O-H das unidades glicosídicas (SILVA et al., 2009; PITOMBEIRA et al., 2015). No espectro de GC-AgNP, além dos grupos encontrados para GC, temos o surgimento de uma banda na região de 1415 cm^{-1} atribuído a vibrações de estiramento C-N devido a interação do polissacarídeo com a AgNP (PAVIA D.L., 2010).

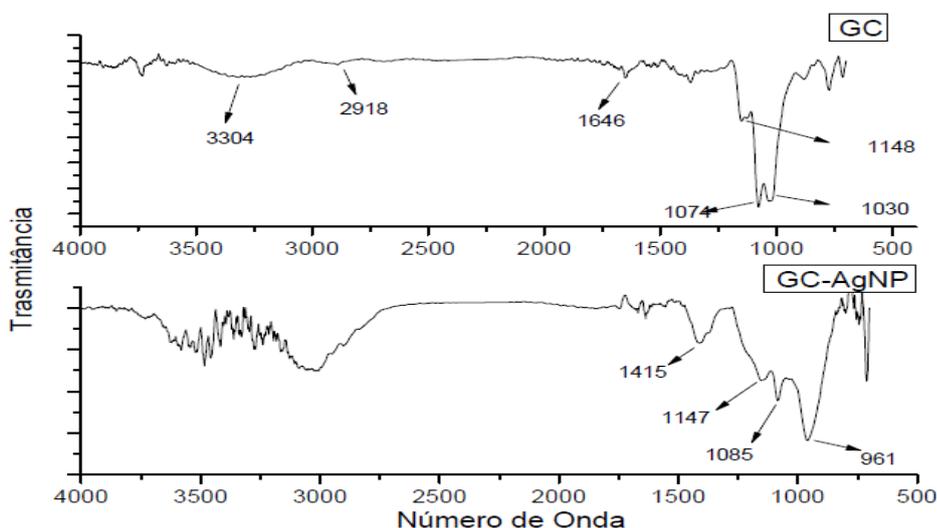


Figura 11 – Espectros obtidos por FT-IR para a Goma do cajueiro (GC) e para a Nanopartícula de Prata estabilizada com Goma do cajueiro (GC-AgNP).

No espectro de GCA (Figura 12) podemos confirmar a modificação do polissacarídeo através da ausência de banda na região de 3400 cm^{-1} presente na goma do cajueiro devido à inserção de grupos acetila (PITOMBEIRA et al., 2015). Também é observa-se picos em 1378 e 1740 cm^{-1} , pertencentes aos grupos C=O, e dois grandes picos na região entre 1000 - 1300 cm^{-1} atribuídos ao grupo C-O de ésteres (PAVIA D.L., 2010). Ao analisar o espectro de sua nanopartícula, é possível perceber a diminuição dos picos em 1378 cm^{-1} e na região entre 1000 - 1300 cm^{-1} e o alargamento em 1740 cm^{-1} , todos referentes ao grupo de éster. Essas alterações podem ter ocorrido devido à interação do polissacarídeo com a nanopartícula. Este resultado corrobora com os obtidos através da análise do potencial zeta que exhibe valores mais negativos para as nanopartículas que utilizaram este polissacarídeo, fato que pode ser explicado devido a substituição dos grupos OH pelo grupo COO.

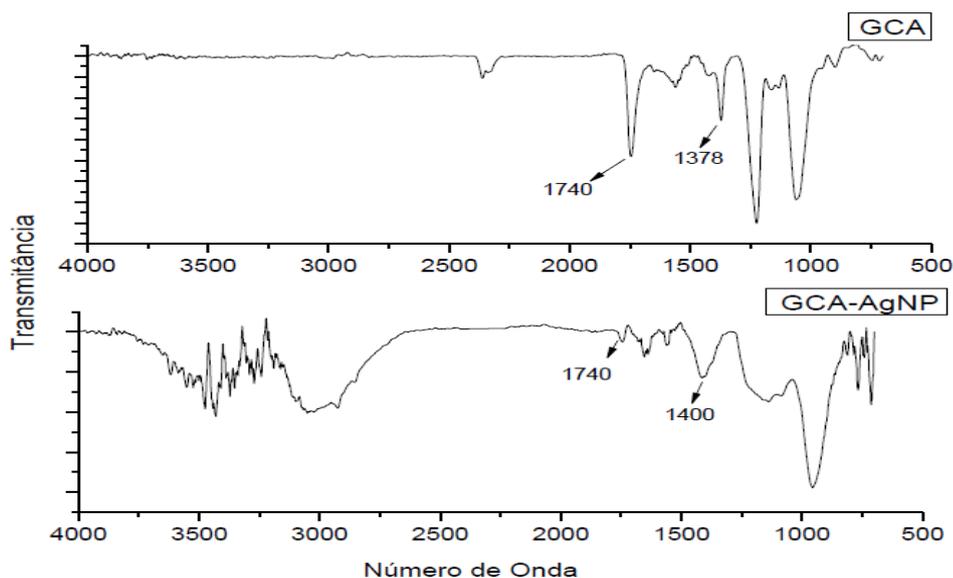


Figura 12 – Espectros obtidos por FT-IR para a Goma do cajueiro Acetilada (GCA) e para a Nanopartícula de Prata estabilizada com Goma do Cajueiro Acetilada (GCA-AgNP).

No espectro obtido para a GCC (Figura 13) além das bandas encontradas no espectro da GC, encontramos um pico de intensidade moderado em 1750 cm^{-1} , associado ao estiramento C=O e picos de fraca intensidade na região entre $1210\text{ a }1320\text{ cm}^{-1}$ devido ao estiramento C-O, provenientes do processo de carboximetilação (SILVA et al., 2010; PAVIA D.L., 2010). Entretanto, ao analisar sua nanopartícula, temos o desaparecimento do pico citado anteriormente, sugerindo que o grupo responsável pela carboximetilação da goma do cajueiro pode ter sido consumido durante o processo de síntese da nanopartícula.

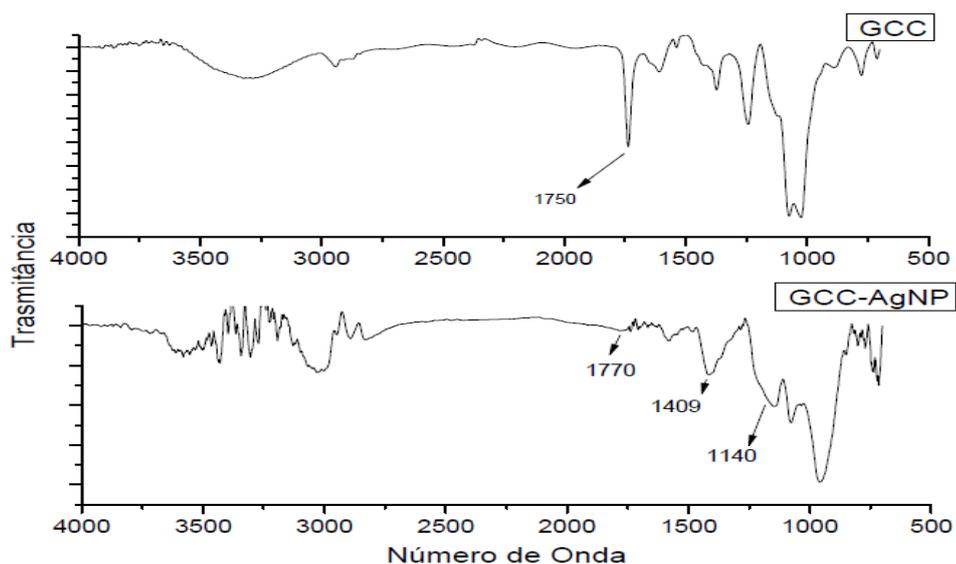


Figura 13 – Espectros obtidos por FT-IR para a Goma do cajueiro Carboximetilada (GCC) e para a Nanopartícula de Prata estabilizada com Goma do Cajueiro Carboximetilada (GCC-AgNP).

5.3 Avaliação da Atividade Catalítica das Nanopartículas

O presente estudo investigou a eficácia de GC-AgNPs, GCC-AgNPs e GCA-AgNPs como catalisadores na reação de redução do corante vermelho congo com o borohidreto de sódio.

Um experimento controle foi realizado utilizando apenas a solução de vermelho congo e o borohidreto de sódio para verificar o tempo de reação na ausência das nanopartículas (Figura 14-A). Nesta etapa, observou-se uma taxa de redução muito lenta. Após 12 horas de reação do corante na presença do $NaBH_4$, não houve grande mudança na absorbância, nem na sua coloração (Figura 15), indicando que a reação não ocorreu completamente nesta situação e que não é cineticamente favorável, surgindo a necessidade de utilizar catalisadores para diminuir o tempo de reação.

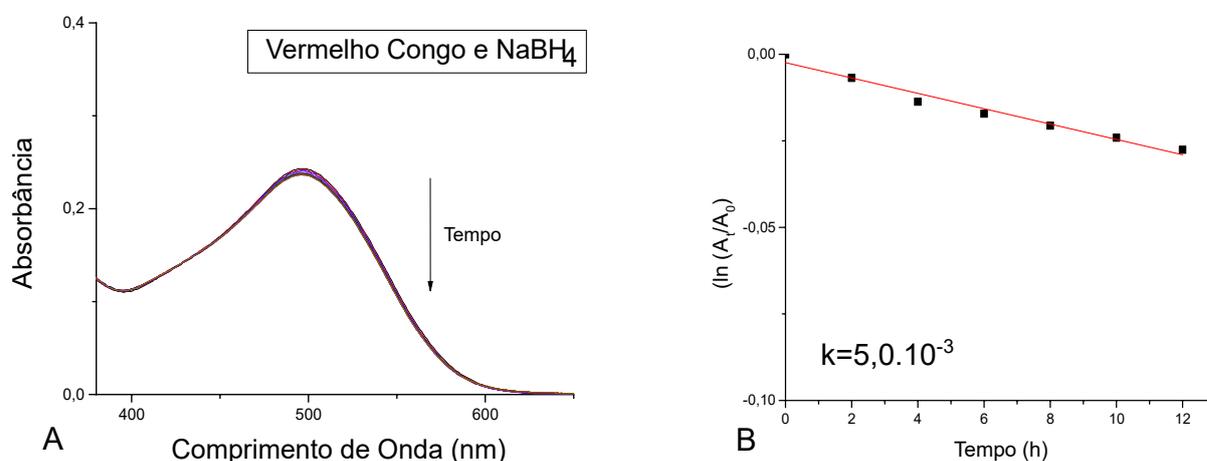


Figura 14 – (A) Teste de degradação do corante vermelho congo em solução aquosa com $NaBH_4$ registrada a cada 2 horas de reação (B) $\ln(A_t/A_0)$ versus tempo de reação para o teste de degradação do corante

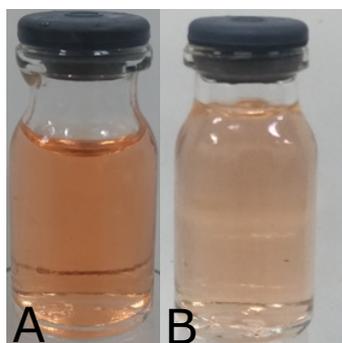


Figura 15 – Soluções do corante vermelho congo antes (A) e após 12 horas de reação com o $NaBH_4$ (B).

Já os espectros de UV-Visível para as reações que utilizaram as nanopartículas GC-AgNPs (Figura 16-A), GCA-AgNPs (Figura 17-A) e GCC-AgNPs (Figura 18-A)

como catalisadores do borohidreto de sódio na redução do vermelho congo, exibem uma diminuição gradual do valor máximo de absorbância na banda característica do corante em função do tempo de reação, bem como sua descoloração, que foi de vermelho a incolor em 25 minutos (Figura 19), indicando uma mudança na cinética da reação devido ao efeito catalítico das AgNPs empregadas.

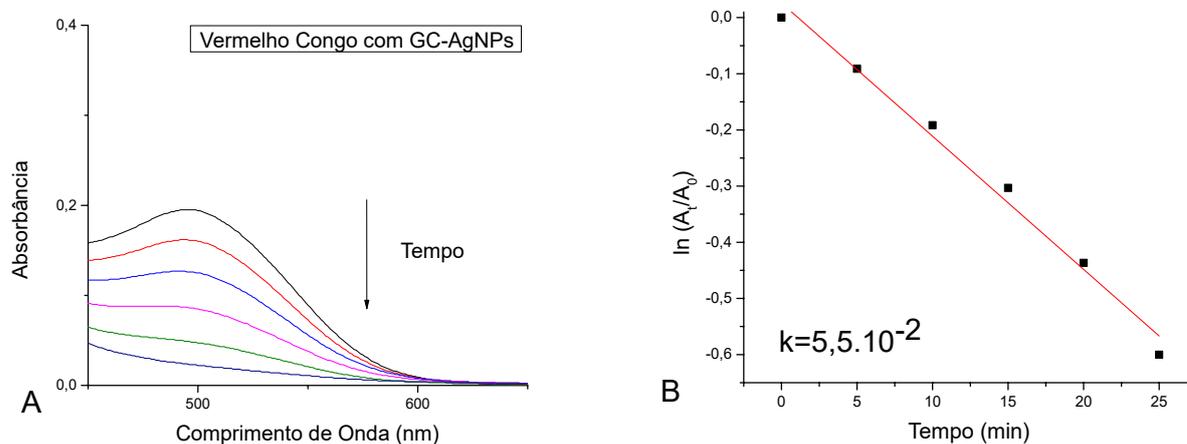


Figura 16 – (A) Teste de degradação do corante vermelho congo em solução aquosa utilizando as GC-AgNPs como catalisador do $NaBH_4$, registrada a cada 5 min de reação. (B) $\ln(A_t/A_0)$ versus tempo de reação para o teste de degradação do corante

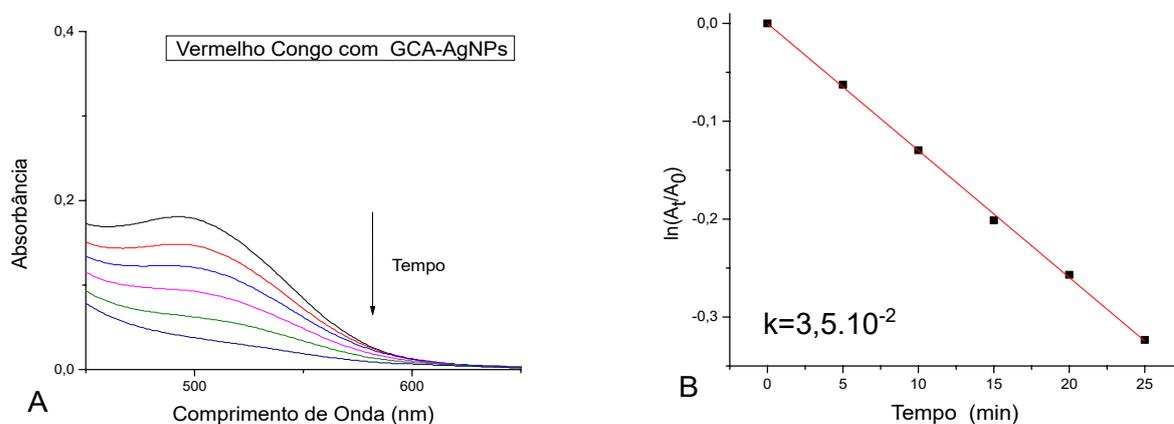


Figura 17 – (A) Teste de degradação do corante vermelho congo em solução aquosa utilizando as GCA-AgNPs como catalisador do $NaBH_4$, registrada a cada 5 min de reação. (B) $\ln(A_t/A_0)$ versus tempo de reação para o teste de degradação do corante

Os resultados indicam que as nanopartículas auxiliam o redutor borohidreto de sódio na possível clivagem da ligação $-N=N-$ do grupo cromóforo presente na estrutura do azocorante e conseqüentemente descoloração das soluções (ALJAMALI, 2015) (ZHENG; WANG, 2012). A ausência de coloração e o desaparecimento de sua banda de absorção comprovam a eficiência das AgNPs como catalisadores na reação em questão.

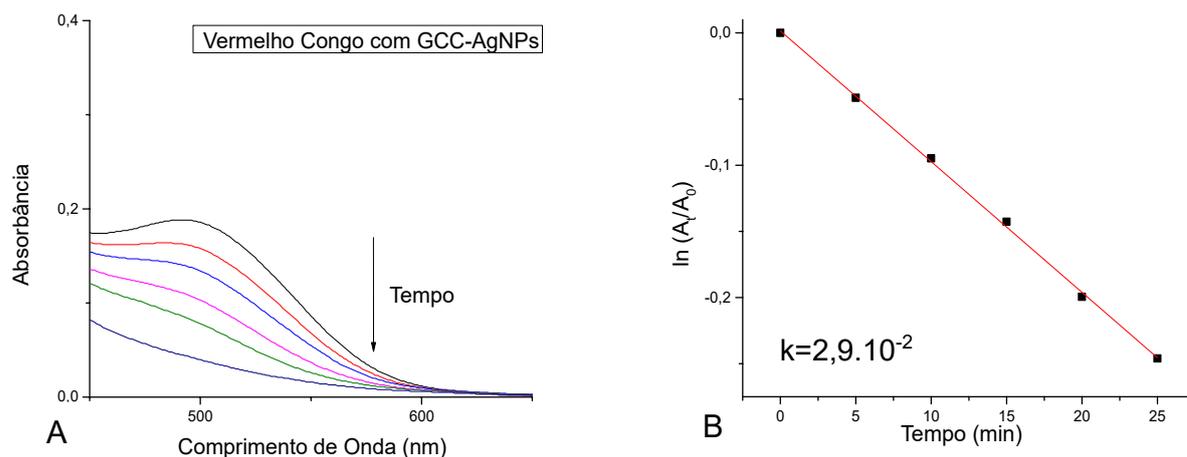


Figura 18 – (A) Teste de degradação do corante vermelho congo em solução aquosa utilizando as GCC-AgNPs como catalisador do $NaBH_4$, registrada a cada 5 min de reação. (B) $\ln(A_t/A_0)$ versus tempo de reação para o teste de degradação do corante

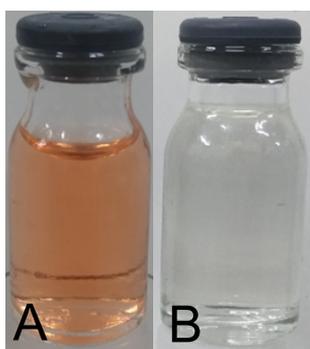


Figura 19 – Soluções do corante vermelho congo antes (Vermelho) e após o teste de descoloração utilizando as nanopartículas GC-AgNPs como catalisador do $NaBH_4$ (Incolor).

Estes dados mostraram-se vantajosos frente ao trabalho desenvolvido por (SARAVANAN et al., 2017) que utilizou nanopartículas de prata estabilizadas com exopolissacarídeos como catalisadores na degradação do corante vermelho congo, tendo a reação completa em 240 minutos, com $k= 12,57 \cdot 10^{-3} \text{min}^{-1}$.

Com o objetivo de analisar a eficiência do nanocatalisador nos meios ácido e básico, foram utilizadas soluções do corante com $\text{pH}=2$ e $\text{pH}=10$. O tempo de descoloração destas soluções foi semelhante ao obtido para a reação utilizando o corante com $\text{pH}=7$ descrita anteriormente, sugerindo assim que o pH inicial do corante não altere o efeito das nanopartículas nas situações observadas. Zheng (2012), ao utilizar nanopartículas de prata com hidrogel para catalisar a redução do corante vermelho congo também não observou mudança no tempo de reação com a alteração do pH inicial do corante.

Por meio das figuras 14 (B), 16 (B), 17 (B) e 18 (B), é possível observar uma correlação linear de $\ln(A_t/A_0)$ versus o tempo, onde A_0 e A_t são as absorbâncias no

tempo 0 e no tempo t, respectivamente. Portanto, o ordem da reação foi considerada de pseudo-primeira ordem em relação ao corante isolado. Essa reação ocorre quando a concentração de um dos reagentes permanece constante seja porque está em excesso em relação aos outros reagentes, ou porque se trata de um catalisador. À medida que a reação ocorre, apenas uma pequena fração do reagente em excesso é consumida, sendo assim, sua concentração pode ser considerada constante.

A cinética da reação pode ser descrita como $(A_t/A_0) = -kt$, sendo k a constante de taxa aparente de primeira ordem (min^{-1}) e t, o tempo de reação, verificando-se através destes resultados que as reações que utilizaram as AgNPs apresentaram valor de k 10 vezes maior que o obtido na reação que ocorreu na ausência destas (controle) e também na reação apresentada pelo trabalho de Saravanan (2017) citado anteriormente, enfatizando o potencial catalítico promissor dessas nanopartículas.

Ao compararmos a constante de taxa aparente obtida para as reações catalisadas, percebemos que também há uma diferença entre esses valores, fato que pode ser esclarecido através do tamanho das partículas utilizadas. Com o auxílio das técnicas DLS, AFM e NTA, vimos que GC-AgNPs e GCC-AgNPs exibiram respectivamente os menores e os maiores tamanhos de partícula, o que contribuiu para o melhor desempenho de GC-AgNPs, contrariamente ao apresentado por GCC-AgNPs, evidenciando que o menor tamanho de partícula colabora para a maior velocidade de reação, pois pode resultar em uma maior área superficial, aumentando o potencial catalítico da substância em questão (ZHANG; LI; CHEN, 2009). Outros trabalhos que utilizaram nanopartículas como catalisadores na descoloração de azocorantes, também obtiveram as melhores taxas de reação com as menores partículas (SALEM; BAKR; EL-ATTAR, 2017) e (PING et al., 2018).

Embora as NPs utilizadas neste trabalho exibirem uma boa atividade catalítica, a reciclagem das mesmas também foi avaliada. As GC-AgNPs, GCA-AgNPs e GCC-AgNPs foram reaplicadas no teste de descoloração do corante vermelho congo, sendo possível constatar que sua eficiência catalítica permanece sem grandes alterações no tempo de reação por dois ciclos.

5.4 Atividade Antimicrobiana das AgNPs

Para análise da atividade antibacteriana *in vitro* das nanopartículas, utilizou-se a determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) para cepas Gram-positivas de *S. aureus* ATCC 29213 e *S. aureus* MRSA 43300 (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas *E. coli* ATCC 25922.

Através dos resultados obtidos, (Tabela 3) temos que a amostra GC-AgNPs não exibiu atividade inibitória, fato que pode ser explicado devido ao polissacarídeo utilizado não apresentar atividade antimicrobiana para as cepas testadas (TORQUATO et al.,

2004).

Já as GCA-AgNPs e GCC-AgNPs foram capazes de inibir o crescimento de todas as cepas. Verifica-se que as GCC-AgNPs apresentaram resultado semelhante para as três cepas, enquanto para as GCA-AgNPs a menor MIC foi encontrada para a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Ao comparar estas últimas, a melhor atividade observada para GCA-AgNPs pode ter ocorrido devido esta amostra apresentar menor tamanho de partícula, o que melhora sua interação com os microrganismos devido a sua elevada área superficial, possibilitando que as AgNPs ataquem a superfície celular e penetrem no interior destes organismos. Além disso, podem causar danos na cadeia respiratória, provocando a morte celular e podem ainda inibir as funções do DNA ao interagirem com proteínas que contêm fósforo e enxofre (WONG; LIU, 2010). Resultado semelhante foi observado no trabalho de Panacek e col (2006), que ao sintetizar nanopartículas de prata utilizando sacarídeos também obteve o melhor efeito inibitório com as menores partículas, relacionando assim o menor tamanho de partícula à maior eficiência da atividade antimicrobiana.

Em relação ao MBC, este se encontra acima da maior concentração testada (0,25mM/27 μ g/mL) para todas as amostras citadas anteriormente, evidenciando que as NPs do tipo GCA e GCC possuem potencial bacteriostático e não bactericida frente as cepas testadas.

Amostras	MIC		
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. aureus</i> MRSA 43300	<i>E. coli</i> ATCC 25922
GC-AgNPs	-	-	-
GCA-AgNPs	0,0625mM/6,75 μ g/mL	0,25mM/27 μ g/mL	0,125mM/13,5 μ g/mL
GCC-AgNPs	0,25mM/27 μ g/mL	0,25mM/27 μ g/mL	0,25mM/27 μ g/mL
Oxacilina	<0,25	*	*
Vancomicina	*	<0,5	*
Meroponem	*	*	<0,1
<i>AgNO₃</i>	0,125mM/13,5 μ g/mL	0,125mM/13,5 μ g/mL	0,0625mM/6,75 μ g/mL

Tabela 3 – Atividade antimicrobiana das NPs sintetizadas determinada pela concentração inibitória mínima (MIC). (*) Não apresenta os dados; (-) Não apresentou atividade.

5.5 Ensaio de Toxicidade

O vermelho congo é um corante tóxico, que pode causar inúmeros problemas em organismos vivos, assim como relatado em seções anteriores. Seu teste de redução foi catalisado utilizando nanopartículas metálicas, que por sua vez também podem apresentar efeitos nocivos. Para avaliar a toxicidade *in vivo* das substâncias utilizadas neste trabalho,

empregou-se o modelo de *Galleria mellonella*. Muitos autores tem utilizado este modelo para avaliar os efeitos tóxicos de algumas substâncias e dentre as vantagens apresentadas por este modelo, podemos citar o fato de seu uso ser eticamente aceitável, apresentar menor custo de manutenção e o curso de infecção durar em média apenas duas semanas (MYLONAKIS, 2007).

As larvas foram monitoradas durante o período de 7 dias e sua curva de sobrevivência é exibida na figura 20 (A), onde nota-se que houve diferença estatística entre o grupo de larvas tratado com o corante vermelho congo e os demais grupos que foram analisados, indicando que o corante foi mais letal para as larvas de *Galleria mellonella* que as outras soluções testadas.

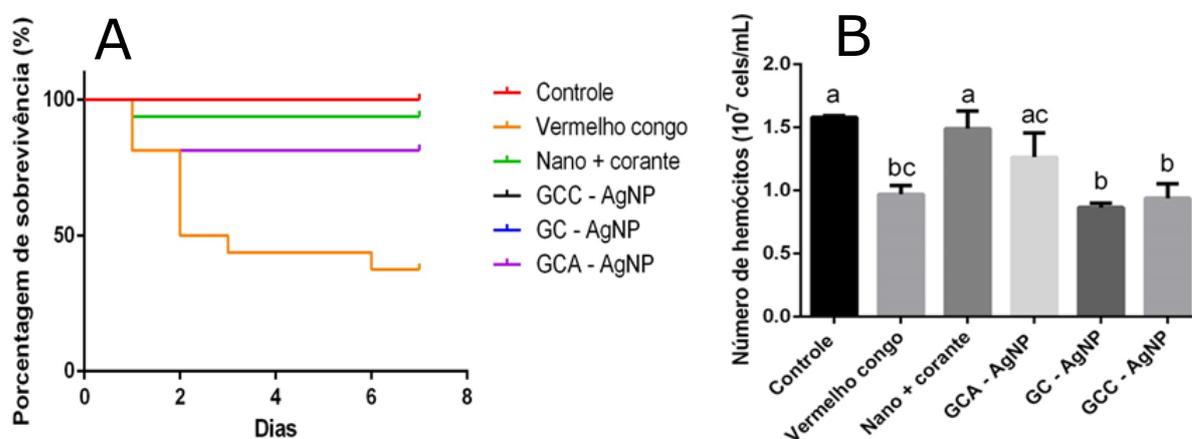


Figura 20 – (A) Curva de sobrevivência de *Galleria mellonella* inoculadas com diferentes formulações após 7 dias de teste. (B) Número total de hemócitos de *G. mellonella* tratado com diferentes formulações após 24 horas de teste. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre grupos. Ensaios realizados em triplicata biológica e utilizando ANOVA one way e teste de tukey para comparações múltiplas ($p < 0.05$). (Controle = PBS; Corante = Vermelho congo).

Já o grupo de larvas inoculadas com o resíduo do teste de descoloração do vermelho congo apresentou resultados próximos aos obtidos pelo controle PBS, o que nos sugere uma diminuição da toxicidade da solução de corante após a reação de redução utilizando as nanopartículas como catalisadores. As imagens das populações de *G. mellonella* inoculadas com as diferentes formulações estão no apêndice A.

Na contagem de hemócitos totais (Figura 20-B), observamos uma diferença estatística entre o corante e os grupos controle PBS e o resíduo da reação catalisada (nano + corante). Houve uma redução do número de células de defesa do grupo tratado com o corante em relação ao controle. Entretanto, também foi observado uma redução do número de células dos grupos tratados com as nanopartículas, não diferindo estatisticamente do corante. Apesar desse fato, as nanopartículas utilizadas neste trabalho não mostraram

serem letais às larvas quando visto o teste da curva de sobrevivência. A Porcentagem de sobrevivência das larvas e o número de hemócitos totais estão apresentadas na tabela 4.

Amostra	Porcentagem de sobrevivência (%)	Número de médio de hemócitos (céls/mL)
PBS	100	$1,58.10^7$
Vermelho Congo	37,5	$0,97.10^7$
Nano + Corante	93,7	$1,49.10^7$
GC-AgNPs	93,7	$0,86.10^7$
GCA-AgNPs	81,2	$1,26.10^7$
GCC-AgNPs	93,7	$0,94.10^7$

Tabela 4 – Porcentagem de sobrevivência de *Galleria mellonella* inoculadas com diferentes formulações nanoméricas após 7 dias de teste e número total de hemócitos de *Galleria mellonella* tratado com diferentes formulações nanoméricas após 24 horas de teste. Ensaio realizado em triplicatas biológicas.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No presente trabalho, nanopartículas de prata foram sintetizadas utilizando goma do cajueiro, goma do cajueiro acetilada e goma do cajueiro carboximetilada como estabilizantes. É possível concluir que o processo de síntese empregado e que os polissacarídeos utilizados foram eficientes, produzindo partículas com tamanhos entre 25 e 244 nm e boa estabilidade coloidal. Observa-se também que as nanopartículas funcionam como catalisadores do $NaBH_4$ na reação de redução do corante vermelho congo. Outro ponto a ser destacado é o fato das nanopartículas sintetizadas com a goma modificada apresentarem melhor atividade antimicrobiana frente aos obtidos com a goma pura. Uma das hipóteses que podem ser levantadas para explicar este fenômeno é a redistribuição das cargas ocasionada pelos processos de acetilação e carboximetilação, porém, tal fato necessita ser analisado de forma mais aprofundada para melhor compreensão. Em relação à toxicidade *in vivo*, apesar de reduzirem o número de células de defesa da *Galleria mellonella*, as nanopartículas sintetizadas neste trabalho não foram letais a essas larvas. Já o corante vermelho congo, que inicialmente apresentou-se tóxico frente a esse sistema, após passar pelo processo de redução catalisado pelas AgNPs teve sua toxicidade reduzida, indicando a formação de produtos menos nocivos, entretanto é necessário uma maior investigação para descobrir o mecanismo responsável pela atividade catalítica das nanopartículas, bem como a caracterização dos produtos gerados a partir da reação de descoloração do vermelho congo.

Referências

- ABREU, M. A. C. S. A. d. et al. Perfis estratÃde conduta social e ambiental: estudos na indÃtÃnordestina. *GestÃ ProduÃ§Ã*, scielo, v. 15, p. 159 – 172, 04 2008. ISSN 0104-530X. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-530X2008000100014&nrm=iso>. Citado na página 14.
- AIKEN, J. D.; FINKE, R. G. A review of modern transition-metal nanoclusters: their synthesis, characterization, and applications in catalysis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 145, n. 1, p. 1 – 44, 1999. ISSN 1381-1169. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381116999000989>>. Citado na página 22.
- ALBERNAZ, V. L. *Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de Brosimum gaudichaudii, caracterização fisicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico*. Universidade de Brasília, 2014. Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/16467>>. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 31.
- ALJAMALI, N. M. Review in azo compounds and its biological activity. *Biochemistry Analytical Biochemistry*, OMICS International., v. 4, n. 2, p. 1–4, 2015. ISSN 2161-1009. Disponível em: <<https://www.omicsonline.org/open-access/review-in-azo-compounds-and-its-biological-activity-2161-1009-1000169.php?aid=53163>>. Citado na página 45.
- ALMEIDA, E. J. R. de. *A indústria têxtil no Brasil: Uma revisão dos seus impactos ambientais e possíveis tratamentos para os seus efluentes*. [S.l.]: Ministério Público Federal, Brasília/DF, p. 1 - 18, 2016. Citado 3 vezes nas páginas 15, 16 e 17.
- ANDRADE, P. F. *Preparação e caracterização de nanopartículas de prata e de nanocompósitos poliméricos antimicrobianos*. [S.l.]: Tese de Doutorado – UNICAMP. Campinas, SP, 2013., 2013. Citado na página 38.
- ANDRADE, P. F. *Preparação e Caracterização de Nanopartículas de Prata e de Nanocompósitos Poliméricos Antimicrobianos*. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 2013. Disponível em: <<http://biq.iqm.unicamp.br/arquivos/teses/ficha103154.htm>>. Citado na página 21.
- ARAVIND, P. et al. An integrated (electro- and bio-oxidation) approach for remediation of industrial wastewater containing azo-dyes: Understanding the degradation mechanism and toxicity assessment. v. 318, 07 2016. Citado na página 13.
- BAFANA, A.; DEVI, S. S.; CHAKRABARTI, T. Azo dyes: past, present and the future. *Environmental Reviews*, v. 19, n. NA, p. 350–371, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1139/a11-018>>. Citado 3 vezes nas páginas 13, 16 e 19.
- BELTRAN, K. F. P. P. *Determinación de la eficacia de biomasa de cladophora sp. En la biosorción de azul metileno*. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, 2015. Disponível em: <<http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/432>>. Citado na página 17.

- BRASIL. *Decreto nº 14.250, de 05 de junho de 1981. Regulamenta dispositivos da Lei nº. 5.793, de 15 de outubro de 1980, referentes à proteção e a melhoria da qualidade ambiental.* [S.l.]: Diário Oficial do Estado, Florianópolis, SC, 09 junho 1981., 1980. Citado na página 16.
- BROWN THEODORE; LEMAY, H. E. B. B. E. *Química: a ciência central.* [S.l.: s.n.], 2005. v. 9 ed. Citado na página 26.
- BUENO, W. A. *Manual de Espectroscopia Vibracional.* [S.l.]: São Paulo: McGraw-Hill, 1990., 1990. Citado na página 42.
- CAMARA, A. M. *Corantes azo: características gerais, aplicações e toxicidade.* Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017. Disponível em: <<http://monografias.ufrn.br/jspui/handle/123456789/51178>>. Citado na página 19.
- 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. ISSN 0144-8617. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861712004560>>. Citado na página 24.
- CASANOVA. *Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis.* [S.l.]: Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo – Instituto de Química de São Carlos, 2010., 2010. Citado na página 31.
- CHOPRA, I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 59, p. 587–590, 2007. ISSN 2161-1009. Citado na página 27.
- CHUNG, K.-T. Azo dyes and human health: A review. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, Taylor Francis, v. 34, n. 4, p. 233–261, 2016. PMID: 27635691. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10590501.2016.1236602>>. Citado na página 19.
- CLSI. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 21st informational supplement (M100-S22).* [S.l.: s.n.], 2012. Citado na página 34.
- CONAMA, B. C. N. D. M. A. *Resolução CONAMA 430/2011, Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução Nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA.* Brasília, 2011. [S.l.: s.n.], 2011. Citado na página 16.
- DURAN, N. et al. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 12, n. 3, p. 789 – 799, 2016. ISSN 1549-9634. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963415006000>>. Citado na página 21.
- ELBANNA, K. et al. Microbiological, histological, and biochemical evidence for the adverse effects of food azo dyes on rats. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 25, n. 3, p. 667 – 680, 2017. ISSN 1021-9498. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949817300479>>. Citado na página 19.

- FARIA, B. E. F. de. *Produção e caracterização de nanopartículas de prata estabilizadas com polissacarídeos da goma do cajueiro: Perspectivas na papiloscopia forense*. [S.l.: s.n.], 2016. Citado na página 26.
- FLORÊNCIO, A. Estudo da atividade anti-tumoral do polissacarídeo (pju) extraído de anacardium occidentale frente a um modelo experimental do sarcoma 180. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 4, n. 1, 2007. ISSN 1808-0804. Disponível em: <<https://revistas.ufg.br/REF/article/view/2122>>. Citado na página 24.
- GARCIA, M. V. D. *Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis*. [S.l.: s.n.], 2011. Citado na página 36.
- GENTRY, S. T.; FREDERICKS, S. J.; KRCHNAVEK, R. Controlled particle growth of silver sols through the use of hydroquinone as a selective reducing agent. *Langmuir*, v. 25, n. 5, p. 2613–2621, 2009. PMID: 19203178. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/la803680h>>. Citado na página 22.
- GRASSIAN, V. H. When size really matters: Size-dependent properties and surface chemistry of metal and metal oxide nanoparticles in gas and liquid phase environments. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 112, n. 47, p. 18303–18313, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jp806073t>>. Citado na página 21.
- GUARATINI, C.; ZANONI, M. Corantes têxteis. *Química Nova*, Sociedade Brasileira de Química, v. 23, n. 1, p. 71–78, January 2000. ISSN 0100-4042. Disponível em: <<https://doaj.org/article/3333361e9f31495fb6cddac8c0b8035e>>. Citado na página 17.
- HAIDER, A.; KANG, I.-K. Preparation of silver nanoparticles and their industrial and biomedical applications: A comprehensive review. *Advances in Materials Science and Engineering*, v. 2015, p. 1–16, 03 2015. Citado na página 22.
- HOLE, P. et al. Interlaboratory comparison of size measurements on nanoparticles using nanoparticle tracking analysis (nta). *Journal of Nanoparticle Research*, v. 15, n. 12, p. 2101, Nov 2013. ISSN 1572-896X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11051-013-2101-8>>. Citado na página 40.
- HOO, C. M. et al. A comparison of atomic force microscopy (afm) and dynamic light scattering (dls) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 10, n. 1, p. 89–96, Dec 2008. ISSN 1572-896X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11051-008-9435-7>>. Citado na página 39.
- INDEX, C. *The Colour IndexTM*. [S.l.: s.n.], 2018. Citado na página 17.
- JR., M. A.-c. A. M. et al. PreparaÃ§Ãade nanopartÃculas de prata e ouro: um mÃs simples para a introduÃ§Ãada nanociÃem laboratÃde ensino. *QuÃmica Nova*, scielo, v. 35, p. 1872 – 1878, 00 2012. ISSN 0100-4042. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000900030&nrm=iso>. Citado na página 23.
- KAMAL, T.; KHAN, S. B.; ASIRI, A. M. Synthesis of zero-valent cu nanoparticles in the chitosan coating layer on cellulose microfibrils: evaluation of azo dyes catalytic reduction. *Cellulose*, v. 23, n. 3, p. 1911–1923, Jun 2016. ISSN 1572-882X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10570-016-0919-9>>. Citado na página 20.

- LALNUNHLIMI, S.; KRISHNASWAMY, V. Decolorization of azo dyes (direct blue 151 and direct red 31) by moderately alkaliphilic bacterial consortium. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 1, p. 39 – 46, 2016. ISSN 1517-8382. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1517838215000143>>. Citado na página 13.
- LIU, J.-F. et al. Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 33, p. 95–106, 03 2012. Citado na página 23.
- MELLO, V.; SUAREZ, P. As formulações de tintas expressivas através da história. *Revista Virtual de Química*, Secretaria Regional do Rio de Janeiro da Sociedade Brasileira de Química, v. 4, n. 1, p. 2–12, 2012. ISSN 19846835. Citado na página 13.
- MORAES, S. G. de; FREIRE, R. S.; DURAN, N. Degradation and toxicity reduction of textile effluent by combined photocatalytic and ozonation processes. *Chemosphere*, v. 40, n. 4, p. 369 – 373, 2000. ISSN 0045-6535. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653599002398>>. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 27.
- MOTHE, C.; CORREIA, D. Caracterização reológica de blendas de gomas cajueiro e xantana em suco [rheological characterization of blends of cashew and xanthan gum juice]. *Revista Analytica*, v. 1, p. 59–64, 01 2002. Citado 2 vezes nas páginas 24 e 26.
- MULFINGER, L. et al. Synthesis and study of silver nanoparticles. *Journal of Chemical Education*, v. 84, n. 2, p. 322, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ed084p322>>. Citado na página 23.
- MYLONAKIS, E. *Galleria mellonella* and the study of fungal pathogenesis: Making the case for another genetically tractable model host. *Mycopathologia*, v. 165, p. 1–3, 2007. Citado na página 49.
- NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Silver nanoparticles: Synthesis and therapeutic applications. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 3, p. 301–316, 12 2007. Citado na página 22.
- NASEEM, K.; BEGUM, R.; FAROOQI, Z. H. Catalytic reduction of 2-nitroaniline: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, n. 7, p. 6446–6460, Mar 2017. ISSN 1614-7499. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-016-8317-2>>. Citado 2 vezes nas páginas 14 e 21.
- NASEEM, K. et al. Removal of congo red dye from aqueous medium by its catalytic reduction using sodium borohydride in the presence of various inorganic nano-catalysts: A review. v. 187, 03 2018. Citado 2 vezes nas páginas 14 e 21.
- NETO, E. A. B. *Desenvolvimento de nanobiocompósitos contendo nanopartículas de prata para aplicações bactericidas*. [S.l.]: Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010. Citado na página 23.
- OLIVEIRA, M. S. C. et al. Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. *Acta Tropica*, v. 117, n. 3, p. 165 – 170, 2011. ISSN 0001-706X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X10002056>>. Citado na página 24.

OLIVEIRA, R. D. de. *Preparação, caracterização e aplicação de filmes LbL com nanopartículas de prata, estabilizadas em amido*. [S.l.]: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2014. Citado na página 36.

PATAKFALVI, R.; PAPP, S.; DÉKÁNY, I. The kinetics of homogeneous nucleation of silver nanoparticles stabilized by polymers. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 9, n. 3, p. 353–364, Jun 2007. ISSN 1572-896X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11051-006-9139-9>>. Citado na página 22.

PAVIA D.L., L. G.-K. G. V. J. *Introdução à Espectroscopia*. [S.l.]: Cengage Learning, 2010. Citado 2 vezes nas páginas 42 e 43.

PING, Y. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using grape seed extract and their application for reductive catalysis of direct orange 26. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 58, p. 74 – 79, 2018. ISSN 1226-086X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1226086X17304823>>. Citado na página 47.

PITOMBEIRA, N. A. et al. Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum: Characterization and evaluation as potential drug carrier. *Carbohydrate Polymers*, v. 117, p. 610 – 615, 2015. ISSN 0144-8617. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861714010005>>. Citado 2 vezes nas páginas 25 e 42.

PORTO, B. C.; CRISTIANINI, M. Evaluation of cashew tree gum (anacardium occidentale l.) emulsifying properties. *LWT - Food Science and Technology*, v. 59, n. 2, Part 2, p. 1325 – 1331, 2014. ISSN 0023-6438. 10th SLACA - Food Science Impact on Nutrition and Health. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643814001832>>. Citado na página 24.

PORTO, G. V. S. . F. M. F. M. . F. de OliveiraSilva / José Luís de Lima Filho / Ana Maria dos A. C. L. . A. L. O polissacarídeo do anacardium occidentale l. na faseinflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. *Ciência Rural*, v. 36, p. 149–154, 2006. Citado na página 24.

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. ISSN 0144-8617. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861712011277>>. Citado na página 23.

QUELEMES, P. V. et al. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles reduced and stabilized by cashew tree gum. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, v. 5, n. 8, p. 890–893, 2013. ISSN 2164-6627. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/content/asp/ asem/2013/00000005/00000008/art00020>>. Citado 3 vezes nas páginas 24, 25 e 26.

REIS, L. G. T. dos. *Aqueous Congo Red degradation induced by plasma with glow discharge electrolysis*. Universidade Federal de Viçosa, 2009. Disponível em: <<http://locus.ufv.br/handle/123456789/2078>>. Citado na página 17.

SALEM, M.; BAKR, E.; EL-ATTAR, H. G. Pt@ag and pd@ag core/shell nanoparticles for catalytic degradation of congo red in aqueous solution. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 188, 07 2017. Citado na página 47.

SARAVANAN, C. et al. Synthesis of silver nanoparticles using bacterial exopolysaccharide and its application for degradation of azo-dyes. *Biotechnology Reports*, v. 15, p. 33 – 40, 2017. ISSN 2215-017X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215017X17300516>>. Citado na página 46.

SCHUE, F. Colloids and interfaces with surfactants and polymers: an introduction. j goodwin. john wiley & sons, chichester, 2004. isbn 0-470-84143-5. pp 285. *Polymer International*, v. 53, n. 11, p. 1899–1899, 2004. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pi.1640>>. Citado na página 23.

SIGNORI, A. M. *Desenvolvimento de uma Nova Metodologia para Preparação de Nanopartículas de Prata Estabilizadas pela Polietilenoimina Funcionalizada e Aplicação na Catálise*. [S.l.: s.n.], 2010. Citado na página 26.

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, Oct 2010. Citado na página 43.

SILVA, D. A. et al. Carboxymethylation of cashew tree exudate polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, v. 58, n. 2, p. 163 – 171, 2004. ISSN 0144-8617. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861704002267>>. Citado na página 25.

SILVA, D. A. da et al. Synthesis and characterization of cashew gum/acrylic acid nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, v. 29, n. 2, p. 437 – 441, 2009. ISSN 0928-4931. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493108002154>>. Citado na página 42.

SKOOG D. A.; WEST, D. M. H. F. J. C. S. R. *Fundamentos de química analítica.8.ed.* [S.l.]: São Paulo – SP: Cengage Learning,, 2010. Citado na página 32.

SONG, K. C. et al. Preparation of colloidal silver nanoparticles by chemical reduction method. *Korean Journal of Chemical Engineering*, v. 26, n. 1, p. 153–155, Jan 2009. ISSN 1975-7220. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11814-009-0024-y>>. Citado na página 36.

STEENSMA, D. P. "congo"red: out of africa? *Journal Article*, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11175644>>. Citado na página 20.

SUÁREZ, J. F. M. *Comportamiento electroquímico de colorantes antraquinónicos, azul de metileno, y compuestos afines en solución de solventes no-acuosos*. Tese (Doutorado), 2017. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10915/60850>>. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 17.

T NESTOR J, C.-T. M. S. R. T. Emulsões: correlação da estabilidade física de longo prazo com medições reológicas de curto prazo. *Cosmetics Toiletries*, v. 19, p. 60–65, 2007. Citado na página 24.

TORQUATO, D. et al. Evaluation of antimicrobial activity of cashew tree gum. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 20, p. 505–507, 07 2004. Citado na página 48.

TOSHIMA, N. metal nanoparticles for catalysis. *nanoscale materials*, p. 70–96, 2007. Citado na página 22.

VEISI, H.; AZIZI, S.; MOHAMMADI, P. Green synthesis of the silver nanoparticles mediated by thymra spicata extract and its application as a heterogeneous and recyclable nanocatalyst for catalytic reduction of a variety of dyes in water. *Journal of Cleaner Production*, v. 170, p. 1536 – 1543, 2018. ISSN 0959-6526. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652617322321>>. Citado na página 33.

VERTELOV, G. K. et al. A versatile synthesis of highly bactericidal myramistin® stabilized silver nanoparticles. *Nanotechnology*, v. 19, n. 35, p. 355707, 2008. Disponível em: <<http://stacks.iop.org/0957-4484/19/i=35/a=355707>>. Citado na página 38.

WONG, K. K. Y.; LIU, X. Silver nanoparticles—the real “silver bullet” in clinical medicine? *Med. Chem. Commun.*, The Royal Society of Chemistry, v. 1, p. 125–131, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C0MD00069H>>. Citado na página 48.

ZAMPA, M. F. et al. Natural gum-assisted phthalocyanine immobilization in electroactive nanocomposites: physicochemical characterization and sensing applications. *Biomacromolecules*, v. 8, n. 11, p. 3408–3413, 2007. PMID: 17939712. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/bm700528u>>. Citado na página 23.

ZHANG, H.; LI, X.; CHEN, G. Ionic liquid-facilitated synthesis and catalytic activity of highly dispersed ag nanoclusters supported on tio2. *J. Mater. Chem.*, The Royal Society of Chemistry, v. 19, p. 8223–8231, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/B910610C>>. Citado na página 47.

ZHANG, J. Z.; NOGUEZ, C. Plasmonic optical properties and applications of metal nanostructures. *Plasmonics*, v. 3, n. 4, p. 127–150, Dec 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11468-008-9066-y>>. Citado na página 22.

ZHENG, Y.; WANG, A. Ag nanoparticle-entrapped hydrogel as promising material for catalytic reduction of organic dyes. *J. Mater. Chem.*, The Royal Society of Chemistry, v. 22, p. 16552–16559, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C2JM32774K>>. Citado na página 45.

A APÊNDICE-A

Imagens dos grupos de larvas de *Galleria mellonella* utilizadas no teste de toxicidade *in vivo* das substâncias utilizadas neste trabalho durante o primeiro dia de teste.



Figura 21 – Grupo de larvas *Galleria mellonella* utilizadas para o teste de toxicidade *in vivo* inoculadas com solução salina (PBS) como controle da reação.



Figura 22 – Grupo de larvas *Galleria mellonella* utilizadas para o teste de toxicidade *in vivo* inoculadas com GC-AgNPs.



Figura 23 – Grupo de larvas *Galleria mellonella* utilizadas para o teste de toxicidade *in vivo* inoculadas com GCA-AgNPs.



Figura 24 – Grupo de larvas *Galleria mellonella* utilizadas para o teste de toxicidade *in vivo* inoculadas com GCC-AgNPs.



Figura 25 – Grupo de larvas *Galleria mellonella* utilizadas para o teste de toxicidade *in vivo* inoculadas com a solução do corante vermelho congo.



Figura 26 – Grupo de larvas *Galleria mellonella* utilizadas para o teste de toxicidade *in vivo* inoculadas com a solução resultante da degradação do vermelho congo utilizando as AgNPs como catalisador.