



**ISEL**

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

# **Nanopontos de Carbono Fluorescentes a partir de Biomassa de Microalgas: síntese, caracterização e atividade biológica**

**MARIA INÊS VILAR CHOUZENDE**  
(Licenciada em Biotecnologia)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre  
em Engenharia Química e Biológica - Perfil Bioprocessos

Orientadores:

Doutora Alexandra Isabel Martins Paulo da Costa  
Doutora Sónia Alexandra de Almeida Martins

Júri:

Presidente: Doutor Nelson Alberto Frade da Silva

Vogais:

Doutora Liliana Marques Martelo  
Doutora Ana Maria Barreiros  
Doutora Alexandra Isabel Martins Paulo da Costa

Novembro 2023





**ISEL**

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

# **Nanopontos de Carbono Fluorescentes a partir de Biomassa de Microalgas: síntese, caracterização e atividade biológica**

**MARIA INÊS VILAR CHOUZENDE**  
(Licenciada em Biotecnologia)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre  
em Engenharia Química e Biológica - Perfil Bioprocessos

Orientadores:

Doutora Alexandra Isabel Martins Paulo da Costa  
Doutora Sónia Alexandra de Almeida Martins

Júri:

Presidente: Doutor Nelson Alberto Frade da Silva

Vogais:

Doutora Liliana Marques Martelo  
Doutora Ana Maria Barreiros  
Doutora Alexandra Isabel Martins Paulo da Costa

Novembro 2023



## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Alexandra Costa, orientadora deste trabalho quero expressar o meu agradecimento por toda a ajuda, conhecimento transmitido, dedicação incansável e constante disponibilidade que ofereceu durante a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Sónia Martins, orientadora deste trabalho, pela ajuda e disponibilidade ao longo deste trabalho.

À Professora Doutora Patrícia Barata e Professora Doutora Magda Semedo, pela ajuda e disponibilidade durante todo o trabalho.

Ao Doutor Fernando Cardoso, pela disponibilidade e ajuda na realização dos estudos de citotoxicidade no Grupo de Protozoários Oportunistas /VIH e Outros Protozoários, UEI de Parasitologia Médica do IHMT/UNL.

À Doutora Maria Luísa Lobo, pelo seu apoio e disponibilidade na realização dos ensaios de microscopia de fluorescência no Grupo de Protozoários Oportunistas /VIH e Outros Protozoários, UEI de Parasitologia Médica do IHMT/UNL.

Ao Professor Doutor Miguel Fernandes pela ajuda na realização dos ensaios de microscopia de força atómica acessórios à caracterização morfológica dos NPsC, que integra o Grupo de Investigação Aplicada em Microeletrónica, Optoelectrónica e Sensores (GIAMOS) do ISEL.

Ao Instituto Politécnico de Lisboa pelo financiamento concedido através do projeto IPL/IDI&CA\_2022/ $\mu$ Algae2Dots\_ISEL (Utilização de Microalgas na Síntese de Pontos de Carbono Bioactivos).

À Allmicroalgae-Natural Products, S.A. pelo fornecimento da biomassa da microalga.

Ao Departamento de Engenharia Química, Laboratório de Química Orgânica e Laboratório de Biotecnologia do ISEL.

Aos meus amigos, Rúben, Jojo (João), Miguel, Gonçalo (Caré), Gabriel, Andreia, Tiago, Beatriz, Joana, Catarina agradeço todo apoio, incentivo e motivação constante. À Inês e Catarina pela vossa ajuda, apoio e pelas horas de almoço passadas, que melhoravam sempre os dias. Ao Bruno Antunes e Rita Marçalo, pela sua valiosa ajuda e por terem partilhado comigo conhecimentos preciosos ao longo deste trabalho.

Aos meus pais e irmão, por terem sempre acreditado em mim e por todo o apoio e carinho incondicional desde sempre, sem vocês nada disto seria possível.



## Resumo

Esta dissertação apresenta a síntese de Nanopontos de Carbono (NPsC) luminescentes realizada por métodos sustentáveis, utilizando como fonte de carbono a biomassa e uma cultura de *Porphyridium cruentum*, uma microalga vermelha marinha muito utilizada industrialmente devido às suas características únicas.

Os NPsC obtidos foram submetidos a processos de purificação, incluindo filtração e extração líquido-líquido e caracterizados estruturalmente por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e ressonância magnética nuclear de próton (RMN  $^1\text{H}$ ). As suas propriedades fotofísicas foram analisadas utilizando técnicas de espectroscopia de absorção no estado fundamental (UV-Vis) e fluorescência de estado estacionário. A análise morfológica por microscopia de força atômica (AFM) foi também realizada para NPsC previamente selecionados.

Os NPsC foram avaliados quanto à bioatividade, tendo sido estudadas as suas atividades antioxidante e antimicrobiana, bem como a sua citotoxicidade em diversas linhas celulares. Em paralelo, foi analisada por microscopia de fluorescência a interação de alguns NPsC com células animais e humanas (Vero, 3T3, HeLa e S180).

Os NPsC sintetizados a partir da biomassa seca de *P. cruentum* por carbonização hidrotérmica com aquecimento convencional, apresentaram maiores rendimentos quânticos de fluorescência, comparativamente aos obtidos quer a partir da cultura da microalga, quer a partir da biomassa húmida. Por outro lado, o tratamento hidrotérmico da biomassa húmida produziu NPsC que revelaram uma maior bioatividade, exibindo tanto ação bacterioestática, como bactericida para *E. coli* e *S. aureus*, embora com atividade antioxidante moderada. Na generalidade, os NPsC produzidos não revelaram citotoxicidade para as linhas celulares testadas até  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , propriedade fundamental para aplicações biológicas.

O recurso a microscopia de fluorescência permitiu visualizar a presença dos NPsC no interior das células animais e humanas em estudo.

**Palavras-chave:** Nanopontos de carbono; microalgas; fluorescência; atividade antioxidante; citotoxicidade

## Abstract

This dissertation presents the synthesis of luminescent Carbon Nanodots (CNDs) through sustainable methods, using biomass and a culture of *Porphyridium cruentum*, a marine red microalga widely used industrially due to its unique characteristics, as carbon sources.

The obtained CNDs were subjected to purification processes, including filtration and liquid-liquid extraction, and were structurally characterized by Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR) and proton nuclear magnetic resonance (NMR  $^1\text{H}$ ). Its photophysical properties were analyzed using ground-state absorption spectroscopy (UV-Vis) and steady-state fluorescence techniques. Morphological analysis by atomic force microscopy (AFM) was also performed for previously selected NPsC.

The CNDs were evaluated for their bioactivity, and their antioxidant and antimicrobial activities were studied, as well as their cytotoxicity in several cell lines. In parallel, the interaction of some NPsC with animal cells (Vero, 3T3, HeLa and S180) was analyzed by fluorescence microscopy.

The CNDs synthesized from the dried biomass of *P. cruentum* by hydrothermal carbonization with conventional heating showed higher quantum yields compared to those obtained from microalgae culture or wet biomass. On the other hand, hydrothermal treatment of the wet biomass produced NPsC that showed greater bioactivity, exhibiting both bacteriostatic and bactericidal action for *E. coli* and *S. aureus*, although with moderate antioxidant activity. In general, the NPsC produced showed no cytotoxicity for the cell lines tested up to  $2000\ \mu\text{g mL}^{-1}$ , a fundamental property for biological applications.

The use of fluorescence microscopy made it possible to visualize the presence of the NPsC inside the animal and human cells under study.

**Keywords:** Carbon nanodots; microalgae; fluorescence; antioxidant activity; cytotoxicity

## **Divulgação Científica**

Da presente tese de mestrado resultaram as seguintes publicações científicas:

### **Comunicações em Conferências (Comunicações em Painel)**

1. Chouzende, I.; Costa, A.I.; Barata, P.D.; Semedo, M.C.; Martins, S.; Prata, J.V. “Utilização de Microalgas na Síntese de Pontos de Carbono Bioativos”, 9º Fórum de Engenharia Química e Biológica (iFEQB’23), 16-19 maio 2023, ISEL, Lisboa, Portugal.
2. Marques, C.; Ferrer, V.; Pratas, R.; Chouzende, I.; Antunes, B.G.; Costa, A.I. “Síntese de Materiais de Carbono Luminescentes a partir de Microalgas”, 9º Fórum de Engenharia Química e Biológica (iFEQB’23), 16-19 maio 2023, ISEL, Lisboa, Portugal.
3. Chouzende, I.; Costa, A.I.; Barata, P.D.; Semedo, M.C.; Martins, S.; Cardoso, F.M.H., Prata, J.V. “Green Synthesis of Luminescent Carbon Nanomaterials from *Porphyridium cruentum* Microalgae”, I Internacional Meeting Molecules4Life 2023, 20-22 setembro 2023, UTAD, Vila Real, Portugal.
4. Chouzende, I.; Costa, A.I.; Barata, P.D.; Semedo, M.C.; Martins, S.; Cardoso, F.M.H., Lobo, M.L., Prata, J.V. “Síntese de Pontos de Carbono Fluorescentes assistida por Microondas a partir da Biomassa da Microalga *Porphyridium cruentum*”, XXVII Encontro Luso-Galego de Química, 22-24 novembro 2023, Fundação Dr. António Cupertino de Miranda, Porto, Portugal.

### **Comunicações em Conferências (Comunicação Oral)**

Chouzende, I.; Costa, A.I.; Barata, P.D.; Semedo, M.C.; Martins, S.; Prata, J.V. “Utilização de Microalgas na Síntese de Pontos de Carbono Bioativos”, 9º Fórum de Engenharia Química e Biológica (iFEQB’23), 16-19 maio 2023, ISEL, Lisboa, Portugal.

### **Comunicações em Atas de Conferências**

1. Chouzende, I.; Costa, A.I.; Barata, P.D.; Semedo, M.C.; Martins, S.; Cardoso, F.M.H., Lobo, M.L.; Prata, J.V., “Green Synthesis of Luminescent Carbon Nanomaterials from *Porphyridium cruentum* Microalgae”, I International Meeting Molecules4Life, 20-22 setembro 2023 (Proceeding in *Medical Sciences Forum* (<https://doi.org/10.3390/msf2023023003>)).
2. Chouzende, I.; Costa, A.I.; Barata, P.D.; Semedo, M.C.; Martins, S.; Cardoso, F.M.H., Lobo, M.L.; Prata, J.V., “Carbon Dots from *Porphyridium cruentum* Microalgae by High-efficient Hydrothermal Approaches: Biocompatibility and Antioxidant Capabilities”, 27<sup>th</sup> International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, 15-30 novembro

2023\_online (Proceeding in *Chemistry Proceedings* (<https://doi.org/10.3390/ecsoc-27-16074>)).

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Cultura de <i>Porphyridium cruentum</i> (Culture Collection of Algae (SAG)).....	6
<b>Figura 2</b> - Reação de redução do radical ABTS (adaptado de Rodríguez <i>et al.</i> <sup>38</sup> ).....	11
<b>Figura 3</b> - Reação de redução do radical DPPH. RH = molécula antioxidante, R = radical antioxidante (adaptado de Liang <i>et al.</i> <sup>39</sup> ).....	12
<b>Figura 4</b> - Reação da capacidade quelante dos íões Fe <sup>2+</sup> (adaptado de Canabady-rochelle <i>et al.</i> <sup>35</sup> ).....	13
<b>Figura 5</b> - Diferentes categorias de Pontos de Carbono (adaptado de Ozyurt <i>et al.</i> <sup>53</sup> ).....	14
<b>Figura 6</b> - Estratégias para a formação de NPsC a partir de diferentes fontes de carbono (adaptado de Anuar <i>et al.</i> <sup>52</sup> ).....	15
<b>Figura 7</b> - Método bottom-up na produção de NPsC (adaptado de Ozyurt <i>et al.</i> <sup>53</sup> ).....	16
<b>Figura 8</b> - Método top-down na produção de PsC (adaptado de Ozyurt <i>et al.</i> <sup>53</sup> ).....	17
<b>Figura 9</b> - Espectros de FTIR da cultura de <i>P. cruentum</i> em pastilha de KBr.....	36
<b>Figura 10</b> - Espectros de FTIR da biomassa de <i>P. cruentum</i> antes e após lavagem em pastilha de KBr.....	36
<b>Figura 11</b> - Espectros de FTIR dos NPsC a diferentes temperaturas em pastilha de KBr.....	38
<b>Figura 12</b> - Espectros de FTIR das frações orgânicas e da dispersão aquosa em pastilha de KBr.....	46
<b>Figura 13</b> - Intensidade de fluorescência das frações eluídas da coluna com Sephadex G75.....	47
<b>Figura 14</b> - Espectros de UV-Vis (linha cinza), emissão (linha laranja; $\lambda_{exc}=340$ nm) e excitação (linha azul; monitorizado a 435 nm) de uma dispersão aquosa 0.1 mgmL <sup>-1</sup> NPsC obtidos a partir de BS_Porphy.cr.....	48
<b>Figura 15</b> - Espectros de emissão de dispersões aquosas 0.1 mgmL <sup>-1</sup> de NPsC com excitação a diferentes comprimentos de onda (300 a 400 nm), obtidos a partir da BS_Porphy.cr.....	49
<b>Figura 16</b> - NPsC em dispersão aquosa sob luz natural <b>(A)</b> ; NPsC em dispersão aquosa sob lâmpada UV ( $\lambda =366$ nm) <b>(B)</b> .....	49
<b>Figura 17</b> - Variação da fotoluminescência ( $\lambda_{exc}= 340$ nm; monitorizado a 430 nm) da dispersão aquosa de NPsC 0.1mgmL <sup>-1</sup> , obtidos da C_Porphy.cr.....	50
<b>Figura 18</b> - Espectros de emissão de dispersão aquosa (0.1 mgmL <sup>-1</sup> ) de NPsC ( $\lambda_{em} = 425$ nm) após 1 hora de irradiação contínua ( $\lambda_{exc}= 340$ nm).....	51
<b>Figura 19</b> - Espectros de FTIR dos NPsC obtidos da BS_Porphy.cr. e da BS_APL_Porphy.cr. em pastilha de KBr.....	51
<b>Figura 20</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H dos NPsC obtidos a partir de biomassa de Porphy.cr. (D <sub>2</sub> O); *solvente residual.....	52
<b>Figura 21</b> - Imagem obtida por AFM dos NPsC sintetizados a partir da C_Porphy.cr. <b>(A)</b> e representação da variação de tamanho das partículas <b>(B)</b> .....	53
<b>Figura 22</b> - Imagem obtida por AFM dos NPsC sintetizados a partir da BS_Porphy.cr. <b>(A)</b> e representação da variação de tamanho das partículas <b>(B)</b> .....	54

<b>Figura 23</b> – Imagem obtida por AFM dos NPsC obtidos a partir da BS_Porphy.cr. por carbonização assistida por irradiação microondas (A) e representação da variação de tamanho das partículas (B). .....	54
<b>Figura 24</b> - Atividade antioxidante em percentagem de inibição dos NPsC. ....	55
<b>Figura 25</b> - Capacidade Quelante de iões Fe <sup>2+</sup> para NPsC. ....	57
<b>Figura 26</b> - Resultados dos ensaios de difusão em disco, após incubação das culturas bacterianas com NPsC obtidos de BS_Porphy.cr. (100, 500 e 1000 µg). Controlos: GNT (10 µg) e W. ....	58
<b>Figura 27</b> - Resultados dos ensaios de difusão em disco, após incubação das culturas bacterianas com NPsC obtidos de BS_APL_Porphy.cr. (100, 500 e 1000 µg). Controlos: GNT (10 µg) e W. ....	58
<b>Figura 28</b> - Resultados dos ensaios de difusão em disco, após incubação das culturas bacterianas com NPsC_Mw_15 (100, 500 e 1000 µg). Controlos: GNT (10 µg) e W. ....	59
<b>Figura 29</b> - Resultados dos ensaios de difusão em disco, após incubação das culturas bacterianas com NPsC_Mw_30 (100, 500 e 1000 µg). Controlos: GNT (10 µg) e W. ....	59
<b>Figura 30</b> - Viabilidade de <i>E. coli</i> avaliada pelo método colorimétrico da resazurina, após incubação de diferentes concentrações de NPsC obtidos a partir de BH_Porphy.cr. ....	61
<b>Figura 31</b> – Viabilidade de <i>S. aureus</i> avaliada pelo método colorimétrico da resazurina, após incubação de diferentes concentrações de NPsC obtidos a partir de BH_Porphy.cr. ....	61
<b>Figura 32</b> - Viabilidade de <i>E. coli</i> avaliada pelo método colorimétrico da resazurina, após incubação de diferentes concentrações de NPsC obtidos a partir de BH_APL_Porphy.cr. ....	62
<b>Figura 33</b> - Viabilidade de <i>S. aureus</i> avaliada pelo método colorimétrico da resazurina, após incubação de diferentes concentrações de NPsC obtidos a partir de BH_APL_Porphy.cr. ....	63
<b>Figura 34</b> - Citotoxicidade <i>in vitro</i> dos NPsC_C_Porphy.cr. a 250 °C durante 6h (a) e durante 4 h (b) e com NPsC_BH_Porphy.cr. (c) na linha celular 3T3. ....	65
<b>Figura 35</b> - Citotoxicidade <i>in vitro</i> dos NPsC_C_Porphy.cr. a 250 °C durante 6h (a) e durante 4 h (b) e com NPsC_BH_Porphy.cr. (c) na linha celular S180. ....	66
<b>Figura 36</b> - Citotoxicidade <i>in vitro</i> dos NPsC_C_Porphy.cr. a 250 °C durante 6h (a) e durante 4 h (b) na linha celular HeLa. ....	67
<b>Figura 37</b> - Citotoxicidade <i>in vitro</i> dos NPsC_C_Porphy.cr. a 250 °C durante 6h (a) e durante 4 h (b) e com NPsC_BH_Porphy.cr. (c) na linha celular Vero. ....	68
<b>Figura 38</b> - Citotoxicidade <i>in vitro</i> dos NPsC_CHMw_200 a 200 °C durante 1h nas linhas celulares 3T3 (a), S180 (b) e Vero (c). ....	69
<b>Figura 39</b> - Imagens de microscopia de fluorescência dos NPsC_C_Porphy.cr. na presença de células HeLa e respetivos controlos (ampliação 400x). ....	70
<b>Figura 40</b> - Imagens de microscopia de fluorescência dos NPsC_C_Porphy.cr. na presença de células Vero e respetivos controlos (ampliação 400x). ....	71
<b>Figura 41</b> - Imagens de microscopia de fluorescência dos NPsC_C_Porphy.cr. na presença de células S180 e respetivos controlos (ampliação 400x). ....	71

**Figura 42** - Imagens de microscopia de fluorescência dos NPsC\_C\_Porphy.cr. na presença de células 3T3 e respetivos controlos (ampliação 400x). ..... 72

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Aplicações da biomassa e de compostos bioativos extraídos de <i>P. cruentum</i> (adaptado de Tsvetanova <i>et al.</i> <sup>8</sup> ).....	6
<b>Tabela 2</b> - Quantificação dos sólidos totais dos lotes da cultura de <i>P. cruentum</i> .....	31
<b>Tabela 3</b> - Teor de cinzas na cultura de <i>P. cruentum</i> .....	31
<b>Tabela 4</b> - Teor de lípidos presentes na cultura de <i>P. cruentum</i> .....	32
<b>Tabela 5</b> - Compostos bioativos presentes no sobrenadante de <i>P. cruentum</i> .....	33
<b>Tabela 6</b> - Compostos bioativos presentes nas frações de MSE obtidas a partir da biomassa de <i>P. cruentum</i> .....	33
<b>Tabela 7</b> - Teores de flavonoides totais e compostos fenólicos nos sobrenadantes da cultura de <i>P. cruentum</i> .....	34
<b>Tabela 8</b> - Teores de flavonoides e compostos fenólicos das frações obtidas na extração MSE da biomassa de <i>P. cruentum</i> .....	34
<b>Tabela 9</b> - Teores de flavonoides e compostos fenólicos no sobrenadante e biomassa de <i>P. cruentum</i> .....	34
<b>Tabela 10</b> - Efeito da temperatura no rendimento quântico e mássico dos NPsC. <sup>a)</sup> .....	38
<b>Tabela 11</b> - Efeito do tempo de reação e da temperatura no rendimento quântico e mássico dos NPsC. <sup>a)</sup> .....	39
<b>Tabela 12</b> - Efeito da natureza do aditivo no rendimento quântico e mássico dos NPsC. <sup>a)</sup> .....	39
<b>Tabela 13</b> - Efeito da quantidade de ED no rendimento quântico e mássico dos NPsC. <sup>a)</sup> .....	40
<b>Tabela 14</b> - Ensaio em duplicado para diferentes rúcios mássicos de ED <sup>a)</sup> .....	41
<b>Tabela 15</b> - Efeito da natureza da atmosfera nas características dos NPsC.....	41
<b>Tabela 16</b> - Efeito da origem da matéria-prima no rendimento quântico e mássico dos NPsC.....	42
<b>Tabela 17</b> - Efeito do tempo de reação no rendimento quântico e mássico dos NPsC obtidos por CHMW_10 <sup>a)</sup> .....	42
<b>Tabela 18</b> - Efeito do tempo de reação no rendimento quântico e mássico dos NPsC obtidos por CHMW_30 <sup>a)</sup> .....	43
<b>Tabela 19</b> - Efeito da quantidade de ED no rendimento quântico e mássico dos NPsC por CHMW_10 <sup>a)</sup> .....	43
<b>Tabela 20</b> - Efeito do tempo de reação no rendimento quântico e mássico dos NPsC obtidos por CHMW <sub>D</sub> . <sup>a)</sup> .....	44
<b>Tabela 21</b> - Efeito do rúcio de ED na síntese de NPsC em mufla. <sup>a)</sup> .....	44
<b>Tabela 22</b> - Quantificação teor de cinzas totais dos NPsC sintetizados a partir C_Porphy.cr. ..	45
<b>Tabela 23</b> - Quantificação teor de cinzas dos NPsC sintetizados a partir da biomassa de <i>P. cruentum</i> .....	45
<b>Tabela 24</b> - Atividade antioxidante dos NPsC.....	56
<b>Tabela 25</b> - Valores de MIC e MLC para os NPsC sintetizados a partir da biomassa de <i>P. cruentum</i> .....	60

## Glossário, Símbolos e Abreviaturas

### A

---

ABTS	<i>2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)</i> (2,2'-Azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
Abs	Absorção
AcOEt	Acetato de etilo

### B

---

BH_ <i>Porphy.cr</i>	Biomassa de <i>Porphyridium cruentum</i>
S_MSE_ <i>Porphy.cr</i>	Somatório das frações obtidas na extração MSE
BS_ <i>Porphy.cr</i>	Biomassa seca de <i>Porphyridium cruentum</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina de soro bovino)

### C

---

ca.	Quantidade aproximada
C_ <i>Porphy.cr</i>	Cultura de <i>Porphyridium cruentum</i>

### D

---

DPPH	<i>2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl</i> (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo)
------	--

### E

---

EAG	Equivalentes de ácido gálico
EAU	Extração assistida por ultrassons
EC	Equivalentes de catequina
ED	Etilenodiamina
em	Emissão
EPS	<i>Extracellular polysaccharides</i> (Polissacáridos extracelulares)
ET	Equivalentes de trolox
<i>et al.</i>	<i>Et alia</i> (origem do latim, referência a outros)
exc	Excitação

**F**

---

FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (Soro bovino fetal)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Autoridade Reguladora do Medicamento dos Estados Unidos)
FHCI	Fração de extração MSE com solução aquosa de ácido clorídrico 0.6 M
FL	Fotoluminescência
FNaOH	Fração de extração MSE com solução aquosa de hidróxido de sódio 1M
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (Especetroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier)
FKOH	Fração de extração MSE com solução aquosa de hidróxido de potássio 1M
FW1	Fração de extração MSE com água à temperatura ambiente
FW2	Fração de extração MSE com água em ebulição

**L**

---

LD50	<i>Medium Lethal Dose</i> (Dose letal média)
LED	<i>Light emission diode</i> (Díodo emissor de luz)

**M**

---

MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i> (Concentração mínima inibitória)
ML	Melamina
MLC	<i>Minimal Lethal Concentration</i> (Concentração mínima letal)
MSE	Multi-Step Extraction (Método de extração fracionada em 5 etapas)
MTT	<i>(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)</i> (Brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
Mw	<i>Microwaves</i> (Microondas)
MHB	<i>Mueller Hinton Broth</i> (Caldo Mueller Hinton)
MHA	<i>Mueller Hinton Agar</i> (Agar Mueller Hinton)

**N**

---

n.d.	Não detetado
------	--------------

NMsC	Nanomateriais de Carbono
NPsC	Nanopontos de Carbono
NPs	Nanopartículas
<b>O</b>	
<hr/>	
<i>o</i> -PD	<i>orto-phenylenediamine</i> ( <i>orto-fenilenodiamina</i> )
<b>P</b>	
<hr/>	
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (Tampão fosfatos salino)
PS	Polissacáridos Sulfatados
PsC	Pontos de Carbono
PQsG	Pontos Quânticos de Grafeno
PQsC	Pontos Quânticos de Carbono
PsPC	Pontos de Polímero Carbonizados
<i>p</i> -PD	<i>para-phenylenediamine</i> ( <i>para-fenilenodiamina</i> )
<b>R</b>	
<hr/>	
RMN <sup>1</sup> H	(Espectroscopia de) Ressonância Magnética Nuclear de Protão
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies reativas de oxigênio)
<b>S</b>	
<hr/>	
1_SB_ <i>Porphy.cr</i>	Primeiro lote de sobrenadante da cultura de <i>Porphyridium cruentum</i>
2_SB_ <i>Porphy.cr</i>	Segundo lote de sobrenadante da cultura de <i>Porphyridium cruentum</i>
ST	Sólidos totais
<b>T</b>	
<hr/>	
TS	Teor de sólidos
<b>U</b>	
<hr/>	
UV	(Espectroscopia de) Ultravioleta
UV-Vis	(Espectroscopia de) Ultravioleta-visível
UFC	Unidades Formadoras de Colónias

V

---

vs.

*versus*

**Símbolos**

---

$\lambda$  Comprimento de onda

$\nu$  Número de onda

$\Phi_F$  Rendimento quântico

## Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo .....	iii
Abstract .....	iv
Divulgação Científica .....	v
Índice de Figuras .....	vii
Índice de Tabelas .....	x
Glossário, Símbolos e Abreviaturas .....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1    Preâmbulo .....	3
1.2    Microalgas .....	4
1.3    Microalgas Vermelhas .....	4
1.4    Extração de Compostos Bioativos a partir de Microalgas .....	7
1.5    Métodos de Doseamento de Compostos Bioativos.....	8
1.5.1    Métodos Colorimétricos .....	8
1.5.2    Capacidade Antioxidante .....	10
1.6    Nanomateriais de Carbono .....	13
1.6.1    Métodos de Síntese.....	14
1.6.2    Funcionalização da Superfície e Dopagem.....	17
1.6.3    Propriedades Fotofísicas e Óticas .....	19
1.6.4    Propriedades Biológicas .....	20
1.6.5    Aplicações .....	21
1.7    Síntese de Nanomateriais de Carbono a partir de Microalgas .....	25
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
2.1    Preâmbulo.....	30
2.2    Caracterização da Matéria-Prima (Cultura de <i>P. cruentum</i> ) .....	31
2.2.1    Quantificação de Sólidos Totais .....	31
2.2.2    Quantificação do Teor de Cinzas Totais .....	31
2.2.3    Quantificação do Teor de Lípidos.....	31

2.2.4	Quantificação dos Compostos Bioativos presentes na cultura de <i>P. cruentum</i> .....	32
2.2.5	Caracterização Estrutural .....	35
2.3	Síntese e Caracterização de NPsC a partir da Microalga <i>P. cruentum</i> .....	37
2.3.1	Síntese por Carbonização Hidrotérmica com Aquecimento Convencional... ..	37
2.3.2	Carbonização Hidrotérmica Assistida por Irradiação Microondas.....	42
2.3.3	Purificação de Nanomateriais de Carbono.....	44
2.3.4	Propriedades Fotofísicas dos NPsC .....	47
2.3.5	Caracterização Estrutural .....	51
2.3.6	Avaliação da Bioatividade dos NPsC .....	55
3.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	73
3.1	Preâmbulo.....	75
3.2	Reagentes, Material Biológico, Técnicas Gerais e Equipamento .....	77
3.3	Microalga <i>Porphyridium cruentum</i> .....	79
3.3.1	Caracterização Estrutural .....	79
3.3.2	Quantificação de Sólidos Totais .....	79
3.3.3	Quantificação de Cinzas.....	79
3.3.4	Extração de Compostos Bioativos da <i>P. cruentum</i> .....	79
3.3.5	Quantificação de Lípidos .....	80
3.3.6	Doseamento de Polissacáridos .....	81
3.3.7	Doseamento de Proteína Total.....	82
3.3.8	Avaliação da Capacidade Antioxidante .....	82
3.4	Síntese e Purificação dos NPsC.....	84
3.4.1	Síntese de NPsc a partir da Cultura de <i>P. cruentum</i> por Aquecimento Convencional.....	84
3.4.2	Síntese dos NPsc a partir da Biomassa húmida/seca de <i>P. cruentum</i> por Aquecimento Convencional .....	84
3.4.3	Síntese de NPsC a partir da Biomassa Seca por Irradiação Assistida por Microondas .....	85

3.4.4	Purificação de NPsC por Extração Líquido-Líquido.....	85
3.4.5	Purificação de NPsC por Sephadex G75.....	85
3.5	Avaliação da Bioatividade dos NPsC .....	86
3.5.1	Atividade Antimicrobiana .....	86
3.5.2	Avaliação da Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	87
3.5.3	Marcação Celular com NPsC por Microscopia de Fluorescência .....	87
4.	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS .....	89
5.	REFERÊNCIAS .....	91

# 1. INTRODUÇÃO



## 1.1 Preâmbulo

Neste trabalho é apresentada a síntese de nanopontos de carbono (NPsC) obtidos a partir de *Porphyridium cruentum*, uma microalga vermelha que tem despertado bastante interesse na comunidade científica, devido à sua capacidade de produzir diversos compostos bioativos, com aplicação comprovada em áreas muito distintas, nomeadamente nas indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica.

Neste capítulo, será realizado um enquadramento sobre a origem, classificação, composição química e principais aplicações das microalgas. Os métodos mais comuns para o isolamento de biocompostos com valor acrescentado serão igualmente apresentados.

Na vertente da síntese de NPsC, um dos objetivos deste trabalho, será realizada uma revisão bibliográfica dos diferentes tipos de nanoestruturas de carbono e dos métodos de síntese mais comuns utilizados na sua obtenção. Serão também apresentadas as suas propriedades fotofísicas e as áreas de aplicação mais representativas.

De forma a contextualizar a matéria-prima utilizada na síntese dos NPsC, será feita uma breve abordagem sobre a importância e a valorização da biomassa, produzida por microalgas, na vertente da nanotecnologia.

## 1.2 Microalgas

As microalgas são organismos unicelulares, fotossintéticos, com células do tipo eucariota, que vivem numa grande variedade de ambientes aquáticos, incluindo oceanos, lagos, rios e até superfícies terrestres húmidas. No grupo das microalgas, são frequentemente incluídas as cianobactérias, embora seja uma questão controversa junto da comunidade científica, atendendo às diferenças na sua estrutura celular.<sup>1</sup> As microalgas têm várias formas, tamanhos e cores devido à presença de diferentes pigmentos. Como produtores primários, formam a base das cadeias alimentares aquáticas, fornecendo nutrientes essenciais e energia para uma gama diversificada de organismos, desde o zooplâncton até aos mamíferos marinhos.<sup>1,2</sup> Através da fotossíntese, as microalgas também contribuem significativamente para a produção de oxigénio, libertando quase metade do oxigénio do planeta Terra para a atmosfera.<sup>1,2</sup>

Estes microrganismos vivem em *habitats* naturais complexos e adaptam-se facilmente a condições adversas designadamente a alterações de salinidade, temperatura, nutrientes e à radiação ultravioleta. Neste contexto, podem produzir uma grande variedade de metabolitos de elevado interesse (com novas estruturas e atividades biológicas que, em geral, são inexistentes noutros organismos). Desconhece-se quantas espécies de microalgas existem, estimando-se que o seu número varie entre muitas centenas de milhar a vários milhões, sendo que até 2019, somente 30000 espécies estavam documentadas, e destas, apenas uma pequena percentagem pode ser mantida viva em cultura, pelo que, só o cultivo de algumas se tornou viável comercialmente.<sup>1,2,3</sup>

A versatilidade das microalgas tornou-as objeto de interesse em vários campos de investigação e também na vertente industrial. A comunidade científica tem vindo a explorar as suas potenciais aplicações em biotecnologia, na produção de biocombustíveis, na indústria alimentar, no tratamento de águas residuais, nas indústrias farmacêutica e cosmética. A elevada taxa de crescimento das microalgas, o seu alto teor de lípidos e a capacidade de se desenvolverem em diversos ambientes, tornam-nas candidatas muito atrativas para o (bio)processamento sustentável.<sup>2,4,5</sup>

O desenvolvimento tecnológico aliado ao cada vez mais aprofundado conhecimento sobre as microalgas e às suas potenciais aplicações, permitirá desenvolver processos otimizados e sustentáveis, direcionados para uma economia circular.<sup>4</sup>

## 1.3 Microalgas Vermelhas

As micro e macroalgas podem ser divididas em classes, de acordo com a sua composição em pigmentos, nomeadamente, *Phaeophyceae* (algas castanhas), *Chlorophyceae* (algas verdes), *Pyrophyceae* (dinoflagelados), *Bacillariophyceae*

(diatomáceas), *Chrysophyceae* (algas douradas) e *Rhodophyceae* (algas vermelhas). As microalgas vermelhas são um grupo importante, exibindo características muito particulares e únicas, contudo, atualmente ainda se encontram pouco exploradas. Destas, as mais estudadas são as pertencentes aos géneros *Porphyridium*, *Rhodella* e *Rhodosorus*, com espécies que são consideradas mais simples do ponto de vista morfológico.<sup>6,7,8</sup>

As espécies do género *Porphyridium* são microalgas unicelulares, que podem ser encontradas em água doce, água salobra, água salgada e em solo húmido, tendo sido classificadas como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*).<sup>8</sup> Pertencem ao filo *Rhodophyta*, classe *Bangiophyceae*, ordem *Porphyridiales* e à família *Porphyridiaceae*.<sup>9</sup> Das nove espécies de *Porphyridium* conhecidas, *Porphyridium purpureum* (também designada por *Porphyridium cruentum*) é a que tem sido mais estudada como espécie-modelo, sendo cultivada para a produção e comercialização de produtos de elevado valor nutricional, nomeadamente ácidos gordos poli-insaturados (PUFA) de cadeia longa (e.g. ácidos gordos ómega-3) e polissacáridos, bem como de compostos antioxidantes (e.g. compostos fenólicos) e pigmentos. A cor rosa-avermelhada característica da *Porphyridium* deve-se ao teor de B-ficoeritrina, uma proteína da família das ficobiliproteínas existente no cloroplasto e que participa como pigmento acessório na captação de luz durante o processo de fotossíntese.<sup>6,10</sup>

As células das microalgas vermelhas apresentam-se encapsuladas por uma camada de polissacáridos sulfatados (PS), constituída por uma fração que durante o crescimento permanece ligada à membrana celular e por outra fração que se dissolve no meio, conferindo-lhe viscosidade. Estes polímeros são designados por EPS (*Extracellular Polysaccharides*), substâncias poliméricas extracelulares ou exopolissacáridos.<sup>6,8</sup> Muitos estudos revelam que os EPS de *Porphyridium* sp. apresentam atividade anti-inflamatória e antioxidante, tendo por isso já sido introduzidos na formulação de uma vasta gama de produtos cosméticos e farmacêuticos.<sup>8,10</sup>

*Porphyridium cruentum* é uma microalga vermelha (**Figura 1**) muito utilizada industrialmente, pelo facto de possuir propriedades únicas, designadamente capacidade de produzir polissacáridos extracelulares sulfatados e PUFA de cadeia longa, com aplicações em áreas muito diversificadas.<sup>8,10,11</sup> A elevada procura de suplementos nutricionais e alimentos funcionais, tem potenciado a utilização desta microalga na indústria alimentar, devido aos seus teores de nutrientes e de compostos bioativos.<sup>8,11</sup>



**Figura 1-** Cultura de *Porphyridium cruentum* (Culture Collection of Algae (SAG)).

Em termos nutricionais, a *P. cruentum* é composta por ca. 32.1% de proteínas, 21.7% de fibras brutas e 29.5% de aminoácidos, possuindo ainda vários minerais como cálcio, magnésio, zinco e potássio. É uma microalga fácil de produzir e para crescer não requer vitamina B, contrariamente a outras microalgas.<sup>11</sup> Na Tabela 1, são evidenciadas diferentes áreas de aplicação da sua biomassa e dos seus compostos com bioatividade.

**Tabela 1** - Aplicações da biomassa e de compostos bioativos extraídos de *P. cruentum* (adaptado de Tsvetanova *et al.*<sup>8</sup>).

Biomassa/Compostos Bioativos	Aplicação
Polissacáridos sulfatados	Regeneração celular, agente hidratante (cosméticos)
	Agentes antioxidantes, anti-inflamatórios e antimicrobianos
	Proteção solar, agentes anti-inflamatórios e anti-envelhecimento
Oligossacáridos	Vasoconstrição dos vasos sanguíneos
Ficobiliproteínas	Diagnóstico médico
Biomassa	Aquacultura

Além dos constituintes mencionados, esta microalga também apresenta na sua composição tocoferol, flavonoides, alcaloides e pigmentos carotenoides, sendo alargada a sua aplicação na área farmacêutica, em particular na formulação de antibióticos, de anti-hiperglicémicos e de antioxidantes.<sup>8,11,12</sup>

A importância ecológica das microalgas ultrapassa o seu papel de produtores primários.<sup>4,13</sup>

Atualmente, a sua utilização encontra-se em franco desenvolvimento noutras indústrias, nomeadamente na produção de biocombustíveis, dado que podem acumular grandes quantidades de lípidos, sendo estes aproveitados para a produção de biodiesel, estas também têm revelado um bom desempenho na remediação ambiental.<sup>4,13</sup>

### **1.4 Extração de Compostos Bioativos a partir de Microalgas**

O isolamento de compostos bioativos de microalgas tem merecido uma atenção significativa nos últimos anos, devido às suas potenciais aplicações em várias indústrias, incluindo a farmacêutica, a cosmética e a alimentar funcional.<sup>14,15</sup>

O processo de obtenção destes compostos a partir da biomassa das microalgas envolve a sua extração e ulterior purificação para aplicações específicas. Um dos principais desafios inerentes reside na etapa de extração destas biomoléculas, pois o método selecionado influencia a composição dos extratos, as propriedades intrínsecas dos vários compostos, bem como as suas estruturas. A extração com solventes orgânicos, designadamente com etanol, metanol, acetona ou hexano, onde a solubilidade desses compostos bioativos é elevada, é um dos métodos mais comuns. No entanto, existe um interesse crescente no desenvolvimento de métodos de extração mais sustentáveis, tais como extração com fluídos supercríticos, extração assistida por irradiação microondas ou também ultrasonicação.<sup>14,15</sup>

O método mais convencional utilizado para maximizar a concentração de polissacáridos solúveis e insolúveis em água é o método de extração fracionada em cinco etapas, que envolve extração com água quente, seguida de extrações com soluções alcalinas conduzidas a temperaturas e tempos variáveis. O isolamento dos polissacáridos insolúveis em água requer ainda a utilização de soluções ácidas, pelo que as variações de pH durante os processos extrativos, podem comprometer a estrutura dos polissacáridos e, conseqüentemente a sua massa molecular, com impacto direto nas suas características, nomeadamente na sua bioatividade.<sup>16</sup>

Desta forma, as extrações convencionais apresentam vários inconvenientes, designadamente tempos de extração longos, utilização de solventes orgânicos, baixa seletividade e consumo de energia, tornando-se premente desenvolver processos de extração alternativos mais eficientes para obtenção de compostos bioativos a partir de algas e que se revelem ambientalmente sustentáveis.<sup>15</sup>

A extração com fluídos supercríticos (EFS) surgiu como uma alternativa baseada nos princípios da Química Verde e demonstrou ser eficiente na extração de compostos bioativos presentes nas microalgas. Na EFS, o dióxido de carbono é utilizado como solvente a uma temperatura e pressão críticas, o que lhe permite atuar como um fluído supercrítico com excelente poder solvente. A vantagem desta extração reside na sua

seletividade, uma vez que consegue extrair compostos bioativos específicos, separando componentes indesejáveis, de onde resulta um extrato mais limpo e concentrado. Outra abordagem inovadora, é o recurso à extração assistida por ultrassons (EAU), que se baseia na aplicação de ondas sonoras de alta frequência para lisar as células das microalgas e libertar os compostos bioativos para o solvente. Este método reduz significativamente o tempo de extração e melhora a eficiência global comparativamente aos métodos convencionais.<sup>15,17</sup>

Mais recentemente, o recurso a extração assistida por enzimas para a libertação de compostos bioativos presentes na biomassa de microalgas revela-se também uma alternativa muito promissora. As enzimas podem degradar as paredes celulares, facilitando assim o processo de extração e aumentando o rendimento destes compostos.<sup>15,17</sup>

Após a extração, a mistura de compostos bioativos é sempre sujeita a purificação, levando à obtenção de produtos com um elevado grau de pureza.<sup>15</sup>

## 1.5 Métodos de Doseamento de Compostos Bioativos

### 1.5.1 Métodos Colorimétricos

As técnicas colorimétricas ou espectrofotométricas fundamentam-se na avaliação da transmissão ou absorção de radiação a um dado comprimento de onda pelo analito, para quantificação da sua concentração. Estes métodos são amplamente utilizados na atualidade, especialmente em microescala, devido à sua simplicidade, rapidez, alta sensibilidade, especificidade e por serem bastante económicos.

#### 1.5.1.1 Método do Fenol-Sulfúrico

O método do fenol-sulfúrico, foi desenvolvido por Dubois *et al.*<sup>20</sup> em 1956 para quantificar carboidratos (polissacáridos, oligossacáridos, monossacáridos), continuando a ser até hoje o método colorimétrico mais utilizado, devido à sua elevada sensibilidade, simplicidade e rapidez de execução. Este tem como princípio a desidratação dos carboidratos, originando derivados de furfural em meio ácido, estes últimos, ao reagirem com fenol, formam complexos de cor acastanhada que absorvem no visível ( $\lambda_{\text{abs}} = 490 \text{ nm}$ ).<sup>18,19,20, 21</sup>

O método tem sofrido algumas adaptações, de forma a alargar o limite de deteção e também reduzir a exposição ao fenol, com a diminuição dos tempos de reação.<sup>18,20,21</sup>

#### 1.5.1.2 Método do Corante Congo Red

O corante Congo Red tem sido utilizado para avaliar as conformações de polissacáridos e em particular as de  $\beta$ -(1,3)-D-glucanos.<sup>22</sup>

Os  $\beta$ -glucanos são polissacáridos normalmente presentes em plantas, algas e cogumelos e têm suscitado considerável interesse devido à sua notável atividade biológica, destacando-se pelas suas propriedades de modulação do sistema imunológico, potencial anti-tumoral e ação antioxidante.<sup>22,23</sup>

Estes polissacáridos são constituídos por monómeros de D-glucose ligados entre si por ligações  $\beta$ -glicosídicas (1,3), (1,4) ou (1,6).<sup>24</sup> Os primeiros métodos disponíveis para quantificar estes polissacáridos eram economicamente inviáveis e de difícil execução, sendo urgente a procura de alternativas mais económicas e com menores tempos de execução. Nitschke *et al.*<sup>26</sup> e Semedo *et al.*<sup>22</sup> desenvolveram um método para a deteção de  $\beta$ -D-glucanos de tripla hélice utilizando o corante Congo Red, verificando-se a ocorrência de uma interação seletiva e sensível com  $\beta$ -(1,3)-(1,6)-glucanos com esse tipo de conformação.<sup>23,25,26</sup>

As ligações do corante à complexa estrutura tridimensional da tripla hélice dos  $\beta$ -(1,3)-(1,6)-glucanos são mediadas por forças eletrostáticas, ligações por pontes de hidrogénio e interações de *Van der Waals*. Estas interações provocam um desvio batocrómico de 488 nm para 516 nm. Semedo *et al.*<sup>22</sup> otimizaram o método para a escala em microplaca de 96 poços, permitindo assim a utilização de menores volumes de amostra e solvente, bem como uma redução no tempo do ensaio.<sup>23,26</sup>

### 1.5.1.3 Método do Corante Azul de Toluidina

O método do corante azul de toluidina é utilizado no doseamento de polissacáridos sulfatados, relevando-se um método rápido e seletivo. Na presença do corante, ocorre uma interação entre a carga negativa do grupo éster sulfato dos polissacáridos com a carga positiva das moléculas do corante, observando-se um decréscimo na intensidade de absorvância monitorizada a 632 nm.<sup>27</sup>

### 1.5.1.4 Método do Corante Azul de Coomassie

O método do corante Azul de Coomassie ou método de Bradford é muito utilizado em bioquímica e biologia molecular, permitindo quantificar a concentração de proteínas numa solução, devido à sua reprodutibilidade, rapidez, precisão, simplicidade e viabilidade económica.<sup>28</sup> Este método explora a interação do corante com os grupos amino das proteínas, resultando numa mudança de cor para o azul, que é quantificada espectralmente a 595 nm. Esta ligação forma um complexo bastante estável durante algum tempo (ca. uma hora).<sup>28</sup>

### 1.5.2 Capacidade Antioxidante

A capacidade antioxidante de muitos compostos desempenha um papel fundamental em vários domínios científicos, nomeadamente na área da nutrição, na saúde e no desenvolvimento de alimentos funcionais e de produtos farmacêuticos.<sup>29</sup>

Os compostos antioxidantes normalmente encontram-se na forma de enzimas ou moléculas derivadas de nutrientes ingeridos, que protegem as células e as estruturas biológicas dos danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigénio. A avaliação das suas propriedades antioxidantes é determinante, atendendo aos inegáveis benefícios que apresentam para a saúde humana. O *stress* oxidativo, que ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigénio e a capacidade do organismo em os neutralizar, é o principal responsável pelo desenvolvimento de inúmeras doenças (e.g. cardiovasculares, cancro, doenças neurodegenerativas e diabetes).<sup>29</sup>

Os compostos antioxidantes presentes nas microalgas, especialmente os carotenoides, os compostos fenólicos, os ácidos gordos poli-insaturados, os polissacáridos sulfatados, os flavonoides e os alcaloides, desempenham um papel importante no controlo do processo oxidativo, suscitando assim um grande interesse neste domínio.<sup>1</sup>

A avaliação da capacidade antioxidante pode ser realizada com recurso a ensaios *in vitro* e a modelos baseados em células, que permitem a quantificação da capacidade de uma substância em eliminar radicais livres, inibir reações oxidativas e proteger contra danos celulares. A atividade antioxidante pode ser monitorizada recorrendo a uma grande variedade de métodos, envolvendo diferentes mecanismos, nomeadamente a transferência de átomos de hidrogénio, a transferência de um único eletrão, o poder redutor e a quelação de metais, entre outros.<sup>29</sup>

Os métodos mais utilizados para a deteção e quantificação de moléculas associadas à capacidade antioxidante, são o método do Folin-Ciocalteu, usado na determinação dos compostos fenólicos totais, o método do radical ABTS (2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), o método do radical DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo) e ainda o teste da capacidade quelante dos iões  $Fe^{2+}$ .<sup>30</sup>

#### 1.5.2.1 Determinação de Compostos Fenólicos e Flavonoides

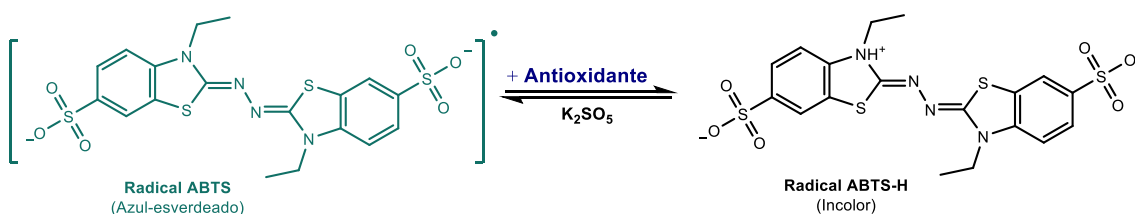
Os compostos fenólicos são um grupo importante de compostos bioativos devido à sua contribuição em reações oxidativas, exibindo elevada capacidade de reação com espécies oxidantes, com a consequente neutralização do seu efeito. Para quantificar estes compostos, o método do Folin-Ciocalteu é o método colorimétrico mais utilizado, baseando-se na reação dos compostos polifenólicos com o reagente Folin-Ciocalteu, originando um complexo de cor azul com  $\lambda_{abs} = 655 \text{ nm}$ .<sup>31,32</sup>

No grupo dos compostos polifenólicos naturais, destacam-se os flavonoides que representam uma das classes de compostos mais prevalentes em frutos, plantas e algas. Estudos epidemiológicos clínicos e em animais revelam que os flavonoides podem exercer efeitos protetores contra várias patologias, incluindo doenças cardiovasculares e cancro, para além de possuírem efeitos antibacterianos, antivirais e anti-inflamatórios.<sup>33</sup>

Para a quantificação de flavonoides totais é utilizado o método colorimétrico do cloreto de alumínio, que consiste na formação de complexos ácidos estáveis entre o grupo carbonilo C4 ou grupos hidroxilo C3 ou C5 dos flavonoides com o cloreto de alumínio, todos detetáveis na gama do espetro visível ( $\lambda_{\text{abs}} = 510 \text{ nm}$ ).<sup>34</sup>

### 1.5.2.2 Método do Radical ABTS

Neste método, a molécula ABTS (2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (incolor) quando oxidada, origina o radical ABTS que exibe uma coloração azul-esverdeada muito característica. O processo oxidativo ocorre quando a molécula de ABTS é colocada na presença de persulfato de potássio, resultando no catião radical ABTS, cuja coloração apresenta uma intensidade que é diretamente proporcional à quantidade do catião radical formado ( $\lambda = 645 \text{ nm}$ ). Esta espécie catiónica, ao entrar em contacto com compostos antioxidantes, reduz-se à sua forma não-radicalar, tornando-se novamente incolor (**Figura 2**).<sup>35,36,37,38</sup>



**Figura 2** - Reação de redução do radical ABTS (adaptado de Rodríguez *et al.*<sup>38</sup>).

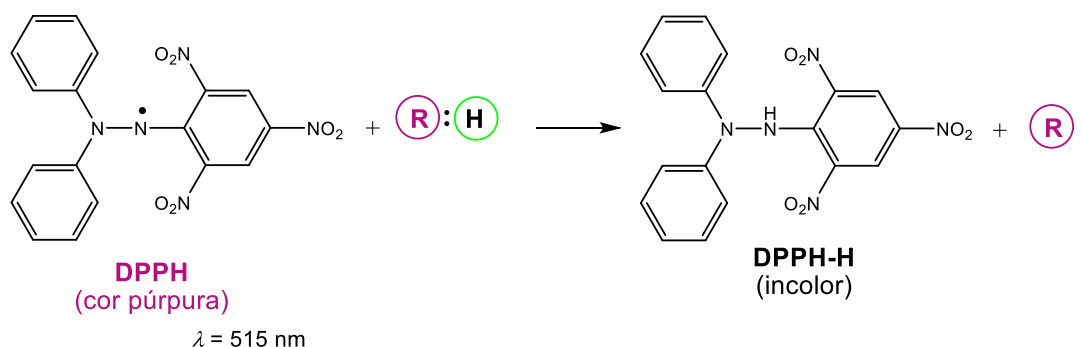
Este método oferece múltiplas vantagens, destacando-se pela sua simplicidade, versatilidade e rapidez. É aplicável a uma vasta gama de amostras e pode ser utilizado para comparar o potencial antioxidante de vários compostos. Os resultados são frequentemente expressos em equivalentes de trolox, que é um análogo hidrossolúvel da vitamina E, sendo utilizado como composto de referência.<sup>35,37</sup>

### 1.5.2.3 Método do Radical DPPH

O método do radical DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo) baseia-se no princípio da mudança de cor, que ocorre quando o radical DPPH reage com compostos

antioxidantes. Este método é relativamente simples e é frequentemente utilizado para avaliar o potencial antioxidante geral de uma substância, podendo ser aplicado a uma vasta gama de amostras, nomeadamente a extratos de plantas e de microalgas, entre outros.<sup>39,40</sup>

O radical DPPH é um radical livre estável de cor púrpura com um eletrão não emparelhado. Na presença de uma molécula com características antioxidantes é reduzido à sua forma não radicalar, resultando numa descoloração de púrpura para amarelo ou mesmo incolor (**Figura 3**). O grau de descoloração é indicativo da atividade antioxidante do composto testado. Um maior grau de descoloração sugere uma maior capacidade do composto para doar eletrões e eliminar os radicais livres, sendo esta quantificação realizada por UV-Vis, monitorizando a diminuição da absorvância a 515 nm.<sup>39,40</sup>



**Figura 3** - Reação de redução do radical DPPH. RH = molécula antioxidante, R = radical antioxidante (adaptado de Liang *et al.*<sup>39</sup>).

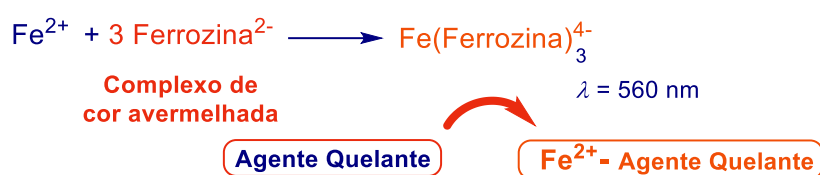
Os resultados obtidos neste método são habitualmente comparados com os resultados do método do radical ABTS, que frequentemente origina valores mais elevados, apresentando como principal vantagem poder ser realizado em diferentes condições de pH.<sup>39</sup>

#### 1.5.2.4 Capacidade Quelante de Iões $\text{Fe}^{2+}$

A quelação tem implicações importantes em vários domínios, incluindo na química, na biologia e na medicina. Nos sistemas biológicos, a quelação desempenha um papel vital em vários processos, nomeadamente no transporte de metais, na atividade metabólica e na regulação celular. No contexto médico, os agentes quelantes são utilizados para tratar o envenenamento por metais, uma vez que podem formar complexos estáveis com metais tóxicos e facilitar a sua eliminação do organismo.<sup>35,41</sup>

Deste modo, o método da capacidade quelante de ferro é utilizado na avaliação da atividade antioxidante de substâncias, devido à sua apetência para ligar íons ferro, impedindo a participação deste metal em reações que produzem espécies reativas de oxigénio. Esta ligação limita a capacidade de o ferro contribuir para o *stress* oxidativo, um desequilíbrio associado ao envelhecimento celular e a diversas doenças degenerativas.<sup>29,41</sup>

O método da capacidade quelante dos íons  $\text{Fe}^{2+}$ , origina um complexo de íão  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozina de coloração avermelhada, que quando na presença de agentes quelantes sofre destruição, resultando na diminuição da intensidade da cor (**Figura 4**) aliada ao comprimento de onda de 560 nm.<sup>35,42</sup>



**Figura 4** - Reação da capacidade quelante dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  (adaptado de Canabady-rochelle *et al.*<sup>35</sup>).

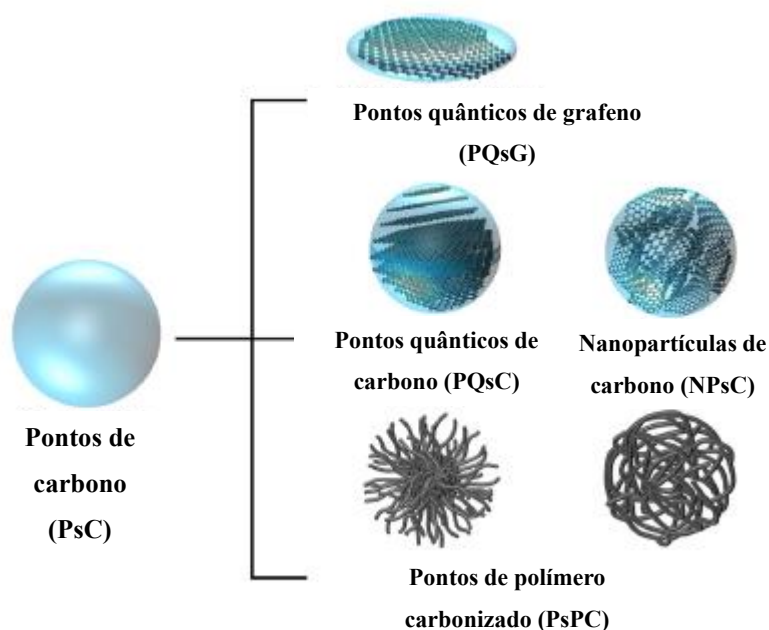
## 1.6 Nanomateriais de Carbono

O carbono é um dos elementos mais abundantes na crosta terrestre e possui uma notável habilidade para estabelecer ligações covalentes com outros átomos de carbono, adotando diferentes hibridizações ( $sp$ ,  $sp^2$ ,  $sp^3$ ), resultando na ocorrência de uma grande variedade de alótropos, de onde se destacam o diamante, a grafite e estruturas amorfas de carbono. O grande desenvolvimento nas áreas da nanociência e da tecnologia, tem conduzido a um aumento significativo da conceção de materiais à base de carbono, desde a macro escala até à escala nanométrica.<sup>43,44</sup>

Em 1985, Kroto e seus colaboradores<sup>45</sup> isolaram os fullerenos ( $\text{C}_{60}$ ), inaugurando assim a era das nanoestruturas de carbono de dimensão zero. Posteriormente, no início da década de 90, Ljima<sup>46</sup> conseguiu sintetizar nanotubos de carbono unidimensionais e já em 2004, Novoselov<sup>47</sup> e a sua equipa isolaram materiais bidimensionais como o grafeno; Xu *et al.*<sup>48</sup> identificaram pela primeira vez nanopartículas de carbono com propriedades fluorescentes. Posteriormente, Sun *et al.*<sup>49</sup> foram pioneiros na síntese de nanopartículas de carbono luminescentes e estáveis, com diâmetro inferior a 10 nm, conhecidas como pontos de carbono (PsC) ou C-Dots (CDs).<sup>50,51,52</sup>

Os PsC são assim classificados como uma classe de nanomateriais fluorescentes à base de carbono com dimensão inferior a 10 nm, exibindo funcionalidade química e propriedades fotofísicas variáveis. Os PsC podem ser classificados em três categorias: pontos quânticos de grafeno (PQsG), nanopontos de carbono que podem ser divididos

em nanopartículas de carbono (NPsC) e pontos quânticos de carbono (PQsC) e ainda pontos de polímero carbonizados (PsPC) (**Figura 5**).<sup>53</sup>



**Figura 5** - Diferentes categorias de Pontos de Carbono (adaptado de Ozyurt *et al.*<sup>53</sup>).

Os PsC ganharam um enorme reconhecimento na área da ciência dos materiais pelo seu elevado desempenho, pela disponibilidade de precursores baratos para a sua obtenção, pelas abordagens de síntese fáceis, bem como pela vasta gama de aplicações. Uma outra vantagem, reside na possibilidade de poderem substituir os pontos quânticos baseados em metais tóxicos, estes últimos com grandes limitações em aplicações biológicas e ambientais, face aos efeitos nefastos na saúde humana e no meio ambiente. Os PsC apresentam uma boa biocompatibilidade, exibem baixa toxicidade, elevada luminescência e estabilidade química e ainda excelentes propriedades biológicas, físicas e químicas, proporcionando uma grande amplitude de aplicações, designadamente na deteção de explosivos, em deteção química, em segurança alimentar, em bioimagem, na administração de fármacos, na conversão de energia, em fotocatalise, entre outras.<sup>51,52,54</sup>

A funcionalização da superfície dos PsC com heteroátomos (*e.g.* oxigénio, azoto, fósforo, enxofre, boro) reflete-se nas suas propriedades estruturais e óticas, possibilitando assim a sua modelação em função da aplicação pretendida.<sup>51,52,54</sup>

### 1.6.1 Métodos de Síntese

Na última década, houve um grande progresso na preparação de NPsC, não só na simplificação dos processos de fabrico, mas também na parametrização das condições

reacionais, tendo como propósito a modelação das suas propriedades de luminescência.<sup>50</sup> Existem duas abordagens na obtenção dos NPsC, designadas por métodos *bottom-up* e *top-down* (**Figura 6**). A abordagem *bottom-up* consiste no corte e oxidação, sendo a estrutura maior do aglomerado de carbono clivada em pequenas nanopartículas de carbono, resultando em NPsC. Pelo contrário, a abordagem *top-down* baseia-se numa série de reações químicas a partir de pequenas moléculas precursoras originando igualmente nanomateriais de carbono.<sup>50,51,55</sup>



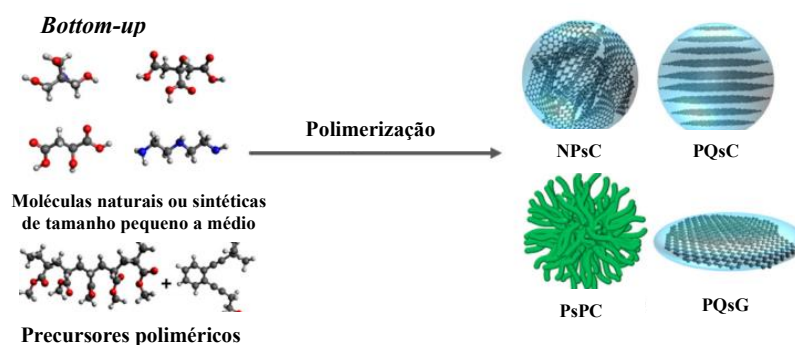
**Figura 6** - Estratégias para a formação de NPsC a partir de diferentes fontes de carbono (adaptado de Anuar *et al.*<sup>52</sup>).

As técnicas *top-down* têm como principais vantagens a possibilidade de aumento de escala na produção de NPsC e obtenção de estruturas bem definidas; por outro lado, as técnicas *bottom-up* são mais difíceis de modular devido à possibilidade de originarem produtos secundários, exigindo etapas adicionais de purificação, embora com a vantagem de permitirem a funcionalização da superfície num único passo. Dos vários métodos *bottom-up* conhecidos, o método hidrotérmico é o mais utilizado na síntese de NPsC devido ao seu baixo custo, aos procedimentos simples e utilização, em geral, de materiais não tóxicos.<sup>50,51,55</sup>

O tipo de técnica e os precursores escolhidos na síntese, determinam as propriedades físico-químicas das nanopartículas resultantes, nomeadamente o seu tamanho, cristalinidade, rendimento quântico, estabilidade coloidal e a compatibilidade com um determinado solvente.<sup>51,55</sup>

### 1.6.1.1. Método *Bottom-up*

As abordagens *bottom-up* baseiam-se na reação de polimerização de pequenas moléculas, normalmente moléculas orgânicas, por carbonização a temperaturas que variam tipicamente entre 150 °C e 300 °C conduzindo à obtenção de NPSC. Esta metodologia permite escolher uma gama muito vasta de precursores, especialmente derivados de biomassa de diferentes origens, designadamente resíduos agrícolas, industriais e domésticos,<sup>56,57,58</sup> algas marinhas, entre outros (**Figura 7**), sendo uma vertente que converge para a sustentabilidade.<sup>53,54</sup>



**Figura 7** - Método *bottom-up* na produção de NPSC (adaptado de Ozyurt *et al.*<sup>53</sup>).

Os métodos mais expeditos são o tratamento hidrotérmico convencional, a irradiação assistida por microondas e os ultrassons, resultando na produção de NPSC com elevados rendimentos quânticos de fluorescência.<sup>51,52,59</sup>

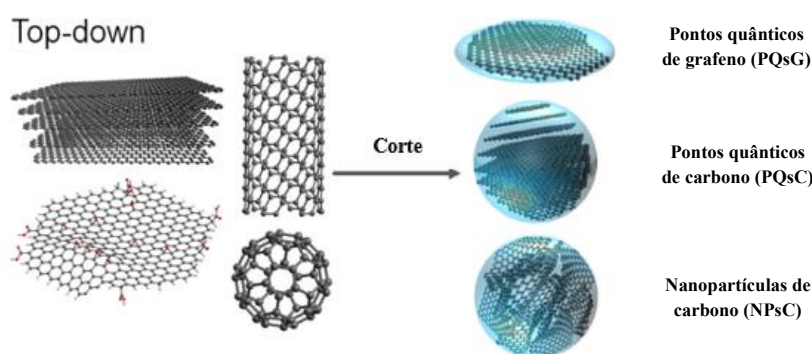
O método hidrotérmico apresenta um baixo custo e utiliza matérias-primas de recursos naturais, sendo assim um processo ecológico, com parâmetros de reação facilmente controlados, tornando viável o aumento de escala. No entanto, o isolamento dos NPSC exige a aplicação de técnicas de purificação para remoção de impurezas, nomeadamente material insolúvel e moléculas de baixa polaridade. O recurso a irradiação assistida por microondas revela-se assim como uma alternativa muito promissora, combinando as vantagens do processo hidrotérmico e da radiação de microondas, com uma diminuição do tempo de reação muito significativa; no entanto, apresenta limitações de escala atendendo à capacidade dos reactores, para além da purificação ser mais difícil.<sup>51,52</sup>

Nos diferentes métodos de *bottom-up*, o ácido cítrico, devido ao custo relativamente baixo e à sua grande disponibilidade, é o precursor mais utilizado para a síntese de NPSC, sendo reportados NPSC com elevado rendimento quântico (*ca.*  $\Phi_F = 0.69$ ) obtidos por processo hidrotérmico, na presença de etilenodiamina (ED) como aditivo.<sup>53</sup>

Em 2009, foram relatados os primeiros NPsC produzidos a partir de hidratos de carbono utilizando irradiação assistida por microondas, resultando em nanomateriais com excelentes propriedades luminescentes.<sup>51</sup>

### 1.6.1.2. Método *Top-down*

A abordagem *top-down* utiliza como precursores alótropos de carbono, como a grafite, mas também carbono amorfo, bem como o óxido de grafeno, que ao sofrerem clivagem originam NPsC através de métodos de síntese físicos, químicos e eletroquímicos, envolvendo condições mais severas comparativamente aos métodos *bottom-up*.



**Figura 8** - Método *top-down* na produção de PsC (adaptado de Ozyurt *et al.*<sup>53</sup>).

Esta abordagem recorre a métodos como ablação a laser, descarga elétrica e oxidação eletroquímica. Por exemplo, a descarga elétrica, levou à descoberta dos NPsC fluorescentes em 2004, por Xu *et al.*,<sup>48</sup> a partir da purificação de nanotubos de carbono por eletroforese.<sup>51,54</sup>

O método *top-down* para produzir pontos de carbono proporciona um elevado grau de controlo sobre as propriedades das nanopartículas resultantes, possibilitando modelar a sua dimensão, a funcionalidade da superfície e as características luminescentes para aplicações específicas. No entanto, estes métodos requerem equipamentos mais especializados e envolvem etapas de processamento bastante complexas.<sup>51,54,60</sup>

### 1.6.2 Funcionalização da Superfície e Dopagem

A funcionalização da superfície e a dopagem são estratégias cruciais para melhorar as propriedades e alargar as áreas de aplicação dos NPsC. Estes processos envolvem a modificação química da superfície dos NPsC através da ligação covalente de grupos funcionais ou na dopagem com heteroátomos na sua estrutura. Estas modificações personalizadas permitem ajustar as propriedades dos NPsC, nomeadamente o

incremento da luminescência, a estabilidade, a biocompatibilidade e a interação com moléculas-alvo, tornando-os ainda mais versáteis para várias áreas de investigação e aplicação.<sup>44,61,62</sup>

Em geral, os NPcC sintetizados não são fluorescentes ou possuem rendimentos quânticos de fluorescência bastante baixos, o que limita as suas aplicações. Assim, o recurso à funcionalização da superfície e à dopagem são estratégias essenciais para melhorar as características óticas destes materiais, em particular o seu rendimento quântico ( $\Phi_F$ ).<sup>61,62</sup>

A passivação da superfície é normalmente obtida pela formação de uma fina camada isolante, geralmente pela fixação de materiais poliméricos orgânicos como o PEG (polietilenoglicol), sendo este o agente de passivação mais comum. Shen *et al.*<sup>63</sup> conseguiram obter PsC com melhor rendimento quântico ao utilizarem o PEG como agente de passivação.

Zhu *et al.*<sup>64</sup> sintetizaram PsC dopados com azoto através de processos hidrotérmicos, utilizando ácido cítrico e etilenodiamina, tendo obtido PsC com um rendimento quântico de 80.6% ( $\lambda_{exc} = 360$  nm). Li *et al.*<sup>65</sup> conseguiram também obter PsC com um rendimento quântico de 83%, ( $\lambda_{exc} = 360$  nm) utilizando mais do que um elemento para a dopagem, o magnésio e o azoto. A introdução de magnésio e a preservação do grupo carboxilo decorrente do quelato ácido Mg:ácido cítrico, aumentaram consideravelmente a fotoluminescência dos PsC dopados.<sup>62,65</sup>

Durante o processo de passivação, alguns grupos funcionais, como grupos amina, hidroxilo e carboxilo podem ser introduzidos na superfície dos PsC, preenchendo os defeitos na superfície, sem que ocorra alteração no estado do centro, conferindo uma maior solubilidade em água e reatividade química específica. Outras abordagens de passivação incluem a oxidação da superfície dos PsC com ácidos fortes ou com um sal inorgânico (ZnO ou ZnS) ou ainda com heteroátomos (S ou N), resultando na obtenção de PsC com propriedades específicas.<sup>62</sup>

Dos elementos mais utilizados para a dopagem, o nitrogénio ocupa lugar de destaque. Qu *et al.*<sup>66</sup> mostraram que da utilização de ácido cítrico como fonte de carbono e etilenodiamina e ureia como fonte de nitrogénio na síntese de PsC, foram obtidos nanomateriais com rendimentos quânticos superiores comparativamente aos PsC não dopados ( $\Phi_F = 22\%$  vs. 94%).<sup>66</sup>

Recentemente, vários nanomateriais modificados com ácidos borónicos foram utilizados em aplicações biomédicas, nomeadamente na separação selectiva de glicopéptidos e glicoproteínas, agentes terapêuticos para tratamento do cancro e diabetes.<sup>67</sup>

### 1.6.3 Propriedades Fotofísicas e Óticas

Os PsC exibem propriedades óticas semelhantes, apesar das diferenças nas suas estruturas, métodos de síntese, dopagem com heteroátomos, precursores e ambiente químico. As técnicas mais expeditas para obter informação sobre a estrutura química e o comportamento de absorção/emissão dos PsC são técnicas espectroscópicas, nomeadamente espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-Vis) e fluorescência de estado estacionário.<sup>53,68</sup>

Geralmente, os PsC apresentam amplos máximos de absorção ótica na região do ultravioleta (UV) (250-350 nm), conjuntamente com uma fraca cauda de absorção na região do visível nos espectros de UV-Vis. No espectro de UV-Vis, os PsC exibem duas bandas de absorção características, uma entre 230-270 nm, com origem em transições  $\pi-\pi^*$  das ligações C=C do núcleo de carbono e outra entre 300-340 nm, geralmente atribuível à transição  $n-\pi^*$  dos grupos carbonilo de superfície. Estas transições exibem uma intensa capacidade de absorção na região do UV, apesar da ausência ou fraca ocorrência de emissão de fluorescência devido à existência de lacunas.<sup>51,52,65</sup>

Gedda *et al.*<sup>69</sup> sintetizaram PsC a partir de cascas de camarão obtendo duas bandas de absorção a 280 e 330 nm, com origem na transição eletrónica  $\pi-\pi^*$  e  $n-\pi^*$ , respetivamente, indicando a presença de ligações C=C e C=O. Mehta *et al.*<sup>70</sup> também obtiveram resultados semelhantes com duas bandas de absorção a 250 nm e 300 nm em PsC sintetizados a partir de sumo de maçã.<sup>52,71</sup>

A maioria dos PsC, preparados por oxidação eletroquímica, microondas e/ou ultrassons, exibem uma banda de absorção característica entre 260-320 nm. No entanto, Li *et al.*<sup>72</sup> verificaram que a absorvância dos PsC sofreu um desvio batocrómico após a passivação da superfície com 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina (TTDDA) ou organosilano (350-550 nm e 340-410 nm, respetivamente).

A fotoluminescência é uma das características mais fascinantes dos PsC, pelo que muitos investigadores têm proposto várias explicações da sua origem, como os efeitos de confinamento quântico, defeitos de superfície, grupos funcionais e o grau de passivação na superfície. Contudo, os estudos das propriedades óticas dos PsC são controversos, uma vez que os mecanismos exatos da fotoluminescência continuam por definir. Uma propriedade única da fotoluminescência dos PsC é a sua dependência do comprimento de onda de excitação com o comprimento de onda de emissão e respetiva intensidade.<sup>72</sup>

Em geral, os PsC emitem no azul sob iluminação de luz UV, existindo também nanomateriais com emissão na região do verde, amarelo e vermelho.<sup>73</sup> Por exemplo, Qu *et al.*<sup>74</sup> obtiveram PsC com emissão no laranja e  $\Phi_f$  de 46%, a partir de ácido cítrico

e ureia como precursores por processo hidrotérmico, na presença de *N,N*-dimetilformamida.

A fluorescência dos PsC depende do estado molecular, cuja avaliação é feita observando os espectros de UV-Vis destes fluoróforos, os quais exibem sempre uma banda gaussiana muito característica, com o espectro de emissão independente do comprimento de onda de excitação, podendo a fluorescência proveniente do estado molecular ser reduzida após procedimentos de purificação por diálise.<sup>75</sup>

Alguns estudos indicam que o estado do núcleo de carbono dos PsC possui um rendimento quântico inferior, mas uma fotoestabilidade mais forte, em comparação com o estado molecular. A carbonização do núcleo é sempre incompleta e a sua estrutura deve conter redes poliméricas, hidrocarbonetos policíclicos, grafite dopada com heteroátomos, entre outros. Assim, o efeito de confinamento quântico não pode ser rigorosamente seguido na maioria dos casos, pois muitos outros factores podem afetar as propriedades de fotoluminescência dos PsC e o efeito do centro de carbono ficar dissimulado por outros centros com forte luminescência.<sup>73,75</sup>

Foi também demonstrado que a fluorescência dos PsC oxidados depende do seu tamanho, observando-se nos espectros de excitação e de emissão, um desvio para o vermelho quando ocorre um aumento do seu peso molecular. Num outro estudo, onde foi explorada a fotoluminescência visível de PQsG com diferentes formas e tamanhos (5-35 nm), foi possível observar a dependência do tamanho e da forma na fotoluminescência. O aumento do tamanho dos PQsG originou um deslocamento do  $\lambda_{em}$  para o vermelho. Adicionalmente, na mesma gama de dimensão, a absorção máxima ocorreu a comprimentos de onda superiores e a intensidade diminuiu com o aumento do tamanho dos PQsG.<sup>76</sup>

Outra característica importante dos PsC é a sua fotoestabilidade, ou seja, não se observa degradação significativa de fluorescência quando irradiados durante longos períodos a um dado comprimento de onda, tornando-os adequados para aplicações em imagiologia de longo prazo, onde é crucial que a intensidade de fluorescência seja mantida.<sup>77</sup>

O maior  $\Phi_F$  registado para PsC é inferior a 10%,<sup>76</sup> no entanto, recorrendo a dopagem e a funcionalização da superfície dos PsC, o  $\Phi_F$  pode aumentar de forma significativa.<sup>76,78</sup>

### 1.6.4 Propriedades Biológicas

O carbono é um dos principais elementos presente nas biomoléculas e nas células, pelo que a notável biocompatibilidade exibida pelos PsC, os coloca em posição de destaque face a outros nanomateriais. Apesar das propriedades dos PsC, nomeadamente

possível citotoxicidade, variarem significativamente em função dos métodos de síntese, vários estudos mostraram o seu potencial para aplicações biomédicas *in vitro* e *in vivo*.<sup>54</sup> Zheng *et al.*<sup>54</sup> reportaram que células de carcinoma hepatocelular humano apresentaram uma taxa de sobrevivência superior a 90%, após exposição a PsC numa concentração de  $0.5 \text{ mgmL}^{-1}$ , valor acima do necessário para estudos de bioimagem. Relataram ainda que os PsC exibiram uma citotoxicidade negligenciável para muitas outras linhas celulares. Peng *et al.*<sup>79</sup> demonstraram que concentrações de PQsG até  $50 \text{ } \mu\text{gmL}^{-1}$  não apresentaram toxicidade significativa para linhas celulares de cancro da mama humano. Outro tipo de ensaios conduzidos em ratos utilizando PsC passivados com PEG, não revelaram alterações nos animais após administração intravenosa de 40 mg desses nanomateriais.<sup>54</sup>

Recentemente, Sousa *et al.*<sup>80</sup> reportaram nanopontos de carbono fluorescentes obtidos a partir de bagaço de azeitona que revelaram citotoxicidade negligenciável quando testados *in vitro* para duas linhas celulares não-tumorais e tumorais de mamíferos, L929 e HeLa, respetivamente.

O método colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) é um método estabelecido para determinar a viabilidade de culturas em estudos de proliferação celular e de citotoxicidade. Este ensaio baseia-se na redução dos sais de tetrazólio, MTT, a formazan, catalisada por desidrogenases mitocondriais em células metabolicamente ativas, sendo a quantidade de formazan produzida diretamente proporcional ao número de células vivas expostas ao MTT.<sup>81,82</sup>

Por ser rápido, prático e económico, tem sido um dos métodos mais utilizados para quantificação de células viáveis em meios de cultura. No entanto, foram identificados vários parâmetros que podem afetar o metabolismo celular e outros factores que modificam significativamente a atividade específica para o MTT, podendo originar resultados pouco precisos. Por conseguinte, é essencial estabelecer parâmetros de ensaio com controlos adequados para cada linha celular, visando otimizar as condições de teste e minimizar erros experimentais. Estes parâmetros devem incluir densidades celulares adequadas, seleção do meio de cultura apropriado, bem como de concentrações de MTT e de tempos de exposição ótimos.<sup>81,82</sup>

### 1.6.5 Aplicações

As excelentes propriedades óticas e biológicas exibidas pelos PsC têm despertado interesse na sua utilização em áreas muito diversificadas, nomeadamente em bioimagiologia, em fotocatalise, em (bio)sensores, em optoelectrónica, como agentes antimicrobianos, entre outras.

### 1.6.5.1 Sensores Químicos e Biossensores

Os PsC demonstraram um notável potencial em aplicações sensoriais, dado que podem ser sintetizados de forma a responder seletivamente a analitos específicos, designadamente na deteção de iões metálicos, biomoléculas<sup>57</sup> e poluentes ambientais,<sup>83</sup> bem como a alterações de pH. Esta sensibilidade torna-os ferramentas valiosas para a conceção de sensores e (bio)sensores de elevada precisão e especificidade.

A sua versatilidade e facilidade de funcionalização permitem o desenvolvimento de plataformas de deteção portáteis e económicas para uma vasta gama de aplicações, incluindo a monitorização ambiental e o diagnóstico médico, designadamente na deteção de proteínas hémicas, como a hemoglobina.<sup>53,79</sup> Qu *et al.*<sup>84</sup> sintetizaram NPsC por métodos hidrotérmicos utilizando ácido ascórbico como fonte de carbono, que demonstraram elevada sensibilidade e seletividade para esta proteína, comparativamente à deteção de caseína ou de albumina do soro bovino.<sup>53,85</sup>

A utilização de PsC na deteção de iões essenciais a várias funções no metabolismo celular tem sido amplamente explorada; refira-se por exemplo, a monitorização de Cu(II), ião essencial como cofator de numerosas enzimas e cuja deficiência pode conduzir ao desenvolvimento de diversas doenças como Alzheimer e lesões hepáticas. Zheng *et al.*<sup>54</sup> reportaram que NPsC funcionalizados com poli(etilenoimina) ramificada foram utilizados no desenvolvimento de um sistema de deteção de Cu(II) rápido, fiável e seletivo com um limite de deteção de 6 nM.<sup>54</sup>

### 1.6.5.2 Optoelectrónica

Os PsC emergiram como materiais versáteis e promissores no domínio da optoelectrónica dado que exibem propriedades de fotoluminescência notáveis, emitindo luz numa vasta gama de comprimentos de onda. Esta propriedade impulsionou a sua integração em dispositivos emissores de luz, incluindo LEDs. Os seus espectros de emissão sintonizáveis, a elevada pureza de cor e a sua fácil síntese abrem caminhos para o desenvolvimento de tecnologias LED eficientes e personalizáveis. Os PsC podem melhorar a precisão da cor, a eficiência energética e a estabilidade dos LEDs, contribuindo para avanços em soluções de iluminação, ecrãs e sistemas de comunicação visual.<sup>52,86</sup>

### 1.6.5.3 Bioimagiologia

Uma das aplicações mais auspiciosas dos NPsC é no domínio da bioimagiologia. As suas excepcionais propriedades fluorescentes, estabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade torna-os excelentes candidatos para a marcação de várias biomoléculas, células e até organismos, assegurando que o processo de imagiologia não perturba o comportamento natural ou a viabilidade das amostras biológicas em estudo.<sup>65</sup>

A possibilidade de modelar o comprimento de onda de emissão variando o comprimento de onda de excitação, permite a multiplexagem, também conhecida por multiplexação, uma técnica que possibilita marcar e monitorizar vários componentes celulares em simultâneo, capacidade que revolucionou o campo da bioimagem, por permitir a visualização de interações celulares complexas e processos dinâmicos em sistemas vivos.<sup>65,67</sup>

Células de rim de porco (LLC-PK1) foram utilizadas para testar a utilidade dos NPsC em imagiologia celular e os NPsC foram detetados na membrana celular e no citoplasma, provavelmente após internalização por endocitose.<sup>72</sup> Observou-se emissão de fluorescência na região do vermelho nas células LLC-PK1 que tinham sido cultivadas num meio contendo  $1.2 \text{ mgmL}^{-1}$  de NPsC durante 24 h, quando excitadas a comprimentos de onda entre 510-530 nm, não se verificando qualquer emissão de fluorescência nas células livres de PsC quando excitadas na mesma gama de comprimento de onda. A elevada intensidade de fluorescência detetada nas células demonstrou a estabilidade dos NPsC, confirmando a sua manutenção em meios de elevada força iónica e a viabilidade celular média determinada foi superior a 95%, para uma concentração de NPsC até  $1.8 \text{ mgmL}^{-1}$ . Estes resultados revelaram que os NPsC exibem melhor biocompatibilidade do que os pontos quânticos.<sup>72</sup>

Os NPsC comparativamente aos pontos quânticos semicondutores, apresentam múltiplas vantagens, incluindo propriedades óticas comparáveis, boas estabilidades química e fotoquímica, sendo a ausência de toxicidade uma das vantagens mais relevantes, uma vez que os pontos quânticos possuem metais pesados, conduzindo a problemas de toxicidade para a saúde humana e para o meio ambiente. Assim, os NPsC são cada vez mais utilizados na visualização de sistemas biológicos *in vitro* e *in vivo*, contudo, como os agentes de passivação aplicados na síntese dos NPsC podem não ser totalmente inócuos, os mesmos devem ser empregues em baixas concentrações.<sup>65</sup>

Os PQsC também têm sido amplamente utilizados em imagiologia de linhas celulares cancerígenas, verificando-se que os mesmos podem entrar rapidamente nas células através de pinocitose ou endocitose mediada por lípidos. Devido às diferenças estruturais dos PQsC e aos diversos tipos de células testados, os PQsC podem estar distribuídos nas mitocôndrias, lisossomas, retículo endoplasmático, complexo de Golgi ou nucléolo.<sup>87</sup>

De uma forma geral, os NPsC podem ser funcionalizados com ligandos ou anticorpos específicos que se ligam seletivamente a determinados biomarcadores na superfície das células. Esta potencialidade possibilita a imagiologia direcionada, permitindo aos investigadores visualizar tipos específicos de células ou moléculas relacionadas com certas doenças. No domínio do diagnóstico, a imagiologia baseada em NPsC é bastante

promissora para a detecção precoce e na caracterização de doenças como o cancro, em que marcadores moleculares específicos estão associados a determinadas fases da doença.<sup>52,65,67</sup>

### 1.6.5.4 Atividade Antimicrobiana

A emergência e prevalência de bactérias resistentes a antibióticos representa atualmente uma séria ameaça para a saúde pública global. Face às crescentes preocupações e à necessidade de novas abordagens terapêuticas para combater as infeções causadas por microrganismos multirresistentes, os NPsC surgem como uma aposta promissora para enfrentar este desafio. Os NPsC apresentam propriedades antibacterianas e antifúngicas inerentes e os dados disponíveis sugerem que os seus efeitos antimicrobianos resultam de múltiplos mecanismos. A sua dimensão tipicamente na escala nanométrica favorece a interação com as membranas das células microbianas, perturbando a sua função e integridade estrutural e conduzindo à lise celular. Adicionalmente, os NPsC podem produzir espécies reativas de oxigénio (*Reactive Oxygen Species*, ROS) quando expostos à luz, o que pode causar *stress* oxidativo resultando em danos nas células microbianas. Esta abordagem de dupla ação aumenta o seu potencial antimicrobiano e reduz a probabilidade de desenvolvimento de resistência.<sup>52,65,87</sup>

Também a intensidade da fluorescência e o comprimento de onda de emissão dos vários tipos de PQsC são influenciados pelos microrganismos existentes, pelo que, na presença de populações bacterianas mistas, os PQsC fluorescentes podem ser utilizados como uma ferramenta seletiva de espécies diferentes, funcionando como sonda/marcador fluorescente de bactérias. Atualmente, os PQsC têm sido aplicados em imagiologia de diferentes células microbianas, citando-se como exemplos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, leveduras, entre outros.<sup>87</sup>

Shahshahanipour *et al.*<sup>88</sup> exploraram duas espécies de bactérias, *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) para testar a capacidade antibacteriana de NPsC obtidos por processos hidrotérmicos utilizando como precursor a planta Hena (*Lawsonia inermis*) em diferentes concentrações. Os resultados revelaram que para concentrações muito baixas de precursor ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), os NPsC atuaram como bactericidas tanto para bactérias Gram-positivas como Gram-negativas. Shahshahanipour *et al.*<sup>88</sup> anteciparam que a morte bacteriana poderá ter ocorrido devido ao tamanho dos NPsC e à sua elevada relação superfície/volume, podendo causar danos nas membranas ou produzirem radicais livres e espécies oxidantes levando à morte bacteriana.<sup>52,88</sup>

## 1.7 Síntese de Nanomateriais de Carbono a partir de Microalgas

Ao longo dos anos, as microalgas têm sido uma fonte de compostos úteis utilizados principalmente como alimentos e suplementos dietéticos. Atualmente, a síntese de nanomateriais de carbono surge da necessidade de substituir materiais perigosos por recursos alternativos ecologicamente mais sustentáveis e economicamente viáveis.<sup>89</sup> Nas últimas décadas, a comunidade científica tem assim direcionado a sua atenção na síntese de nanopartículas obtidas a partir de diferentes precursores, através da valorização de resíduos de diversas origens como alternativa à síntese química convencional. Até ao momento, uma grande diversidade de fontes de carbono, nomeadamente enzimas, extratos de plantas, resíduos alimentares e agrofloretais, bactérias, algas e fungos, entre outros, têm sido utilizados na produção de nanopartículas.<sup>56,58,89</sup>

Esta nanotecnologia verde representa uma tecnologia altamente promissora com uma ampla gama de aplicações na área farmacêutica, ao proporcionar uma relação superfície/volume significativamente maior comparativamente às nanopartículas produzidas por processos químicos mais convencionais.<sup>87</sup> Nanopartículas sintetizadas a partir de algas foram descritas na literatura e as mesmas revelaram-se eficazes no tratamento e prevenção de infeções causadas por microrganismos resistentes a antibióticos.<sup>89</sup>

A síntese de NPsC a partir de microalgas apresentam várias vantagens, sendo uma fonte de matéria-prima renovável e de rápido crescimento, reduzindo a dependência das fontes de carbono tradicionais, nomeadamente de combustíveis fósseis, conduzindo a um processo mais ecológico devido ao seu alto teor de carbono. Os processos de cultivo e a carbonização de microalgas podem considerar-se rentáveis, especialmente quando comparados com os métodos tradicionais que requerem materiais precursores dispendiosos ou equipamento sofisticado.<sup>88,89</sup>

Uma outra vantagem reside no facto de facilmente poder implementar-se um aumento de escala, uma vez que as microalgas podem ser cultivadas em grandes quantidades utilizando biorreatores, o que as torna uma matéria-prima escalável para a síntese de nanomateriais de carbono.<sup>88,89</sup>

As propriedades únicas dos nanomateriais de carbono derivados de microalgas poderão abrir novos caminhos para aplicações diversificadas, nomeadamente em aplicações biomédicas, como biossensores, em bioimagem, em sistemas de libertação controlada de fármacos ou como agentes antimicrobianos.<sup>90,91</sup>

Contudo, a síntese de NPsC a partir de microalgas pode ser um processo complexo, que requer um controlo criterioso de vários parâmetros reacionais.

Embora as microalgas ofereçam propriedades únicas, podem nem sempre ser a matéria-prima mais adequada para uma dada aplicação, pelo que fontes alternativas de carbono ou métodos de síntese diferenciados estão em permanente desenvolvimento.<sup>89,90,91</sup>

As algas vermelhas, como referido anteriormente, são maioritariamente utilizadas como fonte de alimento em vários países devido ao seu sabor diferenciado, aos elevados teores de proteínas e vitaminas, podendo a sua presença minimizar e estabilizar a produção de NMsC.<sup>89</sup> A produção de nanopartículas a partir de algas vermelhas marinhas está ainda por isso numa fase inicial de desenvolvimento devido a fenómenos de agregação, ao crescimento lento e a problemas de estabilidade. A *Porphyra vietnamensis* é uma espécie de macroalga vermelha que tem sido investigada exaustivamente pela sua capacidade de gerar vários tipos de nanopartículas, graças à existência de um potencial agente redutor, como são os polissacáridos sulfatados.<sup>92</sup>

Na generalidade, a síntese de NMsC a partir de microalgas é ainda uma área de investigação emergente, existindo desafios contínuos na otimização do processo, na reprodutibilidade dos ensaios, bem como o intuito do sempre desejável, aumento de escala, tendo como foco os princípios da Química Verde e do desenvolvimento de materiais sustentáveis.



## **2. RESULTADOS E DISCUSSÃO**



## 2.1 Preâmbulo

Neste capítulo serão apresentados os processos empregues na síntese de NPsC recorrendo à microalga vermelha como fonte de carbono. Os ensaios foram realizados utilizando a cultura direta de *P. cruentum*, a biomassa seca e a biomassa húmida, designando-se ao longo do texto por *C\_Porph.cr.*, *BS\_Porph.cr.*, *BH\_Porph.cr.*, respetivamente. Numa fase posterior, a biomassa foi lavada e seca, tendo sido igualmente utilizada na síntese de NPsC (*BH\_APL\_Porph.cr.* e *BS\_APL\_Porph.cr.*). A caracterização físico-química da matéria-prima foi realizada para quantificação dos compostos extra e intracelulares, sendo que os extracelulares se encontram presentes no sobrenadante.

A avaliação foi realizada nos respetivos lotes fornecidos, sendo o 1º lote designado por *1\_SB\_Porph.cr.* e o 2º lote por *2\_SB\_Porph.cr.*; já os compostos intracelulares estão presentes nas frações obtidas após extração MSE, tendo sido designados por *S\_MSE\_Porph.cr.* Esta caracterização consistiu na determinação dos sólidos totais, flavonoides, compostos fenólicos totais, polissacáridos, proteínas, cinzas e lípidos. Foram também obtidos os espectros de FTIR da biomassa resultante dos processamentos anteriormente referidos.

Os NPsC produzidos através de processos hidrotérmicos, quer em reator de alta pressão, quer por irradiação assistida por microondas e em mufla, foram caracterizados por FTIR e ressonância magnética nuclear de protão (RMN <sup>1</sup>H).

Foram também avaliadas as suas propriedades fotofísicas utilizando técnicas espectroscópicas de ultravioleta-visível (UV-Vis) e de fluorescência de estado estacionário. Perspetivando potenciais aplicações biológicas, foi estudada a atividade antioxidante dos NPsC, utilizando os métodos dos radicais ABTS e DPPH e também foi explorada a capacidade quelante de ferro (II). Nos NPsC que exibiram melhor rendimento quântico foi avaliada a sua atividade antimicrobiana e a citotoxicidade *in vitro* em diferentes linhas celulares (não-tumorais e tumorais), acompanhada por microscopia de fluorescência com a pretensão de explorar o seu potencial para aplicações em bioimagemologia.

## 2.2 Caracterização da Matéria-Prima (Cultura de *P. cruentum*)

### 2.2.1 Quantificação de Sólidos Totais

Quantificou-se o teor de sólidos totais da cultura de *P. cruentum*, (ca. 40 mL) nos diferentes lotes (**Tabela 2**). Estes valores serviram de base aos cálculos necessários para a realização das reações de carbonização (em reator de alta-pressão, em reator de microondas e em mufla) na presença de vários aditivos.

**Tabela 2** - Quantificação dos sólidos totais dos lotes da cultura de *P. cruentum*.

<i>P. cruentum</i>	Sólidos Totais (mgmL <sup>-1</sup> )
Lote 1	32.62
Lote 2	32.43

### 2.2.2 Quantificação do Teor de Cinzas Totais

A determinação das cinzas permitiu quantificar o teor de materiais inorgânicos presentes na cultura de *P. cruentum* em estudo (**Tabela 3**). Este teor foi determinado em ambos os lotes, segundo o procedimento descrito por Sluiter *et al.*<sup>93</sup>

**Tabela 3** - Teor de cinzas na cultura de *P. cruentum*.

<i>P. cruentum</i>	Cinzas Totais (%)
Lote 1	86.3
Lote 2	85.6

O teor de cinzas totais nos lotes em estudo foi bastante elevado, indiciando a presença de uma grande quantidade de matéria inorgânica e conseqüentemente, um baixo teor de carbono. Dados disponíveis na literatura indicam para a *P. cruentum* valores entre 16.8% e 23.6%,<sup>11</sup> valores que não são compatíveis com os resultados obtidos.

### 2.2.3 Quantificação do Teor de Lípidos

A quantificação dos lípidos presentes nos lotes em estudo da cultura de *P. cruentum* foi realizada por extração contínua em Soxhlet utilizando *n*-hexano como solvente, durante 5 horas, com uma carga de 3 g de biomassa previamente seca em estufa a 105 °C (**Tabela 4**).

**Tabela 4** - Teor de lípidos presentes na cultura de *P. cruentum*.

<i>P. cruentum</i>	Lípidos (%)
Lote 1	7.6
Lote 2	1.3

De acordo com a literatura, as algas vermelhas apresentam um teor de lípidos que varia entre 10-47%,<sup>15</sup> sendo os valores obtidos bastante baixos, em particular no lote 2.

#### **2.2.4 Quantificação dos Compostos Bioativos presentes na cultura de *P. cruentum***

Os componentes extra e intracelulares da cultura de *P. cruentum* foram quantificados, separando-se o sobrenadante da biomassa por centrifugação. O recurso a métodos espectrofotométricos, permitiu a sua quantificação, sendo o sobrenadante analisado diretamente após centrifugação e a biomassa sujeita a extração MSE, onde cada fração obtida foi caracterizada, nomeadamente foi determinado o teor em polissacáridos, em proteínas, em compostos fenólicos, bem como avaliada a sua capacidade antioxidante. Os resultados obtidos do S\_MSE\_Porphy.cr. representam o somatório dos conteúdos determinados para as 5 frações resultantes da extração MSE (FW1, FW2, FKOH, FHCl e FNaOH).

A caracterização do sobrenadante foi feita individualmente para cada um dos lotes (**Tabela 5**); a biomassa, devido à pouca quantidade foi caracterizada com a resultante dos dois lotes (**Tabela 6**).

**Tabela 5** - Compostos bioativos presentes no sobrenadante de *P. cruentum*.

	<b>1_SB_Porphy.cr.</b>		<b>2_SB_Porphy.cr.</b>	
	Concentração (mg/mL)	%	Concentração (mg/mL)	%
<b>Proteínas</b>	0.36	1.09	0.29	0.90
<b>Polissacáridos totais</b>	4.94	15.21	2.61	8.03
<b>Polissacáridos sulfatados</b>	0.39	1.19	0.37	1.12
<b>Polissacáridos ácidos</b>	0.47	1.46	0.42	1.28
<b>Lípidos</b>	0.06	0.19	0.03	0.11
<b><math>\beta</math>-Glucanos</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. - não detetado. % (massa / massa sólidos totais na biomassa).

**Tabela 6** - Compostos bioativos presentes nas frações de MSE obtidas a partir da biomassa de *P. cruentum*.

<b>S_MSE_Porphy.cr.</b>	<b>Massa (mg/g biomassa)</b>	<b>%</b>
<b>Proteínas</b>	3.30	5.98
<b>Polissacáridos totais</b>	8.12	14.76
<b>Polissacáridos sulfatados</b>	1.08	1.97
<b><math>\beta</math>-Glucanos</b>	n.d.	n.d.
<b>Polissacáridos ácidos</b>	9.24	16.80
<b>Lípidos</b>	4.36	7.92

% (massa / massa sólidos totais na biomassa); n.d. não detetado.

A biomassa que foi sujeita à extração por MSE apresenta os valores mais elevados em compostos bioativos, resultado esperado atendendo que o sobrenadante é essencialmente meio de cultura exausto. Contudo, as etapas de congelamento e descongelamento da amostra podem ter resultado em lise celular, pelo que é provável que alguns componentes bioativos quantificados no sobrenadante possam ser de origem intracelular. Atendendo a dados reportados na literatura, os valores obtidos para os compostos bioativos intracelulares são bastante inferiores, podendo esta evidência ter origem na baixa concentração de biomassa presente na cultura, bem como na eventual libertação já mencionada destes compostos para o meio.<sup>8,10,15</sup>

#### 2.2.4.1 Avaliação da Capacidade Antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada para os vários extratos, utilizando os métodos descritos em 3.3.8.

A quantificação de flavonoides totais e compostos fenólicos para os sobrenadantes de cada lote (1\_SB\_Porphy.cr. e 2\_SB\_Porphy.cr.) é apresentada na tabela seguinte.

**Tabela 7** - Teores de flavonoides totais e compostos fenólicos nos sobrenadantes da cultura de *P. cruentum*.

Amostra	Flavonoides (mg EC/g biomassa)	Compostos Fenólicos (mg EAG/g biomassa)
1_SB_Porphy.cr.	3.84 ± 0.07	1.46 ± 0.05
2_SB_Porphy.cr.	3.92 ± 0.29	1.25 ± 0.18

Os conteúdos totais de compostos fenólicos e flavonoides dos extratos de algas marinhas podem variar significativamente com o método de extração utilizado.<sup>15</sup> Assim, o método de extração desempenha um papel crucial na quantificação destes componentes, atendendo às diferenças de solubilidade nas condições de temperatura e pH impostas nas várias etapas envolvidas no processo extrativo. A etapa onde a extração é realizada com água quente e da qual resulta a fração FW2 revela teores superiores desses compostos (**Tabela 8**).

**Tabela 8** - Teores de flavonoides e compostos fenólicos das frações obtidas na extração MSE da biomassa de *P. cruentum*.

Fração obtida em MSE	Flavonoides (mg EC/g biomassa)	Compostos Fenólicos (mg EAG/g biomassa)
FW1	1.36 ± 0.17	0.04 ± 0.0
FW2	3.04 ± 0.18	0.05 ± 0.01
FKOH	0.51 ± 0.02	0.04 ± 0.0
FHCl	0.70 ± 0.04	0.03 ± 0.02
FNaOH	0.16 ± 0.07	n.d.
<b>S_MSE_Porphy.cr.</b>	<b>5.76 ± 1.14</b>	<b>0.16 ± 0.01</b>

**Tabela 9** - Teores de flavonoides e compostos fenólicos no sobrenadante e biomassa de *P. cruentum*.

Amostra	% Flavonoides	% Compostos Fenólicos
1_SB_Porphy.cr.	0.55	0.17
2_SB_Porphy.cr.	0.56	0.14
<b>S_MSE_Porphy.cr.</b>	<b>10.47</b>	<b>0.24</b>

% (massa / massa sólidos totais na biomassa).

Os teores de flavonoides e compostos fenólicos na biomassa são superiores comparativamente aos teores observados no sobrenadante (**Tabela 9**), contudo

bastantes inferiores aos de compostos fenólicos reportados para a biomassa de *P. cruentum* após extração com etanol, n-hexano ou metanol.<sup>94</sup>

Os polissacáridos sulfatados presentes na microalga *P. cruentum* são os principais responsáveis pela sua capacidade antioxidante.<sup>12</sup> Os resultados obtidos revelaram uma baixa percentagem de polissacáridos sulfatados ca. 2 %, quer no sobrenadante quer na biomassa (**Tabela 5** e **Tabela 6**), que aliados aos teores de flavonoides e compostos fenólicos determinados antecipavam uma baixa resposta antioxidante. De acordo com a literatura, durante o crescimento da *P. cruentum* há produção de polissacáridos extracelulares sulfatados,<sup>8</sup> desta forma era de esperar que o teor destes polissacáridos fosse superior no sobrenadante, o que não se verificou. Contudo, apesar de reduzida, foi observada atividade antioxidante (método radical ABTS) mais elevada no sobrenadante ( $1.10 \pm 0.0$  mg ET/ g biomassa), face à obtida para a fração FKOH de MSE ( $0.02 \pm 0.10$  mg ET/ g biomassa), que foi a única que exibiu essa atividade.

Como anteriormente referido, o processo de congelamento/descongelamento da amostra, poderá ter originado lise celular, direcionando componentes intracelulares, responsáveis pela atividade antioxidante, para a fração de sobrenadante.

Pelo método do radical DPPH, não foi detetada atividade nos sobrenadantes nem nas frações MSE.

### 2.2.5 Caracterização Estrutural

A caracterização estrutural dos lotes da cultura de *P. cruentum*, da biomassa seca (antes e após lavagem e designadas ao longo do texto por C\_Porphy.cr.\_1lote, C\_Porphy.cr.\_2lote, BS\_Porphy.cr. e BS\_APL\_Porphy.cr., respetivamente), foi realizada por espectroscopia de FTIR (**Figura 9** e **Figura 10**).

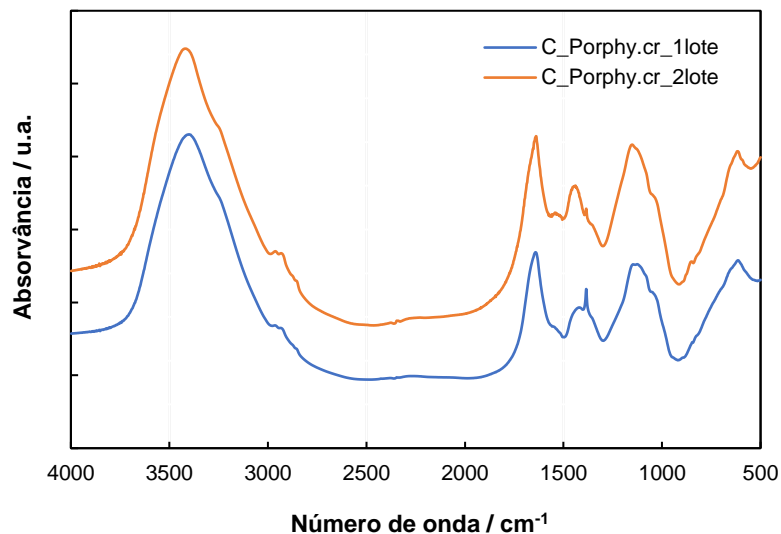


Figura 9 - Espectros de FTIR da cultura de *P. cruentum* em pastilha de KBr.

A análise dos espectros revela um perfil muito semelhante para ambos os lotes, destacando-se como bandas mais relevantes uma banda alargada a ca. 3405 cm<sup>-1</sup> (OH), com ombro a 3240 cm<sup>-1</sup> (NH de amida), 2970 e 2930 cm<sup>-1</sup> (=C-H e C-H de grupos alquilo), 1650 cm<sup>-1</sup> (C=O de ácidos e amidas e C=C), 1552, 1453 e 1380 cm<sup>-1</sup> e ainda a 1160 cm<sup>-1</sup> (C-O).

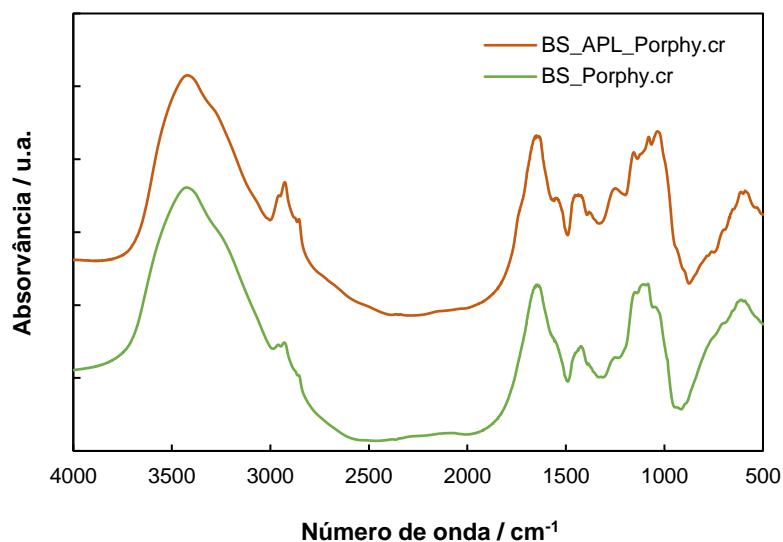


Figura 10 - Espectros de FTIR da biomassa de *P. cruentum* antes e após lavagem em pastilha de KBr.

Conforme observado nos espectros anteriores (**Figura 9**), o perfil volta a ser muito similar, embora seja notória uma maior evidência das bandas respeitantes às vibrações de C-H e =C-H a ca. 2942, 2928, 2850  $\text{cm}^{-1}$  na biomassa após lavagem, com manutenção em ambas da banda alargada de OH a 3415  $\text{cm}^{-1}$  e C=O/C=C a ca. 1640  $\text{cm}^{-1}$ .

### 2.3 Síntese e Caracterização de NPsC a partir da Microalga *P. cruentum*

A síntese dos NPsC foi realizada através de métodos sustentáveis, designadamente por carbonização hidrotérmica com aquecimento convencional, recorrendo à utilização de um reator de alta pressão, por carbonização hidrotérmica assistida por irradiação microondas realizada em reatores de microondas monomodo e microondas doméstico e também carbonização com recurso a aquecimento em mufla. Na síntese por aquecimento convencional foram utilizados 3 tipos de amostra, designadas ao longo do texto por *C\_Porphy.cr.*, *BS\_Porphy.cr.*, *BH\_Porphy.cr.*. Os NPsC obtidos por carbonização hidrotérmica assistida por microondas e aquecimento em mufla, utilizaram a *BS\_Porphy.cr.* como precursor. As misturas reacionais obtidas foram filtradas por membrana de celulose regenerada 0.2  $\mu\text{m}$  e purificadas por extração líquido-líquido com solventes orgânicos ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e AcOEt).

#### 2.3.1 Síntese por Carbonização Hidrotérmica com Aquecimento Convencional

Foram realizados vários ensaios no reator de alta pressão, variando as condições operatórias, designadamente o tipo de aditivo, o rácio aditivo/biomassa, a temperatura, o tempo de residência e as condições de arejamento e ainda as condições físicas da amostra. Na síntese com *C\_Porphy.cr.* (120 mL) foram utilizados diferentes aditivos como fonte de nitrogénio: etilenodiamina (ED), ureia, melamina (ML), *para*-fenilenodiamina (*p*-PD) e *orto*-fenilenodiamina (*o*-PD). A avaliação espectroscópica dos NPsC produzidos revelou maior intensidade de fluorescência com  $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$  e nalguns casos, a comprimentos de onda ligeiramente superiores (360 nm).

Considerando o rendimento quântico de fluorescência como um dos parâmetros mais relevantes para determinadas aplicações, avaliou-se o efeito da variação do rácio aditivo/biomassa no rendimento quântico. Os NPsC obtidos com rácio mássico de ED 0.16 demonstraram, em geral, valores de rendimento quântico mais elevados, quando

comparados com rácios mássicos superiores (até 0.32), mantendo inalteradas as restantes condições reacionais (temperatura e tempo de residência).

O efeito da temperatura na síntese dos NPsC foi igualmente avaliado (**Tabela 10**).

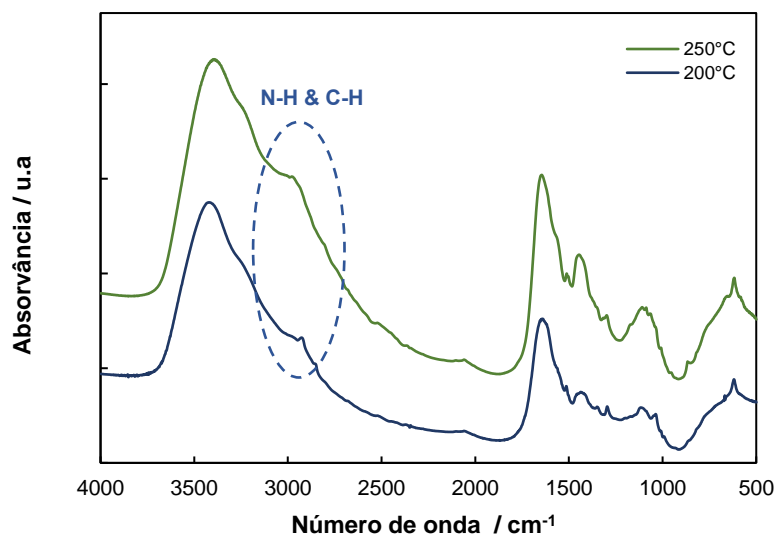
**Tabela 10** - Efeito da temperatura no rendimento quântico e mássico dos NPsC.<sup>a)</sup>

T (°C)	Rendimento Mássico NPsC (%)	Teor de Sólidos (mgmL <sup>-1</sup> )	$\Phi_F$ (340nm)
200	78.4	33.04	0.09*
250	70.4	37.74	0.12

<sup>a)</sup> Condições operatórias: C\_Porphy.cr. (120 mL), ED (10.65 mmol), rácio mássico (ED/C\_Porphy.cr.) = 0.16, 6 h, com agitação. \* $\lambda_{exc}$  = 360 nm.

Do tratamento hidrotérmico à temperatura mais baixa, verificou-se uma diminuição do rendimento quântico, podendo concluir-se que os melhores rendimentos quânticos foram alcançados a temperaturas superiores (até ca. 16 %; vide adiante), resultados não concordantes com o reportado na literatura,<sup>95</sup> onde é referido que o aumento de temperatura promove a degradação das espécies emissivas, resultando numa diminuição do  $\Phi_F$  dos NPsC.

Da análise dos espectros de FTIR (**Figura 11**) verifica-se que com o aumento da temperatura, as bandas a ca. 2975 e 2955 cm<sup>-1</sup>, referentes à extensão das ligações N-H e C-H tornam-se mais pronunciadas.



**Figura 11** - Espectros de FTIR dos NPsC a diferentes temperaturas em pastilha de KBr.

Um outro parâmetro em avaliação foi o tempo de residência, não se observando incremento no rendimento quântico para tempos de reação mais prolongados

(4 h vs. 6 h) (**Tabela 11**). Tempos mais prolongados poderão ser explorados atendendo ao seu benefício na criação do núcleo de carbono e consequentemente, nas propriedades óticas inerentes.<sup>96</sup>

**Tabela 11** - Efeito do tempo de reação e da temperatura no rendimento quântico e mássico dos NPsC.<sup>a)</sup>

t (h)/T (°C)	$\Phi_F$ (340 nm)	Rendimento Mássico NPsC (%)	Teor de Sólidos (mgmL <sup>-1</sup> )
4/200	0.08 <sup>b)</sup>	74.3	31.92
4/250	0.16	72.8	33.15
6/200	0.09 <sup>b)</sup>	78.4	33.04
6/250	0.15 <sup>c)</sup>	74.6	37.74

<sup>a)</sup> Condições operatórias: C\_Porph.cr. (120 mL), ED (10.65 mmol), rácio mássico (ED/ C\_Porph.cr.) = 0.16, com agitação; <sup>b)</sup>  $\lambda_{exc}$  = 360 nm; <sup>c)</sup> média dos ensaios.

Considerando que a funcionalização da superfície de carbono, com espécies de nitrogénio, potencia as propriedades luminescentes dos NPsC, foi explorado o impacto de diferentes aditivos (Ureia, ML, *p*-PD e *o*-PH) (**Tabela 12**) nas suas propriedades óticas.

**Tabela 12** - Efeito da natureza do aditivo no rendimento quântico e mássico dos NPsC<sup>a)</sup>.

Aditivo	Rácio	$\Phi_F$ ( $\lambda_{exc}=340nm$ )	Rendimento Mássico NPsC (%)	Teor de Sólidos (mgmL <sup>-1</sup> )
-	-	0.06	90.1	32.65
ED	0.16	0.12	70.4	37.74
	0.32	0.15	72.5	39.24
Ureia	0.16	0.07	81.7	33.71
	0.32	0.07	49.7	32.09
ML	0.16	0.05	66.0	29.98
	0.32	0.07	55.8	29.41
<i>p</i> -PD	0.16	0.01	62.5	30.01
	0.32	0.03*	55.2	30.57
<i>o</i> -PH	0.16	0.07	70.1	31.91

\* $\lambda_{exc}$  = 360 nm; <sup>a)</sup> Condições operatórias: C\_Porph.cr. (120 mL), 250 °C, 6 h, com agitação.

Nenhuma das aminas testadas (com exceção para a ED conforme já referido anteriormente) contribuiu positivamente para o incremento do rendimento quântico,

quando comparados os valores dos  $\Phi_F$  dos NPsC com o obtido na ausência de qualquer aditivo (ca. 0.06), sendo que na presença da *p*-PD se obtêm  $\Phi_F$  inferiores para qualquer um dos rácios testados (0.01 e 0.03 para rácios 0.16 e 0.32, respetivamente).

A ED demonstrou ser a fonte de nitrogénio que originou NPsC com maior luminescência, em particular para um rácio mássico de 0.32, sendo que valores mais elevados (até 0.64) não mostraram qualquer mais-valia no rendimento quântico. As reações foram realizadas sempre com as mesmas condições operatórias, i.e., 120 mL de *C\_Porphy.cr.*, 250 °C, 6 h com agitação e em atmosfera oxidativa, fazendo apenas variar o rácio ED/*C\_Porphy.cr.* (**Tabela 13**).

**Tabela 13** - Efeito da quantidade de ED no rendimento quântico e mássico dos NPsC<sup>a)</sup>.

Rácio	$\Phi_F$ ( $\lambda_{exc}=340nm$ )	Rendimento Mássico (NPsC %)	Teor de Sólidos (mgmL <sup>-1</sup> )
—	0.06	90.1	32.65
0.08	0.11	82.5	32.92
0.16	0.12	70.4	37.74
0.32	0.15	72.5	39.24
0.64	0.17	68.3	37.60

<sup>a)</sup> Condições operatórias: 250 °C, 6 h.

O incremento do rácio de ED mostra um aumento progressivo do rendimento quântico, acompanhado pelo teor de sólidos, embora haja uma diminuição dos rendimentos mássicos dos NPsC.

Paralelamente foram realizados ensaios em duplicado para cada um dos rácios mássicos, de forma a avaliar a reprodutibilidade dos ensaios (**Tabela 14**), podendo considerar-se os resultados aceitáveis atendendo à heterogeneidade da matriz em estudo.

**Tabela 14** - Ensaio em duplicado para diferentes rácios mássicos de ED<sup>a)</sup>.

Ensaio	Rácio	$\Phi_F$ ( $\lambda_{exc}=340nm$ )	Rendimento Mássico (NPsC %)	Teor de Sólidos (mgmL <sup>-1</sup> )
1	0.08	0.11	82.5	28.5
2		0.14	86.4	35.8
1	0.16	0.12	70.4	37.7
2		0.16	80.9	33.4
1	0.32	0.15	62.4	39.2
2		0.16	71.3	33.5
1	0.64	0.15	63.6	38.9
2		0.14	65.1	40.9

<sup>a)</sup> Condições operatórias: 250 °C, 6 horas.

O impacto do desarejamento foi também avaliado em condições de carbonização hidrotérmica típicas, não se observando um efeito significativo nas propriedades dos NPsC (**Tabela 15**).

**Tabela 15** - Efeito da natureza da atmosfera nas características dos NPsC.

Atmosfera	$\Phi_F$ ( $\lambda_{exc}=340nm$ )	Rendimento NPsC (%)	Teor de Sólidos (mgmL <sup>-1</sup> )
Ar	0.16	80.9	33.40
N <sub>2</sub>	0.18	76.4	30.99

Dado que a proveniência da biomassa da microalga e os procedimentos que envolvem a sua obtenção, particularmente a etapa de centrifugação para separação da biomassa do meio nutriente, influenciam de forma significativa as suas propriedades físico-químicas, foram sintetizados NPsC utilizando a biomassa húmida e seca, designando-se por BH\_*Porphy.cr.* e BS\_*Porphy.cr.*, respetivamente. Assim, nos ensaios de carbonização foi utilizada biomassa direta da centrifugação (biomassa húmida e seca) e também biomassa que, após a centrifugação foi previamente lavada e posteriormente seca para ser utilizada como precursor na síntese de NPsC (BS\_APL\_*Porphy.cr.*) e utilizada diretamente após lavagem (BH\_APL\_*Porphy.cr.*). Os resultados obtidos em cada síntese encontram-se descritos na **Tabela 16**.

**Tabela 16** - Efeito da origem da matéria-prima no rendimento quântico e mássico dos NPsC.

Matéria-Prima	Rácio	Teor de Sólidos (mgmL <sup>-1</sup> )	Rendimento Mássico NPsC (%)	$\Phi_F$ ( $\lambda_{exc}$ 340 nm)
BH_Porphy.cr.	0.16	2.59	5.13	0.07
BS_Porphy.cr.	0.16	28.99	63.70	0.16
BS_Porphy.cr.	0.32	25.42	51.00	0.20
BH_Porphy.cr.	0.32	3.67	6.12	0.05
BH_APL_Porphy.cr.	0.16	1.95	4.22	0.05
BS_APL_Porphy.cr.	0.16	23.85	52.57	0.15

Verifica-se que ao utilizar a biomassa húmida sem e com lavagem, há uma diminuição significativa do teor de sólidos, no rendimento mássico em NPsC e também no rendimento quântico; contudo, mesmo para a biomassa seca, os rendimentos mássicos em geral são mais baixos que os obtidos para os NPsC sintetizados utilizando a cultura direta (*C\_Porphy.cr.*) (**Tabela 13**).

### 2.3.2 Carbonização Hidrotérmica Assistida por Irradiação Microondas

A carbonização hidrotérmica de biomassa assistida por irradiação microondas (CHMw) para a síntese de NPsC foi também explorada, utilizando apenas a *BS\_APL\_Porphy.cr.* como precursor. Os ensaios foram realizados em reatores monomodo em *vials* de 10 mL (CHMw\_10) e 30 mL (CHMw\_30) de capacidade máxima, tendo também sido utilizado um reator doméstico.

Nos ensaios realizados nos reatores monomodo, avaliou-se o efeito do tempo de reação, variando o tempo entre 5 e 60 min (**Tabela 17** e **Tabela 18**).

**Tabela 17** - Efeito do tempo de reação no rendimento quântico e mássico dos NPsC obtidos por CHMw\_10<sup>a)</sup>

Ensaio	t (min)	Teor de Sólidos (mgmL <sup>-1</sup> )	Rendimento Mássico NPsC (%)	$\Phi_F$ ( $\lambda_{exc}$ 380 nm)
NPsC_Mw_5	5	28.4	19.6	0.05
NPsC_Mw_10	10	28.2	32.4	0.06
NPsC_Mw_20	20	24.0	30.3	0.07
NPsC_Mw_30	30	26.0	32.9	0.06

<sup>a)</sup> Condições operatórias: 150 mg *BS\_APL\_Porphy.cr.*, 4.5 mL água, 150 °C, 27  $\mu$ L ED.

Nos ensaios realizados nos *vials* de menor capacidade, foi possível observar que o tempo de reação não teve impacto significativo nas características óticas dos NPsC. Comparativamente com os NPsC obtidos por tratamento hidrotérmico convencional,

verifica-se um desvio batocrômico no UV-Vis para 380 nm, sendo este o comprimento de onda de excitação utilizado no estudo das propriedades óticas destes materiais (**Tabela 17**). Verificou-se também que nas condições testadas, os rendimentos quânticos de fluorescência revelaram valores inferiores comparativamente aos observados nos NPsC obtidos por tratamento hidrotérmico convencional.

**Tabela 18** - Efeito do tempo de reação no rendimento quântico e mássico dos NPsC obtidos por CHMw\_30<sup>a)</sup>.

Ensaio	t (min)	Teor de Sólidos (mgmL <sup>-1</sup> )	Rendimento Mássico NPsC (%)	$\Phi_F$ ( $\lambda_{exc}$ 360 nm)
NPsC_Mw_15	15	29.15	37.7	0.05
NPsC_Mw_30	30	30.35	52.3	0.06
NPsC_Mw_60	60	25.25	69.7	0.09

<sup>a)</sup> Condições operatórias: 500 mg BS\_APL\_Porphy.cr., 15 mL água, 200 °C, 89  $\mu$ L ED (ED/ Porphy.cr. = 0.16).

Nos NPsC obtidos por CHMw\_30, o aumento do tempo de reação contribuiu para um incremento quer no rendimento mássico, quer no rendimento quântico dos NPsC. Comparativamente com os NPsC obtidos por tratamento hidrotérmico convencional e por CHMw\_10 verifica-se um desvio batocrômico no UV-Vis para 360 nm (**Tabela 18**). No reator monomodo com capacidade máxima de 10 mL, a quantidade de aditivo na carbonização foi também avaliada, podendo concluir-se que essa variação não teve um impacto significativo no rendimento quântico (**Tabela 19**).

Devido ao pequeno volume de NPsC isolado em cada reação (ca. 2 mL), não foi possível determinar o teor de sólidos dos NPsC.

**Tabela 19** - Efeito da quantidade de ED no rendimento quântico e mássico dos NPsC por CHMw\_10<sup>a)</sup>.

Rácio	$\Phi_F$ ( $\lambda_{exc}$ 380 nm)	Rendimento Mássico NPsC (%)	Teor de Sólidos (mgmL <sup>-1</sup> )
—	0.02	51.8	24.3
0.08	0.05	n.d.	n.d.
0.16	0.05	19.6	28.4
0.32	0.03	n.d.	n.d.

<sup>a)</sup> Condições operatórias: 150 mg BS\_APL\_Porphy.cr., 4.5 mL água, 150 °C, 5 min. n.d.- não determinado.

Nos ensaios realizados no reator doméstico foram variados os tempos de reação e os resultados comparados com os obtidos nos reatores monomodo. Foram alcançados

rendimentos mássicos ligeiramente superiores, contudo, os rendimentos quânticos são menores (**Tabela 20**).

**Tabela 20** - Efeito do tempo de reação no rendimento quântico e mássico dos NPsC obtidos por CHMwD.<sup>a)</sup>

Ensaio	t (min)	Teor de Sólidos (mg mL <sup>-1</sup> )	Rendimento Mássico NPsC (%)	$\Phi_F$ ( $\lambda_{exc}$ 360 nm)
NPsC_MwD_5	5	22.0	60.7	0.04
NPsC_MwD_10	10	12.2	33.7	0.04
NPsC_MwD_15	15	20.7	57.1	0.05

<sup>a)</sup> Condições operatórias: 800W, 89  $\mu$ L ED (ED/ *Porphy.cr.* = 0.16).

Para além dos métodos de carbonização enunciados anteriormente, realizaram-se ensaios exploratórios utilizando uma mufla como fonte de aquecimento. A biomassa seca, o aditivo selecionado e água foram colocados num reator de aço inox com vaso de Teflon que foi previamente desarejado e selado. Selecionou-se para o estudo a temperatura de 150 °C e 6 h como tempo de residência; fez-se variar o rácio do aditivo (0.16 e 0.32) e selecionou-se como precursor a biomassa *BS\_APL\_Porphy.cr.* (**Tabela 21**).

**Tabela 21** - Efeito do rácio de ED na síntese de NPsC em mufla.<sup>a)</sup>

Biomassa	Aditivo	Rácio	Teor de Sólidos (mgmL <sup>-1</sup> )	Rendimento Mássico NPsC (%)	$\Phi_F$ ( $\lambda_{exc}$ 340 nm)	Cinzas (%)
<i>BS_APL_Porphy.cr.</i>	ED	0.16	27.84	43.2	0.06	57.0
	ED	0.32	30.28	46.8	0.06	51.7

<sup>a)</sup> Condições operatórias: 150 °C, 6h, sem agitação, desarejado.

Avaliando as diferentes condições testadas, é possível inferir que a carbonização hidrotérmica convencional, na presença de ED como aditivo e utilizando como precursor a biomassa *BS\_Porphy.cr.*, foi a que produziu NPsC com rendimentos quânticos e mássicos relevantes.

### 2.3.3 Purificação de Nanomateriais de Carbono

O processo de purificação é realizado de forma a remover impurezas inorgânicas e também moléculas de polaridade média/baixa que estejam presentes na mistura reacional e que possam interferir nas propriedades luminescentes do NPsC produzidos. A metodologia aplicada, após a filtração da mistura reacional por

membrana de acetato de celulose, foi a extração da dispersão aquosa com solventes orgânicos (diclorometano e acetato de etilo). Uma outra abordagem envolveu o recurso a cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex.

Paralelamente, foi avaliado o teor de cinzas nos NPsC produzidos a partir da cultura de *P. cruentum* (Tabela 22).

**Tabela 22** - Quantificação teor de cinzas totais dos NPsC sintetizados a partir *C\_Porphy.cr.*

Aditivo	Rácio	Cinzas (%)	Aditivo/Rácio	Cinzas (%)
ED	0.08	84.1	<i>p</i> -PD/0.16	95.0
	0.16	84.3	<i>o</i> -PH/0.16	98.5
	0.32	78.3	ED/0.16 (4 h, 250 °C)	82.1
	0.64	71.1	ED/0.16 (4 h, 200 °C)	89.5
Ureia	0.16	83.9	ED/0.32 (4 h, 200 °C)	81.9

Todas as condições testadas produziram NPsC com elevado teor de cinzas, inferindo-se da presença de materiais inorgânicos em quantidade muito significativa. Este resultado poderá ter origem na fonte da matéria-prima (microalgas), a qual se encontra dispersa no meio de cultura com nutrientes, onde a razão biomassa/meio de cultura poderá ser baixa.

**Tabela 23** - Quantificação teor de cinzas dos NPsC sintetizados a partir da biomassa de *P. cruentum*

Matéria-prima	Cinzas (%)
BH_ <i>Porphy.cr.</i>	40.4
BS_ <i>Porphy.cr.</i>	74.9
BS_ <i>Porphy.cr.</i> *	75.6
BH_ <i>Porphy.cr.</i> *	30.0
BH_APL_ <i>Porphy.cr.</i>	31.2
BS_APL_ <i>Porphy.cr.</i>	73.0

\*Rácio (ED/*Porphy.cr.*) = 0.32.

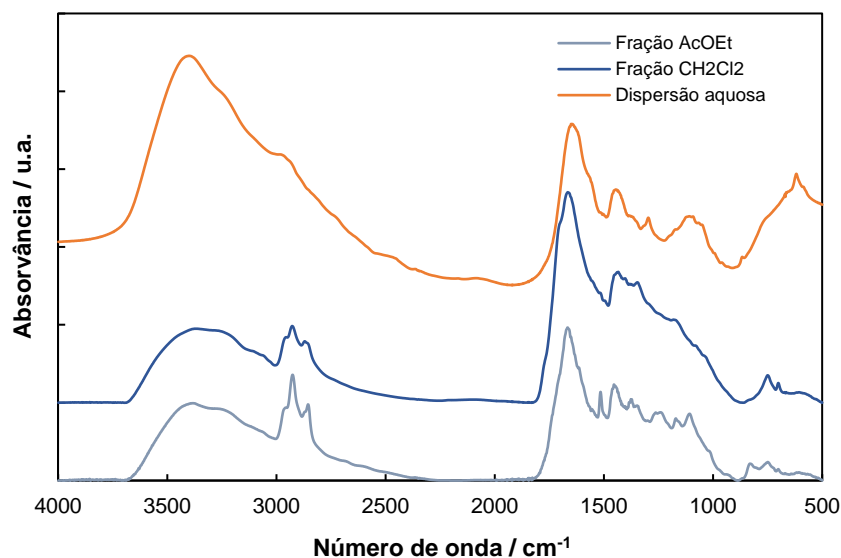
Da quantificação das cinzas dos NPsC produzidos com a biomassa de *P. cruentum* (recuperada do meio de cultura) (Tabela 23), foi possível observar que há uma diminuição significativa no seu teor, com particular destaque para os NPsC produzidos a partir de biomassa húmida.

### 2.3.3.1 Extração Líquido-Líquido

As misturas reacionais foram filtradas por membrana de acetato de celulose com tamanho de poro 0.20 µm e purificadas por extração líquido-líquido com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,

seguido de AcOEt. A fase aquosa resultante das extrações foi levada ao evaporador rotativo para remoção do solvente residual, as fases orgânicas foram evaporadas à secura e os respectivos resíduos quantificados.

Na **Figura 12** são apresentados os espectros de FTIR das frações orgânicas.



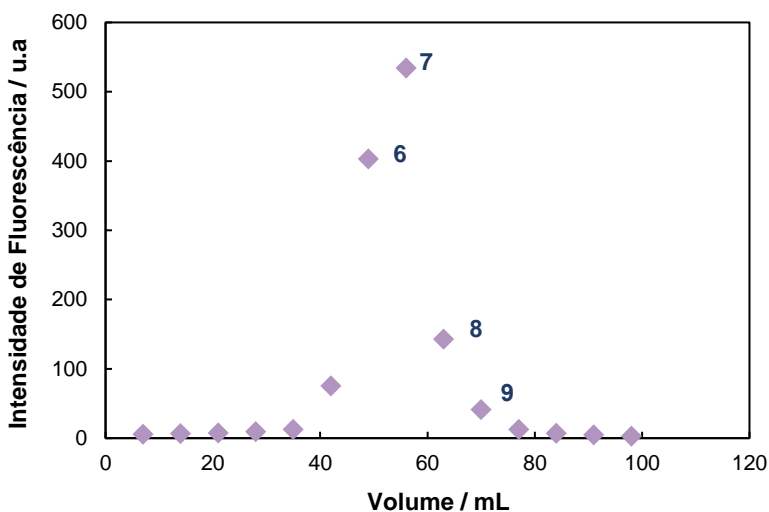
**Figura 12** - Espectros de FTIR das frações orgânicas e da dispersão aquosa em pastilha de KBr.

O espectro de FTIR da dispersão aquosa dos NPsC apresenta como bandas mais características as associadas a vibrações de extensão de ligações OH ( $3400\text{ cm}^{-1}$ ) com ombro a  $3239\text{ cm}^{-1}$  (N-H) e ainda a  $2989$  e  $2945\text{ cm}^{-1}$  (=CH e CH). A existência de grupos amida é identificada pela presença de uma banda de absorção intensa a  $1654\text{ cm}^{-1}$ , característica de vibrações de extensão de ligações C=O. Nos espectros das frações orgânicas, observa-se uma maior contribuição das bandas de vibração dos grupos =CH e CH de  $\text{Csp}^2$  e  $\text{Csp}^3$ , respetivamente.

### 2.3.3.2 Purificação por Sephadex G75

A purificação por Sephadex G75 assenta na premissa da separação por cromatografia de exclusão molecular. Esta purificação teve como objetivo a exclusão por tamanho de constituintes da amostra a purificar (NPsC), onde as espécies de maior dimensão são eluídas na frente do solvente, resultando em tempos de retenção menores na coluna cromatográfica. A purificação foi realizada por gravidade e as frações eluídas foram rastreadas por fluorescência com  $\lambda_{\text{exc}} = 340\text{ nm}$ , comprimento de onda máximo de absorção dos NPsC.

A purificação foi realizada no lote de NPsC\_C\_*Porphy.cr.* obtidos na presença de ED (0.32) e cujo rendimento quântico de fluorescência foi ca. 0.15. A coluna previamente empacotada com Sephadex G75 foi carregada com 1.3 mL de NPsC (ca. 50 mg), tendo sido recolhidas 14 frações, com volumes aproximados de 7 mL/fração e avaliada a sua intensidade de fluorescência (**Figura 13**).



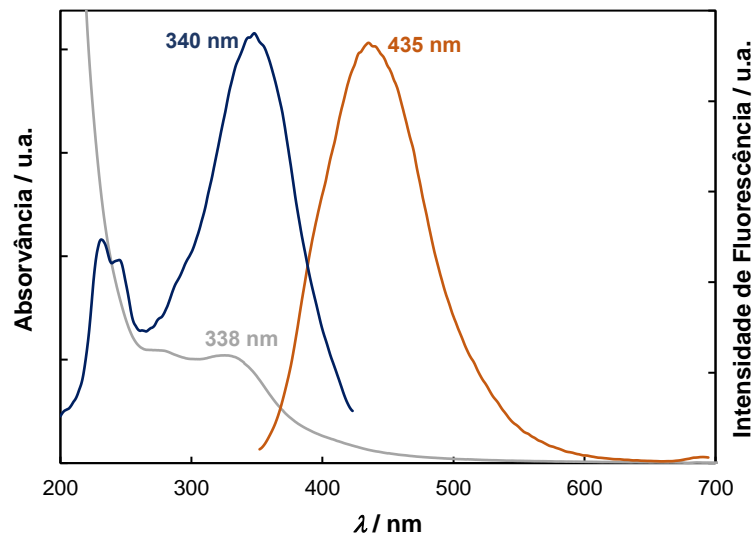
**Figura 13** - Intensidade de fluorescência das frações eluídas da coluna com Sephadex G75.

Foram selecionadas quatro frações e reunidas duas a duas atendendo ao seu máximo de emissão (NPsC\_Seph\_C1 (fração 6 e 8) e NPsC\_Seph\_C2 (7 e 9)) e determinado o respetivo rendimento quântico, obtendo-se 0.13 e 0.07 para NPsC\_Seph\_C1 e NPsC\_Seph\_C2, respetivamente.

O resultado obtido parece demonstrar que embora a fração NPsC\_Seph\_C1 apresente menor  $\Phi_F$  comparativamente à fração original ( $\Phi_F = 0.15$ ), o processo cromatográfico permitiu a separação de frações com propriedades óticas aparentemente distintas.

#### 2.3.4 Propriedades Fotofísicas dos NPsC

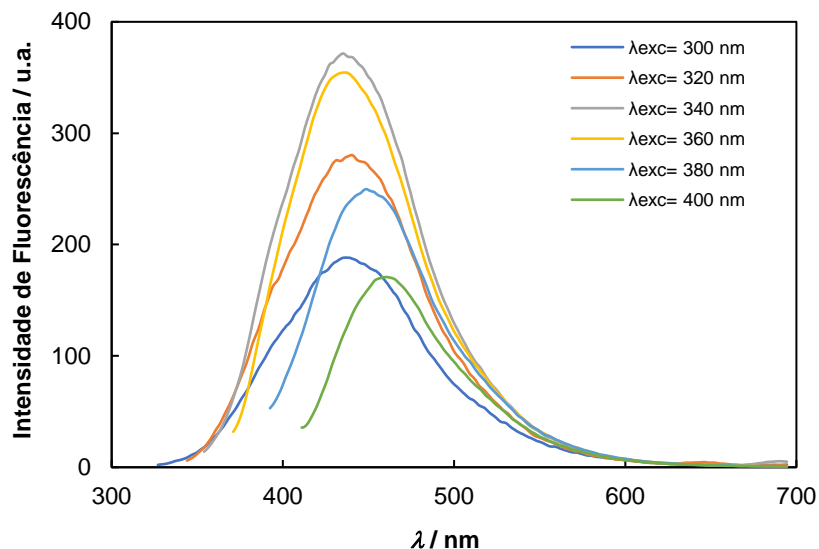
Para cada dispersão aquosa dos NPsC foram analisadas as características fotofísicas recorrendo a técnicas espectroscópicas, nomeadamente espectroscopia de absorção de estado fundamental (UV-Vis) e fluorescência de estado estacionário (emissão e excitação). Os espectros apresentados (**Figura 14**) correspondem aos NPsC obtidos a partir da biomassa seca de *P. cruentum* a 250 °C durante 6 horas, na presença de ED com um rácio de 0.32, os quais revelaram os rendimentos quânticos de fluorescência mais elevados.



**Figura 14** - Espectros de UV-Vis (linha cinza), emissão (linha laranja;  $\lambda_{exc}=340$  nm) e excitação (linha azul; monitorizado a 435 nm) de uma dispersão aquosa 0.1 mgmL<sup>-1</sup> NPsC obtidos a partir de BS\_Porphy.cr..

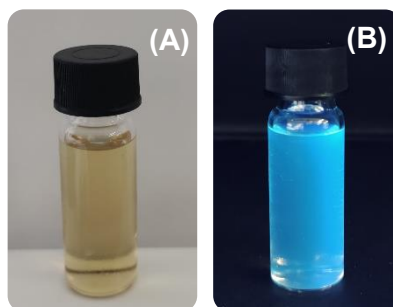
O espectro de UV-Vis exibe bandas bem definidas a ca. 280 nm e 330 nm, podendo ser atribuídas a transições  $\pi-\pi^*$  do centro de carbono e transições de  $n-\pi^*$ , podendo indicar a presença dos cromóforos C=C e C=O.

Os NPsC obtidos na presença de ED como aditivo, mostraram uma forte dependência entre o comprimento de onda de excitação e o comprimento de onda de emissão (**Figura 15**), verificando-se um progressivo desvio batocrômico.



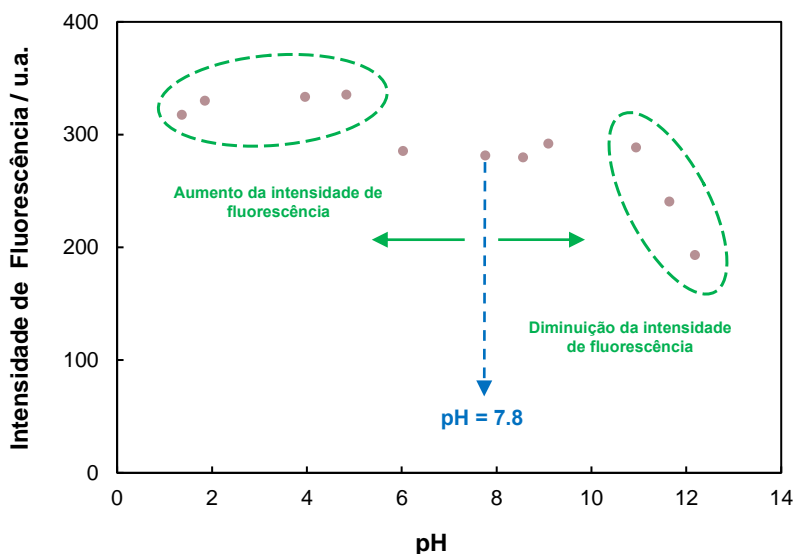
**Figura 15** - Espectros de emissão de dispersões aquosas  $0.1 \text{ mgmL}^{-1}$  de NPSC com excitação a diferentes comprimentos de onda (300 a 400 nm), obtidos a partir da BS\_Porphy.cr.

Quando excitados a  $\lambda_{exc} = 340 \text{ nm}$ , as dispersões aquosas emitem no azul, apresentando o máximo de emissão a  $435 \text{ nm}$ . Na **Figura 16**, apresentam-se fotografias de uma dispersão aquosa dos NPSC produzidos que exibem fluorescência no azul sob luz UV com  $\lambda = 366 \text{ nm}$ .



**Figura 16** - NPSC em dispersão aquosa sob luz natural (A); NPSC em dispersão aquosa sob lâmpada UV ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ) (B).

O efeito do pH na luminescência dos NPSC foi também avaliado, fazendo variar o pH da dispersão aquosa dos NPSC ( $0.1 \text{ mgmL}^{-1}$ ; pH inicial 7.76) de 1 a 12, recorrendo à adição de soluções aquosas de HCl e NaOH, mantendo a concentração dos NPSC inalterada (**Figura 17**).

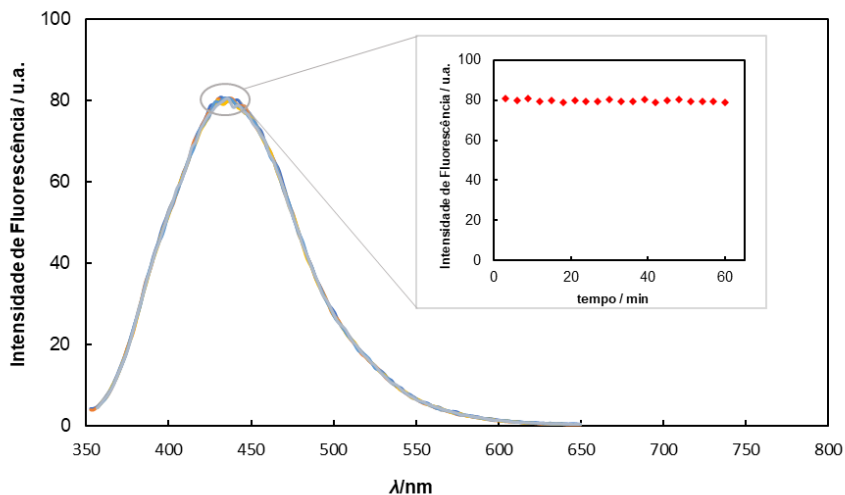


**Figura 17** - Variação da fotoluminescência ( $\lambda_{exc}= 340\text{nm}$ ; monitorizado a  $430\text{ nm}$ ) da dispersão aquosa de NPsC  $0.1\text{mgmL}^{-1}$ , obtidos da *C\_Porphy.cr.*.

Verificou-se que a fotoluminescência dos NPsC é sensível às variações de pH do meio. A acidificação do meio conduziu a um aumento da intensidade de fluorescência com o pH variando entre 2 e 4, sendo que a valores de pH superiores ao valor de pH inicial (acima de 8), a intensidade de fluorescência diminuiu.

Considerando o potencial de aplicação dos NPsC na área sensorial, bem como em bioimagem, a sua fotoestabilidade é um fator determinante, i.e., a capacidade de manter a sua fluorescência inalterada.

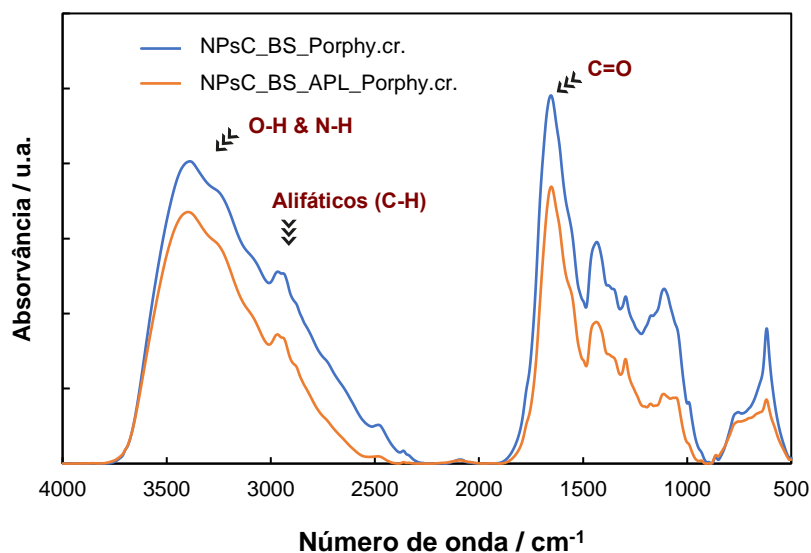
Assim, a fotoestabilidade da dispersão aquosa ( $0.1\text{ mgmL}^{-1}$ ) dos NPsC obtidos por carbonização hidrotérmica com aquecimento convencional, foi avaliada sob condições de irradiação contínua de UV ( $\lambda_{exc}= 340\text{ nm}$ ) durante 1 hora. Decorrido esse período, verificou-se a manutenção da intensidade de fluorescência (monitorizada ao comprimento de onda de emissão, ( $\lambda_{em} = 435\text{ nm}$ ), sendo o decréscimo de intensidade nulo (**Figura 18**).



**Figura 18** - Espectros de emissão de dispersão aquosa ( $0.1 \text{ mgmL}^{-1}$ ) de NPSC ( $\lambda_{em} = 425 \text{ nm}$ ) após 1 hora de irradiação contínua ( $\lambda_{exc} = 340 \text{ nm}$ ).

### 2.3.5 Caracterização Estrutural

A caracterização estrutural dos NPSC com *BS\_Porphy.cr.* e *BS\_APL\_Porphy.cr.* foi realizada por FTIR e RMN  $^1\text{H}$ .

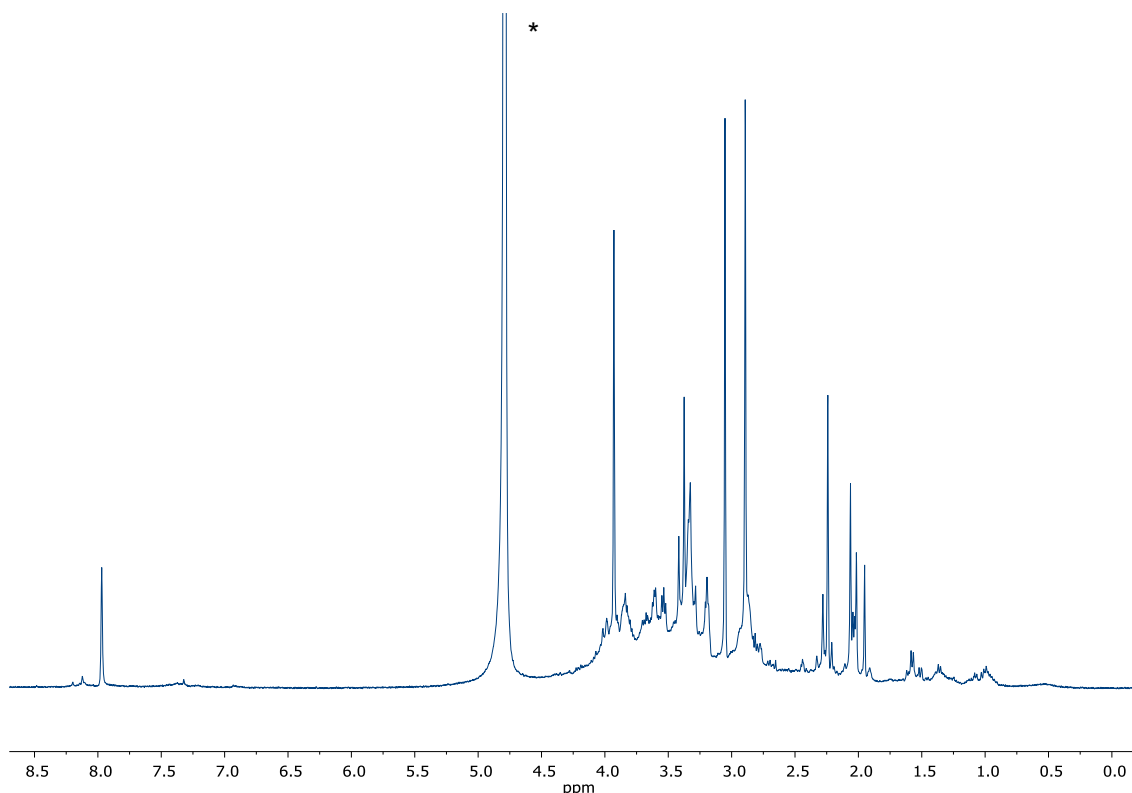


**Figura 19** - Espectros de FTIR dos NPSC obtidos da *BS\_Porphy.cr.* e da *BS\_APL\_Porphy.cr.* em pastilha de KBr.

As bandas mais representativas são atribuíveis a vibração de OH a  $ca. 3398 \text{ cm}^{-1}$  com ombro a  $3250 \text{ cm}^{-1}$  (NH),  $2972, 2930 \text{ cm}^{-1}$  (=CH e CH de grupos arilo e alquilo) e também a  $1653$  e  $1430 \text{ cm}^{-1}$  correspondentes a ácidos/carboxilatos e amidas.

Os espectros dos NPsC sintetizados a partir de matéria-prima obtida em diferentes condições, não aparentam diferenças significativas, sendo os espectros praticamente sobreponíveis.

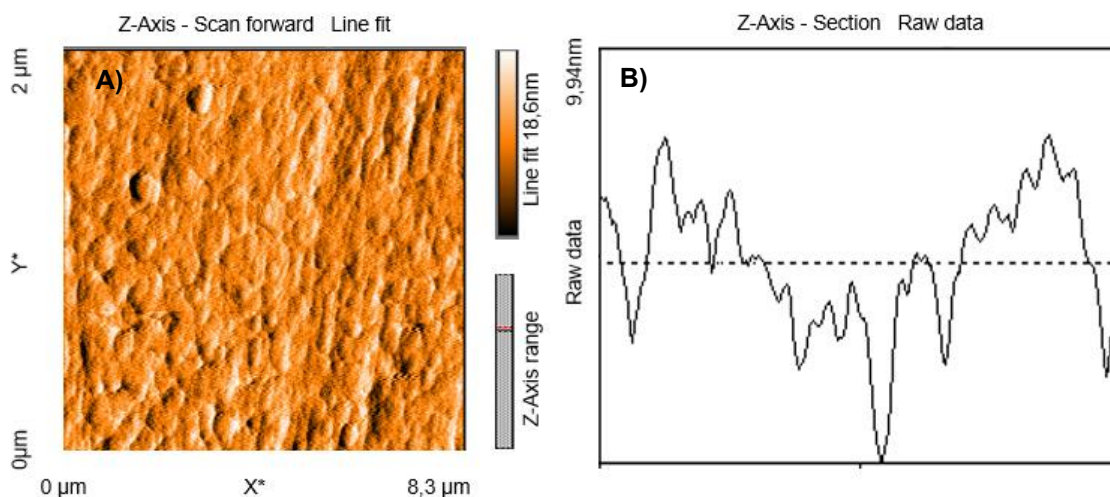
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  foi obtido na tentativa de verificar a presença de funcionalidades na superfície dos NPsC, tendo sido possível identificar ressonâncias em duas zonas distintas, uma primeira zona com sinais entre 1.0 e 2.5 ppm, sugerindo a presença de CH alifáticos e entre 2.8 e 4.3 ppm sinais correspondentes a CHN e CHO (**Figura 20**).



**Figura 20** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  dos NPsC obtidos a partir de biomassa seca de *P. cruentum*. ( $\text{D}_2\text{O}$ ); \*solvente residual.

### 2.3.6 CARATERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

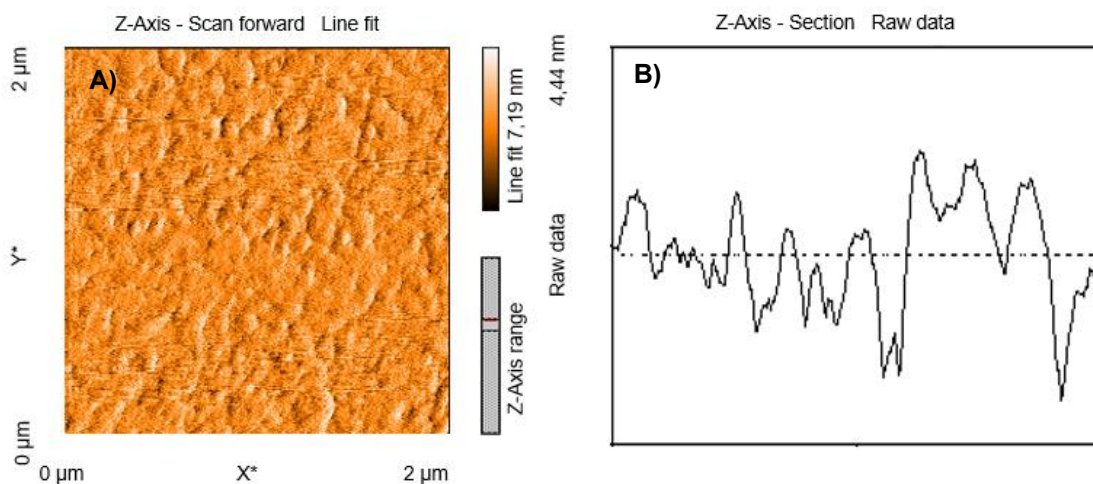
A partir de uma solução aquosa de NPsC a  $0.1 \text{ mgmL}^{-1}$  foi realizada a análise morfológica por AFM (*Atomic Force Microscopy*). A solução foi depositada em lamelas de vidro e deixadas evaporar naturalmente ao ar. Foram adquiridas as imagens que de seguida se apresentam.



**Figura 21** - Imagem obtida por AFM dos NPsC sintetizados a partir da *C\_Porphycr.* (A) e representação da variação de tamanho das partículas (B).

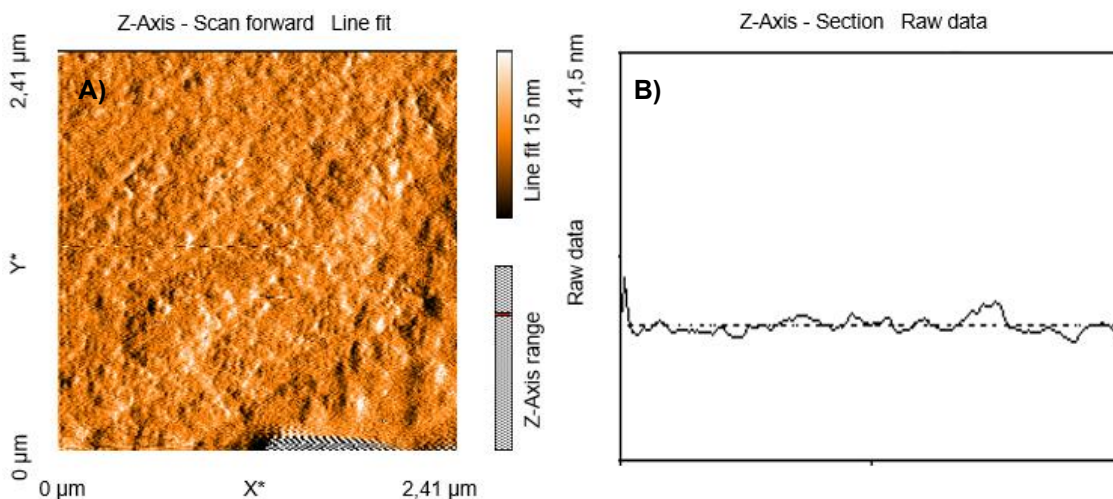
Da análise da **Figura 21** é possível observar que os NPsC sintetizados a partir da *C\_Porphycr.* ( $ED/ Porphycr. = 0.64$ ) apresentam uma boa dispersividade, não evidenciando aglomeração significativa, exibindo uma dimensão de partículas inferior a 9 nm. Estes resultados permitem corroborar os resultados obtidos na microscopia de fluorescência realizada para os NPsC em células animais (*cf.* apresentado no tópico *Marcação Celular com NPsC por Microscopia de Fluorescência*, adiante neste documento). De acordo com o descrito na literatura, os NPsC devem ter um tamanho inferior a 10 nm para conseguirem entrar facilmente na célula e interagir com os componentes intracelulares,<sup>97</sup> o que se verificou nas imagens de microscopia de fluorescência obtidas no presente trabalho. Foram também analisados NPsC produzidos nas mesmas condições, mas com menor rácio de ED (0.16), tendo sido observado tamanhos igualmente inferiores a 10 nm. Destes resultados, foi possível inferir que o rácio de ED não influenciou o tamanho dos NPsC produzidos (imagens não apresentadas).

Resultados similares foram obtidos para os NPsC produzidos a partir da *BS\_Porphycr.* (**Figura 22**), embora com dimensão na ordem dos 4 nm.



**Figura 22** - Imagem obtida por AFM dos NPsC sintetizados a partir da BS\_Porphy.cr. (A) e representação da variação de tamanho das partículas (B).

Como se observa na **Figura 22 (B)**, o tamanho dos NPsC é inferior a 4 nm, podendo inferir-se de que a natureza da biomassa utilizada na produção dos NPsC terá tido impacto nas características morfológicas dos NPsC. Foram também avaliadas as características morfológicas dos NPsc obtidos por carbonização assistida por irradiação microondas (**Figura 23**).



**Figura 23** – Imagem obtida por AFM dos NPsC obtidos a partir da BS\_Porphy.cr. por carbonização assistida por irradiação microondas (A) e representação da variação de tamanho das partículas (B).

Estes resultados parecem mostrar a ocorrência de aglomerados (tamanho ca. 40 nm). Uma deposição/evaporação inadequada, pode ter comprometido uma boa dispersividade; contudo, estes NPsC revelaram na emissão de fluorescência um desvio bacteriocromico, sendo descrito na literatura<sup>76</sup> que NPsC de maiores dimensões

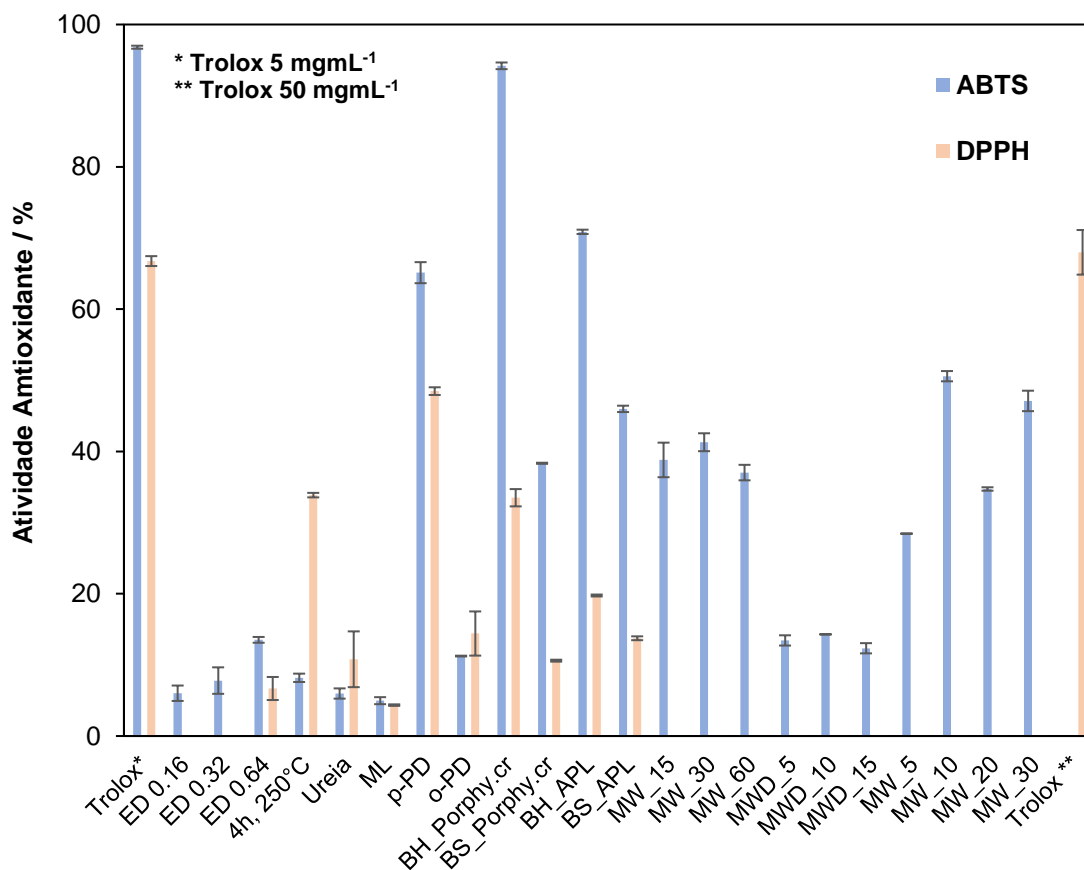
originam um deslocamento para o vermelho, acompanhado de uma diminuição do rendimento quântico, o que se observou nas propriedades óticas destes nanomateriais.

### 2.3.6 Avaliação da Bioatividade dos NPsC

Para os diferentes lotes de NPsC produzidos foram avaliadas as atividades antioxidante e antimicrobiana, bem como a sua citotoxicidade *in vitro*.

#### 2.3.6.1 Atividade Antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelo método dos radicais ABTS e DPPH. Os resultados obtidos são descritos em percentagem de inibição (%) e em  $\mu\text{g}$  de equivalentes de trolox (ET) por mg NPsC (**Figura 24** e **Tabela 24**, respetivamente).



**Figura 24** - Atividade antioxidante em percentagem de inibição dos NPsC.

**Tabela 24** - Atividade antioxidante dos NPsC.

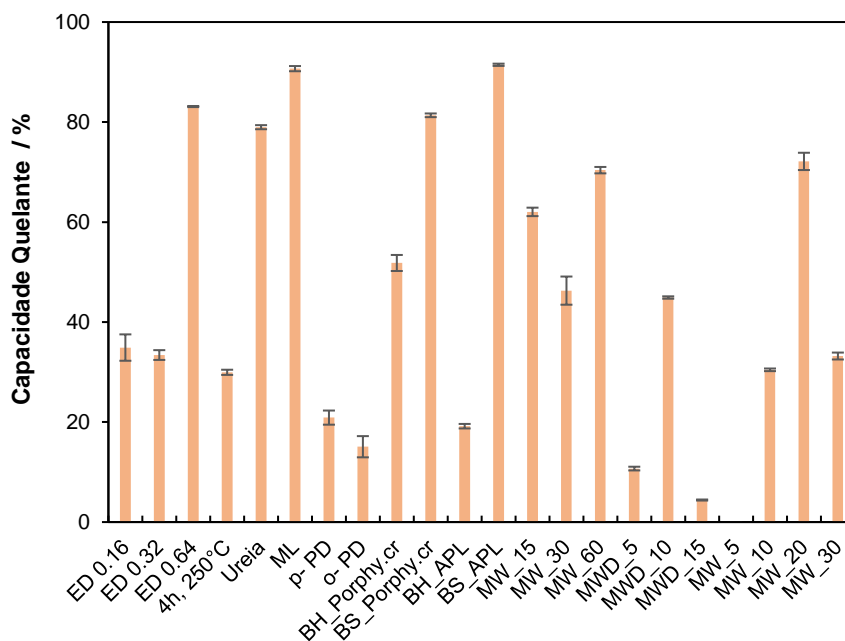
Amostra	Atividade antioxidante ( $\mu\text{g ET/mg NPsC}$ )	
	ABTS	DPPH
ED 0.16	0.80 $\pm$ 0.00	
ED 0.32	4.22 $\pm$ 0.00	n.d.
ED 0.64	5.67 $\pm$ 0.30	
ED 4h, 250 °C	1.66 $\pm$ 0.42	19.43 $\pm$ 0.20
Ureia 0.16	0.35 $\pm$ 0.00	6.36 $\pm$ 0.00
ML 0.16	0.69 $\pm$ 0.00	0.43 $\pm$ 0.07
<i>p</i> -PD	43.03 $\pm$ 1.07	28.83 $\pm$ 0.69
<i>o</i> -PD	4.02 $\pm$ 0.04	6.91 $\pm$ 2.00
BH_ <i>Porphy.cr</i>	66.00 $\pm$ 0.37	19.19 $\pm$ 0.78
BS_ <i>Porphy.cr</i>	64.00 $\pm$ 0.44	4.45 $\pm$ 0.09
BH_APL_ <i>Porphy.cr</i>	48.51 $\pm$ 1.32	10.35 $\pm$ 0.09
BS_APL_ <i>Porphy.cr</i>	48.43 $\pm$ 1.98	6.48 $\pm$ 0.17
NPsC_Mw_15	24.85 $\pm$ 1.64	
NPsC_Mw_30	23.55 $\pm$ 2.37	
NPsC_Mw_60	24.41 $\pm$ 2.85	
NPsC_Mw_5	18.41 $\pm$ 0.00	
NPsC_MwD_5	4.67 $\pm$ 0.66	
NPsC_MwD_10	5.45 $\pm$ 0.00	n.d.
NPsC_MwD_15	3.66 $\pm$ 0.66	
NPsC_Mw_10	38.67 $\pm$ 0.66	
NPsC_Mw_20	24.15 $\pm$ 0.22	
NPsC_Mw_30	35.49 $\pm$ 1.32	

n.d. - não detetado.

Em geral, a atividade antioxidante revelou-se elevada no método do radical ABTS, principalmente para os NPsC sintetizados com BH\_*Porphy.cr*. (ca. 94.19  $\pm$  0.47 %; 66.00  $\pm$  0.37  $\mu\text{g ET/mg NPsC}$ ). Contudo, a atividade antioxidante determinada pelo

método do radical DPPH, foi para a maioria dos NPsC bastante mais baixa e para alguns não foi mesmo detetada. Os NPsC sintetizados com a biomassa de *P. cruentum* são os que apresentaram maior atividade antioxidante.

A capacidade dos NPsC na quelação de iões  $\text{Fe}^{2+}$  foi também explorada, verificando-se que os NPsC sintetizados com a biomassa seca de *P. cruentum* após lavagem foram os que apresentaram maior capacidade quelante ( $91.45 \pm 0.23 \%$ ) (**Figura 25**).



**Figura 25** - Capacidade Quelante de iões  $\text{Fe}^{2+}$  para NPsC.

### 2.3.6.2 Atividade Antimicrobiana dos NPsC

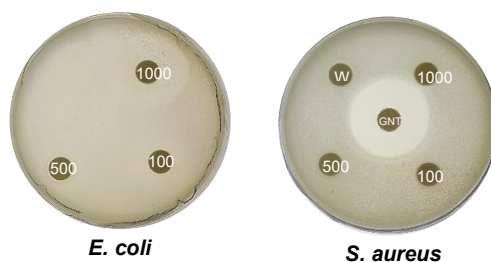
A avaliação da atividade antimicrobiana dos NPsC foi realizada por dois métodos distintos, o método de difusão em discos e o método colorimétrico de microdiluição em meio líquido, permitindo este último a determinação dos valores de MIC (Concentração Mínima Inibitória) e de MLC (Concentração Mínima Letal).

No método de difusão em discos, os NPsC avaliados foram os sintetizados com a biomassa de *P. cruentum*; no método colorimétrico de microdiluição em meio líquido testaram-se os NPsC sintetizados com a cultura de *P. cruentum* e com a respetiva biomassa.

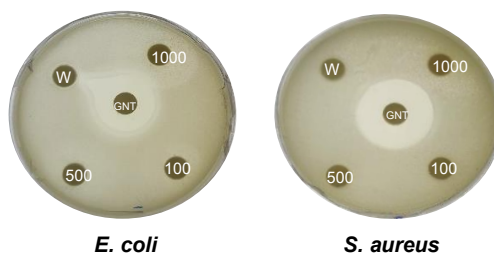
#### Método de Difusão em Discos

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, os NPsC foram testados com diferentes massas (100, 500 e 1000  $\mu\text{g}$ ) contra duas espécies bacterianas, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, usando-se como controlo positivo, o antibiótico gentamicina

(GNT) e como controlo negativo água estéril (W). Foram testados os NPsC sintetizados por aquecimento hidrotérmico convencional e por irradiação microondas. Verificou-se não ocorrer qualquer efeito antimicrobiano contra as bactérias estudadas, face à ausência de halo de inibição de crescimento ao redor dos discos impregnados com NPsC. Contudo, refira-se que para 1000 µg de NPsC produzidos com biomassa seca (antes e após lavagem), observou-se um halo com crescimento retardado de *E. coli* (Figura 26 e Figura 27).

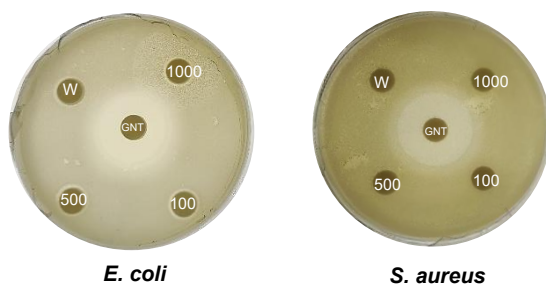


**Figura 26** - Resultados dos ensaios de difusão em disco, após incubação das culturas bacterianas com NPsC obtidos de BS\_*Porphy.cr.* (100, 500 e 1000 µg). Controlos: GNT (10 µg) e W.

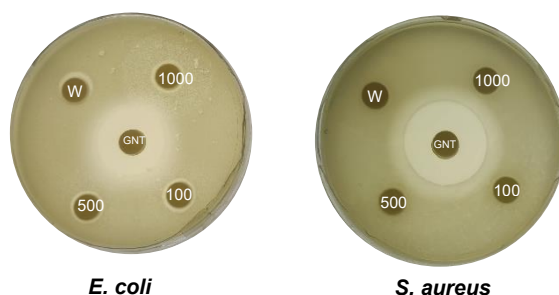


**Figura 27** - Resultados dos ensaios de difusão em disco, após incubação das culturas bacterianas com NPsC obtidos de BS\_APL\_*Porphy.cr.* (100, 500 e 1000 µg). Controlos: GNT (10 µg) e W.

Um comportamento idêntico foi observado para os NPsC produzidos por irradiação Mw (Figura 28 e Figura 29).



**Figura 28** - Resultados dos ensaios de difusão em disco, após incubação das culturas bacterianas com NPsC\_Mw\_15 (100, 500 e 1000 µg). Controlos: GNT (10 µg) e W.



**Figura 29** - Resultados dos ensaios de difusão em disco, após incubação das culturas bacterianas com NPsC\_Mw\_30 (100, 500 e 1000 µg). Controlos: GNT (10 µg) e W.

Face aos resultados obtidos, realizaram-se ensaios paralelos recorrendo ao método de microdiluição em meio líquido com resazurina, conhecido como sendo um método mais sensível e fiável.

### Método de Microdiluição em Meio Líquido

A viabilidade celular das culturas bacterianas em meio líquido, na presença de diferentes concentrações de NPsC, foi avaliada por um método colorimétrico que consiste na redução da resazurina não fluorescente a resorufina fluorescente por parte das células metabolicamente ativas. Desta forma foi possível determinar a concentração mínima inibitória (MIC) e a concentração mínima letal (MLC) dos NPsC. A atividade antimicrobiana foi avaliada contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, utilizando água e meio MHB (*Mueller Hinton Broth*) no ensaio em branco.

Os NPsC sintetizados a partir de *C\_Porph.cr.* não demonstraram capacidade em inibir o crescimento das duas bactérias testadas, não apresentando assim atividade antimicrobiana até 20 mgmL<sup>-1</sup>; o mesmo resultado foi observado nos NPsC sintetizados por irradiação assistida por microondas doméstico. Os NPsC obtidos por carbonização em reator monomodo foram igualmente testados, tendo sido observada

alguma atividade antimicrobiana, permitindo a determinação dos valores de MIC e MLC (**Tabela 25**).

Os NPSC produzidos por aquecimento convencional em reator de alta-pressão a partir da biomassa de *P. cruentum*, também apresentaram inibição de crescimento para as duas bactérias, tendo sido determinados os valores de MIC e MLC (**Tabela 25**).

**Tabela 25** - Valores de MIC e MLC para os NPSC sintetizados a partir da biomassa de *P. cruentum*.

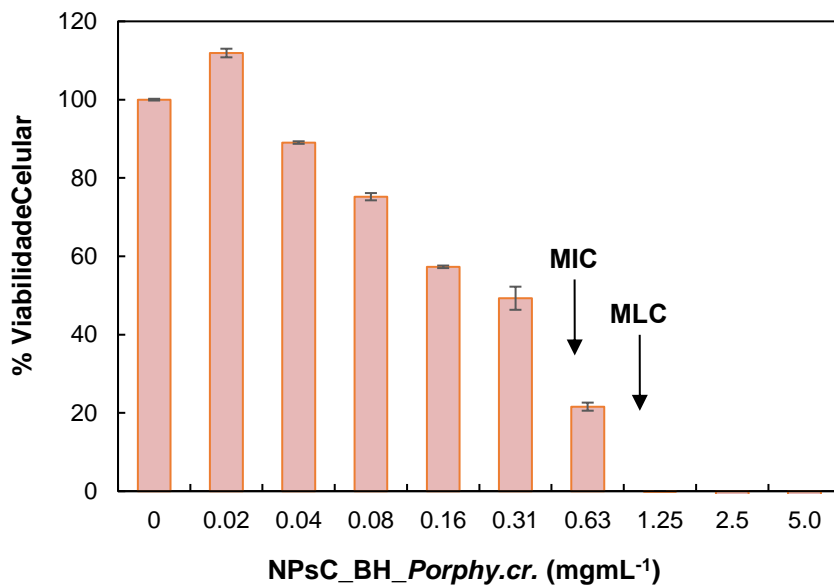
NPSC	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	MIC (mgmL <sup>-1</sup> )	MLC (mgmL <sup>-1</sup> )	MIC (mgmL <sup>-1</sup> )	MLC (mgmL <sup>-1</sup> )
BH_Porphy.cr.	0.63	1.25	0.63	2.5
BS_Porphy.cr.	> 10.0			
BS_Porphy.cr.*	> 10.0	10.0	> 10.0	10.0
BH_Porphy.cr.*	2.5	> 5.0	2.5	5.0
BH_APL_Porphy.cr.	1.25	2.5	1.25	2.5
BS_APL_Porphy.cr.	> 10.0			5.0
MW_15	5.0	> 10.0		
MW_30	5.0			
MW_60	5.0	> 10.0	10	> 10.0
MWD_5	> 10.0			
MWD_15				

\*Rácio ED = 0.32.

Os NPSC sintetizados com biomassa húmida (com ou sem lavagem) são os que apresentam maior inibição de crescimento para *E. coli* e *S. aureus*. (**Tabela 25**).

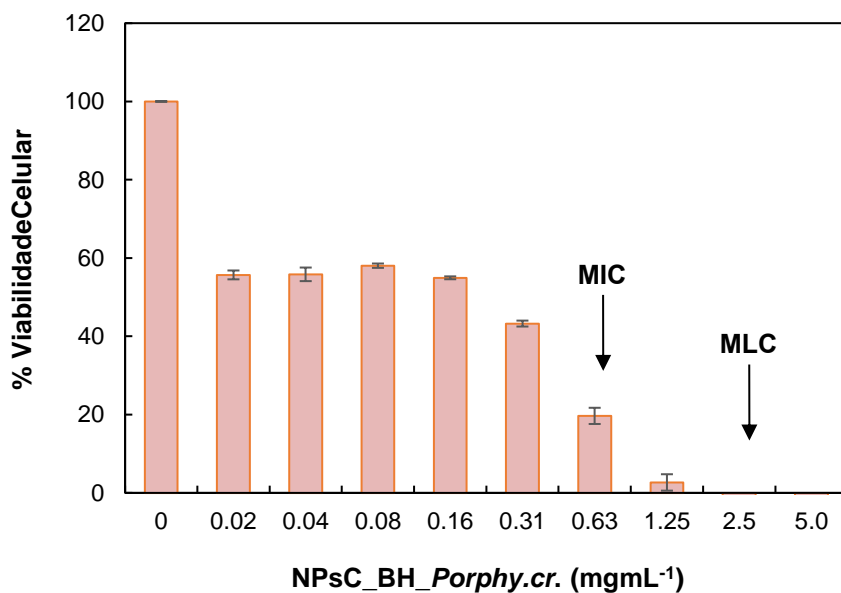
Dados reportados na literatura para NPSC sintetizados a partir da planta Hena,<sup>88</sup> revelaram atividade bacteriostática a partir de uma concentração de 100 µgmL<sup>-1</sup>, tendo-se observado valores muito inferiores para os NPSC obtidos a partir da microalga em estudo, o que reforça o potencial destes nanomateriais no controlo microbiano (**Tabela 25**).

O aumento da concentração dos NPSC originou uma diminuição progressiva do crescimento celular da *E. coli*, atingindo um crescimento de apenas 21.59 ± 4.18 % a uma concentração de 0.63 mgmL<sup>-1</sup>, sendo este o seu valor de MIC; para concentrações superiores a 1.25 mgmL<sup>-1</sup>, deixou de haver crescimento celular, mostrando assim uma atividade bactericida por parte dos NPSC a partir desta concentração (**Figura 30**).



**Figura 30** - Viabilidade de *E. coli* avaliada pelo método colorimétrico da resazurina, após incubação de diferentes concentrações de NPsC obtidos a partir de BH\_Porphy.cr

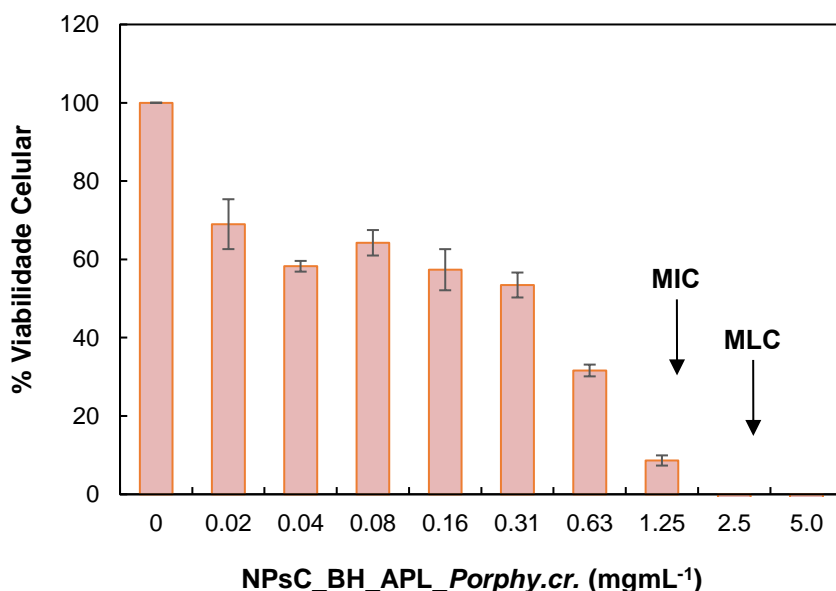
Já para a *S. aureus* (**Figura 31**), verificou-se que para a gama de concentrações de NPsC testada, a viabilidade celular foi sempre baixa ( $\leq 58.04 \pm 0.79$  %), podendo inferir-se que esta bactéria é mais sensível aos NPsC nessas concentrações.



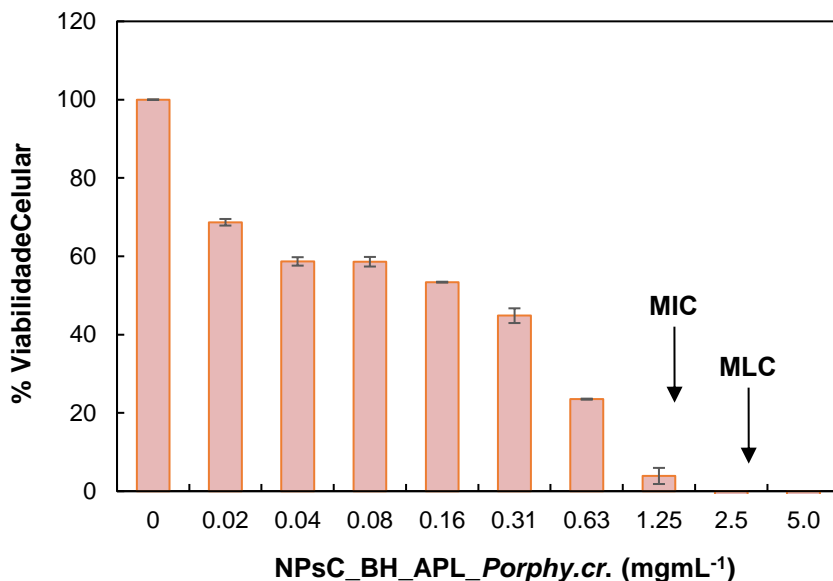
**Figura 31** - Viabilidade de *S. aureus* avaliada pelo método colorimétrico da resazurina, após incubação de diferentes concentrações de NPsC obtidos a partir de BH\_Porphy.cr.

Verificou-se assim, que com o aumento da concentração dos NPsC, o número de células bacterianas viáveis foi diminuindo, sendo possível determinar os valores de MIC e MLC. O MIC foi atingido para viabilidades de *E. coli* de  $21.6 \pm 4.2$  % e de *S. aureus* de  $19.67 \pm 2.92$  %; o MLC é um indicador de morte celular, que foi alcançado a concentrações de NPsC de 1.25 e 2.5  $\text{mgmL}^{-1}$  para *E. coli* e *S. aureus*, respetivamente.

Para os NPsC sintetizados a partir da biomassa húmida após lavagem, a viabilidade celular das duas bactérias foi sempre inferior a 70 %, indicando maior suscetibilidade da *E. coli* para estes NPsC, comparativamente com a obtida com os NPsC\_BH\_Porphy.cr. (Figura 32 e Figura 33).



**Figura 32** - Viabilidade de *E. coli* avaliada pelo método colorimétrico da resazurina, após incubação de diferentes concentrações de NPsC obtidos a partir de BH\_APL\_Porphy.cr..



**Figura 33** - Viabilidade de *S. aureus* avaliada pelo método colorimétrico da resazurina, após incubação de diferentes concentrações de NPsC obtidos a partir de BH\_APL\_Porphycr..

Em geral, os NPsC sintetizados a partir de BH\_APL\_Porphycr., revelaram um comportamento semelhante aos anteriores, verificando-se que com o aumento da concentração dos NPsC ocorreu uma diminuição da viabilidade das culturas bacterianas. Os valores de MIC foram atingidos para viabilidades de *E. coli* de  $8.6 \pm 1.8 \%$  e  $3.9 \pm 2.9 \%$  de *S. aureus*.

Atendendo aos resultados obtidos, foi possível concluir que os NPsC sintetizados utilizando como precursor a biomassa de *P. cruentum* são os que apresentaram melhores respostas, quer de atividade antioxidante, quer de atividade antibacteriana. Refira-se ainda, que os NPsC sintetizados com a biomassa húmida apresentaram bioatividade igualmente relevante contra *E. coli* e *S. aureus*, contudo, a biomassa seca originou NPsC com melhores rendimentos quânticos.

### 2.3.6.3 Citotoxicidade *in vitro* dos NPsC

A citotoxicidade dos NPsC avaliada em ensaios *in vitro*, foi explorada para os NPsC com rendimentos quânticos mais elevados. Foi estudada a sua interação com quatro linhas celulares distintas, 3T3 (células fibroblastos embrionários de murganho, NIH-3T3 ATCC® CRL-1658), células de sarcoma (linha celular de sarcoma de murganho, S180 ATCC® TIB-66), HeLa (células tumorais do colo do útero, ATCC® CCL-2) e Vero (células epiteliais renais de macaco verde, ATCC® CCL-81). Os NPsC foram avaliados a diferentes concentrações e a sua citotoxicidade foi rastreada pelo método do MTT,

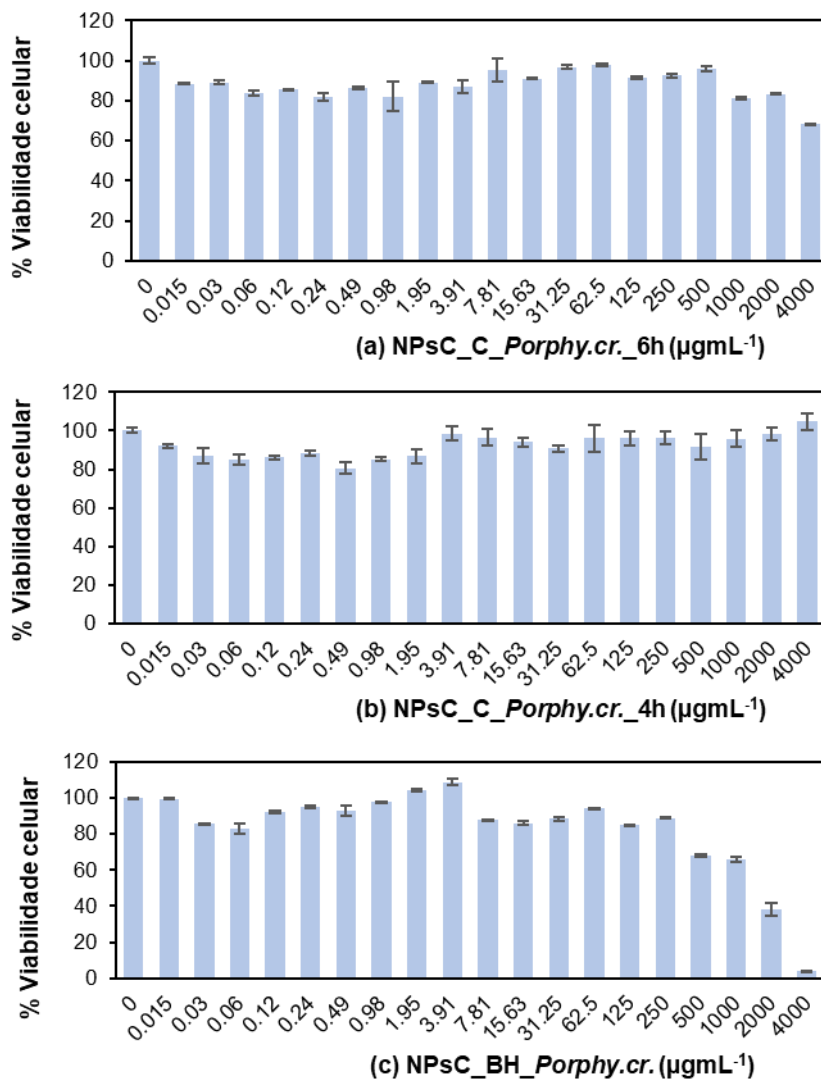
cujo procedimento se encontra descrito no capítulo dos Materiais e Métodos. Os resultados serão de seguida apresentados para cada linha celular.

Da avaliação da interação dos NPsC\_C\_Porph.cr.\_6h (produzidos a partir da cultura de *P. cruentum* durante 6 horas) com a linha celular 3T3, verificou-se que os NPsC não afetaram significativamente a viabilidade celular. No entanto, para a concentração de 4000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a viabilidade diminuiu para *ca.*  $68.07 \pm 0.72 \%$ .

Para os NPsC\_C\_Porph.cr.\_4h (produzidos com a cultura de *P. cruentum* durante 4 horas), a viabilidade celular manteve-se sempre superior a 80 %, na gama de concentrações testada (**Figura 34**).

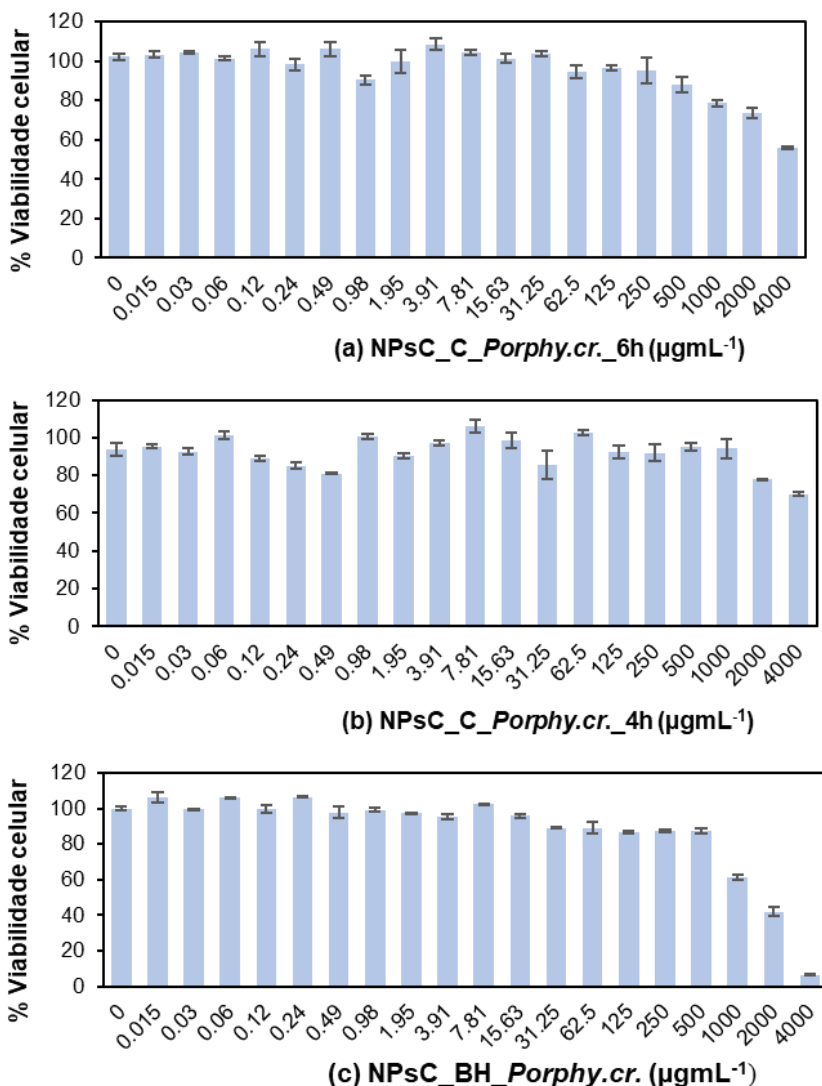
No entanto, os NPsC\_BH\_Porph.cr. (produzidos a partir da biomassa húmida de *P. cruentum* durante 6 horas) apresentaram uma resposta distinta, uma vez que a viabilidade celular diminuiu significativamente para  $3.82 \pm 0.22 \%$  a uma concentração de 4000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (**Figura 34**).

Para os NPsC\_BS\_Porph.cr. (produzido a partir de biomassa seca de *P. cruentum* durante 6 horas), o comportamento citotóxico foi similar ao observado para NPsC\_C\_Porph.cr.\_6h, com redução da viabilidade ( $56.79 \pm 3.81 \%$ ) com 4000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (figura não apresentada).



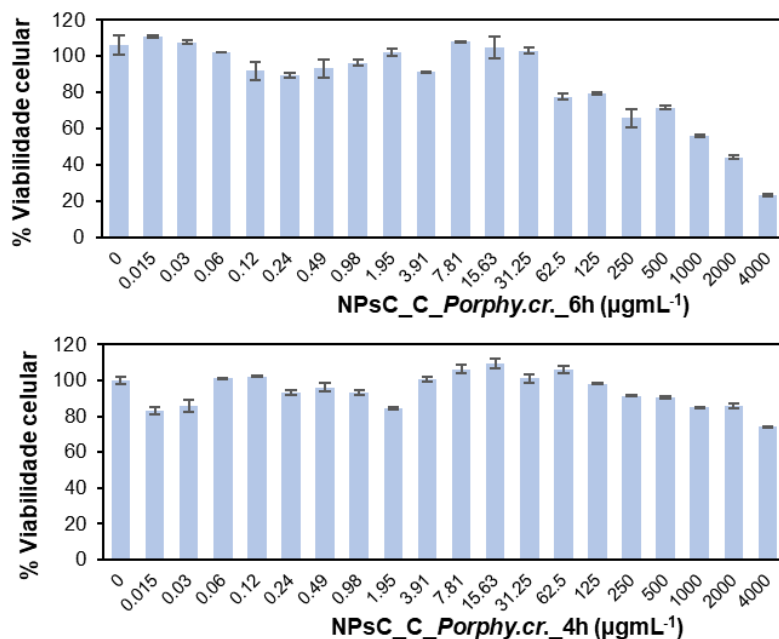
**Figura 34** - Citotoxicidade *in vitro* dos NPSC\_C\_Porphycr. a 250 °C durante 6h (a) e durante 4 h (b) e com NPSC\_BH\_Porphycr. (c) na linha celular 3T3.

O efeito dos NPSC sintetizados com a cultura de *P. cruentum* foi similar na linha celular S180, não existindo um impacto significativo na viabilidade para as menores concentrações de NPSC testadas; contudo, observaram-se decréscimos para a concentração de 4000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de NPSC, atingindo  $55.97 \pm 1.17\%$  com NPSC\_C\_Porphycr. 6h e  $70.15 \pm 1.83\%$  com NPSC\_C\_Porphycr. 4h (**Figura 35**). Para os NPSC\_BH\_Porphycr., os resultados foram semelhantes aos evidenciados para a linha celular anterior, demonstrando citotoxicidade a partir de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , verificando-se uma grande diminuição da viabilidade (ca. 93 %) a 4000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (viabilidade de  $6.59 \pm 0.34\%$ , **Figura 35**).



**Figura 35** - Citotoxicidade *in vitro* dos NPSC\_C\_Porphyrin a 250 °C durante 6h (a) e durante 4 h (b) e com NPSC\_BH\_Porphyrin (c) na linha celular S180.

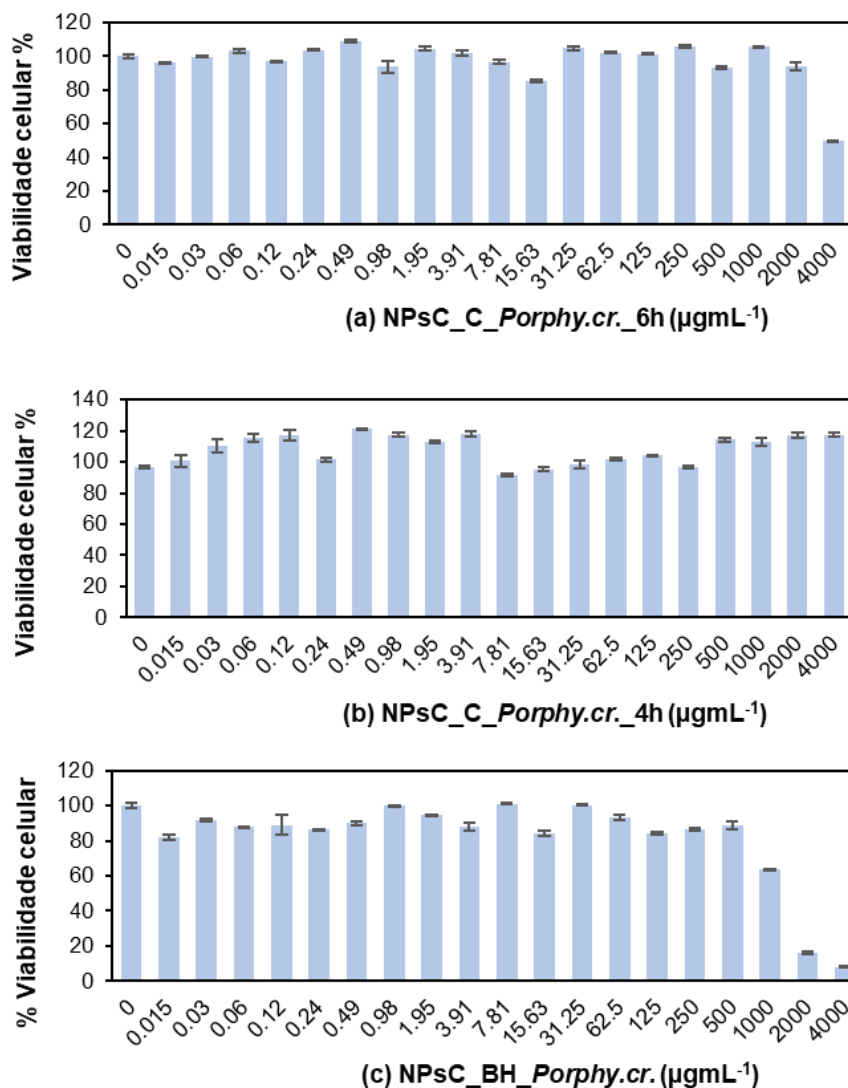
Nos ensaios com a linha celular HeLa, os NPSC\_C\_Porphyrin\_6h exibiram citotoxicidade superior em comparação com as obtidas para as linhas celulares anteriores, tendo a viabilidade celular diminuído a partir de 62.5 µg mL<sup>-1</sup> (ca. 77.75±2.06 %), decrescendo progressivamente até 23.31±0.92 % para 4000 µg mL<sup>-1</sup> (Figura 36). Tal resultado de citotoxicidade aumentada para estas células tumorais potencia a aplicabilidade dos NPSC\_C\_Porphyrin\_6h.



**Figura 36** - Citotoxicidade *in vitro* dos NPsC\_C\_Porphycr. a 250 °C durante 6h (a) e durante 4 h (b) na linha celular HeLa.

Para os NPsC\_C\_Porphycr. 4h, a viabilidade celular manteve-se sempre acima de 85%, com um ligeiro decréscimo ( $74.13 \pm 0.59\%$ ) na concentração de  $4000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 36). Para esta linha celular não foi possível testar os NPsC produzidos com biomassa seca e húmida.

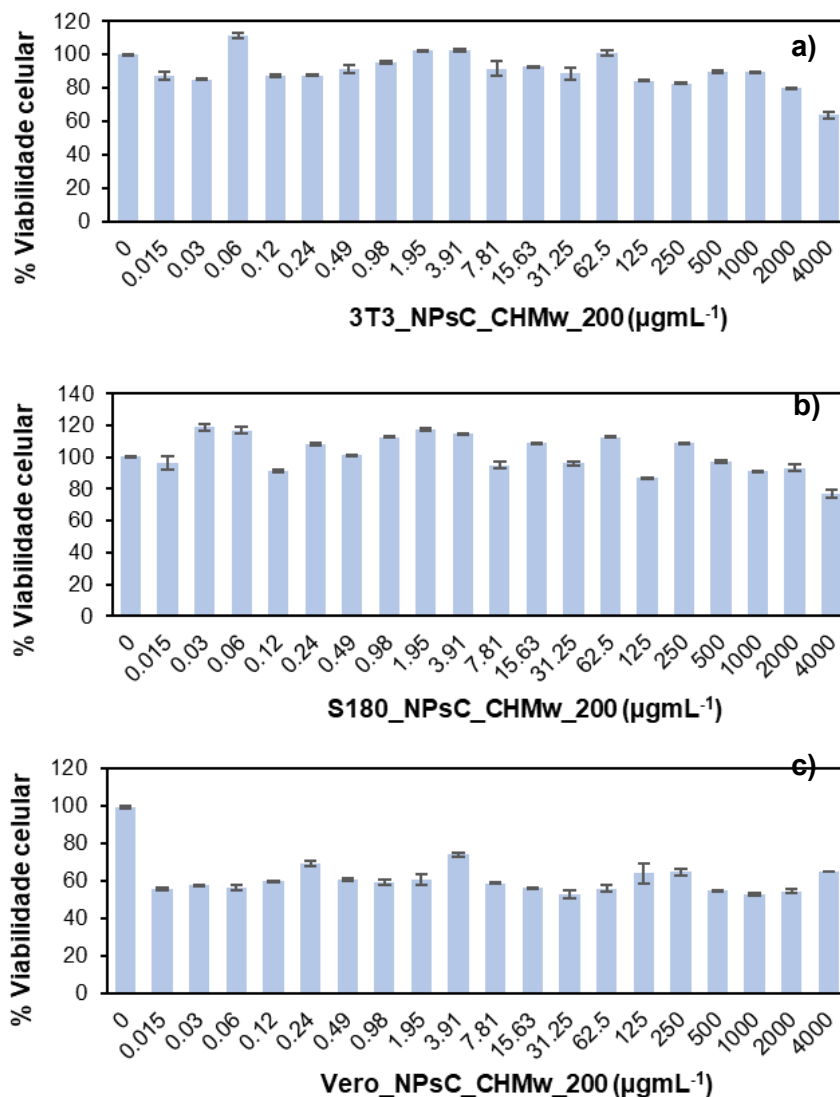
Para as células Vero incubadas com os NPsC\_C\_Porphycr. 4h, verificaram-se viabilidades celulares sempre acima de 80%. Porém, a adição de  $4000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de NPsC\_C\_Porphycr. 6h e NPsC\_BH\_Porphycr., a morte celular foi expressiva (viabilidades de  $49.46 \pm 1.23\%$  e  $7.94 \pm 0.79\%$ , respetivamente (Figura 37). Refira-se que os NPsC\_BH\_Porphycr. demonstraram elevada citotoxicidade para concentrações a partir de  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , corresponde a  $15.83 \pm 1.05\%$  de viabilidade. Os NPsC\_BS\_Porphycr. apresentaram um comportamento similar aos anteriores, onde a viabilidade celular diminuiu para  $18.55 \pm 0.83\%$  a uma concentração de  $4000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (figuras não apresentadas).



**Figura 37** - Citotoxicidade *in vitro* dos NPSC\_C\_Porphy.cr. a 250 °C durante 6h (a) e durante 4 h (b) e com NPSC\_BH\_Porphy.cr. (c) na linha celular Vero.

A citotoxicidade dos NPSC sintetizados por CHMw a 200°C (NPSC\_CHMw\_200) e a 150°C (NPSC\_CHMw\_150) também foi avaliada.

Os NPSC\_CHMw\_200 não provocaram morte significativa das linhas celulares 3T3 e S180, tendo sido detetadas viabilidades superiores a 80 % para concentrações até 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Na linha celular Vero, estes NPSC exibiram alguma citotoxicidade, levando a uma diminuição significativa da viabilidade celular (apenas de 60 %) mesmo para a concentração mais baixa de NPSC avaliada (0.015  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (**Figura 38**). Este comportamento permite inferir que esta linha celular parece demonstrar maior sensibilidade para estes NPSC, limitando a aplicabilidade dos NPSC\_CHMw\_200 em aplicações biológicas.



**Figura 38** - Citotoxicidade *in vitro* dos NPsC\_CHMw\_200 a 200 °C durante 1h nas linhas celulares 3T3 (a), S180 (b) e Vero (c).

Os NPsC\_CHMw\_150 tiveram um comportamento semelhante aos NPsC\_BS\_Porphy.cr. não demonstrando citotoxicidade relevante até uma concentração de 4000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para as linhas celulares testadas (3T3, Vero e S180), a partir da qual ocorre uma diminuição para 47.05 $\pm$ 1.66 %, 35.88 $\pm$ 3.21 % e 16.18 $\pm$ 1.36 %, respetivamente (imagens não apresentadas).

De uma forma geral, verificou-se para os NPsC\_C\_Porphy.cr. e NPsC\_BS\_Porphy.cr. ausência de citotoxicidade até uma concentração de 4000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , mantendo-se a viabilidade das culturas (ca. 70-100 %), com exceção das células HeLa e Vero, para as quais os NPsC\_C\_Porphy.cr.\_6h na concentração de 4000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  induziram viabilidades de apenas 23.31 $\pm$ 0.92 % e 49.46 $\pm$ 1.23 %, respetivamente. Os

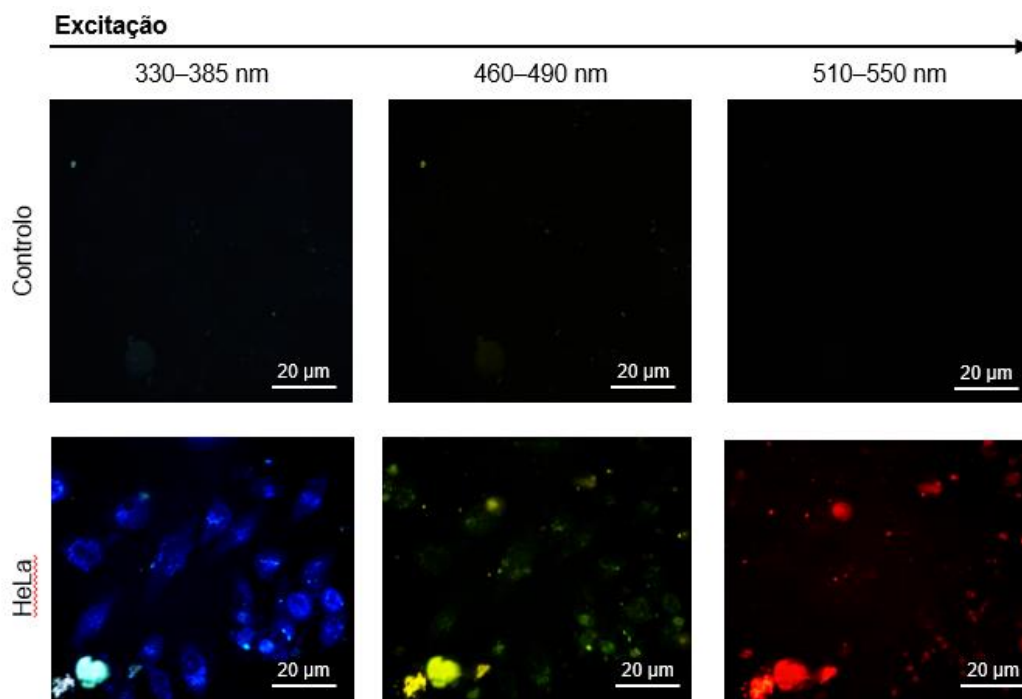
NPsC\_BH\_Porphy.cr. apresentaram alguma citotoxicidade a partir de concentrações de  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Contudo, refira-se que a morte celular foi verificada apenas para concentrações bastante elevadas, muito superiores às usualmente empregues em aplicações médicas.

Resultados reportados por Zheng *et al.*<sup>54</sup> de viabilidade celular superior a 90% para células do carcinoma hepatocelular humano após exposição a PsC numa concentração de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , permitem corroborar os resultados obtidos. Foram também reportadas por Peng *et al.*<sup>79</sup> viabilidades celulares elevadas de linha de carcinoma da mama humano, até uma concentração de PsC de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

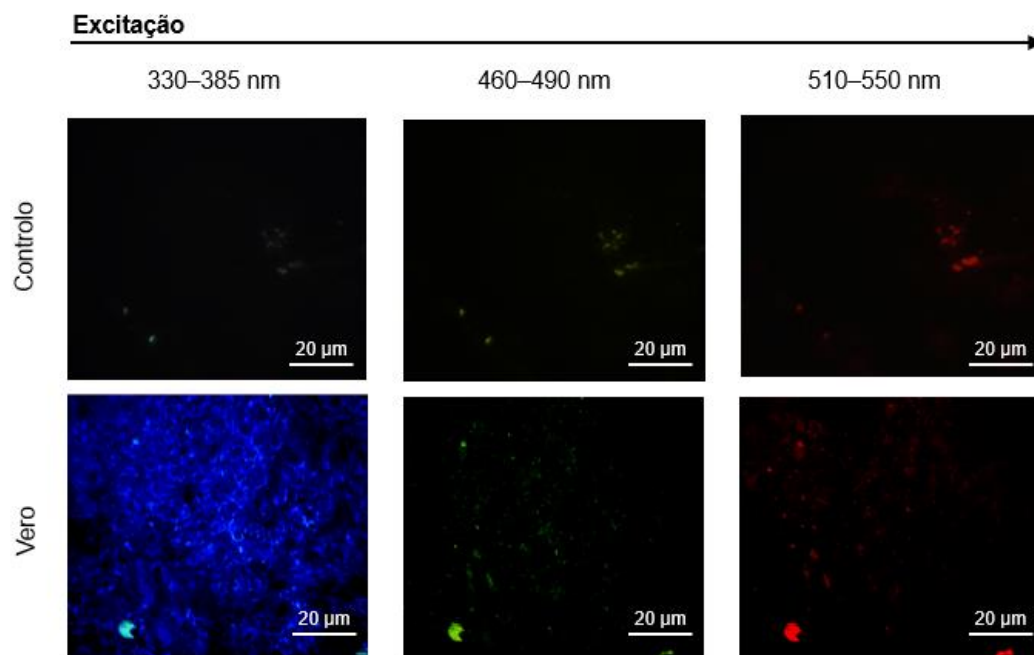
#### 2.3.6.4 Marcação Celular com NPsC por Microscopia de Fluorescência

Os NPsC\_C\_Porphy.cr. que não evidenciaram citotoxicidade nos ensaios *in vitro* foram testados como marcadores fluorescentes de células animais e humanas.

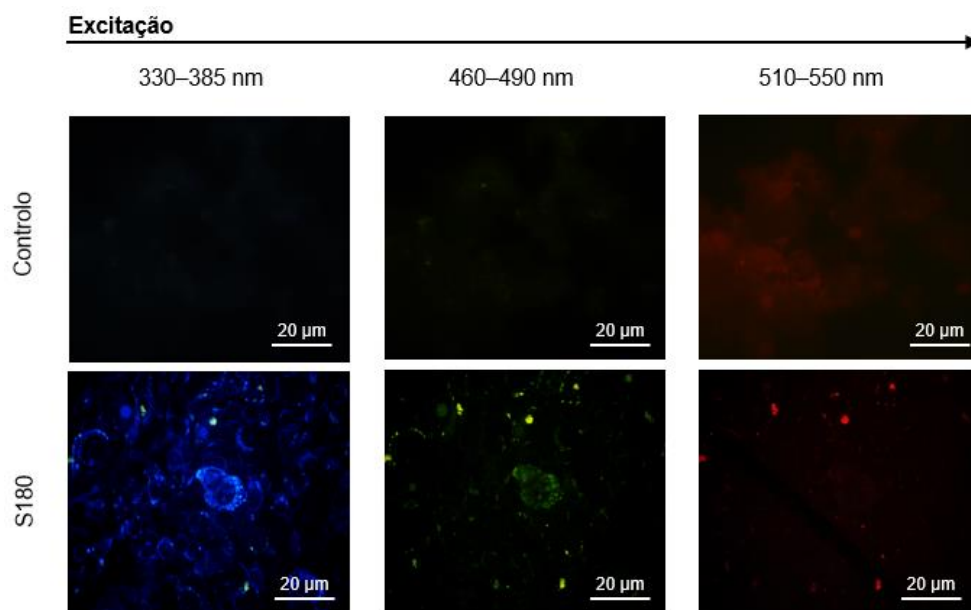
Foram avaliados os NPsC\_C\_Porphy.cr. por microscopia de fluorescência, atendendo ao seu  $\Phi_F$  (ca. 17 %), propriedade determinante para aplicação em bioimagem, bem como à sua biocompatibilidade para as linhas celulares testadas (**Figura 39 a Figura 42**).



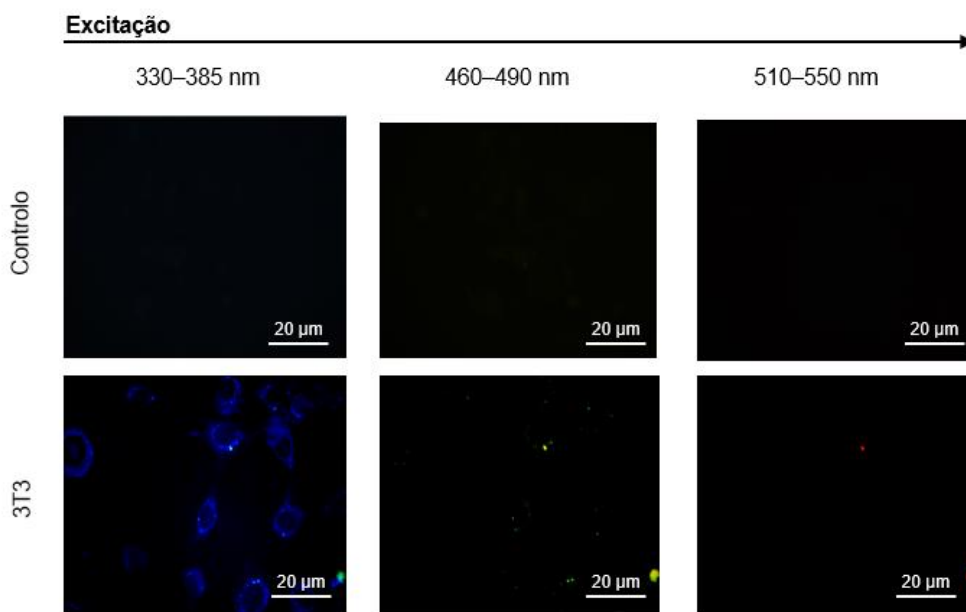
**Figura 39** - Imagens de microscopia de fluorescência dos NPsC\_C\_Porphy.cr. na presença de células HeLa e respetivos controlos (ampliação 400x).



**Figura 40** - Imagens de microscopia de fluorescência dos NPsC\_C\_Porphy.cr. na presença de células Vero e respetivos controlos (ampliação 400x).



**Figura 41** - Imagens de microscopia de fluorescência dos NPsC\_C\_Porphy.cr. na presença de células S180 e respetivos controlos (ampliação 400x).



**Figura 42** - Imagens de microscopia de fluorescência dos NPc\_C\_Porph.cr. na presença de células 3T3 e respetivos controlos (ampliação 400x).

Da análise das imagens obtidas por microscopia de fluorescência foi possível inferir que a internalização dos NPc ocorre à volta do núcleo, dado que se observa um “anel” em torno do mesmo. De forma a tornar mais nítido o contraste entre os NPc e o núcleo, poder-se-á perspetivar a utilização de um corante fluorescente na gama de emissão dos nanomateriais, (e.g. DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol, marcador fluorescente utilizado para corar ácidos nucleicos)).

Estes resultados evidenciam o potencial destes NPc como marcadores de células, contudo, esta aplicação requer uma investigação mais aprofundada. A eventual ausência de afinidade dos NPc, para um determinado componente celular ou região da célula, impulsiona a sua conjugação com anticorpos dirigidos, evidenciando a sua capacidade de marcação seletiva.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**



### 3.1 Preâmbulo

Neste capítulo serão apresentados os reagentes, as técnicas gerais e o equipamento utilizado.

Esta parte experimental será dividida nas seguintes Secções:

3.2. Reagentes. Material biológico. Técnicas Gerais e Equipamento

3.3. Caracterização da cultura de *P. cruentum*

3.4. Síntese e Purificação dos NPsC

3.5. Avaliação da Bioatividade dos NPsC



### 3.2 Reagentes, Material Biológico, Técnicas Gerais e Equipamento

2,2'-Azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), 98%; ácido poli-galacturónico (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>); 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, 95%, Alfa Aesar; ácido gálico (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>); ferrozina, 97%; trolox, 97%, Aldrich; sal de sódio resazurina, > 85%, TCI; azul toluidina, Biochem. Chemopharma; etilenodiamina, 99%, catequina hidratada 98%, Thermo Scientific; reagente Bradford, Bio-Rad Quick Start™; sulfato de dextrano 200 Da, β-(1,3)-D-glucano de cevada >95%, carbazole, albumina de soro bovino 62-88%, sal de sulfato de gentamicina, Sigma; MTT (3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) >98%, reagente Folin-Ciocalteu, PanReaC AppliChem; azul de tripano (GIBCO®, Thermo Fisher Scientific), Congo red, Schering Kahlbaum A.G Berlin.

Os reagentes/solventes utilizados na síntese, purificação e caracterização dos NPsC foram utilizados conforme recebidos.

A cultura de *Porphyridium cruentum* utilizada na síntese dos NPsC foi recolhida na unidade industrial Allmicroalgae - Natural Products, S.A., Pataias, Portugal, tendo sido fornecidos dois lotes distintos obtidos nas mesmas condições.

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados com *Escherichia coli* ATCC® 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923. Para avaliação da citotoxicidade dos NPsC recorreu-se às linhas celulares 3T3 (NIH-3T3 ATCC® CRL-1658), S180 (ATCC® TIB-66), HeLa (ATCC® CCL-2) e Vero (ATCC® CCL-81).

A cultura da microalga previamente desenvolvida em fotobiorreator tubular na Allmicroalgae - Natural Products, S.A. foi armazenada a -15 °C em garrafas de polietileno, sendo estabilizada à temperatura ambiente antes de cada ensaio.

Os NPsC foram sintetizados por tratamento hidrotérmico num reator de alta pressão em aço inox (Parr 4843), com capacidade de 300 mL com sensores e controladores de pressão, agitação e temperatura. Paralelamente, foram obtidos NPsC por irradiação assistida por microondas num reator monodo da marca Anton Paar, modelo Monowave 300, num reator microondas monomodo da marca CEM, modelo Discover, em tubos de pyrex com capacidade de 30 mL e 10 mL, respetivamente e também num microondas doméstico da marca Teka, modelo MW-219, em tubos de ensaio com capacidade de 15 mL. Em reator de aço-inox com vaso de Teflon de 50 mL, foram ainda preparados NPsC com aquecimento em mufla da marca Nabertherm, modelo B 170.

Ao longo do texto serão descritos os procedimentos empregues no processamento/isolamento das misturas reacionais obtidas em cada ensaio, sendo usual a realização de filtração por membrana de celulose de 0.2 µm da Whatman™ RC58.

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram traçados num espectrofotômetro Brüker Vertex 70 com uma resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$  em pastilhas de brometo de potássio de pureza espectroscópica ou em discos de NaCl.

Na descrição de cada espectro, os dados serão indicados da seguinte forma:  $\nu_{\text{máx}}$  (estado da amostra: pastilha de KBr (brometo de potássio));  $n^{\circ}$  de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) correspondente à frequência do máximo de absorção de uma banda, atribuição de vibração a um agrupamento molecular.

Os espectros de ultravioleta-visível (UV-Vis) foram traçados num espectrofotômetro da marca Jasco, modelo V-750. Os reagentes e concentrações utilizadas serão descritas em cada caso.

Os espectros de fluorescência no estado estacionário foram traçados num espectrofluorímetro da Perkin Elmer, modelo LS45, utilizando geometria a  $90^{\circ}$  e células de quartzo de 1 cm; os ensaios foram realizados a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Os espectros de ressonância magnética nuclear de próton (RMN  $^1\text{H}$ , 400 MHz) foram realizados num espectrómetro Brüker AVANCE II+ (400 MHz), utilizando  $\text{D}_2\text{O}$  como solvente.

Os rendimentos quânticos de fluorescência foram determinados em água Millipore®, utilizando como padrão sulfato de quinino,  $>98\%$  (Fluka) em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 M ( $\Phi_{\text{F}} = 0.54^{98}$  em condições de equilíbrio com o ar e geometria a  $90^{\circ}$ ), através do método do declive.<sup>99</sup> A determinação do pH nas etapas de síntese e de caracterização foram realizadas num aparelho de pH VWR, modelo UM 6100L.

A caracterização morfológica dos NPsC foi realizada num microscópio de força atômica (AFM) da Nanosurf, NaioAFM, em modo de força dinâmica e área variável.

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* foram realizados no Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT-NOVA), tendo sido utilizada uma câmara de fluxo laminar horizontal (TL 2448) e uma estufa de incubação de  $\text{CO}_2$  (Heaeus, HERA cell 240). As concentrações celulares foram determinadas pelo método de exclusão do corante azul de tripano (GIBCO®, Thermo Fisher Scientific) numa câmara de contagem *Neubauer Improved* (Superior Marienfeld), utilizando um microscópio ótico invertido, OLYMPUS, CK2.

Os ensaios de marcação celular com os NPsC foram conduzidos num microscópio de fluorescência Olympus, modelo BX51 com conjunto de filtros (330-385 nm, 460-490 nm e 510-550 nm).

Durante os ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana, as bactérias em estudo foram manipuladas numa câmara de segurança biológica SafeFAST Classic e as culturas foram incubadas numa estufa (Memmert)

As leituras em microplacas de 96 poços foram realizadas em leitores de microplacas Bio-Rad, modelo 680, NanoQuant Infinite, modelo M200 Pro e num fluorímetro Labtech-BMg, modelo FLUOstar OPTIMA.

### **3.3 Microalga *Porphyridium cruentum***

#### **3.3.1 Caracterização Estrutural**

O resíduo obtido da cultura de *Porphyridium cruentum*, após evaporação e secagem a 105 °C foi caracterizado por FTIR em pastilhas de KBr.

#### **3.3.2 Quantificação de Sólidos Totais**

Os sólidos totais foram quantificados após evaporação à secura de uma toma de 40 mL da cultura da microalga e posterior secagem a 105 °C em estufa; a quantificação foi feita em triplicado.

#### **3.3.3 Quantificação de Cinzas**

As cinzas na cultura de *P. cruentum* (e também nos NPsC) foram quantificadas; os ensaios foram realizados em duplicado. Os cadinhos de porcelana foram previamente secos a 105 °C durante uma hora e de seguida colocados numa mufla a 575 °C durante 12 horas. Decorrido esse período, os cadinhos foram arrefecidos num exsiccador durante uma hora. Adicionou-se a amostra a cada cadinho e colocou-se novamente na mufla a 575 °C durante 12 horas. Arrefeceram-se os cadinhos num exsiccador até peso constante e quantificaram-se as cinzas resultantes.<sup>93</sup>

#### **3.3.4 Extração de Compostos Bioativos da *P. cruentum***

Para a extração de composto bioativos da *P. cruentum* foi utilizado o método de extração convencional de fracionamento em 5 etapas (MSE).<sup>23</sup> O processo foi iniciado com água fria, seguido de água em ebulição e posteriormente, em condições alcalinas e ácidas.

Na primeira etapa, foram adicionados à biomassa dois volumes de água destilada e agitou-se durante cinco minutos em *vortex*, seguido de centrifugação durante 5 minutos a 11000 rpm e a 4 °C. Foi recolhido o sobrenadante, obtendo-se a primeira fração (FW1). De seguida, ao sedimento (resíduo obtido após centrifugação) adicionou-se um volume de água destilada com agitação e em seguida incubou-se a 100 °C durante 3 horas. Decorrido esse período, centrifugou-se a suspensão a 11000 rpm durante 20 minutos a 4 °C e recolheu-se novamente o sobrenadante (FW2). Lavou-se o sedimento com água destilada à temperatura ambiente e o sobrenadante obtido foi adicionado à fração FW2.

Ao sedimento resultante, adicionaram-se 3 volumes de uma solução de KOH 1M e incubou-se a 60 °C durante 20 minutos numa placa de aquecimento com agitação magnética. Posteriormente, centrifugou-se a 4 °C durante 20 minutos, a 11000 rpm. Após centrifugação, recolheu-se novamente o sobrenadante obtendo-se a fração designada FKOH, o sedimento foi também lavado com água e o sobrenadante obtido foi adicionado à fração FKOH; a fração resultante foi neutralizada.

Ao sedimento obtido da etapa anterior, foram adicionados dois volumes de HCl 0.6 M e incubou-se a suspensão a 100 °C durante uma hora. Após incubação, a suspensão foi novamente centrifugada e lavada com água destilada. Os sobrenadantes foram recolhidos, obtendo-se a fração FHCl, tendo esta sido neutralizada com NaOH. Por fim, ao sedimento resultante, adicionaram-se dois volumes de NaOH 1M e agitou-se a suspensão a 60 °C durante 20 minutos, seguida de centrifugação e lavagem com água destilada. Reuniram-se os sobrenadantes recolhidos (fração FNaOH) e neutralizou-se com HCl.

### **3.3.5 Quantificação de Lípidos**

Os lípidos da cultura de *P. cruentum* e das frações obtidas por extração multi-etapas (MSE) foram quantificados por dois métodos distintos, extração contínua em Soxhlet usando *n*-hexano como solvente e pelo método colorimétrico de sulfofosfovanilina.<sup>100</sup>

#### **3.3.5.1 Extração em Soxhlet**

Uma amostra de 3 g de resíduo seco da cultura de *P. cruentum* foi extraída com 300 mL de *n*-hexano durante 5 horas por extração contínua em sistema Soxhlet. O solvente foi evaporado à secura, o extrato seco sob vácuo, seguido de estufa a 105 °C, tendo o resíduo sido quantificado.

#### **3.3.5.2 Método de Sulfofosfovanilina**

Este método foi realizado para as frações resultantes da MSE. Adicionou-se 20 µL de amostra a tubos de ensaio e incubou-se a 90 °C num banho termostatizado durante 10 minutos. Após arrefecimento até temperatura ambiente, adicionaram-se 180 µL de ácido sulfúrico concentrado, incubou-se novamente a 100 °C durante 10 minutos e quando arrefecido, adicionou-se 500 µL do reagente de fosfovanilina (0.0012 % (m/v) de vanilina 99% numa solução de ácido ortofosfórico 70.83 %), incubando-se a 37 °C durante 15 minutos. Por fim, 150 µL da mistura reacional foram colocadas numa microplaca de 96 poços e incubou-se 30 minutos no escuro, sendo registada a absorvância ao comprimento de onda de 528 nm num leitor de microplacas. Os doseamentos foram realizados em triplicado e o ensaio em branco com água destilada.

Foi utilizado como padrão uma solução de óleo de colza biológico em etanol absoluto, numa gama de 0-2.544 µg. Os resultados foram apresentados em mg/g de biomassa.

### 3.3.6 Doseamento de Polissacáridos

#### 3.3.6.1 Método do Fenol-Ácido Sulfúrico

A quantificação dos polissacáridos totais presentes nos extratos foi realizada segundo o protocolo descrito por Masuko *et al.*<sup>21</sup> Numa microplaca de 96 poços, adicionaram-se por poço 50 µL de amostra, 150 µL de ácido sulfúrico concentrado e de imediato 30 µL de fenol 5% (m/v). A mistura reacional foi incubada a 90 °C num banho termostaticado durante 5 minutos. Decorrido esse período, arrefeceu-se a mistura reacional à temperatura ambiente e registou-se a absorvância ao comprimento de onda de 490 nm num leitor de microplacas. Os doseamentos foram realizados em triplicado e utilizada água destilada no ensaio em branco. O ácido poligalacturónico foi usado como padrão numa gama de 0-500 µg. Os resultados foram apresentados em mg de polissacáridos totais por g de biomassa.

#### 3.3.6.2 Método do Corante Congo Red

A quantificação de β-(1,3)-D-glucanos com estrutura em tripla hélice, realizou-se pelo método descrito por Semedo *et al.*<sup>23</sup> Numa placa de 96 poços, adicionaram-se 140 µL de amostra e 140 µL de uma solução previamente preparada de Congo red 0.017% (m/v) em tampão fosfatos salino (PBS). De seguida, registou-se a absorvância ao comprimento de onda de 510 nm num leitor de microplacas. Os doseamentos foram realizados em triplicado e foram efetuados 3 tipos de ensaio em branco com os mesmos volumes anteriormente descritos. O primeiro com água destilada e com o corante, o segundo com água destilada e PBS e o terceiro com a amostra e o PBS, tendo sido utilizado como padrão β-(1,3)-D-glucano de cevada numa gama de 0-7 µg. Para a correção da absorvância, utilizaram-se os valores de absorvância dos ensaios em branco ( $Abs_{Branco}$ ) e da amostra ( $Abs_{Amostra}$ ) (Equação 1).

$$Abs_{510\text{ nm}} = (Abs_{Amostra} - Abs_{Branco\ 1}) - (Abs_{Branco\ 3} - Abs_{Branco\ 2}) \quad (\text{Eq. 1})$$

Os resultados foram apresentados em mg de β-(1,3)-D-glucanos por g de amostra.

#### 3.3.6.3 Método do Azul de Toluidina

Os polissacáridos sulfatados foram quantificados utilizando o método descrito por Hahn *et al.*<sup>27</sup> adaptado, Numa microplaca de 96 poços, adicionaram-se 50 µL de amostra e 250 µL de uma solução de azul de toluidina 0.05 mgmL<sup>-1</sup> em PBS, lendo-se de seguida a absorvância a 655 nm num leitor de microplacas. Para a preparação dos padrões na gama 0-6.25 µg, utilizou-se uma solução *stock* de sulfato de 1 mgmL<sup>-1</sup> de dextrano

com peso molecular médio de 200 Da. Os doseamentos foram realizados em triplicado e o branco com água destilada. Os resultados foram apresentados em mg de polissacáridos sulfatados por g de biomassa.

#### **3.3.6.4 Método do Carbazole-Ácido Sulfúrico**

Os polissacáridos ácidos foram quantificados pelo método descrito por Cesaretti *et al.*<sup>101</sup> e Monsalve-Bustamante *et al.*<sup>102</sup> Adicionaram-se em tubos de ensaio 40 µL de amostra, 400 µL de água destilada, 2 mL de tetraborato de sódio 0.95 gL<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 40 µL de carbazole, a 0.2 % (m/V) em etanol e incubou-se a 90 °C num banho termostatizado durante 12 minutos. Após arrefecimento, foram adicionados 300 µL da mistura reacional numa microplaca de 96 poços e registou-se a absorvância ao comprimento de onda de 528 nm, utilizando como padrão o ácido D-galacturónico numa gama de 0-2.5 mg. Os resultados foram apresentados em mg de polissacáridos ácidos por g de biomassa.

#### **3.3.7 Doseamento de Proteína Total**

No doseamento de proteína total utilizou-se o método descrito por Bradford<sup>28</sup> com algumas adaptações e que se baseia na ligação do corante Azul de Coomassie às proteínas. Pipetou-se 100 µL de amostra e 100 µL do reagente Bradford (Bio-Rad Quick Start™) para uma microplaca de 96 poços. Misturou-se com a ajuda da micropipeta e deixou-se repousar durante 5 minutos. A absorvância ao comprimento de onda de 550 nm foi registada num leitor de microplacas. Os padrões foram preparados numa gama de 0-10.4 µg a partir de uma solução *stock* 0.20 mgmL<sup>-1</sup> de BSA (albumina de soro de bovino). Os doseamentos foram realizados em triplicado e o branco com água destilada. Os resultados obtidos foram apresentados em mg de proteína por g de biomassa.

### **3.3.8 Avaliação da Capacidade Antioxidante**

#### **3.3.8.1 Compostos Fenólicos Totais**

Os compostos fenólicos totais foram doseados a partir do método de Folin-Ciocalteu descrito por Reis *et al.*<sup>103</sup> com algumas adaptações. Numa microplaca de 96 poços adicionou-se 30 µL de amostra, 150 µL de uma solução de reagente Folin-Ciocalteu (1:10) e 120 µL de uma solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 75 gL<sup>-1</sup>. Incubou-se a mistura reacional a 40 °C durante 30 minutos num banho termostatizado. Após arrefecimento, registaram-se as absorvâncias ao comprimento de onda de 655 nm num leitor de microplacas. Foi utilizado como padrão o ácido gálico numa gama de 0-7.5 µg. Os doseamentos foram realizados em triplicado e o branco com água destilada.

Os resultados obtidos foram apresentados em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de biomassa.

### 3.3.8.2 Flavonoides Totais

Os flavonoides nos extratos obtidos foram quantificados pelo método de cloreto de alumínio descrito por Yeh *et al.*<sup>32</sup> com algumas modificações. Numa microplaca de 96 poços, pipetou-se 25 µL de amostra, 100 µL de água destilada e 7.5 µL de uma solução de NaNO<sub>2</sub> 5 % (m/v) e deixou-se em repouso durante 5 min à temperatura ambiente. De seguida, adicionou-se 7.5 µL de uma solução de AlCl<sub>3</sub> 10 % (m/v) e deixou-se novamente repousar 5 minutos, seguindo-se a adição de 100 µL de uma solução de NaOH 4 % (m/v) à mistura reacional, que ficou em repouso 10 minutos antes de se registar a absorvância ao comprimento de onda de 510 nm num leitor de microplacas. Para a preparação dos padrões numa gama de 0-25 µg, utilizou-se uma solução *stock* de catequina 50 % (m/v) em etanol. Os doseamentos foram realizados em triplicado e o branco com água destilada. Os resultados obtidos foram apresentados em mg equivalentes de catequina (EC) por g biomassa.

### 3.3.8.3 Capacidade Quelante de Iões de Fe<sup>2+</sup>

Determinou-se a capacidade quelante de iões Fe<sup>2+</sup> dos NPsC sintetizados a partir do método descrito por Canabady-Rochelle *et al.*<sup>35</sup> com algumas alterações. Numa microplaca de 96 poços adicionou-se 50 µL da amostra a analisar, 185 µL de metanol absoluto, 50 µL de uma solução de cloreto de ferro (II) 2 mM e 20 µL de uma solução de ferrozina 5mM. Deixou-se repousar a mistura reacional durante 10 min à temperatura ambiente. Após 10 minutos, registou-se a absorvância ao comprimento de onda de 550 nm num leitor de microplacas. Os doseamentos foram realizados em triplicado e o branco com água destilada. A capacidade quelante de iões Fe<sup>2+</sup> foi calculada a partir da Equação 2, onde (Abs<sub>550nm</sub>)<sub>0</sub> corresponde à absorvância do branco e (Abs<sub>550nm</sub>)<sub>amostra</sub> à absorvância da amostra.

$$\text{Capacidade Quelante (\%)} = [(Abs_{550nm})_0 - (Abs_{550nm})_{amostra}] / (Abs_{550nm})_0 \quad (\text{Eq. 2})$$

### 3.3.8.4 Método do Radical ABTS

A atividade antioxidante dos NPsC foi avaliada utilizando o método de inibição do radical ABTS descrito por Re *et al.*<sup>37</sup> com algumas adaptações. Preparou-se uma solução *stock* de ABTS<sup>•+</sup> 7 mM com K<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub> 2.5 mM em água destilada deixando repousar durante a noite (ca. 12-16 h) no escuro. De seguida, a solução foi diluída com PBS para um valor de absorvância unitário ao comprimento de onda de 655 nm, sendo a mesma utilizada como solução *stock*. Para o doseamento, adicionou-se num poço de uma microplaca de 96 poços, 290 µL da solução *stock* e

10 µL da amostra a analisar. As absorvâncias foram lidas ao comprimento de onda de 655 nm num leitor de microplacas. Os doseamentos foram realizados em triplicado e o branco com água destilada. Como padrão foi utilizado o trolox numa gama de 0-3.4 µg. Os resultados foram apresentados em mg equivalentes de trolox (ET) por g de biomassa.

#### **3.3.8.5 Método do Radical DPPH**

Como complemento do estudo, a capacidade antioxidante dos NPsC foi avaliada utilizando o método do radical DPPH, descrito por Thetsrimuang *et al.*<sup>40</sup>, com algumas modificações.

Numa microplaca de 96 poços, adicionou-se 90 µL de uma solução DPPH 0.3 mM em metanol 80 %(v/v) e 10 µL de amostra. De seguida, incubou-se a mistura reacional durante 30 minutos no escuro à temperatura ambiente. Registaram-se as absorvâncias ao comprimento de onda de 510 nm num leitor de microplacas. Como padrão utilizou-se também o trolox numa gama de 0-4 µg. Os doseamentos foram realizados em triplicado e o branco com água destilada. Os resultados foram apresentados em mg equivalentes de trolox (ET) por g de biomassa.

### **3.4 Síntese e Purificação dos NPsC**

Os NPsC foram sintetizados pelo método convencional num reator de alta-pressão Parr, por irradiação assistida por microondas (Mw) e ainda com aquecimento em mufla. No processo hidrotérmico convencional foram utilizadas amostras em diferentes condições: a cultura de *P. cruentum* direta, i.e., na presença do meio nutriente, a biomassa húmida e a biomassa seca; nos ensaios realizados por irradiação assistida por microondas e em mufla, apenas foi utilizada a biomassa seca.

#### **3.4.1 Síntese de NPsc a partir da Cultura de *P. cruentum* por Aquecimento Convencional**

As condições típicas utilizaram 120 mL da cultura de *P. cruentum* que foram introduzidos no reator de aço inox e ao qual foi adicionada uma quantidade conhecida de aditivo. O reator foi selado e as condições do ensaio foram programadas. As condições reacionais de cada ensaio são apresentadas no capítulo dos Resultados e Discussão.

#### **3.4.2 Síntese dos NPsc a partir da Biomassa húmida/seca de *P. cruentum* por Aquecimento Convencional**

As condições típicas utilizaram 3 g de biomassa de *P. cruentum* à qual se adicionaram 120 mL de água Millipore® no reator de aço inox e uma dada quantidade de aditivo (ED). O reator foi posteriormente selado e as condições operatórias programadas. As

condições reacionais de cada ensaio são apresentadas no capítulo dos Resultados e Discussão.

### **3.4.3 Síntese de NPsC a partir da Biomassa Seca por Irradiação Assistida por Microondas**

Pesou-se *ca.* 500 mg de biomassa seca para um tubo de *pyrex* de 30 mL, adicionou-se 15 mL de água Millipore® e a quantidade pretendida de ED. O tubo foi selado e colocado no reator Monowave 300 da Anton Paar, tendo sido iniciada a irradiação nas condições previamente estabelecidas. As reações no microondas doméstico foram realizadas com 500 mg de biomassa seca e 2 mL de água Millipore® (com e sem aditivo) em vaso aberto (tubo de ensaio). Este foi colocado no microondas e o ensaio programado a 800 W, com tempos de irradiação variáveis. Atendendo à evaporação da água durante o aquecimento, no final do período de irradiação foram adicionados 15 mL de água Millipore® e a mistura reacional foi sujeita a ultrassons para desagregar o material das paredes do tubo de ensaio.

Os ensaios realizados em mufla foram conduzidos no reator de aço-inox em vaso de Teflon com 1.67 g de biomassa seca, 50 mL de água e uma quantidade pré-estabelecida de aditivo.

### **3.4.4 Purificação de NPsC por Extração líquido-líquido**

Os NPsC obtidos foram extraídos com 2x60 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e com 2x60 mL de AcOEt, obtendo-se no final uma fase aquosa e duas fases orgânicas. As fases orgânicas foram secas com sulfato de sódio anidro, filtradas por gravidade, evaporadas sob vácuo e posteriormente secas a 105 °C. A fase aquosa foi colocada sob vácuo para remover o solvente orgânico residual e foi armazenada a 4 °C sob atmosfera inerte.

### **3.4.5 Purificação de NPsC por Sephadex G75**

Uma amostra de 1.3 mL (*ca.* 50 mg) de um lote de NPsC previamente selecionado foi carregada numa coluna cromatográfica com Sephadex G75 (previamente preparada) e foram recolhidas várias frações com volumes de *ca.* 7 mL.

Preparação prévia da coluna de Sephadex: 2.5 mg de Sephadex G75 foram suspensos em 150 mL de água Millipore® e a mesma aquecida a 90 °C com agitação, durante três horas. A suspensão resultante foi deixada em repouso durante 14 dias. O líquido sobrenadante foi retirado e o gel depositado foi lavado cuidadosamente 3x com água Millipore® com recurso a sonicação. O gel foi então transferido para uma coluna cromatográfica (1 cm x 20 cm), onde repousou durante 24 horas. Após o processo de

eluição, o Sephadex foi reutilizado depois de várias lavagens com água Millipore®. A eficiência da lavagem foi monitorada medindo a condutividade do eluato.

### 3.5 Avaliação da Bioatividade dos NPsC

#### 3.5.1 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos NPsC foi avaliada utilizando o método de difusão em disco descrito por Kirby-Bauer<sup>104</sup> com algumas adaptações; e os valores MIC e MLC foram determinados pelo método colorimétrico de microdiluição em meio líquido.<sup>105,106</sup> Foram utilizadas duas espécies bacterianas, *E. coli* ATCC® 25922 e *S. aureus* ATCC® 25923. Para cada ensaio, as culturas de pré-inóculo foram preparadas em meio *Mueller Hinton Broth* (MHB, Oxoid), com ajuste da turbidez ao padrão 0.5 *McFarland* ( $1.5 \times 10^8$  UFC/MI, Frilabo), após incubação durante a noite, a 37 °C e com agitação a 180 rpm. Para a aplicação do método de difusão em disco, preparou-se o meio nutriente *Mueller Hinton Agar* (MHA, Scharlau) e distribuiu-se por várias placas de Petri. A inoculação das suspensões celulares foi realizada num meio constituído por  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato de cálcio (MHB) suplementado com 0.5% (m/v) de agar técnico que foi depositado (ca. 6 mL) na superfície do meio MHA previamente seco. A atividade antimicrobiana foi avaliada em ensaios de suscetibilidade à difusão em discos de 9 mm, onde foram aplicados 50  $\mu$ L de NPsC/disco (correspondendo a diferentes massas), utilizando como controlo positivo a gentamicina (10  $\mu$ g/disco) e como controlo negativo água estéril. Os resultados foram observados após um período de incubação de ca. 18 horas, a 37 °C.

Para a determinação dos valores MIC e MLC utilizou-se um método colorimétrico de microdiluição em meio líquido, que se baseia na redução da resazurina a resorufina realizada por células viáveis.<sup>105,106</sup> Numa microplaca de 96 poços estéril, foram colocados em cada poço, 100  $\mu$ L da suspensão celular previamente ajustada à concentração de  $5 \times 10^5$  UFC/mL e 100  $\mu$ L de NPsC (em diferentes concentrações). A placa foi incubada durante aproximadamente 18 horas, a 37 °C. Após esse período, adicionou-se a cada poço 20  $\mu$ L de solução 0.01% (m/v) resazurina em PBS previamente filtrada e voltou-se a incubar por 1-2 horas a 37 °C. Os resultados foram interpretados visualmente e por leitura de intensidade de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 550$  nm e  $\lambda_{em} = 650$  nm).

### 3.5.2 Avaliação da Citotoxicidade *in vitro*

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos NPsC foi realizada pelo método colorimétrico do MTT<sup>81,82</sup> em quatro linhas celulares.

Numa microplaca de 96 poços estéril, adicionou-se 100 µL de suspensão celular ( $1 \times 10^5$  células/poço), em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, GIBCO®, *Thermo Fisher Scientific*) suplementado com 10% (v/v) FBS (soro bovino fetal, GIBCO®, *Thermo Fisher Scientific*) e incubou-se ca. 18 horas, a 37 °C com atmosfera humidificada a 5 % CO<sub>2</sub>. Após esse período, adicionou-se 100 µL de NPsC por poço e as microplacas foram novamente incubadas durante 18 horas, mantendo-se as condições anteriormente referidas. De seguida, descartou-se o sobrenadante e lavaram-se as células nos poços com PBS; adicionou-se 100 µL/poço de uma solução 5 mgmL<sup>-1</sup> de MTT em PBS e incubou-se durante 3 horas a 37 °C com atmosfera humidificada a 5 % CO<sub>2</sub>. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 100 µL/poço de uma solução de 0.1 M Twenn® 20 (Bio-Rad) em isopropanol e após dissolução dos cristais, leu-se a absorvância a 570 nm com referência a 650 nm.

### 3.5.3 Marcação Celular com NPsC por Microscopia de Fluorescência

As observações por microscopia de fluorescência foram realizadas com diferentes linhas celulares, (3T3, S180, HeLa e Vero) previamente incubadas com os NPsC numa concentração de 500 µgmL<sup>-1</sup>.

Após obtenção das suspensões celulares, numa microplaca de 24 poços estéril foram adicionadas lamelas redondas, previamente esterilizadas e adicionou-se 500 µL de uma solução de 0.15% (m/v) de gelatina em PBS. De seguida, os poços foram esvaziados, deixados secar durante 5 minutos e foram adicionadas 1-2 gotas de suspensão celular ( $1 \times 10^5$  células/poço) em meio DMEM suplementado com 10% (v/v) FBS. Foram adicionados a cada poço 500 µL de meio DMEM e a microplaca foi incubada durante ca. 18 horas, a 37 °C com atmosfera humidificada a 5 % CO<sub>2</sub>. Após incubação, descartou-se o sobrenadante, pipetou-se 1 mL de meio DMEM fresco suplementado com 10% (v/v) FBS e adicionou-se 50 µL de NPsC/poço. As placas foram deixadas a incubar, nas condições referidas anteriormente. Após 18 horas, as lamelas foram lavadas com meio DMEM fresco, colocou-se cada lamela invertida numa lâmina e procedeu-se à aquisição das imagens num microscópio de fluorescência, recorrendo a uma ampliação de 400x, tendo sido selecionados filtros de diferentes gamas de comprimentos de onda.

## **4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS**

#### 4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Neste trabalho foram sintetizados nanopontos de carbono (NPsC) luminescentes inovadores utilizando como fonte de carbono uma cultura de *Porphyridium cruentum* e a sua biomassa. A síntese envolveu a produção de NPsC recorrendo à valorização de resíduos da microalga *P. cruentum* produzida industrialmente, utilizando técnicas de carbonização hidrotérmica com aquecimento convencional em reator de alta pressão (CH) e irradiação assistida por microondas. Os NPsC sintetizados por CH exibiram rendimentos quânticos promissores (ca.  $\Phi_F = 0.19$ ), destacando-se os produzidos a partir da biomassa seca de *P. cruentum* utilizando como aditivo etilenodiamina.

Para concentrações inferiores a  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , verificou-se no geral, ausência de citotoxicidade dos NPsC produzidos quando testados em ensaios *in vitro* em células animais e humanas.

A atividade antibacteriana avaliada revelou-se moderada para os NPsC produzidos a partir da BH\_*Porphy.cr.*

Os resultados obtidos mostraram que os NPsC sintetizados exibiram capacidade para serem utilizados como agentes antimicrobianos, bem como na vertente da bioimagemologia como marcadores, atendendo à sua dimensão nanométrica e conseqüentemente, à sua capacidade de migrarem para o interior das células. Contudo, esta aptidão deverá ser melhor explorada, atendendo à diversidade de parâmetros envolvidos na sua aplicação.

Perspetivando uma melhoria das propriedades óticas e morfológicas destes nanomateriais, poderão futuramente ser explorados alguns parâmetros, nomeadamente a liofilização da matéria-prima em alternativa à secagem em estufa, considerando que a temperatura elevada poderá destruir componentes importantes para o processo de carbonização e subseqüentes propriedades dos NPsC produzidos.

Será igualmente pertinente o estudo por microscopia de fluorescência destes NPsC em bactérias, nomeadamente em *E. coli* e *S. aureus*, dado que alguns dos NPsC manifestaram atividade antimicrobiana contra estas duas espécies. Esta abordagem possibilitará a investigação de interações específicas entre os NPsC e as células microbianas, permitindo compreender os mecanismos subjacentes que conduzem à indução da morte celular.

A possibilidade do aumento de escala no reator de microondas será uma vertente a considerar, podendo envolver a exploração de condições operatórias diferenciadas, nomeadamente o aumento da temperatura, com a conseqüente diminuição do tempo de residência.



## 5. REFERÊNCIAS

1. Bule, M.H.; Ahmed, I.; Maqbool, F.; Bilal, M.; Iqbal, H.M. *Front. Biosci.*, **2018**, 10, 197-216.
2. Mobin, S.; Alam, F. *Energy Procedia*, **2017**, 110, 510-517.
3. Priyadarshani, I.; Rath, B., *J. Algal Biomass Util.*, **2012**, 3, 89-100.
4. Bhalamurugan, G.L.; Valerie, O.; Mark, L. *Environ. Eng. Res.*, **2018**, 23, 229-241.
5. Matos, Â.P., **2019**, Academic Press, 63-96.
6. Arad, M.; Yaron, A. *Trends Food Sci Technol.*, **1992**, 3, 92-97.
7. Gaignard, C.; Gargouch, N.; Dubessay, P.; Delattre, C.; Pierre, G.; Laroche, C.; Michaud, P. *Biotechnol. Adv.*, **2018**, 193-222.
8. Tsvetanova, F.; Yankov, D. *Microorganisms*, **2022**, 10, 1-19.
9. Schoch, C.L. *et al.*, **2020**, NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=2791>. Data de acesso: 19 de agosto de 2023.
10. Li, T.; Xu, J.; Wang, W.; Chen, Z.; Chulin, L.; Wu, H.; Xiang, W. *Foods*, **2021**, 10, 1-15.
11. Agustina, S.; Aidha, N.; Oktarina, E.; Setiawati, I. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, **2020**, 980, 1-11.
12. Rossi, A.J.; Machado, K.E.; *Rev. Psic.*, **2022**, 16(61), 347-360.
13. Balasubramaniam, V.; Gunasegavan, R. D. N.; Mustar, S.; Lee, J. C.; Noh, M. F. *Molecules*, **2021**, 26, 943.
14. Xu, S.Y.; Huang, X.; Cheong, K.L. *Marine Drugs*, **2017**, 15, 1-16.
15. Kadam, S.U.; Tiwari, B.K.; O'Donnell, C.P. *Agric. Food Chem.*, **2013**, 61, 4667-4675.
16. Zhang, M.; Cui, S.W.; Cheung, P.C.; Wang, Q. *Trends Food Sci Technol.*, **2007**, 18, 4-19.
17. Khanra, S.; Mondal, M.; Halder, G.; Tiwari, O.; Gayen, K.; Bhowmick, T.K. *Food Bioprod. Process.*, **2018**, 110, 60-84.
18. Albalasmeh, A.A.; Berhe, A.A.; Ghezzehei, T.A. *Carbohydr. Polym.*, **2013**, 97, 253-261.
19. Cuesta, G.; Suarez, N.; Bessio, M.I.; Ferreira, F.; Massaldi, H. *J. Microbiol. Methods*, **2003**, 52, 69-73.
20. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. *Nature*, **1951**, 168, 167
21. Masuko, T.; Minami, A.; Iwasaki, N.; Majima, T.; Nishimura, S. *Anal. Biochem.*, **2005**, 339, 1, 69-72.
22. Smedo, M.C.; Karmali, A.; Fonseca, L., **2015**, *Biotechnol. Prog.*, 31(6), 1526-1535.
23. Smedo, M., C., Karmali, A., Fonseca, L., **2015**, *J. Microbiol. Methods*, 109, 140-148.
24. Ogawa, K.; Wanatable, T.; Tsurugi, J.; Ono, S. *Carbohydr. Res.*, **1972**, 23, 3, 399-405.
25. Wood, P.J. *Carbohydr. Res.*, **1980**, 85, 2, 271-287.
26. Nitschke, J.; Modick, H.; Busch, E.; Rekowski, R.W.; Altenbach, H.J.; Mölleken, H. *Food Chem.*, **2011**, 127, 791-796.
27. Hahn, T.; Schulz, M.; Stadtmüller, R.; Zayed, A.; Muffler, K.; Lang, S.; Ulber, R. *Anal. Lett.*, **2016**, 49, 12, 1948-1962.
28. Bradford, M.M. *Anal. Biochem.*, **1976**, 72, 248-254.
29. Sardesai, V.M. *Nutr. Clin. Pract.*, **1995**, 10, 1, 19-25.
30. Prior, R.L.; Wu, X.; Schaich, K. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 4290-4302.
31. Blainski, A.; Lopes, G.C.; Mello, J.C. *Molecules*, **2013**, 8, 6852-6865.
32. Yeh, J.Y.; Hsieh, L.H.; Wu, K.T.; Tsai, C.F. *Molecules*, **2011**, 16, 3197-3211.
33. Babu, P.V.; Liu, D. Academic Press, **2009**, 371-392.

34. Surana, A.R.; Kumbhare, M.R.; Wagh, R.D. *Res. J. Phytochem.*, **2016**, 10(2), 67-74.
35. Canabady-Rochelle, L.L.; Harscoat-Schiavo, C.; Kessler, V.; Aymes, A.; Fournier, F.; Girardet, J.M. *Food Chem.*, **2015**, 183, 129-135.
36. Erel, O. *Clin. Biochem.*, **2004**, 37(4), 277-285.
37. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. *Free Radic. Biol. Med.*, **1999**, 26, 1231-1237.
38. Rodríguez, P.H.; Baquero, L.P.; Larrota, H.R. *Bioactive Compounds - Health Benefits and Potential Applications*, 265-288, Woodhead Publishing, 2019.
39. Liang, N.; Kitts, D.D. *Molecules*, **2014**, 19, 19180-19208.
40. Thetsrimuang, C.; Khammuang, S.; Sarnthima, R. *Int. J. Pharmacol.*, **2011**, 7(1), 58-65.
41. Santos, J.S.; Brizola, V.R.; Granato, D. *Food Chem.*, **2017**, 214, 515-522.
42. Adjamani, J.P.; Asare, P. *Toxicol. Rep.*, **2015**, 2, 721-728.
43. Jariwala, D.; Sangwan, V.K.; Lauhon, L.; Marks, T.J.; Hersam, M.C. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 2824-2860.
44. Liu, W.; Li, C.; Ren, Y.; Sun, X.; Pan, W.; Li, Y.; Wang, W. *J. Mater. Chem. B*, **2013**, 1-18.
45. Kroto, H.W.; Heath, J.R.; O'Brien, S.C.; Curl, R.F.; Smalley, R.E. *Nature*, **1985**, 318, 162.
46. Lijima, S., *Nature*, **1991**, 354, 56.
47. Novoselov, K.S.; Geim, A.K.; Morozov, S.V.; Jiang, D.; Zhang, Y.; Dubonos, S.V.; Grigorieva, I.V.; Firsov, A.A. *Science*, **2004**, 306, 666-669.
48. Xu, X.; Ray, R.; Gu, Y.; Ploehn, H.J.; Gearheart, L.; Raker, K.; Scrivens, W.A. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126(40), 12736-12737.
49. Sun, Y.-P.; et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 7756-7757
50. Zuo, J.; Jiang, T.; Zhao, X.; Xiong, X.; Xiao, S.; Zhu, Z. *J. Nanomater.*, **2015**, 1-13.
51. Gayen, B.; Palchoudhury, S.; Chowdhury, J. *J. Nanomater.*, **2019**, 1-19.
52. Anuar, N.K.; Tan, H.L.; Lim, Y.P.; So'aib, M.S.; Bakar, N.F. *Front. Energy Res.*, **2021**, 1-22.
53. Ozyurt, D.; Kobaisi, M.A.; Hocking, R.K.; Fox, B. *Carbon Trends*, **2023**, 12, 1-27.
54. Zheng, X.T.; Ananthanarayanan, A.; Luo, K.Q.; Chen, P. *Small*, **2015**, 11(14), 1620-1636.
55. Hola, K.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Giannelis, E.P.; Zboril, R.; Rogach, A.L. *Nano Today*, **2014**, 1-14.
56. Sousa, D.A.; Costa, A.I.; Alexandre, M.R.; Prata, J.V. *Sci. Total Environ.*, **2019**, 647, 1097-1105.
57. Alexandre, M.R.; Costa, A.I.; Santos, M.N.B.; Prata, J.V. *Molecules*, **2020**, 25, 2320.
58. Costa, A.I.; Barata, P.D.; Moraes, B.; Prata, J.V. *Chemosensors*, **2022**, 10, 113.
59. Sing, R.K.; Kumar, R.; Singh, D.P.; Savu, R.; Moshkalev, S.A. *Mater. Today Chem.*, **2019**, 12, 282-314.
60. Bruno, F.; Sciortino, A.; Buscarino, G.; Soriano, M.L.; Ríos, Á.; Cannas, M.; Gelardi, F.; Messina, F.; Agnello, S. *Nanomaterials*, **2021**, 11, 1265.
61. Himaja, A.L.; Karthik, P.S.; Singh, S.P. *Chem. Rec.*, **2015**, 15, 595-615.
62. Zuo, P.; Lu, X.; Sun, Z.; Guo, Y.; He, H. *Microchim. Acta*, **2016**, 183, 519-542.
63. Shen, J.; Zhu, Y.; Yang, X.; Zong, J.; Zhang, J.; Li, C. *New J. Chem.*, **2012**, 36, 97-101.
64. Zhu, S.; Meng, Q.; Wang, L.; Zhang, J.; Song, Y.; Jin, H.; Zhang, K.; Sun, H.; Wang, H.; Yang, B. *Angew. Chemie, Int. Ed.*, **2013**, 52, 3953-3957.
65. Li, F.; Liu, J.; Yang, J.; Wang, Z.; Liu, W.; Tian, F. *RSC Adv.*, **2014**, 4, 3201-3205.

66. Qu, D.; Zheng, M.; Zhang, L.; Zhao, H.; Xie, Z.; Jing, X.; Haddad, R.E.; Fan, H.; Sun, Z. *Sci. Rep.*, **2014**, 4, 5294.
67. Aung, Y.Y.; Kristanti, A.N.; Lee, H.V.; Fahmi, M.Z. *ACS Omega*, **2021**, 6, 17750-17765.
68. Das, S.; Ngashangva, L.; Goswami, P. *Micromachines*, **2021**, 12, 1-36.
69. Gedda, G.; Lee, C.Y.; Lin, Y.C.; Wu, H.F. *Sens. Actuators B Chem.*, **2015**, 224, 396-403.
70. Mehta, V.N.; Jha, S.; Basu, H.; Singhal, R.K.; Kailasa, S.K. *Sens. Actuators B Chem.*, **2015**, 213, 434-443.
71. Carbonaro, C.M.; Corpino, R.; Salis, M.; Mocci, F.; Thakkar, S.V.; Olla, C.; Ricci, P.C. *C - Journal of Carbon Research*, **2019**, 5, 60, 1-15.
72. Li, H.; Kang, Z.; Liu, Y.; Lee, S.T. *J. Mater. Chem.*, **2012**, 22, 24230-24253.
73. Choi, Y.; Choi, Y.; Kwon, O.H.; Kim, B.S. **2018**, *Chem. Asian J.*, 13, 586-598.
74. Qu, S.; Zhou, D.; Li, D.; Ji, W.; Jing, P.; Han, D.; Liu, L.; Zeng, H.; Shen, D. *Adv. Mater.*, **2016**, 28, 3516-3521.
75. Tao, S.; Zhu, S.; Feng, T.; Xia, C.; Song, Y.; Yang, B. *Mater. Today Chem.*, **2017**, 6, 13-25.
76. Sadjadi, S. *Emerging Carbon Materials for Catalysis*, 123-160, Elsevier, 2021.
77. Boëver, R.; Town, J.R.; Li, X.; Claverie, J. *Chem. Eur. J.*, **2022**, 28, 1-19.
78. Sommer, M.E.; Elgeti, M.; Hildebrand, P.W.; Szczepek, M.; Hofmann, K.P.; Scheerer, P. *Meth. Enzymol.*, **2015**, 556, 563-608.
79. Peng, J.; Gao, W.B.; Gupta, K.; Liu, Z.; Romero, R.; Ge, L.; Song, L.B.; Alemany, X.; Zhan, G.; Gao, S. A.; Vithayathil, B.A.; Kaiparettu, A.A.; Marti, T.; Hayashi, J.J.; Zhu, J.-J.; Ajayan, P. M. *Nano Lett.*, **2012**, 12, 844.
80. Sousa, D.A.; Ferreira, L. F. V.; Fedorov, A.A.; Rego, A.M.B.d; Ferraria, A.M.; Cruz, A.B.; Berberan-Santos, M.N.; Prata, J.V. *Molecules*, **2022**, 27, 6768.
81. Sylvester, P.W. *Drug Design and Discovery: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 157-168, Springer, 2011.
82. Oh, Y.J.; Hong, J., *LWT - Food Sci. Technol.*, **2022**, 153, 112565.
83. Sousa, Diogo A.; Berberan-Santos, Mário N.; Prata, José V. *Chemosensors*, **2022**, 10, 487.
84. Qu, F.; Liu, D.; You, J. *Anal. Chim. Acta*, **2016**, 921, 59.
85. Barati, A.; Shamsipur, M.; Abdollahi, H. *Biosens. Bioelectron.*, **2015**, 71, 470-475.
86. Yuan, F.; Li, S.; Fan, Z.; Meng, X.; Fan, L.; Yang, S. *Nano Today*, **2016**, 11, 565-586.
87. Yang, H.L.; Bai, L.F.; Geng, Z.R.; Cjen, H.; Xu, L.T.; Xie, Y.C.; Wang, X.M. *Mater. Today Adv.*, **2023**, 18, 1-24.
88. Shahshahanipour, M.; Rezaei, B.; Ensafi, A.A.; Etemadifar, Z. *Mater. Sci. Eng. C*, **2019**, 98, 826-833.
89. Behera, M.; Behera, P.R.; Bhuyan, P.P.; Singh, L.; Pradhan, B. *Drugs and Drug Candidates*, **2023**, 2, 554-570.
90. Sidorowicz, A.; Fais, G.; Casula, M.; Borselli, M.; Giannaccare, G.; Locci, A.M.; Concas, A. *Marine Drugs*, **2023**, 21, 2-18.
91. Oscar, F.L.; Vismaya, S.; Arunkumar, M.; Thajuddin, N.; Dhanasekaran, D.; Nithya, C. *Algae - Organisms for Imminent Biotechnology*, 157-182, Intech Open, 2016.
- 92 Venkatpurwar, V.; Pokharkar, V. *Mater. Lett.*, **2011**, 65(6), 999-1002.
93. Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. *Determination of Ash in Biomass*, Technical Report NREL/TP-510-42622, 2008.
94. Yilmaz, F.F.; Demirel, Z.; Karabay-Yavasoglu, N.U.; Ozdemir, G.; Conk-Dalay, M. *HERO*, **2017**, 37(1), 1-8.

- 
95. Song, Y.; Zhu, S.; Zhang, S.; Fu, Y.; Wang, L.; Zhao, X.; Yang, B. *J. Mater. Chem. C*, **3**, **2015**, 5976-5984.
96. He, G.; Shu, M.; Yang, Z.; Ma, Y.; Huang, D.; Xu, S.; Wang, Y.; Hu, N.; Zhang, Y.; Xu, L. *Appl. Surf. Sci.*, **2017**, 422, 257-265.
97. Ali, H., Ghosh, S., Jana, N., WIREs Nanomed Nanobiotechnol, 2020, 1617.
98. Wilkinson, F.; Kelly, G.P. *Handbook of Organic Photochemistry*, Vol. II, CRC Press, USA, 1989.
99. Annon, **2018**, *A Guide to Recording Fluorescence Quantum Yields*, Horiba Scientific: [https://static.horiba.com/fileadmin/Horiba/Application/Materials/Material\\_Research/Quantum\\_Dots/quantumyieldstrad.pdf](https://static.horiba.com/fileadmin/Horiba/Application/Materials/Material_Research/Quantum_Dots/quantumyieldstrad.pdf). Data de acesso: 27 de setembro de 2023.
100. Anschau, A.; Caruso, C.S.; Kuhn, R.C.; Franco, T.T. *Braz. J. Chem. Eng.*, **2017**, 34(1), 19-27.
101. Cesaretti, M.; Luppi, E.; Maccari, F.; Volpi, N. *Carbohydr. Polym.*, **2003**, 54, 59-61.
102. Monsalve-Bustamante, Y.; Rincón-Valencia, S.; Mejía-Giraldo, J.; Moreno-Tiado, D.; Puertas-Mejía, M. *J. Appl. Pharm. Sci.*, **2019**, 9(10), 103-109.
103. Reis, F.S.; Martins, A.; Barros, L.; Ferreira, I.C. *FCT*, **2012**, 50, 1201-1207.
104. Hudzicki, J. *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*, American Society for Microbiology, 1-23, 2016.
105. Prasad, S.; Salesier, M.F.; Krishnan, S.; Bharathi, P. *Pharm. Chem. J.*, **2018**, 52(6), 518-525.
106. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard - 9<sup>th</sup> CLSI M07-A9. Wayne, PA, 2012.