



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

Síntese Sustentável de Nanomateriais de Carbono Fluorescentes e Bioativos a partir de Desperdícios da Indústria do Tomate

BRUNO GUERREIRO ANTUNES

(Licenciado em Engenharia Química e Biológica)

**Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre em
Engenharia Química e Biológica – Perfil de Processos Químicos**

Orientadores:

Doutora Patrícia Alexandra Miranda David Barata

Doutora Sónia Alexandra de Almeida Martins

Júri:

Presidente: Doutor Ruben Anacoreta Elvas Leitão

Vogais: Doutora Luísa Margarida Martins

Doutora Maria Paula Alves Robalo

Doutora Patrícia Alexandra Miranda David Barata

Novembro de 2023

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
Departamento de Engenharia Química

**Síntese Sustentável de Nanomateriais de
Carbono Fluorescentes e Bioativos a partir de
Desperdícios da Indústria do Tomate**

BRUNO GUERREIRO ANTUNES

(Licenciado em Engenharia Química e Biológica)

**Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre em
Engenharia Química e Biológica – Perfil de Processos Químicos**

Orientadores:

Doutora Patrícia Alexandra Miranda David Barata

Doutora Sónia Alexandra de Almeida Martins

Júri:

Presidente: Doutor Ruben Anacoreta Elvas Leitão

Vogais: Doutora Luísa Margarida Martins

Doutora Maria Paula Alves Robalo

Doutora Patrícia Alexandra Miranda David Barata

Novembro de 2023

Agradecimentos

À Professora Doutora Patrícia Barata, orientadora deste trabalho, o meu profundo e mais sentido agradecimento pela transmissão de conhecimentos, apoio e dedicação, não só no desenvolvimento deste trabalho, como em todas as unidades curriculares das quais fui seu aluno. Agradeço ainda a oportunidade que a Professora me deu no desenvolvimento do trabalho experimental no âmbito do projeto de investigação, que ultimamente resultou nesta dissertação.

À Professora Doutora Sónia Martins, orientadora deste trabalho, expesso o meu agradecimento pelos conhecimentos transmitidos, bem como o apoio na realização do trabalho experimental e no esclarecimento de todas as dúvidas.

À Professora Doutora Alexandra Costa, expesso o meu agradecimento por todo o apoio e inalcançável dedicação, tanto no desenvolvimento do trabalho experimental como na escrita da dissertação, no esclarecimento de todas as dúvidas. Agradeço em particular toda a dedicação e conhecimento transmitido na avaliação das propriedades fotofísicas.

À Professora Doutora Magda Semedo, o meu agradecimento pelo apoio e dedicação, no esclarecimento de dúvidas na realização do trabalho experimental, em particular nos procedimentos para a determinação da atividade antioxidante e antimicrobiana.

Ao Diogo Sousa, para além de colega de laboratório, agradeço toda a amizade, ajuda e apoio incondicional no desenvolvimento do trabalho experimental, na interpretação de resultados, na escrita desta dissertação e esclarecimento de todas as dúvidas. Agradeço ainda a disponibilidade e dedicação na determinação dos potenciais ζ .

Às restantes colegas dos laboratórios de Química Orgânica e de Biotecnologia, Inês Chouzende, Sara Pimenta, Catarina Gabriel e Carolina Cintra, agradeço toda a amizade, apoio e excelência no ambiente de trabalho, essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Alessandro Fantoni agradeço toda a ajuda e dedicação na realização dos ensaios de microscopia de força atómica acessórios à caracterização morfológica no Grupo de Investigação Aplicada em Microeletrónica, Optoeletrónica e Sensores do ISEL.

Ao Doutor Fernando Cardoso, agradeço a disponibilidade e tutoria dada no auxílio da 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, agradeço o apoio e dedicação na realização dos ensaios de microscopia de fluorescência no Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários, UEI de Parasitologia Médica do IHMT/UNL.

À Sugal Portugal, S.A. pelo fornecimento dos resíduos sólidos do tomate, utilizados como matéria-prima neste trabalho.

Ao Instituto Politécnico de Lisboa pelo financiamento concedido através do projeto IPL/2021/NanoMate_ISEL (*Carbon Nanomaterials with Antibacterial Activity from Tomato Industry Wastewater*).

À minha Mãe, um agradecimento especial, por todo o carinho, incondicional apoio e motivação. Pelo incentivo em nunca duvidar do meu valor e das minhas capacidades.

À minha Avó, pela sabedoria, carinho e apoio ao longo dos anos, por estar sempre confiante, pelo orgulho e dedicação sempre presentes.

O meu profundo agradecimento a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos, Ana Borges, Cláudia Marques, Mariana Conduto, Raquel Figueiredo, André Santos e Henrique Batista por toda a amizade, apoio e motivação, pela partilha dos momentos que passámos ao longo destes anos.

Aos meus amigos, Catarina Costa, Catarina Monteiro, Filipa Sequeira, Madalena Sequeira, Olimpia Camisão, Diogo Ferreira, Rúben Cunha e Tiago Clériguinho, por todo o apoio e fiel amizade ao longo do meu percurso pelo ISEL.

Resumo

A presente dissertação teve como principal objetivo a síntese sustentável de nanopontos de carbono (NPSC) luminescentes e bioativos, utilizando como fonte de carbono resíduos sólidos do tomate (RST) e a sua posterior aplicação como agentes antimicrobianos e marcadores celulares fluorescentes.

Após a síntese por carbonização hidrotérmica através de aquecimento convencional e radiação micro-ondas, e subsequentes etapas de isolamento e purificação, os NPSC foram caracterizados estruturalmente por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ressonância magnética nuclear de próton (RMN ^1H) e análise elementar. A avaliação das propriedades fotofísicas dos nanomateriais foi realizada por espectroscopia de absorção no estado fundamental (UV-Vis) e espectroscopia de fluorescência no estado estacionário.

A bioatividade dos NPSC foi estudada *in vitro* através da determinação das suas propriedades antioxidantes e da avaliação da sua atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) pelos métodos de difusão em disco e de microdiluição em meio líquido. Os NPSC atuaram de forma não seletiva nas bactérias em estudo, tendo os nanomateriais sintetizados com radiação micro-ondas exibido atividade antibacteriana superior.

A análise *in vitro* do efeito citotóxico foi realizada através da avaliação da viabilidade de linhas celulares animais e humanas selecionadas, evidenciando a generalidade dos NPSC toxicidade reduzida, que aliada à capacidade de marcação por fluorescência permitiu a identificação de diversas regiões celulares. Estas características associadas à sua emissão sintonizável, reforçam o potencial de utilização destes novos nanomateriais em marcação celular.

Palavras-chave: Nanopontos de carbono, resíduos sólidos do tomate, carbonização hidrotérmica, fluorescência, bioatividade, citotoxicidade.

Abstract

The main objective of this dissertation was the sustainable synthesis of luminescent and bioactive carbon nanopots (CNDs) using solid tomato waste (STW) as carbon source, and their subsequent application as antimicrobial agents and fluorescent cell markers.

After synthesis by hydrothermal carbonization using conventional heating and microwave-assisted irradiation, and subsequent isolation and purification steps, the CNDs were structurally characterized using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) and elemental analysis. The photophysical properties of the nanomaterials were evaluated using ground-state absorption spectroscopy (UV-Vis) and steady-state fluorescence spectroscopy.

The bioactivity of the CNDs was studied *in vitro* by determining their antioxidant properties and assessing their antimicrobial activity against Gram-negative (*Escherichia coli*) and Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) bacteria using the disk diffusion and broth microdilution methods. The CNDs exhibited non-selective activity against the studied bacteria, with nanomaterials synthesized through microwave-assisted radiation displaying superior antibacterial activity.

The *in vitro* analysis of the cytotoxic effect was carried out by assessing the viability of selected animal and human cell lines, showing that the CNDs were generally low in toxicity, which, together with their fluorescence labelling capacity, enabled the identification of various cell regions. These characteristics, associated with their tunable emission, reinforce the potential for the using of these new nanomaterials in cell labelling.

Keywords: Carbon nanodots, solid tomato waste, hydrothermal carbonization, fluorescence, bioactivity, cytotoxicity.

Divulgação Científica

No âmbito desta dissertação resultaram as seguintes publicações:

Publicações em Revistas Científicas Internacionais:

- Barata, P. D.; Costa, A. I.; Semedo, M. C.; Martins, S.; Antunes, B. G.; Prata, J. V. Carbon Dots from Tomato Industry Waste with Antibacterial Activity. *Chem. Proc.* **2022**, *11* (1), 109–111. <https://doi.org/10.3390/chemproc2022011001>.

Comunicações em Conferências Nacionais e Internacionais (Comunicações em painel):

- Barata, P. D.; Costa, A. I.; Semedo, M. C.; Martins, S.; Antunes, B. G.; Prata, J. V. *Carbon Dots from Tomato Industry Waste with Antibacterial Activity*, 14º Encontro Nacional de Química Orgânica & 7º Encontro Nacional de Química Terapêutica (Sociedade Portuguesa de Química), 20 a 22 de abril de 2022, Caparica (Portugal). <https://14enqo-7enqt.events.chemistry.pt/>.
- Barata, P. D.; Costa, A. I.; Semedo, M. C.; Martins, S.; Antunes, B. G.; Prata, J. V. *Carbon Dots com Atividade Antibacteriana a partir de Resíduos da Indústria do Tomate*, 8º Fórum de Engenharia Química e Biológica, 11 a 13 de maio de 2022, Lisboa (Portugal). <https://ifeqb.isel.pt/>.
- Barata, P. D.; Costa, A. I.; Semedo, M. C.; Martins, S.; Antunes, B. G.; Prata, J. V. *Tomate Industry Waste: A Sustainable Source for the Synthesis of Fluorescent Carbon Dots with Antimicrobial Activity*, Encontro Ciência 2022 (Fundação para a Ciência de Tecnologia), 16 a 18 de maio de 2022, Lisboa (Portugal). <https://www.encontrociencia.pt/2022/>.
- Barata, P. D.; Costa, A. I.; Semedo, M. C.; Martins, S.; Antunes, B. G.; Prata, J. V. *One-pot Microwave-assisted Synthesis of Bioactive Carbon Dots from Tomato Industry Waste*, 5th International Conference on Green Chemistry and Sustainable Engineering, 20 a 22 de julho de 2022, Roma (Itália). <https://greenchem-europe.eu/>.
- Barata, P. D.; Costa, A. I.; Semedo, M. C.; Martins, S.; Antunes, B. G.; Cardoso, F. M. H.; Prata, J. V. *Valorização de Desperdícios da Indústria do Tomate na Síntese de Nanomateriais de Carbono com Atividade Biológica*, 9º Fórum de Engenharia

Química e Biológica, 16 a 19 de maio de 2023, Lisboa (Portugal). <https://ifeqb.isel.pt/> (com subjacente comunicação oral).

- Barata, P. D.; Costa, A. I.; Semedo, M. C.; Martins, S.; Antunes, B. G.; Cardoso, F. M. H.; Prata, J. V. *Comparative Study of Tomato Waste Carbon Dots Bioactivity: Conventional Heating vs. Microwave Irradiation*, I International Meeting Molecules4Life, 20 a 22 de setembro de 2023, Vila Real (Portugal). <https://molecules4life-2023.events.chemistry.pt/>.
- Barata, P. D.; Costa, A. I.; Semedo, M. C.; Martins, S.; Antunes, B. G.; Cardoso, F. M. H.; Lobo, M. L.; Prata, J. V. *Nanopontos de Carbono Fluorescentes Derivados de Desperdícios do Tomate: Avaliação da Citotoxicidade e Aplicação em Bioimagem*, XXVII Encontro Luso Galego de Química, 22 a 24 de novembro de 2023, Porto (Portugal). <https://xxviilgq.events.chemistry.pt/>.

Glossário, Abreviaturas e Símbolos

A

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
AcOEt	Acetato de etilo
AE	Análise Elementar
AFM	Microscopia de Força Atômica (<i>Atomic Force Microscopy</i>)

B

BSA	Albumina do soro bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
-----	---

C

<i>ca.</i>	<i>circa</i> (do Latim, quantidade aproximada)
<i>cf.</i>	<i>confer</i> (do Latim, confrontar com)
CFU	Unidades formadoras de colónias (<i>Colony-Forming Units</i>)
CHAC	Carbonização Hidrotérmica por Aquecimento Convencional
CHMO	Carbonização Hidrotérmica Assistida por Radiação Micro-ondas

D

DET	Dietilenotriamina
DME	<i>Dulbecco's Modified Eagle</i>

E

EAG	Equivalentes de ácido gálico
EAT	Equivalentes de ácido tânico
ED	Etilenodiamina
<i>e.g.</i>	<i>exempli gratia</i> (do Latim, por exemplo)
em	Emissão
exc	Excitação
Eq.	Equivalente
EQ	Equivalentes de quercetina
ET	Equivalentes de trolox

F

FBS	Soro bovino fetal (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

H	
HeLa	Linha celular tumoral do colo do útero de Henrietta Lacks
L	
L929	Linha celular de fibroblastos de murganho
M	
m.r.	Misturas reacionais
MHA	<i>Mueller-Hinton Agar</i>
MHB	<i>Mueller-Hinton Broth</i>
MHS	<i>Mueller-Hinton Soft</i>
MIC	Concentração mínima inibitória (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
MLC	Concentração mínima letal (<i>Minimum Lethal Concentration</i>)
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
N	
NIH-3T3	Linha celular de fibroblastos embrionários de murganho
NM5C	Nanomateriais de Carbono
NP5C	Nanopontos de Carbono
P	
PBS	Solução salina de tampão fosfatos (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PEG	Polietilenoglicol
<i>p</i> -FD	<i>p</i> -Fenilenodiamina
PQ5G	Pontos Quânticos de Grafeno
PsC	Pontos de Carbono
PsPC	Pontos de Polímero Carbonizado
R	
Resazurina	7-Hidroxi-3 <i>H</i> -fenoxazin-3-ona-10-óxido, sal de sódio
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Protão
RST	Resíduos sólidos do tomate
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
S	
S180	Linha celular de sarcoma de murganho

T

T	Temperatura
t	Tempo de reação
t.a.	Temperatura ambiente
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico

U

u.a.	Unidades arbitrárias
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Espectroscopia de Ultravioleta-Visível

V

VERO	Linha celular epitelial renal de macaco verde africano
------	--

Símbolos

λ	Comprimento de onda
ζ	Potencial Zeta
τ	Tempo de vida do fluoróforo
Φ_F	Rendimento quântico de fluorescência

Índice de Figuras

Figura I.1. Diagrama de blocos das etapas de produção de produtos derivados do tomate. Adaptado de Porretta. ⁴	5
Figura I.2. Diferentes tipos de PsC. Adaptado de Zhu <i>et al.</i> ³¹	9
Figura I.3. Métodos de síntese de PsC: <i>top-down</i> e <i>bottom-up</i> . Adaptado de Pathak <i>et al.</i> ³⁵	10
Figura I.4. Mecanismo bactericida de atuação dos PsC. Adaptado de Ghirardello <i>et al.</i> ⁶⁵	17
Figura II.1. Algumas etapas do processamento do tomate (Sugal Portugal, S.A.): (a) lavagem; (b) seleção; (c) polpação; (d) esterilização e enchimento.	26
Figura II.2. Espectros de FTIR dos RST e do extrato aquoso em pastilha de KBr.	27
Figura II.3. Espectro de RMN ¹ H do extrato aquoso dos RST (300 MHz, D ₂ O, 25 °C); *solvente residual.	28
Figura II.4. Espectro de FTIR das cinzas dos RST em pastilha de KBr.	32
Figura II.5. Espectros de FTIR das fases orgânicas (CH ₂ Cl ₂ e AcOEt) e da fase aquosa dos NPsc-CHAC-XIII em pastilha de KBr.	45
Figura II.6. Intensidade de fluorescência ($\lambda_{exc} = 380$ nm) das frações resultantes da separação dos NPsc-CHAC-XIII por Sephadex G-75.	46
Figura II.7. Rendimento quântico de fluorescência ($\lambda_{exc} = 380$ nm) das frações resultantes da separação dos NPsc-CHAC-XIII por diálise.	47
Figura II.8. Espectros de FTIR dos NPsc-CHAC-XIII e dos NPsc-CHMO-VII , em pastilha de KBr.	48
Figura II.9. Espectros de FTIR dos NPsc-CHAC-I e dos NPsc-CHAC-II , sintetizados a diferentes temperaturas, em pastilha de KBr.	49
Figura II.10. Espectros de FTIR dos NPsc-CHAC-V, X, XI, XII, I, XIII e XIV , sintetizados com diferentes rácios mássicos ED/RST, em pastilha de KBr.	50
Figura II.11. Espectros de FTIR dos NPsc-CHAC-I e dos NPsc-CHAC-XVI , sintetizados a partir de diferentes matérias-primas, em pastilha de KBr.	51

Figura II.12. Espectro de RMN ^1H de dispersões de NPSc-CHAC-XIII e de NPSc-CHMO-VII (400 MHz, D_2O , 25 °C); *solvente residual.	52
Figura II.13. Espectro de FTIR das cinzas dos NPSc-CHAC-XIII em pastilha de KBr.	53
Figura II.14. Imagens topográficas de AFM e respectivas secções de corte transversal de dispersões aquosas dos NPSc-CHAC-XIII (a ₁) antes e (a ₂) após diálise, e dos (b) NPSc-CHMO-VII (0.1 mg.mL^{-1}).	56
Figura II.15. Renderização tridimensional de AFM de dispersões aquosas dos NPSc-CHAC-XIII (a ₁) antes e (a ₂) após diálise e (b) NPSc-CHMO-VII (0.1 mg.mL^{-1}).	57
Figura II.16. Espectros de UV-Vis (linha cinza), emissão (linha verde; $\lambda_{\text{exc}} = 380 \text{ nm}$) e excitação (linha azul; monitorizado a 460 nm) de uma dispersão aquosa dos NPSc-CHAC-XII (linha contínua) e NPSc-CHMO-VII (linha tracejada) (0.1 mg.mL^{-1}).	58
Figura II.17. Espectros de UV-Vis (linha cinza) e emissão (linha verde; $\lambda_{\text{exc}} = 380 \text{ nm}$) de dispersões aquosas dos NPSc-CHAC-XII (linha contínua) e NPSc-CHAC-IX (linha tracejada) (0.1 mg.mL^{-1}).	59
Figura II.18. Espectros de emissão de uma dispersão aquosa dos NPSc-CHAC-XII (0.1 mg.mL^{-1}), com excitação a diferentes comprimentos de onda.	60
Figura II.19. Efeito do pH na intensidade de fluorescência de uma dispersão aquosa dos NPSc-CHAC-XII (0.1 mg.mL^{-1}).	61
Figura II.20. Espectros de emissão de uma dispersão aquosa dos NPSc-CHAC-XII (0.1 mg.mL^{-1}), após 1 hora de irradiação contínua ($\lambda_{\text{exc}} = 380 \text{ nm}$).	61
Figura II.21. Atividade antimicrobiana contra (a) <i>E. coli</i> e (b) <i>S. aureus</i> , dos NPSc-CHMO-VII a várias concentrações ($31\text{-}8000 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$), expressa pelo decréscimo da viabilidade celular, determinada pelo método de microdiluição em meio líquido.	68
Figura II.22. Citotoxicidade celular contra as linhas celulares (a) VERO, (b) NIH-3T3, (c) S180 e (d) HeLa, dos NPSc-CHAC-XII a várias concentrações ($0.5\text{-}4000 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$), expressa pelo decréscimo da viabilidade celular, avaliada pelo método do MTT.	71
Figura II.23. Microscopia de fluorescência de células VERO após incubação com uma dispersão aquosa dos NPSc-CHAC-XII ($500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$), ampliação 400x.	74

- Figura II.24.** Microscopia de fluorescência de células NIH-3T3 após incubação com uma dispersão aquosa dos **NPsC-CHAC-XII** ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$), ampliação 400x. 75
- Figura II.25.** Microscopia de fluorescência de células S180 após incubação com uma dispersão aquosa dos **NPsC-CHAC-XII** ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$), ampliação 400x. 76
- Figura II.26.** Microscopia de fluorescência de células HeLa após incubação com uma dispersão aquosa dos **NPsC-CHAC-XII** ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$), ampliação 400x. 77

Índice de Tabelas

Tabela II.1. Características físico-químicas dos RST e extrato aquoso.....	32
Tabela II.2. Composição sumativa do extrato aquoso e com <i>n</i> -hexano dos RST.....	33
Tabela II.3. Efeito da temperatura de reação nos rendimentos mássico e quântico de fluorescência dos NPsC obtidos por CHAC.....	34
Tabela II.4. Efeito do tempo de reação nos rendimentos mássico e quântico de fluorescência dos NPsC obtidos por CHAC.....	35
Tabela II.5. Efeito da natureza do aditivo nos rendimentos mássico e quântico de fluorescência dos NPsC obtidos por CHAC.....	36
Tabela II.6. Efeito do rácio mássico ED/RST nos rendimentos mássico e quântico de fluorescência dos NPsC obtidos por CHAC.....	37
Tabela II.7. Efeito da atmosfera de reação nos rendimentos mássico e quântico de fluorescência dos NPsC obtidos por CHAC.....	38
Tabela II.8. Efeito da natureza da matéria-prima nos rendimentos mássico e quântico de fluorescência dos NPsC obtidos por CHAC.....	38
Tabela II.9. Efeito da temperatura de reação nos rendimentos mássico e quântico de fluorescência dos NPsC obtidos por CHMO.....	40
Tabela II.10. Efeito do tempo de reação nos rendimentos mássico e quântico de fluorescência dos NPsC obtidos por CHMO.....	40
Tabela II.11. Efeito da natureza do aditivo nos rendimentos mássico e quântico de fluorescência dos NPsC obtidos por CHMO.....	41
Tabela II.12. Efeito do rácio mássico ED/RST nos rendimentos mássico e quântico de fluorescência dos NPsC obtidos por CHMO.....	42
Tabela II.13. Efeito da concentração dos RST nos rendimentos mássico e quântico de fluorescência dos NPsC obtidos por CHMO.....	43
Tabela II.14. Efeito do tempo de reação nos rendimentos mássico e quântico de fluorescência dos NPsC obtidos por CHMO (forno de micro-ondas doméstico).....	43

Tabela II.15. Efeito da natureza do aditivo e do rácio mássico ED/RST na análise elementar dos NPSC obtidos por CHAC.....	53
Tabela II.16. Potencial ζ de dispersões aquosas de NPSC (1 mg.mL ⁻¹), obtidos em ensaios selecionados (CHAC e CHMO).	54
Tabela II.17. Capacidade antioxidante, determinada pelo método de inibição do radical ABTS de dispersões aquosas de NPSC (5 mg.mL ⁻¹), obtidos em ensaios selecionados.....	63
Tabela II.18. Atividade antimicrobiana contra <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> , dos NPSC obtidos em ensaios selecionados: (a) NPSC-CHAC-I e (b) NPSC-CHAC-XIII (100, 500 e 1000 µg/disco); (c) NPSC-CHMO-IV e (d) NPSC-CHMO-VII (100, 200 e 400 µg/disco); Gentamicina (G; 10 µg/disco).....	65
Tabela II.19. Diâmetros de inibição do crescimento de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> , obtidos em ensaios de difusão em disco contendo NPSC obtidos em ensaios selecionados.....	66
Tabela II.20. Valores MIC e MLC dos NPSC obtidos em ensaios selecionados, determinados pelo método de microdiluição em meio líquido para <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	69
Tabela II.21. Efeito dos métodos de purificação na citotoxicidade, avaliada pelo método do MTT, contra as linhas celulares VERO, NIH-3T3, S180 e HeLa, dos NPSC obtidos em ensaios selecionados.	72

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	iii
Abstract	v
Divulgação Científica.....	vii
Glossário, Abreviaturas e Símbolos	ix
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xvii
I. INTRODUÇÃO	1
I.1. PREÂMBULO	3
I.2. INDÚSTRIA DE PROCESSAMENTO DO TOMATE.....	4
I.2.1. Tipologia dos Resíduos Produzidos.....	4
I.2.2. Composição Química dos Resíduos Sólidos do Tomate.....	6
I.2.3. Problemática Ambiental, Métodos de Tratamento e Valorização de Resíduos	7
I.3. NANOMATERIAIS DE CARBONO	8
I.3.1. Métodos de Síntese	10
I.3.1.1. Métodos <i>top-down</i>	10
I.3.1.2. Métodos <i>bottom-up</i>	11
I.3.1.3. Funcionalização da Superfície	13
I.3.2. Propriedades Fotofísicas.....	14
I.3.3. Biocompatibilidade e Bioatividade	16
I.4. PRINCIPAIS APLICAÇÕES.....	18
I.4.1. Sensores Químicos.....	18
I.4.2. Fotocatálise	19
I.4.3. Optoeletrónica.....	20

I.4.4. Imagiologia.....	20
I.4.5. Farmacologia.....	21
II. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
II.1. PREÂMBULO	25
II.2. CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS SÓLIDOS DO TOMATE	26
II.2.1. Caracterização Estrutural.....	26
II.2.2. Quantificação de Compostos Fenólicos Totais.....	28
II.2.3. Quantificação de Flavonóides Totais	29
II.2.4. Quantificação de Carbo-hidratos Totais	29
II.2.5. Quantificação de Proteínas.....	30
II.2.6. Quantificação de Cloretos.....	30
II.2.7. Quantificação de Nitratos	31
II.2.8. Quantificação de Lípidos.....	31
II.2.9. Quantificação de Cinzas	31
II.2.10. Caracterização Global dos RST	32
II.3. NANOPONTOS DE CARBONO DERIVADOS DE RESÍDUOS SÓLIDOS DO TOMATE.....	33
II.3.1. Síntese de NPc a partir de RST	33
II.3.1.1. Carbonização Hidrotérmica com Aquecimento Convencional	34
II.3.1.2. Carbonização Hidrotérmica Assistida por Radiação Micro-ondas	39
II.3.2. Isolamento e Purificação dos NPc.....	44
II.3.2.1. Extração Líquido-Líquido	44
II.3.2.2. Cromatografia com Sephadex G-75.....	46
II.3.2.3. Diálise	47
II.3.3. Caracterização Estrutural.....	48
II.3.4. Caracterização Morfológica	55

II.3.5. Propriedades Fotofísicas.....	57
II.4. AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DOS NANOPONTOS DE CARBONO.....	62
II.4.1. Propriedades Antioxidantes	62
II.4.2. Atividade Antimicrobiana	64
II.4.2.1. Ensaio de Difusão em Disco	64
II.4.2.2. Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Letal.....	67
II.4.3. Citotoxicidade <i>in vitro</i>	70
II.4.4. Marcação Celular por Fluorescência.....	73
III. PARTE EXPERIMENTAL.....	79
III.1. PREÂMBULO	81
III.2. REAGENTES, MATERIAL BIOLÓGICO, TÉCNICAS GERAIS E EQUIPAMENTO.....	82
III.3. CARACTERIZAÇÃO DOS RST.....	84
III.3.1. Extração em Soxhlet	84
III.3.2. Quantificação de Sólidos Totais.....	84
III.3.3. Quantificação de Compostos Fenólicos Totais	85
III.3.4. Quantificação de Flavonóides Totais	85
III.3.5. Quantificação de Carbo-hidratos Totais	85
III.3.6. Quantificação de Proteínas.....	86
III.3.7. Quantificação de Cloretos	86
III.3.8. Quantificação de Nitratos.....	86
III.3.9. Quantificação de Lípidos.....	87
III.3.10. Quantificação de Cinzas.....	87
III.4. SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DOS NP_sC.....	87
III.4.1. Síntese dos NP _s C por CHAC	88
III.4.2. Síntese dos NP _s C por CHMO.....	88

III.4.3. Isolamento e Purificação dos NPSC por Extração Líquido-Líquido	88
III.4.4. Purificação dos NPSC por Sephadex G-75	89
III.4.5. Purificação dos NPSC por Diálise	89
III.5. AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DOS NPSC	90
III.5.1. Avaliação das Propriedades Antioxidantes	90
III.5.2. Avaliação da Atividade Antimicrobiana	90
III.5.3. Avaliação da Citotoxicidade <i>in vitro</i>	91
III.5.4. Marcação Celular por Fluorescência	92
IV. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	93
V. BIBLIOGRAFIA	95

I. INTRODUÇÃO

I.1. PREÂMBULO

A presente dissertação descreve a síntese sustentável de nanomateriais de carbono (NM_sC) luminescentes obtidos a partir de resíduos sólidos do tomate (RST), desperdício de grande abundância na bacia do Mediterrâneo, rico em matéria orgânica e outros componentes.

Este Capítulo engloba uma revisão da literatura, onde se encontra uma breve abordagem à indústria do processamento do tomate, a tipologia dos resíduos produzidos e suas propriedades físico-químicas, bem como as diferentes metodologias para a sua valorização.

No presente Capítulo são ainda descritas as diferentes nanoestruturas de carbono e os principais métodos de síntese empregues na sua obtenção. Serão também apresentadas as suas propriedades fotofísicas e biológicas mais relevantes, bem como as potenciais áreas de aplicação destes nanomateriais.

Desta forma, o presente Capítulo inclui as Secções abaixo elencadas:

I.2. Indústria do Processamento do Tomate

I.3. Nanomateriais de Carbono

I.4. Principais Aplicações

I.2. INDÚSTRIA DE PROCESSAMENTO DO TOMATE

O tomate é um dos frutos mais apreciados, devido ao seu sabor apetitoso e às suas variadas formas e cores. Com produção originária da América do Sul, destaca-se por ser uma fonte de compostos bioativos e pelas suas propriedades benéficas para a saúde. Em 2021, a área para o seu cultivo foi de 4.8 milhões de hectares, correspondendo a uma produção mundial de *ca.* 182 milhões de toneladas, impulsionada principalmente por um mercado de *fast food* em constante crescimento. Atualmente, *ca.* 80 % dos tomates produzidos em todo o mundo são consumidos frescos, sendo os restantes 20 % normalmente utilizados na forma de pastas, molhos e sumos.^{1,2}

Em Portugal, esta indústria representa um dos setores transformadores mais relevantes e tem aumentado exponencialmente nas últimas décadas, desde pouco mais de 900 mil toneladas processadas no final dos anos noventa, para 1.7 milhões de toneladas em 2021, representando uma taxa média anual de crescimento de *ca.* 3.2 %.¹

I.2.1. Tipologia dos Resíduos Produzidos

As principais indústrias transformadoras encontram-se localizadas em zonas temperadas, uma vez que esta cultura anual é favorecida em climas amenos. Em locais como a União Europeia mais de metade do cultivo mundial sofre processamento industrial, principalmente para a produção de pastas de tomate, molhos, purés ou tomate enlatado.³ A Figura I.1 mostra as diferentes etapas envolvidas na obtenção de produtos derivados do tomate.

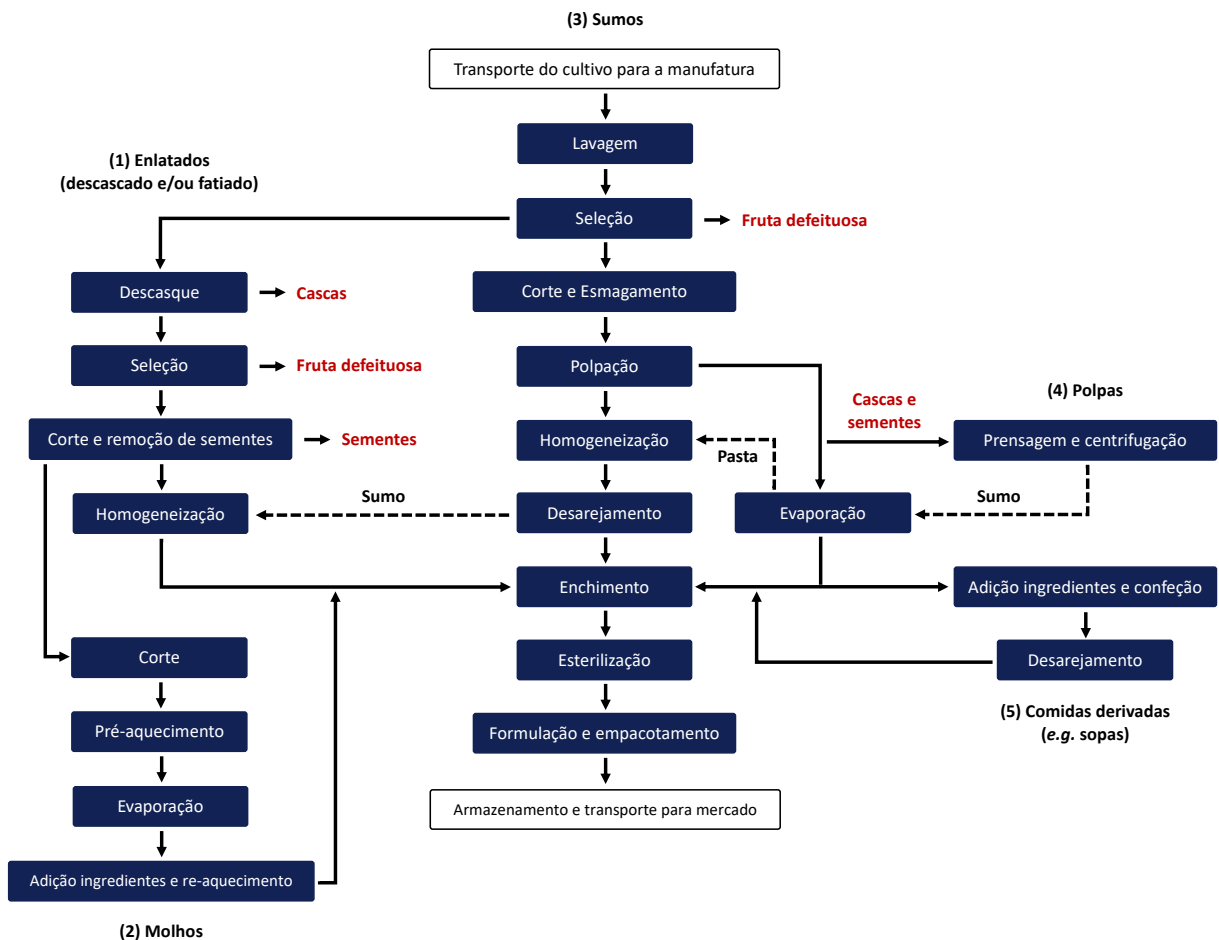


Figura I.1. Diagrama de blocos das etapas de produção de produtos derivados do tomate.

Adaptado de Porretta.⁴

Em termos de composição física, o tomate contém 1.0 a 1.5 % de sementes e 1.5 a 2.5 % de casca e fibra, sendo os restantes 94 a 96 % compostos por sumo, do seu peso total.⁵ Uma fração considerável dos resíduos sólidos do tomate (RST) são sementes, tecidos vasculares e casca, estando frequentemente disponíveis na forma de uma mistura aquosa denominada por bagaço, representando *ca.* 2 a 5 % do tomate bruto.⁶

Uma vez colhido e transportado para as unidades de transformação, o fruto é lavado e selecionado, sendo encaminhado para os diferentes tipos de processamento, seguidos das etapas de enchimento, esterilização, rotulagem e empacotamento, armazenamento e subsequente transporte para a sua comercialização.⁷

Na etapa inicial de lavagem, onde se dá a remoção de sujidade, terra e outras impurezas orgânicas e inorgânicas, são geradas lamas que representam *ca.* 1 % do peso total da

matéria-prima.⁸ Da etapa de seleção, resulta a remoção não só de fruta defeituosa, mas também de fruta imatura e danificada, constituindo *ca.* 5 % do peso total da matéria-prima.⁷ Na obtenção de enlatados, das etapas de descasque e segunda seleção, que visam retirar as cascas, ou pele, do pericarpo exterior do tomate inteiro, e remover defeitos do tomate pelado inteiro, respetivamente, são ainda gerados fragmentos de cascas, frutos danificados e outras partes das plantas e frutos removidos após triagem, que constituem 25 a 28 % do tomate.⁹ Da etapa de corte e remoção de sementes, que visa a obtenção de pedaços de tomate cortado e de tomate pelado inteiro sem sementes, resultam sementes e líquido locular, constituindo 13 a 45 % do cultivo.¹⁰ Na obtenção de sumos, a etapa de corte e esmagamento conduz à obtenção de fruta com dimensões entre 1.0 e 1.5 mm e de desperdícios da própria operação de *ca.* 2 % do peso total.⁸ Por último, na etapa de polpação, ou extração, que visa a obtenção de polpa e sumo, bem como a sua separação do tomate esmagado, resulta o bagaço que contém sementes (33 %), pele (27 %) e polpa (40 %), representando 4 % do peso do tomate.¹¹

Considerando a problemática associada à produção destes resíduos, serão apresentados nesta Secção uma breve abordagem à sua composição química, os problemas ambientais inerentes e respetivos tratamentos possíveis.

I.2.2. Composição Química dos Resíduos Sólidos do Tomate

Os RST, que constituem o bagaço seco, são ricos em fibras (25-50 %), proteínas (15-24 %), lípidos (5-21 %) e minerais (4-7 %), possuindo também variados componentes bioativos, como licopeno e ácido ascórbico.¹² O seu teor em fibra é superior na casca (41 %) relativamente ao da polpa ou de quaisquer outros subprodutos vegetais.^{13,14}

Estes resíduos servem como fonte de proteína, especialmente as sementes, contendo 22-34 % de proteína, a que acresce a presença dos aminoácidos essenciais (com exceção do triptofano) e de uma pequena quantidade de cisteína, pelo que têm aplicação na fortificação de produtos cerealíferos. No entanto, o seu teor de aminoácidos varia, dependendo em grande parte da relação casca/semente do bagaço de tomate.¹⁵ Além disso, as sementes possuem um teor em óleo de 13-19 %, com uma fração maior de ácidos gordos

polinsaturados, como o ácido linoleico (21-40 mg.mL⁻¹), do que ácidos gordos saturados, como o ácido palmítico (6-19 mg.mL⁻¹).¹⁶

Os RST contêm ainda macro (*e.g.* potássio, cálcio e magnésio) e micro (*e.g.* zinco, ferro e manganês) minerais. As sementes de tomate apresentam um teor de ferro de *ca.* 243 mg.kg⁻¹, que é mais elevado em comparação com a casca (*ca.* 76 mg.kg⁻¹ de ferro).¹⁷

A pele e as sementes do tomate possuem um teor de polifenóis mais elevado do que a polpa. Em particular, mais de metade dos compostos fenólicos totais (53 %) (*e.g.* ácido cumárico), flavonóides (52 %) (*e.g.* rutina) e outros compostos antioxidantes (52 %) (*e.g.* licopeno e β -caroteno) do tomate estão presentes na sua pele e sementes.¹⁸

I.2.3. Problemática Ambiental, Métodos de Tratamento e Valorização de Resíduos

Os resíduos gerados durante o processamento de tomate são um sub-produto da produção que não atingiu o estado final. A eliminação desta matéria tem uma influência significativa nos aspetos económicos e ambientais associados ao processo industrial. Uma vez que os resíduos alimentares têm baixas estabilidades biológica e oxidativa, são propensos à degradação microbiana que resulta na produção de gases com efeito de estufa, com sérios impactos no aquecimento global e nas alterações climáticas. Para além disso, o custo do tratamento dos resíduos é demasiado elevado, o que afeta grandemente a economia da indústria.¹⁹

Neste sentido, e de forma a minimizar o impacto na sua atividade, a indústria tem vindo a desenvolver um sistema adequado de gestão de resíduos que inclui a sua redução, reutilização, recuperação, e reciclagem, uma vez que estes contêm variadas substâncias de alto valor acrescentado, como as anteriormente mencionadas (*e.g.* proteínas, lípidos, etc).²⁰

De forma geral, os resíduos resultantes do processamento industrial do tomate podem ter uma aplicação muito vasta, incluindo desenvolvimentos biotecnológicos associados à sua reutilização sustentável, com utilização direta na dieta animal, mas também de compostos extraídos, como pectina, carotenos, líquido de bagaço e proteínas em suplementos para alimentação humana. Em alternativa, podem ainda ser empregues para produzir bioenergia sob a forma de biocombustíveis.²¹

Porém, têm sido relatados alguns estudos sobre a utilização inovadora de resíduos industriais para obtenção de produtos de valor acrescentado. Resíduos alimentares como sementes, grãos, folhas e sumos possuem um conteúdo de carbono suficientemente elevado para atuar como precursores na síntese de nanomateriais de carbono (NM_sC).²¹

I.3. NANOMATERIAIS DE CARBONO

A capacidade única dos átomos de carbono em participar em ligações covalentes robustas com outros átomos de carbono em diversos estados de hibridação (sp , sp^2 , sp^3), ou com elementos não metálicos, permite a formação de uma gama extremamente vasta de estruturas, desde pequenas moléculas a estruturas complexas. As propriedades específicas dos materiais de carbono naturais, como o diamante, a grafite, estruturas inteiramente constituídas de átomos de carbono, e outras estruturas amorfas de carbono, variam consoante a sua configuração.²²

Os nanomateriais de carbono (NM_sC) são constituídos maioritariamente por carbono e possuem dimensões que variam entre 1-100 nm. A primeira nanoestrutura de carbono surgiu em 1985, com a descoberta dos fulerenos (C_{60}) por Kroto *et al.*,²³ e em 1991, os nanotubos de carbono foram descritos por Iijima.²⁴ Mais recentemente, em 2004, Novoselov *et al.*²⁵ conseguiram isolar e caracterizar nanoestruturas de grafeno e, desde então, tem sido intensificado o interesse em nanoestruturas desta natureza, com destaque para os NM_sC luminescentes, dada a sua diversidade de aplicações.²⁶

Em particular, os pontos de carbono (PsC), um novo tipo de nanomateriais fluorescentes à base de carbono, foram descobertos por acaso durante a purificação de nanotubos de carbono de parede simples por Xu *et al.*²⁷ Estes são caracterizados por dimensões inferiores a 10 nm e morfologia *quasi*-esférica, englobando materiais como os pontos quânticos de grafeno (PQsG), os nanopontos de carbono (NP_sC) e os pontos de polímero carbonizado (PsPC).^{28,29} A sua composição estrutural é influenciada pela natureza da fonte de carbono e pelos métodos de síntese utilizados, permitindo uma gama muito vasta de potenciais estruturas (Figura I.2).³⁰

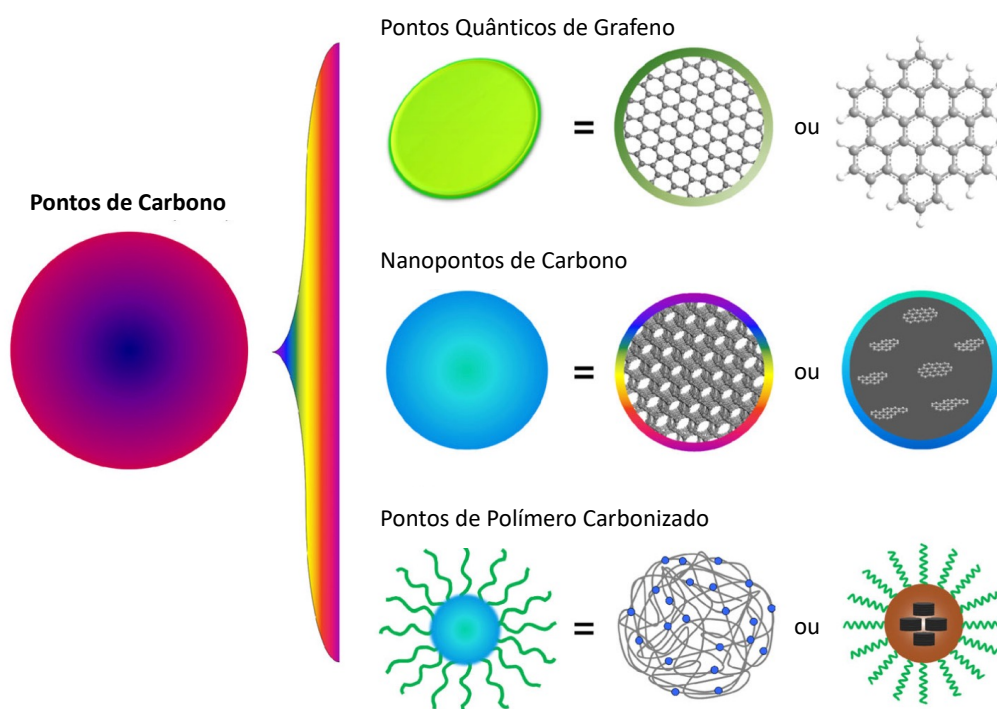


Figura I.2. Diferentes tipos de PsC. Adaptado de Zhu *et al.*³¹

O consenso geral é que grupos funcionais oxidados (*e.g.* éteres, epóxidos e hidroxilos) estão ligados a um centro de carbono composto por redes de Csp^2 . A presença destes grupos confere aos PsC propriedades distintas, designadamente hidrofiliçidade e facilidade de interagirem com várias espécies orgânicas, poliméricas, inorgânicas ou biológicas, em particular com grupos carboxílicos/carboxilatos, hidroxilos, quinonas, e aminas.^{32,33} Nos últimos anos, os NPsC destacaram-se no campo dos nanomateriais, principalmente devido às suas excelentes propriedades luminescentes, fotoestabilidade, baixa toxicidade e biocompatibilidade, especialmente quando comparados com pontos quânticos metálicos e pontos quânticos semicondutores. Estas propriedades permitem a sua aplicação em variadas áreas, incluindo a imagiologia, como (bio)sensores, na fotocatalise e na farmacologia, com destaque para libertação de fármacos e controlo microbiano.³⁴

I.3.1. Métodos de Síntese

Os NPsC, tal como a generalidade dos PsC, podem ser sintetizados através de duas metodologias distintas, designadas por *top-down* e *bottom-up* (Figura I.3). Na abordagem *top-down* ocorre a clivagem de grandes estruturas de carbono, como nanodiamantes, grafite, nanotubos de carbono e carvão ativado, entre outras estruturas amorfas de carbono. No método *bottom-up*, os NPsC são gerados a partir de precursores moleculares orgânicos, nomeadamente resíduos (*e.g.* alimentares, agroindustriais, entre outros), ácido cítrico, ureia e carbo-hidratos, através de tratamento térmico, radiação micro-ondas e ultrassons.^{30,34}

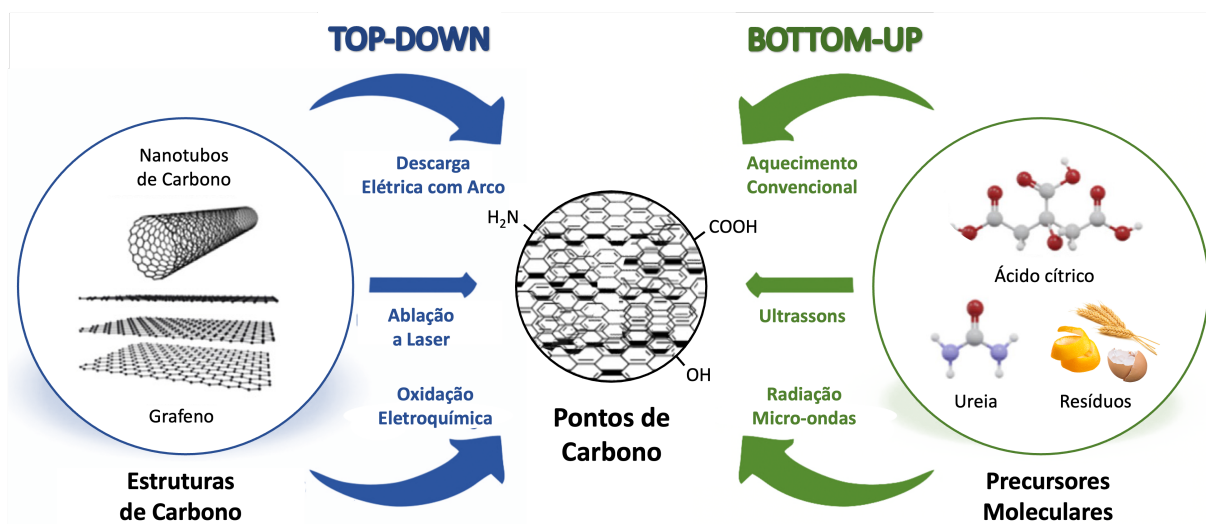


Figura I.3. Métodos de síntese de PsC: *top-down* e *bottom-up*. Adaptado de Pathak *et al.*³⁵

I.3.1.1. Métodos *top-down*

A abordagem *top-down* engloba vias sintéticas como a descarga elétrica com arco, ablação a laser e oxidação eletroquímica.³⁴ Como mencionado anteriormente, Xu *et al.*²⁷ purificaram NPsC luminescentes pela primeira vez, através de eletroforese de nanotubos de carbono de parede simples, produzidos por descarga elétrica com arco. Após pré-tratamento com HNO₃ seguido de extração com NaOH, foi obtida uma suspensão que foi sujeita a procedimentos de isolamento dos NPsC. A fotoluminescência dos NPsC gerada pela descarga elétrica com arco é baixa, e a purificação difícil devido à complexidade da mistura resultante.³⁰

Sun *et al.*³⁶ foram os primeiros a utilizar a síntese por ablação a laser, empregando argon como gás de arraste na presença de vapor de água. Embora estes NPsC não exibam emissão de fluorescência, foram sintetizadas partículas de carbono em agregados de várias dimensões nanométricas. A amostra foi oxidada com ácido, seguida de funcionalização da superfície com polietilenoglicol (PEG) ou poli(propioniletilenoimina-co-etilenoimina) (PPEI-EI), resultando NPsC com rendimentos quânticos de fluorescência entre 4-10 %.³⁶ Apesar da simplicidade deste método, a preparação dos NPsC necessita de grandes quantidades de carbono. Outra desvantagem significativa é a heterogeneidade no tamanho dos NPsC obtidos, sendo necessária a separação das partículas maiores por centrifugação, traduzindo-se numa menor eficiência da utilização do material de carbono.³⁰

A utilização de grafite como fonte primária de carbono na síntese eletroquímica de NPsC é amplamente estudada, tornando-a numa escolha viável para a formação de elétrodos. Lu *et al.*³⁷ utilizaram hastes de grafite de alta pureza como ânodo e um fio de aço como contra-elétrodo, adicionados a uma solução aquosa/líquido iônico, com a aplicação de um potencial estático para promover a esfoliação do material de carbono. Após lavagem até pH neutro, os produtos de esfoliação foram filtrados e ultracentrifugados para obter NPsC com dimensões entre 6-8 nm e um rendimento quântico de fluorescência (definido como o número de fótons emitidos relativo ao número de fótons absorvidos) de *ca.* 5 %. Os NPsC apresentaram propriedades luminescentes excepcionais e estabilidade térmica em água.³⁸

Jiang *et al.*³⁹ apresentaram pela primeira vez a preparação de NPsC, a partir de benzeno e etilenodiamina, utilizando um reator de plasma de arco submerso, permitindo que a síntese e a funcionalização decorressem numa única etapa.

1.3.1.2. Métodos *bottom-up*

Os métodos *bottom-up* incluem processos como a pirólise, as oxidações térmica e química, os ultrassons, o tratamento hidrotérmico com aquecimento convencional e por radiação micro-ondas. Tipicamente, a preparação do NPsC por vias desta natureza baseia-se na carbonização dos precursores a temperaturas entre 150 e 300 °C sob alta pressão de vapor. Em contraste, a preparação destes materiais através de radiação micro-ondas pode ser utilizada para efetuar a mesma carbonização em períodos mais curtos (*ca.* 10 min).

Estes métodos têm como principal vantagem a capacidade de gerar NPsC fotoluminescentes com rendimentos mássicos de excelência. As propriedades dos NPsC, por outro lado, dependem fortemente do tipo de precursor e do método de síntese, sendo a escolha do primeiro influenciada pelo seu custo e disponibilidade.⁴⁰

Zhu *et al.*⁴¹ prepararam NPsC submetendo ácido cítrico e etilenodiamina a um tratamento hidrotérmico durante 5 horas, a temperaturas que variam entre 150 e 300 °C. Após esta fase, os materiais foram isolados através de diálise, gerando NPsC com rendimentos quânticos de fluorescência altamente variável, e dependentes da quantidade de aditivo e temperatura empregues (*ca.* 17-81 %).

Por outro lado, a utilização da radiação micro-ondas na síntese de NPsC é um método eficaz devido aos tempos de reação reduzidos, quando comparados com os de tratamento hidrotérmico com aquecimento convencional, bem como à potencial melhoria do rendimento mássico e qualidade do produto.⁴² Os primeiros estudos sobre a síntese de NPsC através deste método foram relatados por Zhu *et al.*,⁴³ através do aquecimento de uma solução aquosa de PEG e glucose, durante períodos de 2-10 minutos num forno de micro-ondas doméstico. Foram obtidos NPsC com dimensões entre 2-4 nm, revelando rendimentos quânticos de fluorescência de *ca.* 6 %.

A utilização de ultrassons na preparação de NPsC foi reportada por Dang *et al.*,⁴⁴ a partir de poliamida e etilenodiamina após 3 horas de reação, gerando nanomateriais com rendimentos quânticos de fluorescência de *ca.* 9 %. A utilização deste método permitiu a obtenção de NPsC uniformes com menores dimensões.

Numerosas fontes de carbono alternativas, incluindo resíduos alimentares como desperdícios de frutos diversos, são vulgarmente utilizadas para o mesmo propósito. O baixo custo, fácil processamento e possibilidade de utilizar fontes de carbono económicas são algumas vantagens da síntese por tratamento hidrotérmico.⁴⁰ Du *et al.* obtiveram PsC de dimensão variável (6-14 nm) a partir de pericarpo da laranja, em condições hidrotérmicas de 200 °C e 6 horas. Estes materiais demonstraram um rendimento quântico de fluorescência reduzido, de *ca.* 3 %. Num estudo posterior foram obtidos NPsC derivados de cascas de limão, em condições hidrotérmicas semelhantes, com dimensões inferiores (2-4 nm), revelando um rendimento quântico de fluorescência superior (11 %).^{45,46}

De forma semelhante, variadas fontes de carbono foram também estudadas na síntese por radiação micro-ondas. Estudos reportados na literatura descrevem a obtenção de NPsC de dimensões entre 2-8 nm, a partir de folhas de manga e algas eutróficas, sujeitas a irradiação durante 5 minutos. Os materiais isolados apresentaram elevada fotoestabilidade e um rendimento quântico de fluorescência de *ca.* 14 %. No entanto, a dificuldade da escalabilidade do processo ao nível industrial surge como um inconveniente.^{45,46}

I.3.1.3. Funcionalização da Superfície

Sem qualquer modificação superficial, os PsC podem ser fracamente fluorescentes ou não possuir a funcionalidade necessária para uma determinada aplicação. Diferentes grupos funcionais podem ser anexados à sua superfície para gerar fluorescência, efeitos fotodinâmicos, estabilidade e biocompatibilidade.⁴⁷ A sua inserção à superfície dos PsC decorre tipicamente da carbonização de moléculas orgânicas contendo nitrogénio, fósforo ou enxofre ligados covalentemente, originando materiais dopados com heteroátomos.⁴⁸ Bourlinos *et al.*⁴⁹ concluíram que a funcionalização superficial dos PsC pode assegurar uma elevada dispersividade e propuseram a sua correlação com a excitação da fotoluminescência, altamente dependente da eficácia da modificação superficial. Qu *et al.*⁵⁰ demonstraram que a funcionalização de PsC derivados de ácido cítrico (fonte de carbono), utilizando etilenodiamina e ureia como fonte de azoto, conduz a um aumento do rendimento quântico de fluorescência (de *ca.* 22 % para os PsC não dopados até 94 %). Ainda, a utilização de aditivos ácidos pode melhorar o grau de carbonização durante o processo de funcionalização, através do aumento da eficiência da hidrólise da fonte de carbono.⁴⁰

Outra alternativa para melhorar as propriedades dos PsC é a sua funcionalização com outras moléculas. A sua especificidade permite adaptar as características dos PsC à aplicação desejada, utilizando diferentes compostos orgânicos.⁴⁰ Choi *et al.*⁵¹ utilizaram PsC derivados de α -ciclodextrina, onde verificaram que a funcionalização com PEG resulta no aperfeiçoamento das suas propriedades luminescentes, com aumento do rendimento quântico de fluorescência de *ca.* 2 para 8 %. Estes autores verificaram ainda a formação de estados de superfície uniformes, resultando numa luminescência independente do comprimento de onda de excitação, e altamente dependente do tipo de funcionalização de

superfície.^{40,51} Wu *et al.*⁵² demonstram que, devido à presença de aminas catiónicas, PsC sintetizados a partir de ácido cítrico e polietilenoimina (PEI) revelaram estar carregados positivamente a pH 5.0. No entanto, estes materiais foram facilmente modificados com anidrido dimetilmaleico para se tornarem negativamente carregados.

1.3.2. Propriedades Fotofísicas

Tipicamente, os NPsC exibem absorção ótica na região ultravioleta (UV) com uma cauda que se estende até à região do visível. No seu perfil de absorção, são notórias bandas de absorção a *ca.* 240 nm, atribuídas à transição eletrónica $\pi-\pi^*$ de ligações C=C da rede de carbono, e a *ca.* 350 nm, associadas a transições $n-\pi^*$ de ligações C=O e de outros cromóforos. No entanto, os máximos de absorção dependem fortemente da funcionalização da superfície, podendo estes ser sintonizados consoante a aplicação desejada.^{29,40}

A fotoluminescência ajustável é umas das principais características dos NPsC, revelando geralmente um perfil amplo das bandas de emissão. Uma propriedade de fotoluminescência relevante destes materiais é a dependência do máximo de emissão com o comprimento de onda de excitação, devido à grande heterogeneidade da dimensão das partículas, diferentes características químicas e distribuição de diferentes locais emissivos.^{30,53}

A avaliação destas propriedades decorre da análise dos mecanismos de fotoluminescência, podendo estes atuar de forma individual ou de forma sinérgica.³¹ Numa primeira instância, o efeito dominante na fluorescência pode ser relacionado com o estado molecular, onde a sua predominância é atribuída a fluoróforos moleculares. PsC sintetizados por métodos *bottom-up* utilizam precursores capazes de formar fluoróforos moleculares através de desidratação e condensação entre pequenas moléculas.⁵⁴ A presença de aglomerados sp^2 , onde decorre a recombinação radiativa eletrão-lacuna, está relacionada com o estado do centro de carbono dos NPsC. Tipicamente, este mecanismo coexiste com estados moleculares, apresentando maiores rendimentos quânticos de fluorescência e fotoestabilidade inferior. Como resultado do envolvimento de cadeias poliméricas externas, bem como o facto da carbonização ser incompleta, a existência do centro de carbono é, no entanto, apenas indiretamente confirmada. Em muitos casos, o efeito do confinamento quântico não pode ser rigorosamente considerado devido à possibilidade de outros centros

com elevada intensidade de fluorescência omitirem o efeito efetivo do centro de carbono. Por fim, e de forma distinta do estado da molécula, o estado da superfície é atribuído à hibridação sinérgica entre a extensa rede de carbono e os grupos funcionalizados à superfície, onde os elétrons e as lacunas se recombinaem e geram fluorescência.^{31,34,53}

As propriedades fotoluminescentes dos PsC são influenciadas pelo meio envolvente, revelando sensibilidade parcial a estas alterações. A mudança de solvente poderá contribuir para essas alterações, dado que os NPsC são bastantes suscetíveis à polaridade e exibem a capacidade de formar ligações de hidrogénio.⁴⁰ Como consequência da alteração do solvente, a variação do pH reflete-se igualmente na fotoluminescência. Yang *et al.*⁵⁵ verificaram que a intensidade de fluorescência de PsC dopados com azoto é elevada em meio alcalino, sendo extinta em meio ácido. A fluorescência inicial dos PsC é posteriormente recuperada ao repor o meio a pH alcalino. Este fenómeno pode ser atribuído à desprotonação de grupos carboxílicos/carboxilatos e hidroxilos na superfície dos PsC.

Os NPsC possuem ainda elevada fotoestabilidade, não sofrendo fotodegradação após longos tempos de irradiação contínua. Tang *et al.*⁵⁶ sintetizaram PsC dopados com azoto, baseados em arginina e ácido maleico. Após 2 horas de irradiação contínua, estes materiais demonstraram ser fotoestáveis, mantendo *ca.* 95 % da sua intensidade de fluorescência. Desta forma, a sua excelente fotoestabilidade confere uma vantagem significativa sobre outros fluoróforos.³⁰

A emissividade destes materiais pode ser quantificada através do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F). Os primeiros PsC sintetizados (não funcionalizados) exibiram baixos rendimentos quânticos de fluorescência (*ca.* 2 %).²⁷ Devido ao desenvolvimento das estratégias de funcionalização da superfície, este parâmetro pode ser facilmente controlado, verificando-se que este é altamente dependente do método de síntese, da química de superfície e da fonte de carbono.³⁴ Moraes *et al.*⁵⁷ estudaram a relação entre as propriedades fotoluminescentes de NPsC com as condições reacionais e métodos de síntese aplicados. Desta forma, os autores obtiveram NPsC, sintetizados a partir de borras de café, com um rendimento quântico de fluorescência de 18 %, maximizado para condições de síntese hidrotérmica a 300 °C e 6 horas, e um rácio mássico etilenodiamina/borras de café de 0.16.

I.3.3. Biocompatibilidade e Bioatividade

A biocompatibilidade dos NPsC ganhou recentemente atenção como resultado da combinação das suas propriedades óticas, baixa toxicidade para as células animais e humanas, e interação multivalente com microrganismos.^{58,59} Bi *et al.*⁶⁰ verificaram que NPsC sintetizados hidrotérmicamente a partir de glucose e etilenodiamina possuem toxicidade reduzida para osteoblastos de murganho (MC3T3-E1), revelando elevada biocompatibilidade até uma dose máxima de 20 mg.mL⁻¹. Contudo, Sousa *et al.*⁶¹ observaram que, para concentrações de NPsC (*e.g.* 1 mg.mL⁻¹) sintetizados a partir de resíduos industriais do processamento do azeite e etilenodiamina, foi detetada uma toxicidade mínima para fibroblastos de murganho (L929). No entanto, a perda insignificante da viabilidade celular não invalida a sua utilização para novas aplicações biológicas.

Alguns estudos relatam ainda níveis idênticos de toxicidade de NPsC dopados com azoto para linhas celulares tumorais, como são exemplo as células tumorais do colo do útero (HeLa).^{61,62} Embora se tenha referido que os NPsC apresentam biocompatibilidade destacada, um estudo de Dias *et al.*⁶³ revela que a toxicidade destes materiais depende principalmente dos processos para a sua extração, fonte de carbono utilizada e condições de síntese, como temperatura e tempo.

Os NPsC luminescentes podem originar espécies reativas de oxigénio (ROS), tais como H₂O₂, OH[·] e O₂⁻, conhecidas pelas suas propriedades oxidantes com efeitos inibitórios ou letais. A atividade antimicrobiana dos NPsC deve-se em grande parte ao *stress* oxidativo resultante da sua acumulação nas células (Figura I.4).⁶⁴ A baixas concentrações, as ROS atuam como moléculas de sinalização intracelular, em resposta, por exemplo, à presença de um agente patogénico. O *stress* oxidativo desenvolve-se quando o nível de produção de ROS excede a defesa antioxidante natural da bactéria, que provoca danos oxidativos nos ácidos nucleicos, lípidos e proteínas, levando à degradação da membrana celular e conseqüente morte microbiana.⁶⁵

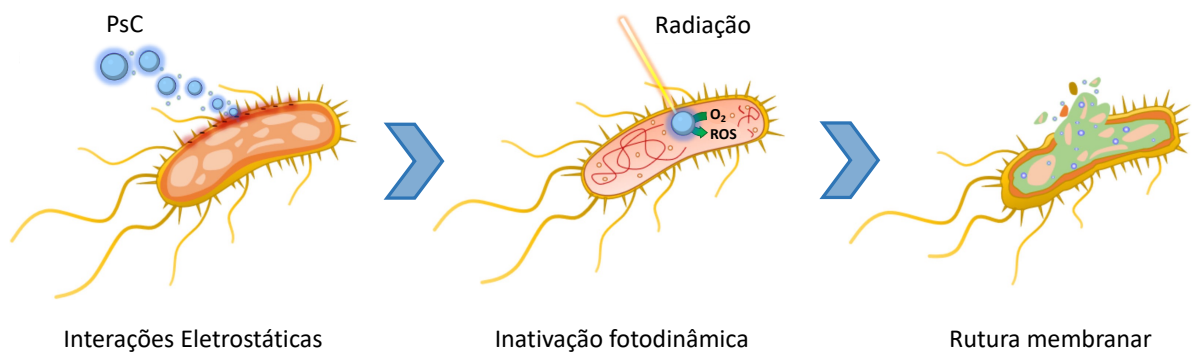


Figura I.4. Mecanismo bactericida de atuação dos PsC. Adaptado de Ghirardello *et al.*⁶⁵

Os heteroátomos presentes nos NPsC aumentam a geração de ROS devido à incorporação de elétrons livres em excesso. Como exemplo, os NPsC dopados com azoto irão produzir grupos com carga positiva, aumentando a atração eletrostática de dupla camada para com a superfície das células microbianas com carga negativa, e conseqüente geração de ROS perto do agente patogénico.⁶⁶ Segundo Wang *et al.*,⁶⁷ NPsC carregados positivamente, preparados a partir de sais de amónio quaternários, revelaram uma forte adesão a proteínas, porinas e peptidoglicano da parede celular bacteriana, resultando na inibição da síntese da mesma em *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva). Como resultado, as concentrações mínimas inibitórias (MICs) destes NPsC para as diferentes bactérias foram até oito vezes inferiores às dos sais de amónio (*ca.* 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).⁶⁸

Contudo, alguns NPsC, como os relatados por Zhang *et al.*,⁶⁹ revelaram atividade antimicrobiana seletiva para bactérias Gram-negativas (*e.g.* *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), mas não para bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *Bacillus subtilis*). Segundo os autores, a concentração mínima letal (MLC) para bactérias Gram-negativas é atingida para uma concentração de 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, através da inibição da atividade enzimática relacionada com a síntese da parede celular, e a partir do qual os NPsC possuem acesso ao interior da bactéria para causar danos oxidativos. Dou *et al.*⁶⁷ prepararam NPsC dopados com azoto, embora carregados negativamente, tendo observado atividade antimicrobiana para ambas as bactérias Gram-negativa (*E. coli*) e Gram-positiva (*S. aureus*), reportando valores de MIC de 64 e 32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respetivamente, que se traduz num efeito bacteriostático superior para *S. aureus*.

Outros estudos reportam que NPsC sintetizados hidrotermicamente, a partir de diversas fontes de biomassa, revelaram valores de MIC bastante superiores contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, demonstrando inibições inferiores e não seletivas das espécies bacterianas. Ma *et al.*⁷⁰ obtiveram NPsC de dimensões compreendidas entre 3-7 nm, derivados de folhas de chá. A avaliação da atividade antibacteriana revelou a inibição praticamente total do crescimento de *E. coli* e *S. aureus*, para concentrações de 1000 µg.mL⁻¹. Karimi *et al.*⁷¹ reportaram a obtenção de NPsC a partir de sumo de limão, os quais revelaram dimensões inferiores a 5 nm. Estes nanomateriais exibiram uma capacidade inibitória promissora, apresentando valores de MIC e MLC de 250 e 1000 µg.mL⁻¹, contra as mesmas espécies bacterianas.

Para além destas propriedades biológicas, alguns estudos recentes relataram uma atividade antimicrobiana moderada para outros microrganismos (*e.g.* fungos) e vírus, bem como excelente capacidade antioxidante, alargando a vasta aplicabilidade destes materiais.⁴⁶ Roy *et al.*⁷² sintetizaram PsC derivados de folhas de curcuma, a partir de condições hidrotérmicas de 200 °C e 6 horas, revelando uma capacidade antioxidante entre 80-90 %, determinada pelo método de inibição do radical ABTS.

I.4. PRINCIPAIS APLICAÇÕES

As propriedades óticas e biocompatibilidade dos NPsC permitem a diversificação da sua aplicação como sensores fluorescentes e nas áreas de fotocatalise, optoeletrónica, imagiologia e farmacologia. Desta forma, serão apresentados nesta Secção alguns exemplos reportados sobre as aplicações destes materiais.

I.4.1. Sensores Químicos

Os NPsC têm sido utilizados como sensores químicos pela sua versatilidade na deteção, boa solubilidade em água, toxicidade reduzida e excelente fotoestabilidade. A sua fluorescência é sensível ao pH, à polaridade local e à existência de iões metálicos em solução, o que aumenta a sua capacidade para aplicações nanosensoriais, por exemplo, no rastreio de poluentes orgânicos e inorgânicos.⁷³ A utilização de PsC como sensores químicos foi descrita

pela primeira vez por Gonçalves *et al.*⁷⁴, para a detecção seletiva de Hg^{2+} em soluções aquosas e células vivas. Os autores verificaram que a intensidade de fluorescência dos PsC diminuiu significativamente na presença de 1.3 mM de Hg^{2+} . Alguns autores reportam a aplicação de NPsC derivados de resíduos alimentares e industriais para a detecção de variados analitos. Sousa *et al.*⁷⁵ avaliaram a capacidade sensorial de NPsC derivados de resíduos industriais do processamento do azeite na detecção de hemoglobina, demonstrando elevada sensibilidade e seletividade. Mais recentemente, Moraes *et al.*⁵⁷ demonstraram a utilização de NPsC sintetizados a partir de borras de café para a detecção de nitroanilinas, tendo verificado seletividade regioisomérica para a *p*-nitroanilina, com um limite de detecção de 68 ppb. Adicionalmente, sensores baseados nestes nanomateriais podem ser utilizados para rastrear visualmente cobre, glucose, pH, níveis vestigiais de H_2O_2 e ácidos nucleicos nas células.⁷⁶

I.4.2. Fotocatálise

A fotodegradação de poluentes tem sido alvo de um crescente interesse na comunidade científica, em particular na remoção de diferentes contaminantes orgânicos. Devido às propriedades fotoluminescentes únicas dos NPsC, estes mostram potencial para aplicações em organocatálise para remediação ambiental. Martins *et al.*⁷⁷ incorporaram PsC na superfície de nanopartículas de TiO_2 e utilizaram este sistema na degradação fotocatalítica de azul de metileno. Após 60 minutos de irradiação UV contínua, verificaram a degradação de 91 % do azul de metileno. Hu *et al.*⁷⁸ alcançaram a degradação de 97 % de índigo-carmim após exposição à luz natural durante 120 minutos, utilizando apenas PsC dopados com azoto. Vários estudos relataram ainda a utilização de PsC para produção de hidrogénio e peróxido de hidrogénio, e para conversão de CO_2 em hidrocarbonetos de valor acrescentado.⁷⁹

I.4.3. Optoeletrónica

Os NPsC têm ainda a capacidade de atuar como materiais sensibilizadores em dispositivos optoelectrónicos, células solares orgânicas e supercondensadores, devido à sua excelente capacidade de absorção da luz. Desta forma, podem ser utilizados como agentes fotossensíveis em células solares para melhoria da eficiência da conversão fotoelétrica.⁴⁰ Wang *et al.*⁸⁰ relataram as propriedades de transporte e injeção de carga dos PsC, utilizados como sensibilizadores em células solares de TiO₂, demonstrando uma potência de eficiência de conversão de 0.79 %, altamente dependente da razão de funcionalização de superfície. Lin *et al.*⁸¹ incorporaram PsC numa matriz de poli(metil-metacrilato) (PMMA), após serem funcionalizados sobre sílica-alumina. Estes compósitos permitiram obter uma eficiência luminescente de *ca.* 15 lm.W⁻¹, equiparando-se ao desempenho luminescente de uma lâmpada de halogéneo de baixa intensidade.

I.4.4. Imagiologia

Os NPsC despertaram grande atenção no campo da imagiologia, exibindo desempenhos excepcionais em imagem celular, tanto *in vitro* como *in vivo*, e em sistemas de monitorização na administração de fármacos, devido à combinação da sua biocompatibilidade com as suas propriedades luminescentes.⁸² Huang *et al.*⁸³ aplicaram PsC em imagiologia *in vitro* de células do mieloma do murganho (Sp2/0), onde comprovaram a viabilidade de aplicação destes nanomateriais. Adicionalmente, os autores avaliaram a seletividade celular no rastreio tumoral *in vivo*. Após administração dos PsC em murganhos, os sinais fluorescentes tornaram-se gradualmente detetáveis, estabilizando quase exclusivamente no local do tumor ao final de 12 horas. Liu *et al.*⁸⁴ estudaram a capacidade de absorção dos NPsC em peixes-zebra, um organismo-modelo em estudos toxicológicos e de eficácia de fármacos, bem como a nível imagiológico. Através de controlo por microscopia de fluorescência, os autores concluíram que os NPsC se encontravam distribuídos no intestino, estômago, fígado e saco vitelino, com aumento progressivo da fluorescência durante 48 horas. Adicionalmente, verificaram que a internalização dos NPsC não refletiu efeitos adversos significativos nos ovos fertilizados, demonstrando uma excelente biocompatibilidade. Outros estudos relevaram a capacidade destes nanomateriais serem utilizados como ferramentas de terapia antibacteriana.

I.4.5. Farmacologia

Os NPsC têm sido utilizados contra vários agentes patogênicos bacterianos que, devido ao desequilíbrio na sua carga superficial, levam à destruição da parede celular e consequente inibição e/ou morte bacteriana. Num estudo recente, Yang *et al.*⁸⁵ utilizaram murganhos infectados com *S. aureus* para avaliar a eficácia terapêutica dos PsC no controlo da infeção bacteriana, onde verificaram uma redução notória na carga microbiana, com apenas 1.9 % da população sobrevivente. Acresce que, a fotoluminescência dos NPsC permite a sua inclusão em técnicas de terapia fotodinâmica complexa, expandindo a sua aplicabilidade na entrega de espécies farmacológicas e terapia anticancerígena.³⁴ Karthik *et al.*⁸⁶ desenvolveram um sistema fotorresponsivo de administração de fármacos, através da ligação covalente de um fotoativador à superfície dos PsC. Estes sistemas foram prontamente internalizados em células cancerígenas do colo do útero (HeLa), ficando acumulados no seu núcleo. Após irradiação, foi possível a libertação controlada do fármaco em estudo para a destruição direcionada das células cancerígenas.

A partir dos exemplos apresentados, bem como de toda a pesquisa citada, é possível inferir que a grande flexibilidade de métodos de síntese dos NMsC associados à sintonização das suas excelentes e diversificadas propriedades, têm tornado estes compostos muito versáteis em termos das suas aplicações.

II. RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.1. PREÂMBULO

Desde a descoberta dos nanopontos de carbono (NPsC), têm sido estudadas alternativas sustentáveis para a sua síntese, utilizando como precursores resíduos com diversas origens, nomeadamente desperdícios agroindustriais e agrícolas, entre outros. Por outro lado, a exploração das potenciais aplicações destes nanomateriais em variadas áreas de ação, tem despertado particular interesse da comunidade científica revelando-se um domínio de investigação particularmente importante.

O presente Capítulo aborda os métodos de síntese utilizados na obtenção de NPsC a partir de resíduos sólidos do tomate (RST). Como resultado da sua elevada carga orgânica, a acumulação de resíduos desta natureza apresenta uma forte contribuição para a atual problemática ambiental. Os RST foram quantificados relativamente ao seu conteúdo em compostos fenólicos totais, flavonóides totais, açúcares totais, proteínas, cloretos, nitratos, lípidos e cinzas, e ainda realizada a sua caracterização estrutural através de métodos espectroscópicos e análise elementar.

Os NPsC foram sintetizados por processos hidrotérmicos com aquecimento convencional num reator de alta pressão e por radiação micro-ondas, e a sua caracterização estrutural foi realizada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ressonância magnética nuclear de protão (RMN ^1H) e análise elementar. A avaliação das propriedades fotofísicas dos NPsC foi efetuada por espectroscopia de absorção no estado fundamental (UV-Vis) e espectroscopia de fluorescência no estado estacionário.

Por fim, será apresentado o estudo da bioatividade dos NPsC obtidos, através da avaliação das propriedades antioxidantes e da atividade antimicrobiana, bem como da capacidade de marcação celular por fluorescência utilizando os NPsC que revelaram as melhores propriedades luminescentes, complementada pelo estudo da sua citotoxicidade.

O presente Capítulo encontra-se dividido nas seguintes Secções:

II.2. Caracterização dos Resíduos Sólidos do Tomate

II.3. Nanopontos de Carbono Derivados de Resíduos Sólidos de Tomate

II.4. Avaliação da Bioatividade dos Nanopontos de Carbono

II.2. CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS SÓLIDOS DO TOMATE

No presente trabalho, a síntese de NPsC tem por base a aplicação de métodos sustentáveis para a sua obtenção, a partir de resíduos sólidos do tomate (RST). Esta Secção visa a caracterização destes resíduos, através da aplicação de métodos reportados na literatura.

Os RST foram recolhidos nas instalações da Sugal Portugal, S.A., indústria portuguesa de transformação do tomate, situada na Azambuja, em setembro de 2021, e foram sujeitos a um tratamento prévio de secagem e trituração, obtendo-se uma matéria-prima homogénea e de fácil manuseamento (Figura II.1).



Figura II.1. Algumas etapas do processamento do tomate (Sugal Portugal, S.A.): (a) lavagem; (b) seleção; (c) polpação; (d) esterilização e enchimento.

A caracterização dos RST foi efetuada com recurso a amostras obtidas após extração em Soxhlet, utilizando água como solvente. O extrato resultante apresentou uma tonalidade acastanhada e um teor de sólidos totais de $47.92 \pm 2.11 \text{ mg.mL}^{-1}$. São exceção a quantificação de lípidos, onde foi efetuada uma extração em Soxhlet com *n*-hexano, e das cinzas, determinadas diretamente dos RST.

II.2.1. Caracterização Estrutural

Os RST e o extrato aquoso foram analisados por FTIR, em pastilha de KBr, com vista à identificação dos grupos funcionais presentes na sua complexa estrutura (Figura II.2).

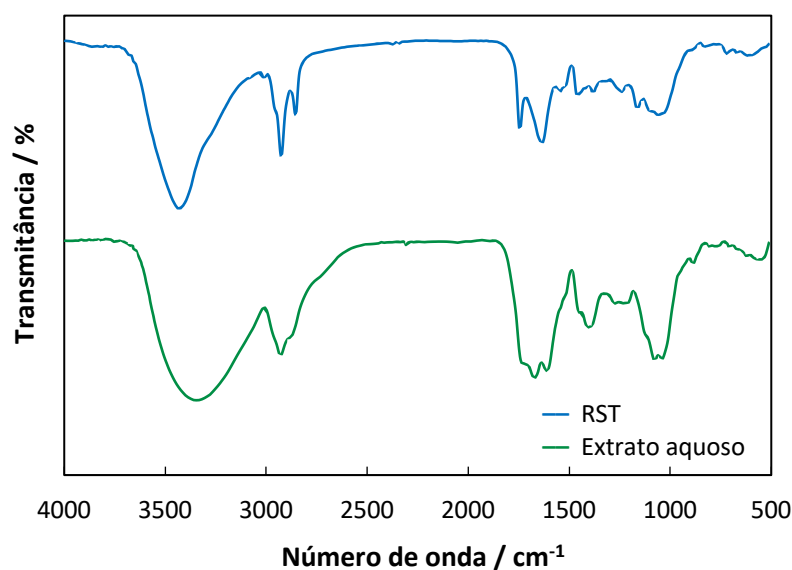


Figura II.2. Espectros de FTIR dos RST e do extrato aquoso em pastilha de KBr.

Na zona das vibrações de extensão, é possível visualizar a banda correspondente à extensão O-H e N-H (larga) a 3432 cm^{-1} , bem como as bandas de vibração de extensão C-H a 2979 , 2926 e 2855 cm^{-1} , correspondentes a grupos alifáticos. A 1745 e 1636 cm^{-1} têm origem as bandas de extensão C=O e C=C. Na zona das vibrações de deformação, verificam-se bandas de deformação a 1459 , 1382 , 1163 e 1061 cm^{-1} , associadas a ligações C-H, C-O e O-H presentes em compostos fenólicos, polissacáridos e cutina.⁸⁷

O espectro de RMN ^1H do extrato aquoso dos RST revela a presença maioritária de C-H alifáticos entre 0.50 e 2.45 ppm . Entre 3.20 e 4.20 ppm verificam-se sinais correspondentes a ligações CH-O e CH-N. A presença reduzida de prótons aromáticos pode ser verificada nos sinais de baixa intensidade com ressonância entre 7.45 e 7.95 ppm (Figura II.3).

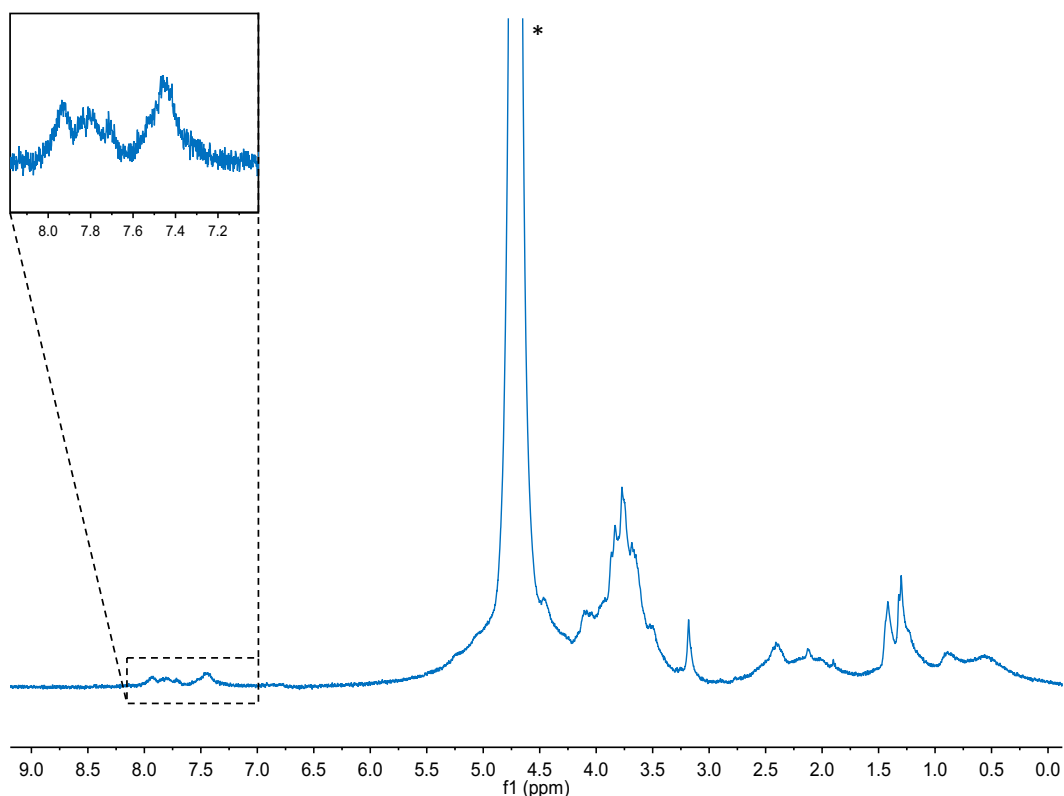


Figura II.3. Espectro de RMN ^1H do extrato aquoso dos RST (300 MHz, D_2O , 25 °C);
*solvente residual.

Por último, a análise elementar (AE) de uma amostra de RST revelou teores de 56.21 % C, 7.47 % H, 3.69 % N, 29.69 % O (calc.), < 0.3 % S, corrigidos com o teor de cinzas obtido (*cf.* referido na Secção II.2.9).

II.2.2. Quantificação de Compostos Fenólicos Totais

Os compostos fenólicos totais no extrato aquoso dos RST foram quantificados pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, e os resultados expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG) e de ácido tânico (EAT).^{88,89} Este método é baseado na interação entre os compostos fenólicos presentes na amostra e um complexo ácido de fosfomolibdato/fosfotungstato, com formação de um complexo de cor azul intensa com absorção a 725 nm. Da aplicação do presente método, resulta um teor de compostos fenólicos totais de 6.52 ± 0.14 mg EAG/g e 9.35 ± 0.20 mg EAT/g extrato.

Através do mesmo método, Fărcaș *et al.*⁹⁰ indicam que o conteúdo em compostos fenólicos nos resíduos do processamento do tomate engloba valores entre 1.48 e 2.02 mg EAG/g extrato. Outros estudos reportam valores tão elevados quanto 13.4 mg EAG/g, em base seca.⁹¹ O conteúdo em compostos fenólicos obtido encontra-se na gama de valores de EAG reportada na literatura, contudo não se encontraram para RST resultados expressos em EAT publicados para comparação.

II.2.3. Quantificação de Flavonóides Totais

Os flavonóides presentes no extrato aquoso dos RST foram quantificados pelo método espectrofotométrico do cloreto de alumínio, e os resultados expressos em equivalentes de quercetina (EQ).⁹² Este método é baseado na formação de complexos entre a amostra e o cátion Al^{3+} , exibindo máximos de absorção entre 410-430 nm. O conteúdo em flavonóides nos RST foi de 4.79 ± 0.01 mg EQ/g extrato.

Dos resultados apresentados verifica-se que os flavonóides constituem entre 51-73 % dos compostos fenólicos totais, respetivamente, em base de equivalentes de ácido tânico e gálico. Esta relação demonstra estar relativamente elevada, quando comparado com estudos recentes da literatura, que sugerem composições em flavonóides entre 0.22 e 0.42 mg EQ/g extrato.⁹⁰

II.2.4. Quantificação de Carbo-hidratos Totais

A quantificação de carbo-hidratos no extrato aquoso dos RST decorreu através da adaptação de um método colorimétrico,⁹³ usando β -D-glucose como referência. A redução destes resulta da hidrólise de oligo e polissacáridos nos monossacáridos correspondentes, por adição de ácido sulfúrico, e conseqüente desidratação destes a furfural e hidroximetilfurfural, respetivamente, a partir de pentoses e hexoses. O aparecimento de tonalidade amarela resulta da condensação final com fenol, exibindo absorção entre 480-490 nm.⁹⁴ Deste método resultou um teor de carbo-hidratos totais de 16.41 ± 0.07 mg Eq. β -D-glucose/g extrato.

Os resultados indicam um teor de carbo-hidratos totais nos RST inferior aos valores reportados na literatura. Para resíduos do processamento do tomate, o intervalo de referência engloba valores entre 110-260 mg/g.¹² Recentemente, um estudo de Coelho *et al.* identificou um conteúdo de açúcares totais inferior, nomeadamente de 54.7 mg/g.⁹⁵

II.2.5. Quantificação de Proteínas

O conteúdo de proteínas no extrato aquoso dos RST foi determinado através do método de Bradford,⁹⁶ após formação de um complexo entre as proteínas presentes na amostra e o corante azul brilhante de Coomassie, revelando absorção a 620 nm. Para tal, foi utilizada BSA (*Bovine Serum Albumin*) como referência, resultando um teor de proteínas de 6.28 ± 1.04 mg/g extrato.

À semelhança dos resultados obtidos para o conteúdo de açúcares totais, o teor de proteínas também revelou ser bastante inferior aos dados reportados na literatura, compreendendo um intervalo entre 154 e 237 mg/g, podendo estes valores variar sazonalmente e regionalmente.¹² No entanto, Lu *et al.*⁹⁷ efetuaram um estudo à distribuição de proteínas no bagaço seco e, dependendo da relação casca/semente, este valor pode ser tão baixo quanto *ca.* 14.2 mg/g extrato.

II.2.6. Quantificação de Cloretos

A quantificação de cloretos no extrato aquoso dos RST foi realizada através do método de Mohr,⁹⁴ baseado na quantificação destes iões por titulação com nitrato de prata, com consequente precipitação a cloreto de prata. O acompanhamento da titulação resulta da utilização de cromato de potássio como indicador, com precipitação de cromato de prata de cor vermelha, formado após o consumo dos iões cloreto pelos iões de prata.

Como resultado, verificou-se a ausência, ou presença residual, de compostos clorados, não sendo detetáveis pelo método aplicado.

II.2.7. Quantificação de Nitratos

A presença de nitratos no extrato aquoso dos RST foi avaliada pelo método do ácido salicílico.⁹⁸ Neste método, a adição de ácido salicílico em ácido sulfúrico concentrado à amostra promove a nitração do anel fenólico do ácido salicílico, por parte dos nitratos presentes, originando um complexo com absorção entre 410-420 nm, após alcalinização a pH 12. O teor de nitratos obtido foi de 0.70 ± 0.02 mg/g extrato, indicando que a quantidade de nitratos nos RST é muito reduzida. A presença destes compostos encontra-se normalmente associada à utilização de fertilizantes azotados aquando do cultivo do tomate.

II.2.8. Quantificação de Lípidos

O conteúdo de lípidos nos RST foi quantificado através de extração em Soxhlet com *n*-hexano durante 5 horas, seguida de evaporação do solvente e secagem do resíduo sob vácuo, obtendo-se um teor de lípidos de 11.46 ± 0.37 %.

Este valor encontra-se de acordo com os reportados na literatura, inserindo-se no intervalo entre 5 e 20 %.¹² Em particular, Silva *et al.*⁹⁹ apresentam uma quantificação de lípidos no bagaço de 14.1 %.

II.2.9. Quantificação de Cinzas

A avaliação do conteúdo inorgânico dos RST surgiu da quantificação de cinzas, através de um método descrito por Sluiter *et al.*¹⁰⁰ A determinação da fração inorgânica dos RST permite avaliar algumas questões sobre o processo de carbonização desta matéria orgânica, para a síntese de NPsC. Da aplicação deste método, obteve-se um teor de cinzas de 2.89 ± 0.07 %.

Este valor encontra-se ligeiramente abaixo dos intervalos reportados na literatura (4-6 %).¹² No entanto, um estudo recente de Silva *et al.*⁹⁹ refere um teor de cinzas médio ligeiramente inferior, de 3.6 % (base seca).

Na Figura II.4 está representado o espectro de FTIR típico das cinzas, a partir do qual se destaca a componente inorgânica dos RST com a presença de carbonatos, visível através da banda intensa a 1090 cm^{-1} .

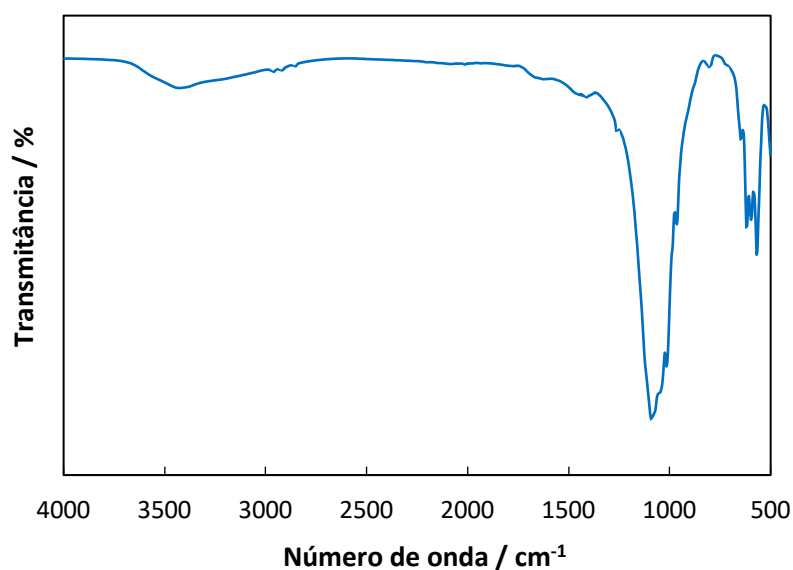


Figura II.4. Espectro de FTIR das cinzas dos RST em pastilha de KBr.

II.2.10. Caracterização Global dos RST

Na Tabela II.1 apresentam-se as características físico-químicas determinadas para os RST e respectivo extrato aquoso.

Tabela II.1. Características físico-químicas dos RST e extrato aquoso.

Parâmetro	Extrato aquoso	RST
Sólidos totais (mg.mL ⁻¹)	47.92 ± 2.11	–
pH	4.4 (25 °C)	–
Cinzas (%)	–	2.89 ± 0.07
Microanálise	–	56.21 % C, 7.47 % H, 3.69 % N, 29.69 % O (calc.), < 0.3 % S

A Tabela II.2 reúne a composição sumativa dos RST, resultante dos métodos de quantificação aplicados aos extratos aquoso e orgânico (*n*-hexano).

Tabela II.2. Composição sumativa do extrato aquoso e com *n*-hexano dos RST.

Parâmetro	Extrato
Compostos fenólicos totais (mg EAG/g) ^a	6.52 ± 0.14
(mg EAT/g) ^a	9.35 ± 0.20
Flavonóides (mg EQ/g) ^a	4.79 ± 0.01
Carbo-hidratos totais (mg Eq. β -D-glucose/g) ^a	16.41 ± 0.07
Proteínas (mg/g) ^a	6.28 ± 1.04
Nitratos (mg/g) ^a	0.70 ± 0.02
Lípidos (%) ^b	11.46 ± 0.37

Determinados a partir do extrato aquoso^a e orgânico (*n*-hexano)^b dos RST

II.3. NANOPONTOS DE CARBONO DERIVADOS DE RESÍDUOS SÓLIDOS DO TOMATE

Nesta Secção serão abordados os métodos de síntese empregues para a obtenção de NPSC a partir dos RST, nomeadamente, por carbonização hidrotérmica através de aquecimento convencional (CHAC) e radiação micro-ondas (CHMO).

Os resultados apresentados incluem a comparação entre os métodos de síntese aplicados, condições reacionais, métodos de purificação e propriedades fotofísicas exibidas, bem como a caracterização estrutural e ótica dos NPSC.

Os rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F) foram determinados utilizando sulfato de quinino em 0.1 M H₂SO₄ como padrão (*cf.* descrito na Secção III.2).

II.3.1. Síntese de NPSC a partir de RST

A carbonização hidrotérmica é a técnica mais utilizada e comum para a síntese de NMSC. Trata-se de um método *bottom-up* que envolve uma reação química realizada a alta pressão utilizando água como solvente. Esta estratégia é uma abordagem ambientalmente sustentável, económica e não tóxica, caracterizada por possuir condições de funcionamento simples, permitindo simultaneamente o procedimento de síntese numa só etapa. O

aquecimento pode ser realizado de forma convencional ou utilizando radiação micro-ondas. A eficiência sintética dos dois métodos é bastante diferente, uma vez que o processo convencional demora várias horas a produzir estes nanomateriais, enquanto a radiação micro-ondas fornece um aquecimento eficiente e homogêneo, promovendo um bom desempenho reacional e conduzindo a reações mais rápidas.⁴⁰

II.3.1.1. Carbonização Hidrotérmica com Aquecimento Convencional

Os estudos de CHAC foram realizados num reator de alta pressão constituído por um vaso de aço inox, o qual foi carregado com *ca.* 4 g dos RST e 120 mL de água Millipore®, na presença (variável) ou ausência de aditivo (etilenodiamina, ED; dietilenotriamina, DET; ureia; melamina; *p*-fenilenodiamina, *p*-FD). A mistura reacional foi submetida a tratamento hidrotérmico, estabelecendo-se a temperatura e tempo como parâmetros reacionais. Após isolamento por filtração e extração líquido-líquido (*vide* Secção II.3.2.1) foram obtidos NPsC na forma de dispersões aquosas de cor castanha.

Os primeiros ensaios realizados tiveram como objetivo avaliar a influência da temperatura nas características dos nanomateriais. Os resultados obtidos revelaram que este parâmetro é um dos fatores com maior impacto no rendimento mássico dos NPsC e nas suas propriedades fotofísicas (Tabela II.3). Nos ensaios apresentados, as m.r. foram sujeitas a tratamento hidrotérmico durante 6 horas, com velocidade de agitação de 180 rpm e um rácio mássico ED/RST de 0.16.

Tabela II.3. Efeito da temperatura de reação nos rendimentos mássico e quântico de fluorescência dos NPsC obtidos por CHAC.

Ensaio ^a	T (°C)	Rendimento NPsC (%)	Sólidos (mg.mL ⁻¹)	Φ_F ^b
NPsC-CHAC-I	250	20.2	8.91	0.15
NPsC-CHAC-II	300	10.5	4.80	0.14

^aCondições reacionais: concentração RST = 30 mg.mL⁻¹; rácio mássico ED/RST = 0.16, 6 h, 180 rpm;

^b λ_{exc} = 380 nm

Da análise aos resultados apresentados, verifica-se que o rendimento quântico de fluorescência se mantém praticamente inalterado (15 % \rightarrow 14 %) com a variação da temperatura, tendência não observada para o rendimento mássico que diminui para *ca.* metade (20.2 % \rightarrow 10.5 %) com o aumento da temperatura (250 °C \rightarrow 300 °C). No entanto, de acordo com estudos reportados na literatura, o aumento da temperatura resulta na degradação das espécies emissivas, e conseqüente diminuição do rendimento quântico de fluorescência dos NPSC.¹⁰¹

Outro fator sintético relevante é o tempo de residência da m.r. A avaliação deste parâmetro foi efetuada para condições hidrotérmicas de 250 °C, com velocidade de agitação de 180 rpm e um rácio mássico ED/RST de 0.16 (Tabela II.4).

Tabela II.4. Efeito do tempo de reação nos rendimentos mássico e quântico de fluorescência dos NPSC obtidos por CHAC.

Ensaio ^a	t (horas)	Rendimento NPSC (%)	Sólidos (mg.mL ⁻¹)	Φ_F^b
NPSC-CHAC-III	4	21.3	7.67	0.14
NPSC-CHAC-I	6	20.2	8.91	0.15
NPSC-CHAC-IV	8	17.2	6.48	0.15

^aCondições reacionais: concentração RST = 30 mg.mL⁻¹, rácio mássico ED/RST = 0.16, 250 °C, 180 rpm;

^b λ_{exc} = 380 nm

Os resultados indicam que o grau de carbonização, controlado pelo tempo de reação, não apresenta impacto significativo no rendimento quântico de fluorescência, observando-se um aumento pouco considerável (14 % \rightarrow 15 %) para períodos de tempo mais prolongados (4 h \rightarrow 8 h), não se registando diferença entre tempos de reação superiores a 6 horas. De acordo com a literatura, a tendência de estabilização do valor do rendimento quântico de fluorescência com o aumento do tempo de reação, pode ser justificada pelo aumento da dimensão dos NPSC.¹⁰²

A influência da natureza do aditivo foi também estudada, utilizando-se várias fontes de funcionalização (aminas). Para o efeito, foram testadas, para além da ED, outras aminas alifáticas (DET e ureia) e aminas aromáticas (melamina e *p*-FD). Os resultados obtidos foram comparados com os do ensaio realizado na ausência de aditivo (**NPSC-CHAC-V**;

Tabela II.5), para condições hidrotérmicas de 250 °C e 6 horas, com velocidade de agitação de 180 rpm e um rácio mássico aditivo/RST de 0.16.

Tabela II.5. Efeito da natureza do aditivo nos rendimentos mássico e quântico de fluorescência dos NPsC obtidos por CHAC.

Ensaio ^a	Aditivo	Rendimento NPsC (%)	Sólidos (mg.mL ⁻¹)	Φ_F^b
NPsC-CHAC-V	–	12.1	4.63	0.09
NPsC-CHAC-I	ED	20.2	8.91	0.15
NPsC-CHAC-VI	DET	28.0	11.13	0.11
NPsC-CHAC-VII	Ureia	16.2	5.83	0.05
NPsC-CHAC-VIII	Melamina	24.5	9.33	0.08
NPsC-CHAC-IX	<i>p</i> -FD	15.4	6.14	0.03

^aCondições reacionais: concentração RST = 30 mg.mL⁻¹, rácio mássico aditivo/RST = 0.16, 250 °C, 6 h, 180 rpm; ^b λ_{exc} = 380 nm

Os resultados apresentados indicam que a funcionalização com ED originou NPsC com maior rendimento quântico de fluorescência (15 %), ao passo que o maior rendimento mássico (28.0 %), e conseqüentemente, teor de sólidos mais elevado, foi obtido através da funcionalização com DET. Para além da ureia, é possível observar que os NPsC dopados com aminas aromáticas (melamina e *p*-FD) originaram rendimentos quânticos de fluorescência mais baixos. Resultados idênticos foram reportados num estudo recente, onde foi verificado que a incorporação de anéis aromáticos em PsC reduzia significativamente a sua solubilidade em água e o rendimento quântico de fluorescência, quando comparados com nanomateriais produzidos com aminas alifáticas.¹⁰³

De forma a avaliar a influência da quantidade de aditivo nas propriedades fotofísicas dos NPsC, foi estudado o rácio mássico ED/RST, para condições reacionais de 250 °C e 6 horas, com velocidade de agitação de 180 rpm (Tabela II.6).

Tabela II.6. Efeito do rácio mássico ED/RST nos rendimentos mássico e quântico de fluorescência dos NPsC obtidos por CHAC.

Ensaio ^a	ED/RST	Rendimento NPsC (%)	Sólidos (mg.mL ⁻¹)	Φ_F^b
NPsC-CHAC-V	0	12.1	4.63	0.09
NPsC-CHAC-X	0.02	16.7	6.53	0.12
NPsC-CHAC-XI	0.04	12.8	4.96	0.14
NPsC-CHAC-XII	0.08	17.6	7.03	0.17
NPsC-CHAC-I	0.16	20.2	8.91	0.15
NPsC-CHAC-XIII	0.32	28.0	14.31	0.12
NPsC-CHAC-XIV	0.64	55.9	22.35	0.10

^aCondições reacionais: concentração RST = 30 mg.mL⁻¹, 250 °C, 6 h, 180 rpm; ^b λ_{exc} = 380 nm

Os resultados apresentados demonstram uma tendência gaussiana, no que respeita às propriedades fotofísicas dos NPsC, verificando-se um rendimento quântico de fluorescência superior (17 %) para um rácio mássico ED/RST de 0.08. No entanto, e seguindo uma tendência crescente, verifica-se que o aumento deste rácio mássico (0.04 → 0.64) resulta em rendimentos mássicos superiores (12.8 % → 55.9 %), e conseqüente incremento no teor de sólidos.

Foi ainda estudada a influência do desarejamento da m.r. nas propriedades fotofísicas dos NPsC, para condições reacionais de 250 °C e 6 horas, com velocidade de agitação de 180 rpm e um rácio mássico ED/RST de 0.16. Pela análise da Tabela II.7, é possível verificar que a presença de atmosfera inerte durante o tratamento hidrotérmico não conduz a alterações significativas das propriedades luminescentes (15 %) e do rendimento mássico dos NPsC (19.2-20.2 %) obtidos.

Tabela II.7. Efeito da atmosfera de reação nos rendimentos mássico e quântico de fluorescência dos NPsC obtidos por CHAC.

Ensaio ^a	Atmosfera	Rendimento NPsC (%)	Sólidos (mg.mL ⁻¹)	Φ_F^b
NPsC-CHAC-I	Ar	20.2	8.91	0.15
NPsC-CHAC-XV	N ₂	19.2	7.31	0.15

^aCondições reacionais: concentração RST = 30 mg.mL⁻¹, rácio mássico ED/RST = 0.16, 250 °C, 6 h, 180 rpm; ^b λ_{exc} = 380 nm

Com o objetivo de obter nanomateriais que funcionassem como entidade modelo para a avaliação das atividades biológicas, foram preparados NPsC a partir de moléculas orgânicas puras. Para o efeito foi realizado um ensaio utilizando ácido cítrico como fonte de carbono, para condições reacionais de 250 °C e 6 horas, com velocidade de agitação de 180 rpm e um rácio mássico ED/ácido cítrico de 0.16. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela II.8.

Tabela II.8. Efeito da natureza da matéria-prima nos rendimentos mássico e quântico de fluorescência dos NPsC obtidos por CHAC.

Ensaio ^a	Matéria-prima	Rendimento NPsC (%)	Sólidos (mg.mL ⁻¹)	Φ_F^b
NPsC-CHAC-I	RST	20.2	8.91	0.15
NPsC-CHAC-XVI	Ácido cítrico	34.9	13.69	0.22

^aCondições reacionais: concentração matéria-prima = 30 mg.mL⁻¹, rácio mássico ED/matéria-prima = 0.16, 250 °C, 6 h, 180 rpm; ^b λ_{exc} = 380 nm

A validação dos resultados surge da comparação do ensaio modelo com ensaios reportados na literatura, através de métodos de síntese equivalentes. Zhu *et al.*⁴¹ sintetizaram materiais desta natureza a partir de ácido cítrico e etilenodiamina (ED/ácido cítrico = 0.30), em condições hidrotérmicas de 250 °C e 5 horas. A comparação desta referência com o ensaio realizado com ácido cítrico (**NPsC-CHAC-XVI**) permite concluir que os NPsC foram obtidos com rendimentos mássicos inferiores (58 % → 34.9 %), apresentando um perfil semelhante dos seus espectros de FTIR (*vide* Secção II.3.3). Os rendimentos quânticos de fluorescência dos dois tipos de nanomateriais revelam uma emissividade semelhante (25 % → 22 %).

Ensaio anteriores, desenvolvidos pelo mesmo grupo de investigação, descrevem a síntese hidrotérmica de NPsC derivados das águas residuais do processamento do azeite através de CHAC por Sousa *et al.*⁷⁵ Os autores verificaram que o tempo e a quantidade de ED foram os parâmetros que refletiram maior impacto no rendimento quântico de fluorescência, atingindo valores superiores aos NPsC obtidos neste trabalho (15-42 %), resultantes de rendimentos mássicos de 30-46 %.

Moraes *et al.*⁵⁷ procederam à mesma técnica de síntese, obtendo NPsC derivados de borras de café com rendimentos mássicos de 9.8-25.5 % e rendimentos quânticos de fluorescência entre 5-18 %, maximizado para condições de 300 °C/6 horas e rácio mássico ED/borras de café de 0.16, apresentando características bastante semelhantes aos NPsC derivados dos RST.

No entanto, os NPsC relatados no presente trabalho apresentaram excelentes características, revelando ser superiores a PsC derivados de cascas de laranja e de limão, reportados noutros estudos, onde foram obtidos rendimentos quânticos de fluorescência inferiores (3-11 %).⁴⁵

II.3.1.2. Carbonização Hidrotérmica Assistida por Radiação Micro-ondas

Os ensaios de CHMO foram realizados recorrendo a reator micro-ondas monomodo. Tipicamente, a um tubo de *pyrex* foram adicionados *ca.* 450 mg dos RST e 15 mL de água Millipore®, na presença (variável) ou ausência de aditivo, seguido de selagem com septo de *teflon*. A mistura reacional foi submetida a irradiação, em condições de temperatura e tempo pré-estabelecidas. Após as etapas de isolamento (*vide* Secção II.3.2.1), foram obtidos NPsC como dispersões aquosas de cor castanha.

Foi igualmente explorada a influência dos vários parâmetros reacionais, onde se verificou que a temperatura é um dos fatores com maior impacto no rendimento mássico dos NPsC e nas suas propriedades fotofísicas (Tabela II.9). Nos ensaios apresentados, as m.r. foram sujeitas a aquecimento durante 15 minutos, com velocidade de agitação de 600 rpm e um rácio mássico ED/RST de 0.16.

Tabela II.9. Efeito da temperatura de reação nos rendimentos mássico e quântico de fluorescência dos NPsC obtidos por CHMO.

Ensaio ^a	T (°C)	Rendimento NPsC (%)	Sólidos (mg.mL ⁻¹)	Φ_F^b
NPsC-CHMO-I	200	23.5	12.27	0.04
NPsC-CHMO-II	230	22.6	10.50	0.08

^aCondições reacionais: concentração RST = 30 mg.mL⁻¹, rácio mássico ED/RST = 0.16, 15 min, 600 rpm;

^b λ_{exc} = 380 nm

Ao contrário do que foi observado anteriormente nos ensaios de CHAC (*vide* Tabela II.3), é possível verificar que o aumento da temperatura (200 °C → 230 °C) reflete-se de forma positiva no rendimento quântico de fluorescência (4 % → 8 %), não tendo este parâmetro impacto significativo no rendimento mássico dos NPsC (22.6-23.5 %), e consequentemente, no teor de sólidos. Devido a limitações operatórias do reator de micro-ondas, nomeadamente no que diz respeito ao limite de pressão, não foi possível testar temperaturas superiores a 230 °C.

Foi ainda avaliada a influência do tempo de irradiação da m.r., através da sua variação entre 15 minutos e 1 hora, para 200 °C, com velocidade de agitação de 600 rpm. Para o efeito, foram testados dois rácios mássicos ED/RST, de 0.16 e de 0.32. Os resultados obtidos encontram-se compilados na Tabela II.10.

Tabela II.10. Efeito do tempo de reação nos rendimentos mássico e quântico de fluorescência dos NPsC obtidos por CHMO.

Ensaio ^a	ED/RST	t (min)	Rendimento NPsC (%)	Sólidos (mg.mL ⁻¹)	Φ_F^b
NPsC-CHMO-I		15	23.5	12.27	0.04
NPsC-CHMO-III	0.16	30	26.3	11.43	0.04
NPsC-CHMO-IV		60	24.3	12.10	0.08
NPsC-CHMO-V		15	30.4	16.40	0.05
NPsC-CHMO-VI	0.32	30	35.6	14.55	0.05
NPsC-CHMO-VII		60	36.4	13.65	0.08

^aCondições reacionais: concentração RST = 30 mg.mL⁻¹, 200 °C, 600 rpm; ^b λ_{exc} = 380 nm

O aumento do tempo de reação é favorável ao rendimento quântico de fluorescência (4 % → 8 %, ED/RST = 0.16; 5 % → 8 %, ED/RST = 0.32), duplicando praticamente o seu valor de 15 para 60 minutos de irradiação, não revelando, no entanto, impacto significativo no rendimento mássico (23.5-26.3 %, ED/RST = 0.16; 30.4-36.4 %, ED/RST = 0.32) e no teor de sólidos dos NPc obtidos.

De seguida, procedeu-se à avaliação da influência da natureza do aditivo, promovendo-se a funcionalização da superfície dos nanomateriais com as mesmas amins alifáticas e aromáticas, anteriormente utilizadas nos ensaios de CHAC (*vide* Secção II.3.1.1). Os resultados obtidos (Tabela II.11) decorreram de irradiação a 200 °C durante 15 minutos, com velocidade de agitação de 600 rpm e um rácio mássico aditivo/RST de 0.16.

Tabela II.11. Efeito da natureza do aditivo nos rendimentos mássico e quântico de fluorescência dos NPc obtidos por CHMO.

Ensaio ^a	Aditivo	Rendimento NPc (%)	Sólidos (mg.mL ⁻¹)	Φ_F ^b
NPc-CHMO-VIII	–	16.4	6.70	0.02
NPc-CHMO-I	ED	23.5	12.27	0.04
NPc-CHMO-IX	DET	30.8	16.05	0.07
NPc-CHMO-X	Ureia	27.5	11.50	0.02
NPc-CHMO-XI	Melamina	19.8	13.50	0.03
NPc-CHMO-XII	<i>p</i> -FD	18.6	7.95	0.01

^aCondições reacionais: concentração RST = 30 mg.mL⁻¹, rácio mássico aditivo/RST = 0.16, 200 °C, 15 min, 600 rpm; ^b λ_{exc} = 380 nm

Ao contrário do estudo homólogo anterior efetuado por CHAC, nos quais se observou um melhor desempenho da ED (*vide* Tabela II.5), em CHMO verificou-se que a funcionalização com DET originou NPc com melhores propriedades, caracterizadas por maior rendimento mássico (30.8 %) e melhores características luminescentes (Φ_F = 7 %). Apesar desta evidência, e com vista à comparação dos resultados subsequentes entre os NPc sintetizados por ambos os métodos, os estudos posteriores foram realizados utilizando ED como aditivo.

A influência da quantidade de aditivo nas características dos NPsC foi avaliada através da variação do rácio mássico ED/RST, para condições reacionais de 200 °C e 15 minutos, com velocidade de agitação de 600 rpm (Tabela II.12).

Tabela II.12. Efeito do rácio mássico ED/RST nos rendimentos mássico e quântico de fluorescência dos NPsC obtidos por CHMO.

Ensaio ^a	ED/RST	Rendimento NPsC (%)	Sólidos (mg.mL ⁻¹)	Φ_F ^b
NPsC-CHMO-VIII	0	16.4	6.70	0.02
NPsC-CHMO-XIII	0.04	19.1	8.13	0.04
NPsC-CHMO-XIV	0.08	20.0	9.00	0.04
NPsC-CHMO-I	0.16	23.5	12.27	0.04
NPsC-CHMO-V	0.32	30.4	16.40	0.05

^aCondições reacionais: concentração RST = 30 mg.mL⁻¹, 200 °C, 15 min, 600 rpm; ^b λ_{exc} = 380 nm

Neste estudo, é observada uma tendência crescente, onde se verifica que o incremento de ED está diretamente associado a maiores rendimentos mássicos (16.4 % → 30.4 %), e conseqüentemente teores de sólidos superiores. No entanto, verifica-se que as propriedades luminescentes destes materiais não exibem o mesmo comportamento, com baixa variabilidade dos rendimentos quânticos de fluorescência (2 % → 5 %), estagnando para quantidades de aditivo intermédias (0.04-0.16).

Por último, foi estudada a influência da concentração dos RST nas características dos NPsC. Os ensaios foram realizados a 200 °C durante 15 minutos com agitação de 600 rpm (Tabela II.13).

Tabela II.13. Efeito da concentração dos RST nos rendimentos mássico e quântico de fluorescência dos NPc obtidos por CHMO.

Ensaio ^a	Concentração RST (mg.mL ⁻¹)	Rendimento NPc (%)	Sólidos (mg.mL ⁻¹)	Φ_F ^b
NPc-CHMO-XV	15	22.8	5.95	0.05
NPc-CHMO-I	30	23.5	12.27	0.04
NPc-CHMO-XVI	70	22.5	26.13	0.08
NPc-CHMO-XVII	100	21.7	37.80	0.04

^aCondições reacionais: rácio mássico ED/RST = 0.16, 200 °C, 15 min, 600 rpm; ^b λ_{exc} = 380 nm

Com base na tabela anterior, verifica-se que o aumento da concentração da matéria-prima não revela impacto significativo no rendimento mássico dos NPc (21.7-23.5 %). Por outro lado, observa-se que o rendimento quântico de fluorescência é máximo para uma concentração de RST de 70 mg.mL⁻¹ (Φ_F = 8 %), não demonstrando uma influência linear neste parâmetro.

Como forma de complemento ao estudo da síntese por CHMO, ensaios selecionados foram replicados em forno de micro-ondas doméstico, obtendo-se NPc com luminescência pouco significativa, resultantes de rendimentos mássicos reduzidos (Tabela II.14).

Tabela II.14. Efeito do tempo de reação nos rendimentos mássico e quântico de fluorescência dos NPc obtidos por CHMO (forno de micro-ondas doméstico).

Ensaio ^a	t (min)	Rendimento NPc (%)	Sólidos (mg.mL ⁻¹)	Φ_F ^b
NPc-CHMO-XVIII	3	12.9	7.95	0.02
NPc-CHMO-XIX	5	17.7	9.70	0.02
NPc-CHMO-XX	10	14.2	8.25	0.02
NPc-CHMO-XXI	15	14.4	7.50	0.03

^aCondições reacionais: concentração RST = 30 mg.mL⁻¹, rácio mássico ED/RST = 0.16, 800 W; ^b λ_{exc} = 380 nm

Ensaio reportados por Moraes *et al.*⁵⁷ descrevem a síntese de NPc derivados de borras de café através de CHMO. Os autores efetuaram a comparação de diversos parâmetros reacionais com ensaios homólogos efetuados por CHAC, onde concluíram que os NPc-CHMO exibem menores rendimentos mássicos e quânticos de fluorescência, atingindo o valor máximo de 10 % para condições de hidrotérmicas de 190 °C e 3 h, comprovando a mesma tendência verificada para os NPc obtidos no presente estudo por radiação micro-ondas.

Outros estudos descrevem a síntese de NPc derivados de folhas de manga e algas eutróficas, sujeitas a irradiação durante 5 minutos, com rendimentos quânticos de fluorescência de *ca.* 14 %, revelando melhores características que os NPc derivados dos RST.^{45,46}

II.3.2. Isolamento e Purificação dos NPc

A remoção total (ou parcial) de impurezas presentes na m.r. decorre da aplicação de etapas de isolamento e purificação, com vista ao melhoramento das propriedades luminescentes dos NPc. Em particular, a remoção de impurezas inorgânicas oriundas dos RST utilizados na obtenção destes nanomateriais, surge como um dos principais objetivos.

O isolamento dos NPc da m.r. foi realizado utilizando extração líquido-líquido com solventes orgânicos adequados (*vide* Secção II.3.3.1) e a purificação dos nanomateriais obtidos recorreu a técnicas de cromatografia (*vide* Secção II.3.3.2) e de diálise (*vide* Secção II.3.3.3), aplicadas apenas a um ensaio de CHAC (NPc-CHAC-XIII; ED/RST = 0.32, 250 °C, 6 h, 180 rpm), dadas as limitações quantitativas dos ensaios em CHMO, em termos da escala reduzida em que a síntese decorre.

II.3.2.1. Extração Líquido-Líquido

Após a etapa reacional, as m.r. foram sujeitas a um processo de filtração por membrana de celulose regenerada com diâmetro de poro de 0.2 µm, seguindo-se etapas de purificação por extração líquido-líquido com CH₂Cl₂ e AcOEt. A fase aquosa resultante sofreu um processo de evaporação para remoção de solvente orgânico residual, sendo armazenada a 4 °C sob atmosfera inerte.

As fases orgânicas recolhidas foram evaporadas e os respetivos resíduos quantificados. Em média, os ensaios de síntese por CHAC (*vide* Secção II.3.1.1) apresentaram uma fração insolúvel recuperada na filtração de 16 %, e frações de resíduo obtido nas etapas de extração com CH_2Cl_2 de 3.6 %, e com AcOEt de 1.5 %, em relação à massa inicial de RST e aditivo. De forma combinada, estes ensaios apresentaram um rendimento mássico de conversão de 23 %. Relativamente aos ensaios realizados por CHMO (*vide* Secção II.3.1.2), uma fração insolúvel recuperada na filtração de 48 %, e frações de resíduo obtido nas etapas de extração 1.1 % (CH_2Cl_2), e 0.7 % (AcOEt), resultaram em rendimentos mássicos de conversão bastante superiores, de 47 %.

Na Figura II.5 apresenta-se o perfil típico dos espectros de FTIR das fases orgânicas, extratadas com CH_2Cl_2 e AcOEt, bem como do resíduo obtido após secagem da fase aquosa a 105 °C (NPSC-CHAC-XIII).

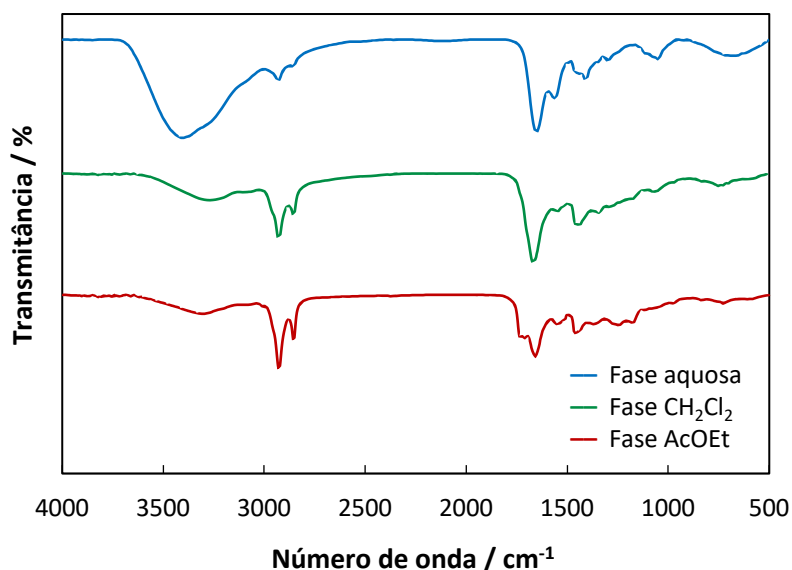


Figura II.5. Espectros de FTIR das fases orgânicas (CH_2Cl_2 e AcOEt) e da fase aquosa dos NPSC-CHAC-XIII em pastilha de KBr.

Os espectros de FTIR das fases orgânicas indicam a presença distinta de bandas a 2930 e 2855 cm^{-1} , onde têm origem as bandas correspondentes à presença de grupos alifáticos. A banda a 1665 cm^{-1} está associada à extensão de ligações C=O, presente em todas as fases, e as bandas a 1562, 1047 e 671 cm^{-1} são indicativas da presença de ácidos/carboxilatos e amidas, grupos estes de presença dominante na fase aquosa, que comporta os NPSC.

II.3.2.2. Cromatografia com Sephadex G-75

O processo de purificação por cromatografia com Sephadex G-75 tem por base o princípio de exclusão molecular, no qual a separação das diferentes espécies é baseada no tamanho molecular. Deste modo, são eluídas em primeiro lugar as espécies de maior tamanho, significando a sua remoção em tempos de retenção inferiores.

A purificação por cromatografia com Sephadex G-75 por gravidade foi aplicada a uma amostra dos **NPsC-CHAC-XIII**. O processo cromatográfico foi seguido através da monitorização da fluorescência das frações eluídas com água Millipore®, a $\lambda_{exc} = 380$ nm (Figura II.6).

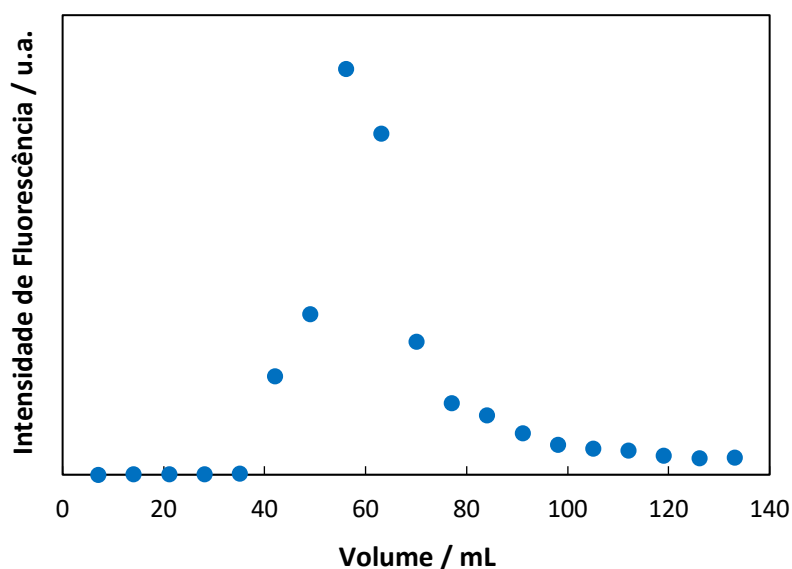


Figura II.6. Intensidade de fluorescência ($\lambda_{exc} = 380$ nm) das frações resultantes da separação dos **NPsC-CHAC-XIII** por Sephadex G-75.

Na figura anterior é possível verificar que a fração com máxima intensidade de fluorescência a 380 nm surge após a eluição de 56 mL, embora a eluição de frações contendo NPsC tenha sido iniciada aos 42 mL. Na sua globalidade, esta estratégia de purificação originou 32.0 mg de NPsC com fluorescência reduzida ($\Phi_f = 5$ %), e considerando a carga inicial de *ca.* 42.9 mg, verificou-se um rendimento mássico de purificação de 74.6 %.

Conforme verificado, a emissão sintonizável dos NPsC, altamente depende do comprimento de onda (*vide* Figura II.18), pode ser associada à presença de grupos funcionais diversos na sua superfície que geram uma variedade de estados superficiais, resultando em rendimentos

quânticos de fluorescência baixos a moderados. No entanto, estima-se que a contribuição para este fator pode também dever-se à presença de fluoróforos moleculares funcionalizados à superfície dos NPsC ou até em solução, conhecidos pela sua baixa fotoestabilidade e elevada luminescência. Assim, verifica-se que a remoção destas espécies, derivada da aplicação de métodos de purificação como a cromatografia com Sephadex G-75, provoca uma redução considerável do rendimento quântico de fluorescência.¹⁰⁴

II.3.2.3. Diálise

A purificação de NPsC por diálise tem sido amplamente estudada, sendo identificada como um dos métodos mais adequados à remoção de espécies moleculares, bem como de outras impurezas presentes em NMSc.¹⁰⁵

Este processo de purificação foi aplicado aos NPsC sintetizados através das condições reacionais do ensaio **NPsC-CHAC-XIII**, utilizando uma membrana com *cut-off* de 1000 Da contra água Millipore® durante 4 dias, com recolha diária do permeado. Devido ao seu baixo tamanho molecular, os NPsC atravessaram a membrana, encontrando-se maioritariamente concentrados no primeiro permeado. Simultaneamente, verificou-se que a suspensão que permaneceu no interior da membrana consiste essencialmente em agregados com luminescência pouco significativa (Figura II.7).

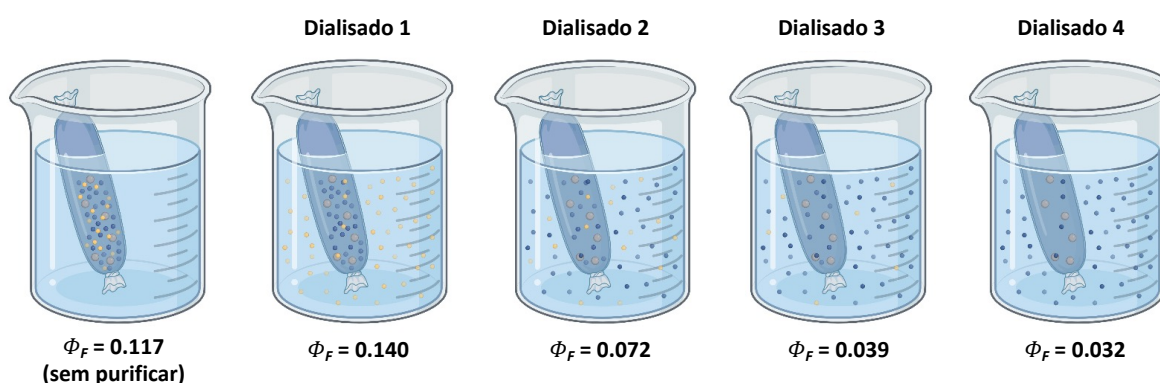


Figura II.7. Rendimento quântico de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 380 \text{ nm}$) das frações resultantes da separação dos **NPsC-CHAC-XIII** por diálise.

Por outras palavras, esta técnica de purificação foi utilizada na sua forma inversa, com vista ao isolamento dos NPsC numa fração de permeado, revelando um rendimento quântico de fluorescência de 14 % ($\lambda_{exc} = 380$ nm). Através deste método de purificação, verificou-se ainda que a permeação indesejada de eventuais fluoróforos moleculares presentes em solução resultou num rendimento quântico de fluorescência praticamente inalterado.

II.3.3. Caracterização Estrutural

A caracterização estrutural dos NPsC decorreu da avaliação dos seus espectros de FTIR e RMN ^1H e da análise elementar efetuada a estes nanomateriais. Neste tópico, é importante salientar que, dada a heterogeneidade das dispersões aquosas dos NPsC, em matéria da sua pureza, é difícil concluir de forma exata sobre a sua caracterização estrutural.

Pela análise do espectro de FTIR dos NPsC obtidos pelos dois métodos de síntese empregues, resultantes dos ensaios **NPsC-CHAC-XIII** (ED/RST = 0.32, 250 °C, 6 h, 180 rpm) e **NPsC-CHMO-VII** (ED/RST = 0.32, 200 °C, 60', 600 rpm), é possível verificar um perfil característico, indicativo de identidade estrutural semelhante (Figura II.8).

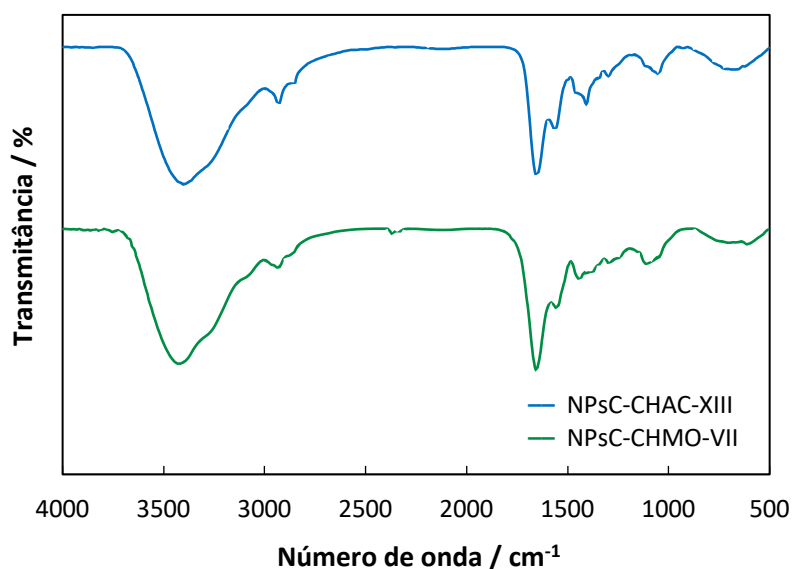


Figura II.8. Espectros de FTIR dos **NPsC-CHAC-XIII** e dos **NPsC-CHMO-VII**, em pastilha de KBr.

Da análise dos espectros, verifica-se o surgimento da banda correspondente à extensão O-H e N-H (ombro) a 3400 cm^{-1} e 3260 cm^{-1} , respetivamente. A 2932 e 2855 cm^{-1} têm origem as bandas correspondentes à presença de grupos alifáticos, de fraca intensidade. A presença de ácidos/carboxilatos e amidas é verificada pelas bandas a 1656 (C=O, ext), 1562 (N-H, def e C=C, ext), 1439 (CH₂, def) e 1403 (CH₃, def) cm^{-1} . Por fim, a 1083 , 1047 e 671 cm^{-1} verificam-se bandas associadas à deformação de ligações C-O, C-H e C-N.

Apresentar-se-á, de seguida, a comparação dos espectros de FTIR resultantes dos ensaios sob os quais se fizeram variar os parâmetros que maior influência revelaram nas características estruturais dos NPsC, tomando como exemplo os ensaios obtidos por CHAC.

A influência da temperatura nas características estruturais dos NPsC é apresentada na Figura II.9, dos ensaios **NPsC-CHAC-I** (ED/RST = 0.16, 250 °C, 6 h, 180 rpm) e **NPsC-CHAC-II** (ED/RST = 0.16, 300 °C, 6 h, 180 rpm). Da comparação dos espectros de FTIR verificou-se que o aumento da temperatura resultou numa diminuição da intensidade das bandas a 2930 , 2850 e 1660 cm^{-1} , correspondentes aos grupos alifáticos e à extensão da ligação C=O, respetivamente. As bandas referentes à vibração de extensão da ligação N-H a 3250 cm^{-1} , bem como a sua deformação a 1560 cm^{-1} e a banda da ligação O-H (3420 cm^{-1}), não sofreram alteração significativa na sua intensidade.

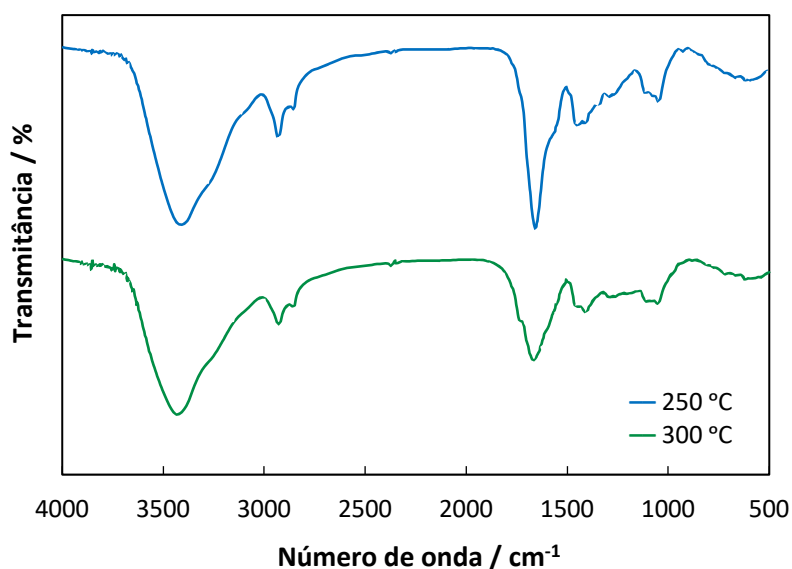


Figura II.9. Espectros de FTIR dos **NPsC-CHAC-I** e dos **NPsC-CHAC-II**, sintetizados a diferentes temperaturas, em pastilha de KBr.

Através da análise dos espectros de FTIR dos ensaios realizados no estudo da variação do rácio mássico ED/RST (**NPsC-CHAC-V, X, XI, XII, I, XIII e XIV**; ED/RST = 0 → 0.64, 250 °C, 6 h, 180 rpm), observou-se que, como resultado do aumento da quantidade de ED, surge o aumento da intensidade das bandas a 1660 e 1560 cm^{-1} , indicativa da presença de ácidos/carboxilatos e amidas, bem como da extensão de ligações O-H e N-H a *ca.* 3400 e 3320 cm^{-1} (Figura II.10).

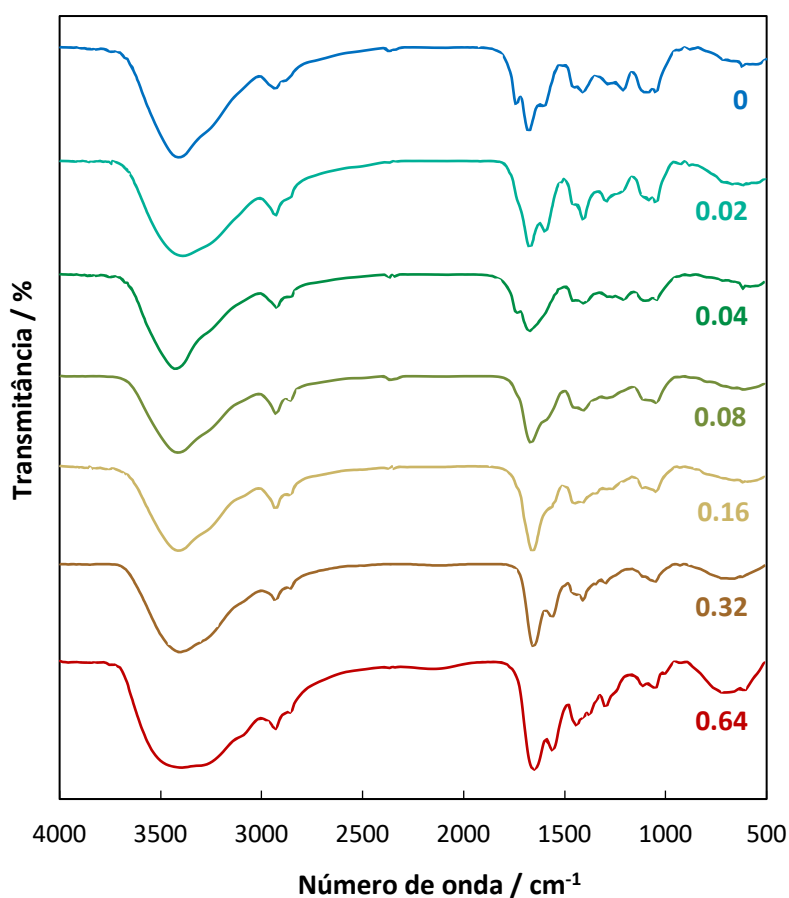


Figura II.10. Espectros de FTIR dos **NPsC-CHAC-V, X, XI, XII, I, XIII e XIV**, sintetizados com diferentes rácios mássicos ED/RST, em pastilha de KBr.

Por fim, da comparação dos espectros de FTIR dos ensaios **NPsC-CHAC-I** (RST, ED/RST = 0.16, 250 °C, 6 h, 180 rpm) e **NPsC-CHAC-XVI** (ácido cítrico, ED/ácido cítrico = 0.16, 250 °C, 6 h, 180 rpm), realizados com matérias-primas diferentes (Figura II.11), verificou-se que a contribuição da componente alifática é superior nos NPsC derivados dos RST, visível nas bandas a 2930 cm^{-1} e a 2855 cm^{-1} . A extensão da ligação C=O, representada a 1660 cm^{-1} não apresentou uma variabilidade significativa, embora nos NPsC derivados de ácido cítrico se

verifique uma maior contribuição da deformação de ligações N-H a 1560 cm^{-1} . As bandas referentes à vibração de ligações O-H e N-H a 3400 e 3260 cm^{-1} , de extensão, não diferem de forma significativa.

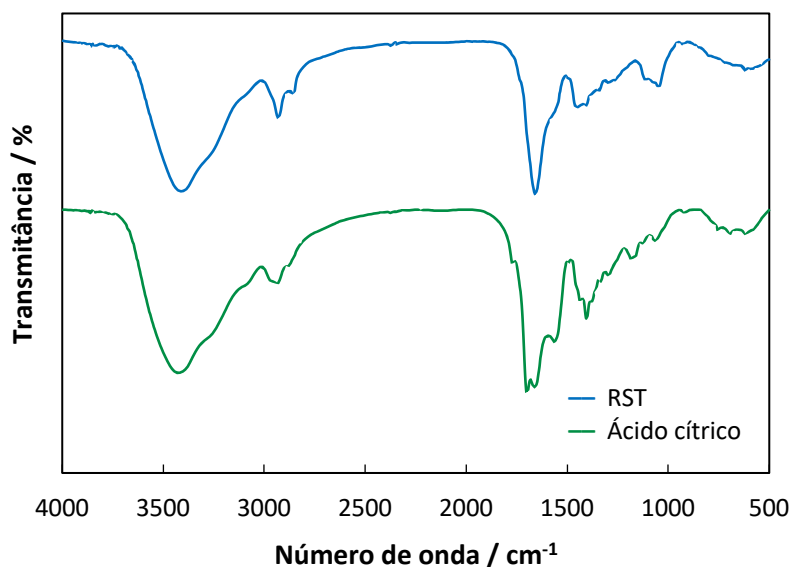


Figura II.11. Espectros de FTIR dos **NPsC-CHAC-I** e dos **NPsC-CHAC-XVI**, sintetizados a partir de diferentes matérias-primas, em pastilha de KBr.

De forma complementar, apresenta-se na Figura II.12 os espectros de RMN ¹H de dispersões de NPsC obtidos pelos dois métodos de síntese, onde é evidenciada a presença maioritária de C-H alifáticos, com ressonâncias entre 0.8 e 3.0 ppm. Os sinais visíveis entre 3.25 e 4.25 ppm são indicativos da presença de ligações CH-O e CH-N, e entre 7.85 e 8.10 ppm surgem sinais de fraca intensidade, associados à presença minoritária de prótons aromáticos.

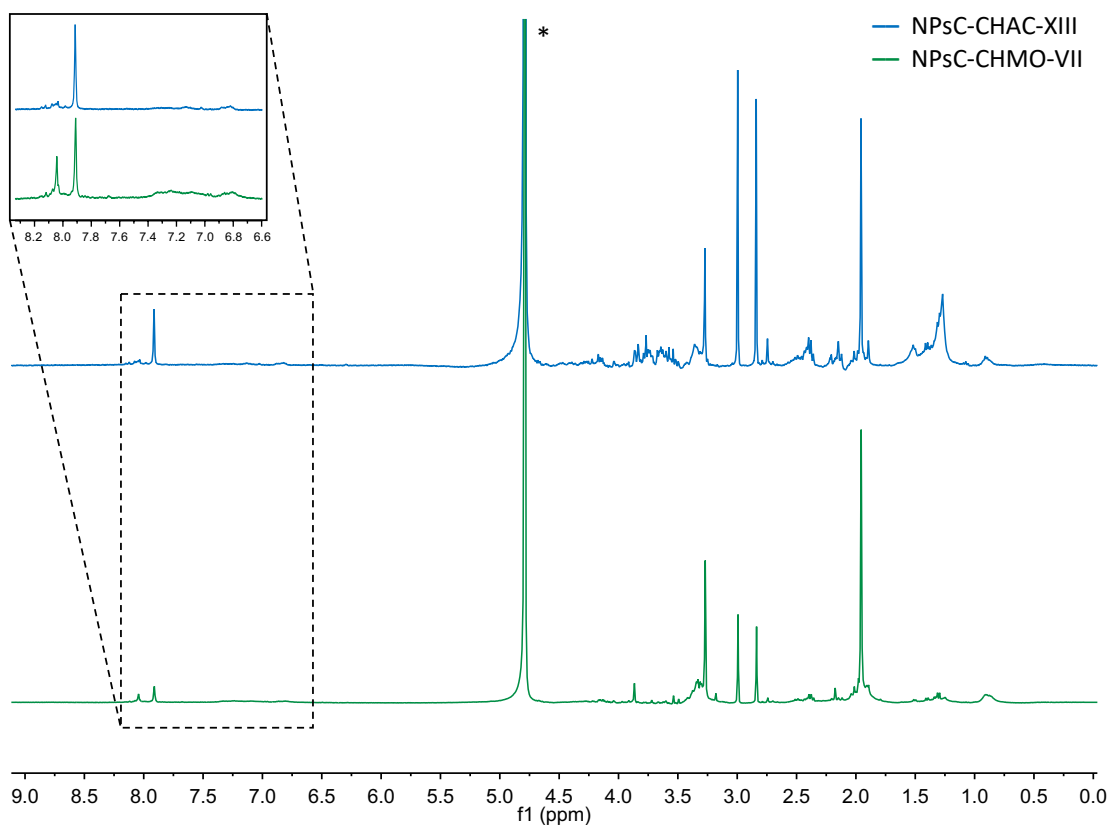


Figura II.12. Espetro de RMN ¹H de dispersões de **NPsC-CHAC-XIII** e de **NPsC-CHMO-VII** (400 MHz, D₂O, 25 °C); *solvente residual.

Ainda, na Figura II.13 está representado o espectro de FTIR típico das cinzas (**NPsC-CHAC-XIII**; ED/RST = 0.32, 250 °C, 6 h, 180 rpm), onde é possível observar que a componente inorgânica dos NPsC é maioritariamente constituída por carbonatos, visível através da banda intensa a 1115 cm⁻¹. A banda alargada a 3500-3200 cm⁻¹ é atribuída à presença de água.

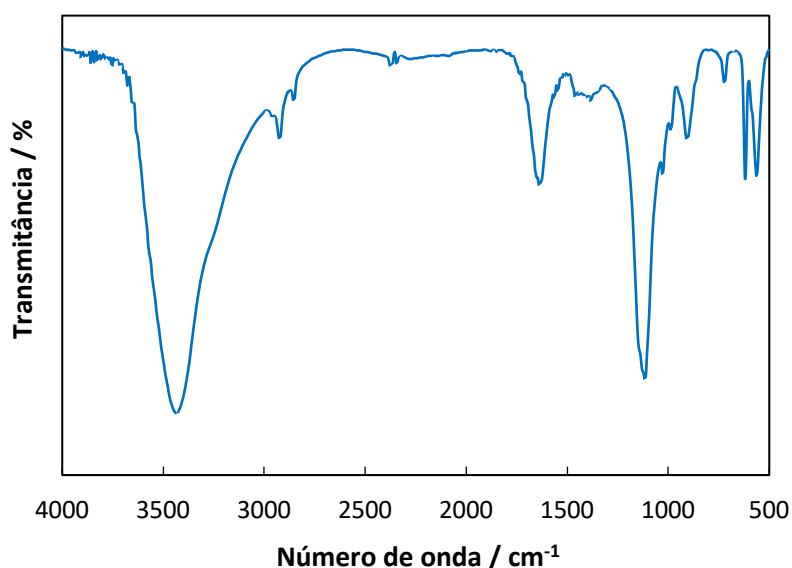


Figura II.13. Espectro de FTIR das cinzas dos **NPc-CHAC-XIII** em pastilha de KBr.

As AE efetuadas para os NPc obtidos nos ensaios relativos ao estudo da variação do tipo de aditivo e da variação do rácio mássico ED/RST, encontram-se apresentadas na Tabela II.15. Os teores elementares foram corrigidos com o respetivo teor de cinzas.

Tabela II.15. Efeito da natureza do aditivo e do rácio mássico ED/RST na análise elementar dos NPc obtidos por CHAC.

Ensaio	Condições reacionais	Microanálise ^c				Cinzas (%)
		% C	% H	% N	% O (calc.)	
NPc-CHAC-V ^a	–	48.04	4.80	5.91	28.21	13.05
NPc-CHAC-I ^a	ED	56.01	5.41	8.75	24.24	5.60
NPc-CHAC-VI ^a	DET	56.03	5.28	9.34	23.55	5.80
NPc-CHAC-VII ^a	Ureia	54.32	4.86	5.81	27.86	7.15
NPc-CHAC-VIII ^a	Melamina	59.36	5.45	5.65	18.94	10.60
NPc-CHAC-XII ^b	ED/RST = 0.08	53.86	5.22	8.14	24.48	8.30
NPc-CHAC-XIII ^b	ED/RST = 0.32	55.53	5.03	11.34	23.70	4.40
NPc-CHAC-XIV ^b	ED/RST = 0.64	56.00	5.49	13.54	21.82	3.15

Condições reacionais: ^aRST 30 mg.mL⁻¹, aditivo/RST = 0.16, 250 °C, 6 h, 180 rpm; ^bRST 30 mg.mL⁻¹, 250 °C, 6 h, 180 rpm; ^c< 0.3 % S

Os resultados apresentados indicam que a quantidade de ED reflete o aumento dos teores de azoto (5.91 % → 13.54 %). Da comparação entre o ensaio realizado com ED (**NPsC-CHAC-I**) e os NPsC dopados com outros aditivos, verificou-se que a utilização de DET (**NPsC-CHAC-VI**) originou um teor de azoto semelhante (8.75 % → 9.34 %), justificando a contribuição para um rendimento quântico de fluorescência próximo (15 % → 11 %), em oposição aos ensaios com as restantes aminas (3-8 %), os quais possuem um teor em azoto semelhante ao obtido na ausência de aditivo (**NPsC-CHAC-V**).

Em particular, da comparação com a AE efetuada para os RST (*cf.* referido na Secção II.2.1), verificou-se um aumento no conteúdo em azoto, resultante da funcionalização efetuada na etapa reacional.

Na aplicação de qualquer substância em ensaios antimicrobianos, o contacto entre esta e o microrganismo é a primeira etapa e baseia-se nas interações entre os dois intervenientes.⁶⁶ Deste modo, é relevante a avaliação da carga superficial dos NPsC através da determinação do potencial ζ , permitindo estabelecer a relação entre as suas características superficiais e a sua capacidade como agentes antimicrobianos (Tabela II.16).

Tabela II.16. Potencial ζ de dispersões aquosas de NPsC (1 mg.mL⁻¹), obtidos em ensaios selecionados (CHAC e CHMO).

Ensaio	Condições reacionais	Rendimento NPsC (%)	Sólidos (mg.mL ⁻¹)	Potencial ζ (mV)
NPsC-CHAC-XII^a	ED/RST = 0.08	17.6	7.03	-19.0 ± 3.19
NPsC-CHAC-I^a	ED/RST = 0.16	20.2	8.91	-29.5 ± 3.45
NPsC-CHAC-XIII^a	ED/RST = 0.32	28.9	14.31	-30.9 ± 7.54
NPsC-CHAC-XVI^b	ED/ácido cítrico = 0.16	34.9	13.69	-22.7 ± 4.14
NPsC-CHMO-I^c	ED/RST = 0.16, 15'	23.5	12.27	-11.0 ± 4.76
NPsC-CHMO-III^c	ED/RST = 0.16, 30'	26.3	11.43	-9.67 ± 2.48
NPsC-CHMO-IV^c	ED/RST = 0.16, 60'	24.3	12.10	-19.5 ± 4.66
NPsC-CHMO-VII^c	ED/RST = 0.32, 60'	36.4	13.65	-10.6 ± 3.78

Condições reacionais: ^aRST 30 mg.mL⁻¹, 250 °C, 6 h, 180 rpm; ^bÁcido cítrico 30 mg.mL⁻¹, 250 °C, 6 h, 180 rpm; ^cRST 30 mg.mL⁻¹, 200 °C, 600 rpm

A intensidade da carga negativa surge como resultado da presença relativa dos grupos funcionais à superfície dos NPsC. A intensidade superior da carga negativa nos NPsC é indicativa de presença maioritária de ácidos/carboxilatos, podendo esta ser reduzida como resultado da presença de aminas. Não obstante, a carga superficial negativa confere uma boa estabilidade coloidal aos NPsC, demonstrando estar altamente dependente do tempo de reação, bem como da quantidade de aditivo.¹⁰⁶ Em geral, os NPsC obtidos por CHAC apresentaram valores de potencial ζ mais negativos em relação aos nanomateriais obtidos por CHMO.

Relativamente ao estudo da influência da purificação nas propriedades superficiais dos NPsC, verifica-se que os métodos aplicados permitem o isolamento de frações com cargas superficiais distintas. Para o ensaio **NPsC-CHAC-XIII** (ED/RST = 0.32, 250 °C, 6 h, 180 rpm), os NPsC purificados por cromatografia com Sephadex G-75 e por diálise apresentaram valores de potencial ζ inferiores, de -12.2 ± 8.40 e -23.5 ± 7.74 mV, respetivamente, em relação aos nanomateriais não purificados. Estima-se que a diminuição neste parâmetro possa ser justificada pela remoção de eventuais agregados que contribuam grandemente para cargas superficiais superiores, bem como de outras espécies moleculares fracionadas.

II.3.4. Caracterização Morfológica

Dada a potencial aplicação biológica dos NPsC e sabendo que, tanto a internalização nas células, como a distribuição dos NPsC nas membranas dependem do seu tamanho, foi realizada uma avaliação morfológica preliminar através de Microscopia de Força Atómica (AFM). Para o efeito foram testadas diferentes concentrações de dispersões aquosas dos NPsC (0.1, 1 e 10 mg.mL⁻¹). Com o aumento da concentração, verificou-se uma tendência notória dos NPsC para se organizarem em agregados irregulares, com conseqüente aumento das alturas topográficas dos agregados formados.

A Figura II.14 apresenta as imagens topográficas e respetivas secções de corte transversal de dispersões aquosas dos NPsC obtidos nos ensaios **NPsC-CHAC-XIII** (ED/RST = 0.32, 250 °C, 6 h, 180 rpm), antes e após diálise, e **NPsC-CHMO-VII** (ED/RST = 0.32, 200 °C, 60', 600 rpm). Numa primeira análise, estas imagens permitem a identificação de partículas com morfologia *quasi-esférica*.

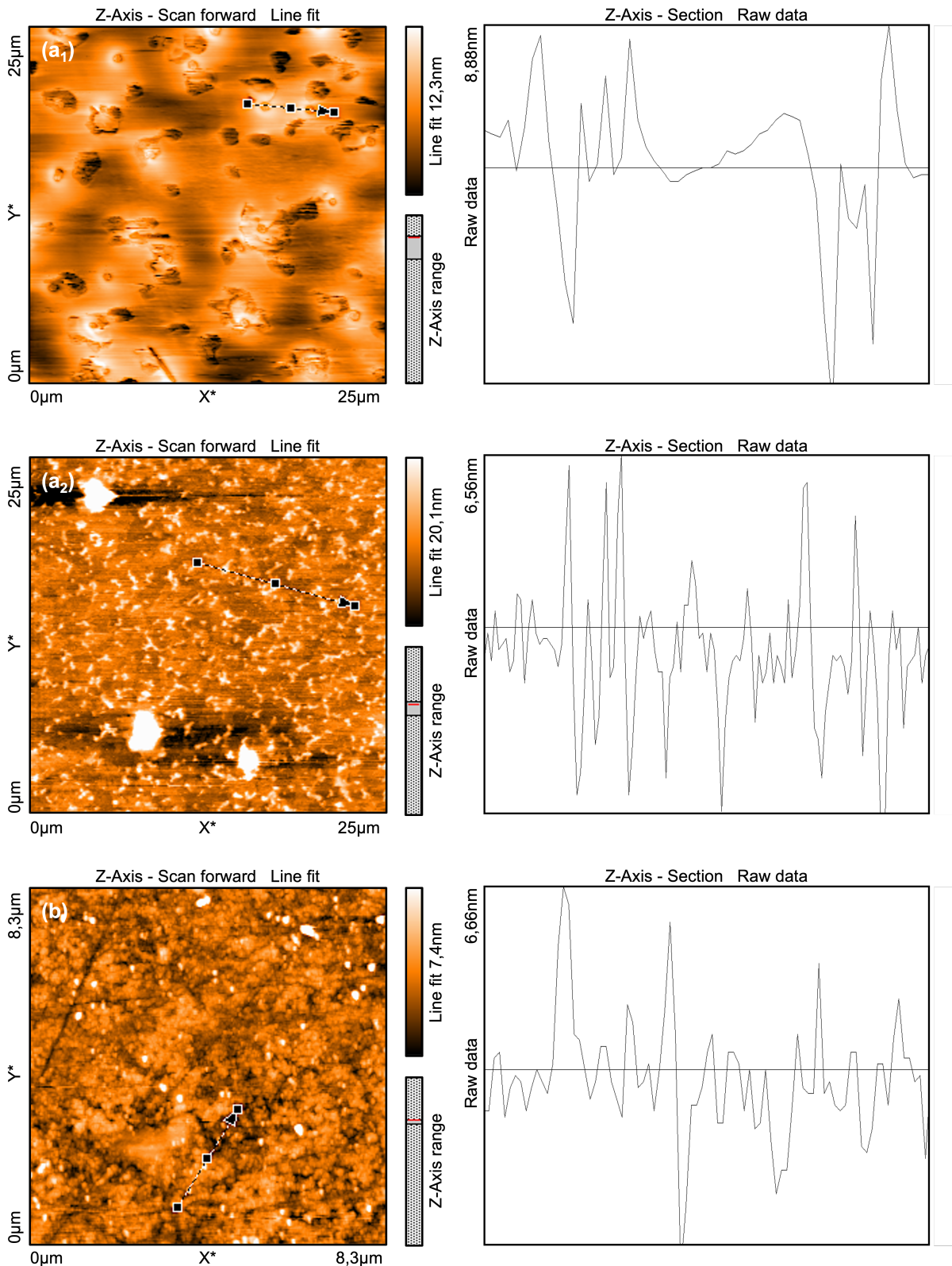


Figura II.14. Imagens topográficas de AFM e respectivas secções de corte transversal de dispersões aquosas dos NPsC-CHAC-XIII (a₁) antes e (a₂) após diálise, e dos (b) NPsC-CHMO-VII (0.1 mg.mL⁻¹).

Apresenta-se ainda, na Figura II.15, a renderização tridimensional correspondente à avaliação morfológica efetuada aos NPcC estudados.

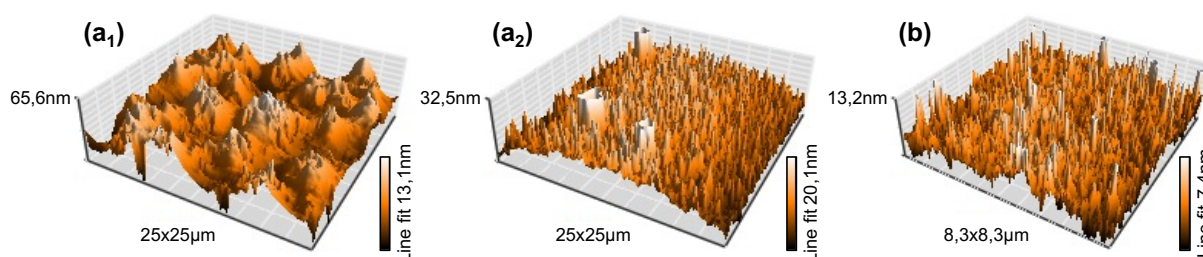


Figura II.15. Renderização tridimensional de AFM de dispersões aquosas dos **NPcC-CHAC-XIII** (**a₁**) antes e (**a₂**) após diálise e (**b**) **NPcC-CHMO-VII** (0.1 mg.mL^{-1}).

Das figuras apresentadas é possível observar que, para ambos os ensaios, foram obtidos NPcC monodispersos com alturas topográficas inferiores a 10 nm. No entanto, mesmo para a concentração mais reduzida, foi possível observar a tendência para a formação de agregados, sendo esta mais notória para o ensaio realizado por CHAC (**NPcC-CHAC-XIII**). Em algumas regiões foi identificada a presença de alguns agregados de grande dimensão (até 65.6 nm). Verificou-se ainda que a purificação por diálise permitiu obter uma maior dispersividade dos NPcC, reduzindo a tendência para a agregação (65.6 nm \rightarrow 32.5 nm), a partir da qual se visualizam NPcC com dimensões inferiores, compreendidas entre *ca.* 3-7 nm. Já os NPcC isolados por cromatografia com Sephadex G-75 não revelaram alteração significativa na sua dispersividade.

O ensaio realizado por CHMO (**NPcC-CHMO-VII**) é caracterizado pela sua boa dispersividade e homogeneidade, apresentado dimensões entre 1-7 nm. Assim, pode afirmar-se que a síntese por CHMO permitiu a obtenção direta de NPcC com uma melhor dispersividade, apesar de apresentar uma agregação moderada (até 13.2 nm).

II.3.5. Propriedades Fotofísicas

Dado o interesse da potencial aplicabilidade dos NPcC na área da biomédica, nomeadamente na imagiologia, foram avaliadas as propriedades fotofísicas dos NPcC, com recurso a espectroscopia de absorção no estado fundamental (UV-Vis) e de fluorescência no estado estacionário (emissão e excitação) das dispersões aquosas dos NPcC sintetizados.

Na Figura II.16 encontram-se representados os espectros para os NPsC obtidos no ensaio **NPsC-CHAC-XII** (ED/RST = 0.08, 250 °C, 6 h, 180 rpm) e **NPsC-CHMO-VII** (ED/RST = 0.32, 200 °C, 60', 600 rpm) e que apresentaram melhor rendimento quântico de fluorescência.

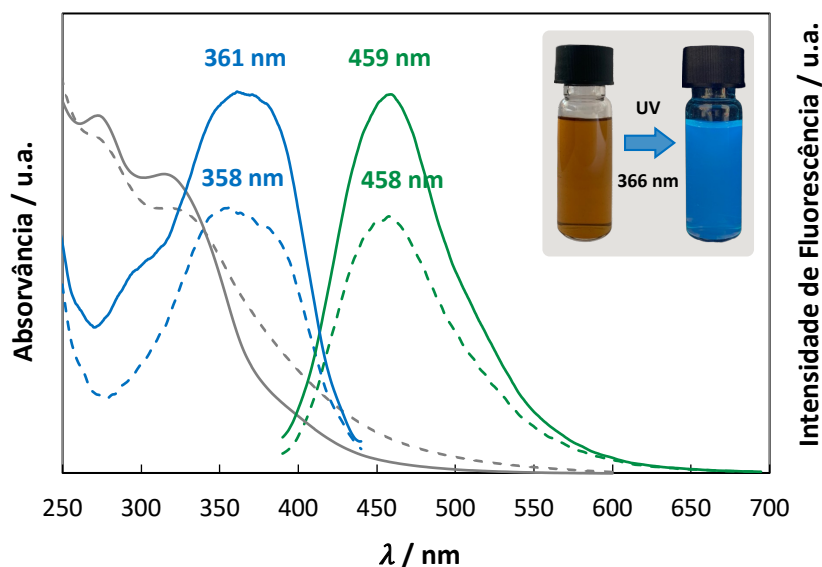


Figura II.16. Espectros de UV-Vis (linha cinza), emissão (linha verde; $\lambda_{exc} = 380$ nm) e excitação (linha azul; monitorizado a 460 nm) de uma dispersão aquosa dos **NPsC-CHAC-XII** (linha contínua) e **NPsC-CHMO-VII** (linha tracejada) ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Os espectros de UV-Vis dos NPsC distinguem-se pela presença de duas bandas a *ca.* 275 nm e a 320 nm, atribuídas às transições $\pi-\pi^*$ do centro de carbono e às transições $n-\pi^*$ ou mistura de transições $\pi-\pi^*$ e $n-\pi^*$ de ligações C=O de amidas. Ao excitar as dispersões aquosas de NPsC a $\lambda_{exc} = 380$ nm, estas emitem na região do azul, apresentando um máximo de emissão centrado a 460 nm. O espectro de excitação monitorizado ao comprimento de onda máximo de emissão indica que a transição eletrónica dos cromóforos que contribui para a emissão dos NPsC ocorre a *ca.* 360 nm.

Da comparação dos NPsC obtidos pelos dois métodos de síntese, verificou-se que o perfil dos seus espectros de absorção, emissão e excitação é semelhante, observando-se apenas um ligeiro desvio batocrómico visível na absorção dos NPsC obtidos por CHMO de *ca.* 10 nm para a região do vermelho. A generalidade dos ensaios realizados (*vide* Secção II.3.1) indica que a síntese por CHAC leva à obtenção de NPsC com rendimentos quânticos de fluorescência superiores, enquanto que a síntese por CHMO permite obter NPsC

resultantes de rendimentos mássicos de excelência, comprovando a eficiência sintética superior característica deste método de síntese.

A presença de grupos fenilo, resultante da funcionalização com aminas aromáticas (em particular com *p*-FD), provoca a diminuição do estado de transição $\pi-\pi^*$ verificado a *ca.* 270 nm. Como exemplo, apresentam-se na Figura II.17 os espectros de absorção e emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 380$ nm) dos NPSC obtidos nos ensaios **NPSC-CHAC-XII** (ED/RST = 0.08, 250 °C, 6 h, 180 rpm) e **NPSC-CHAC-IX** (*p*-FD/RST = 0.16, 250 °C, 6 h, 180 rpm). O perfil dos espectros apresentados demonstrou que o máximo de emissão dos NPSC funcionalizados com *p*-FD sofre um desvio batocrômico para *ca.* 470 nm, acompanhado de um ombro a *ca.* 510 nm.

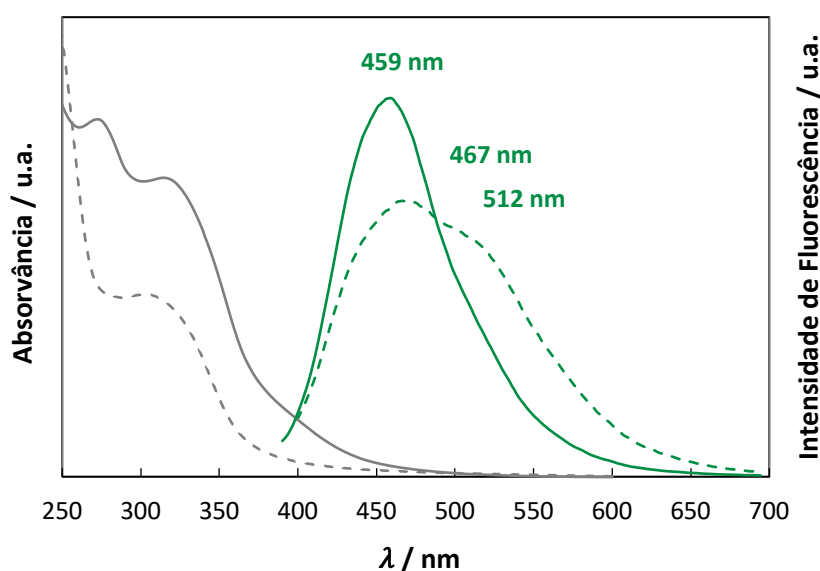


Figura II.17. Espectros de UV-Vis (linha cinza) e emissão (linha verde; $\lambda_{\text{exc}} = 380$ nm) de dispersões aquosas dos **NPSC-CHAC-XII** (linha contínua) e **NPSC-CHAC-IX** (linha tracejada) ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

De forma complementar, foi registado o decaimento da intensidade de fluorescência de dispersões aquosas de NPSC, com recurso a fluorescência resolvida no tempo, a partir do qual foram obtidos tempos de vida médios (τ_m) de 7.81 ± 0.45 ns.

Ensaio reportado por Moraes *et al.*⁵⁷ e Sousa *et al.*,⁶¹ respetivamente, de NPSC derivados de borras de café e de águas residuais do processamento do azeite, obtiveram valores de τ_m de 9.11 e 6.20 ns, englobando o valor médio obtido para os NPSC descritos neste trabalho.

Conforme referido anteriormente, a emissão dos NPsC mostra forte dependência com o comprimento de onda de excitação. A Figura II.18 apresenta o comportamento dos espectros de emissão dos NPsC com a variação do λ_{exc} entre 340 e 440 nm, verificando-se um desvio batocrômico na sua emissão para a região do vermelho com o aumento do comprimento de onda de excitação.

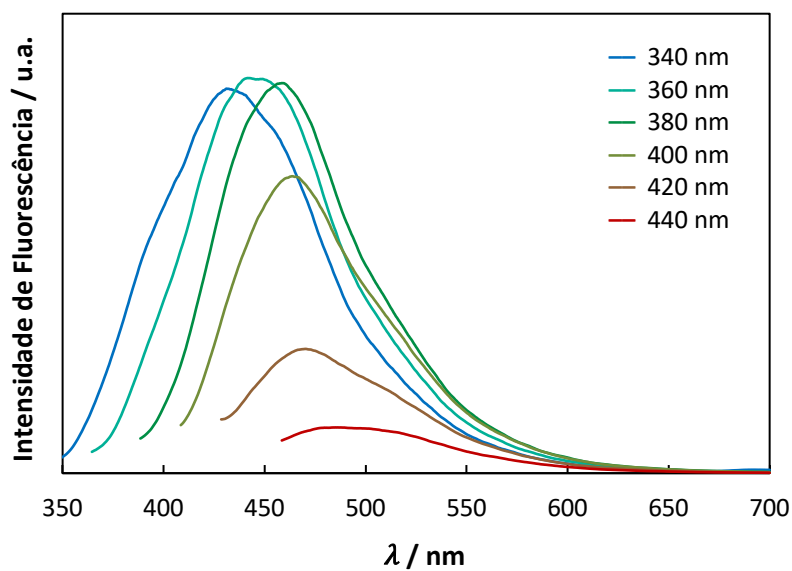


Figura II.18. Espectros de emissão de uma dispersão aquosa dos **NPsC-CHAC-XII** (0.1 mg.mL^{-1}), com excitação a diferentes comprimentos de onda.

De forma a aferir a capacidade para aplicações de detecção em condições fisiológicas dos NPsC, foi avaliada a influência do pH na intensidade de fluorescência dos nanomateriais obtidos (Figura II.19). Na amplitude de pH estudada, entre 1 e 12, verificou-se uma ligeira redução na intensidade de fluorescência dos NPsC a pH básico. No entanto, dadas as características ácido/base dos grupos funcionais presentes à superfície dos NPsC, foi possível observar a sua recuperação no retorno ao pH inicial.

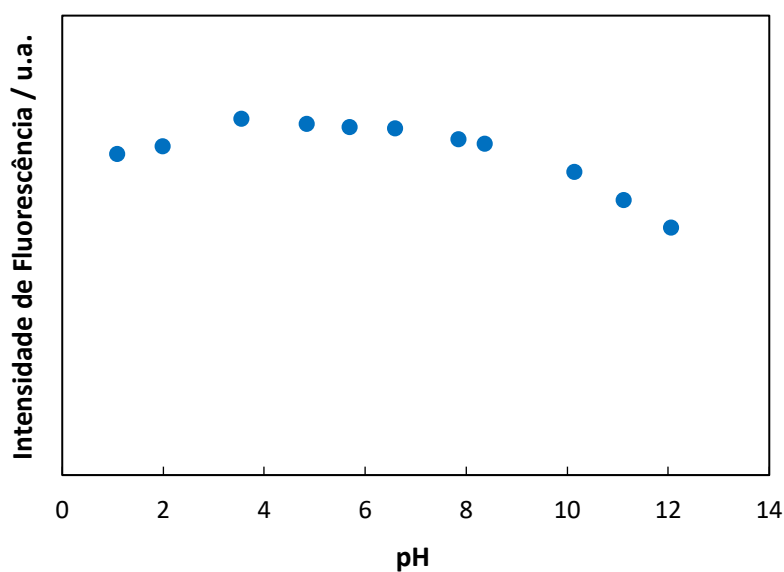


Figura II.19. Efeito do pH na intensidade de fluorescência de uma dispersão aquosa dos **NPsC-CHAC-XII** (0.1 mg.mL^{-1}).

Por fim, foi avaliada a fotoestabilidade dos NPsC em condições de irradiação contínua durante 1 hora ($\lambda_{\text{exc}} = 380 \text{ nm}$). Na Figura II.20 apresenta-se a sobreposição dos espectros de emissão dos NPsC obtidos, a partir dos quais foi verificado que a intensidade de fluorescência foi mantida, indicando a sua excelente fotoestabilidade.

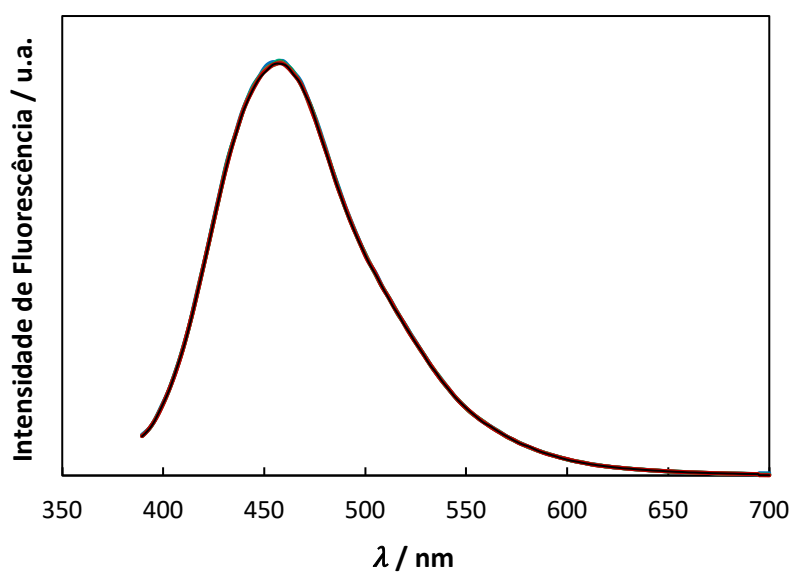


Figura II.20. Espectros de emissão de uma dispersão aquosa dos **NPsC-CHAC-XII** (0.1 mg.mL^{-1}), após 1 hora de irradiação contínua ($\lambda_{\text{exc}} = 380 \text{ nm}$).

II.4. AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DOS NANOPONTOS DE CARBONO

Conforme referido, a versatilidade das características dos NPsC permite a sua aplicação em áreas muito diversificadas, como as anteriormente apresentadas (*vide* Secção I.4).

No presente trabalho, após a síntese e caracterização estrutural dos NPsC obtidos por métodos de carbonização hidrotérmica a partir dos RST, foram avaliadas as propriedades antioxidantes e o seu potencial de aplicação como agentes antimicrobianos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Adicionalmente, foram realizados estudos relativamente à sua citotoxicidade celular, e subjacente aplicabilidade como marcadores celulares.

II.4.1. Propriedades Antioxidantes

A avaliação das propriedades antioxidantes de dispersões aquosas dos NPsC decorreu segundo o método de inibição do radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).^{107,108} Na Tabela II.17 apresentam-se os resultados para os NPsC obtidos em ensaios selecionados com base nas suas propriedades, expressos em equivalentes de trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico; ET) por unidade de massa de NPsC e em percentagem de inibição. A determinação da capacidade antioxidante do ácido ascórbico foi também analisada para efeitos comparativos.

Tabela II.17. Capacidade antioxidante, determinada pelo método de inibição do radical ABTS de dispersões aquosas de NPSC (5 mg.mL⁻¹), obtidos em ensaios selecionados.

Ensaio	Condições reacionais	Rendimento NPSC (%)	Sólidos (mg.mL ⁻¹)	Capacidade Antioxidante ^d	
				(µg ET/mg NPSC)	(%)
NPSC-CHAC-XII ^a	ED/RST = 0.08	17.6	7.03	65.2 ± 0.15	60.8
NPSC-CHAC-I ^a	ED/RST = 0.16	20.2	8.91	76.9 ± 1.83	72.0
NPSC-CHAC-XIII ^a	ED/RST = 0.32	28.9	14.31	74.8 ± 0.92	70.0
NPSC-CHAC-XVI ^b	ED/ácido cítrico = 0.16	34.9	13.69	97.6 ± 0.25	91.9
NPSC-CHMO-I ^c	ED/RST = 0.16, 15'	23.5	12.27	72.9 ± 1.12	68.2
NPSC-CHMO-III ^c	ED/RST = 0.16, 30'	26.3	11.43	76.4 ± 8.05	71.6
NPSC-CHMO-IV ^c	ED/RST = 0.16, 60'	24.3	12.10	80.0 ± 2.38	75.0
NPSC-CHMO-VII ^c	ED/RST = 0.32, 60'	36.4	13.65	78.1 ± 1.34	73.2

Condições reacionais: ^aRST 30 mg.mL⁻¹, 250 °C, 6 h, 180 rpm; ^bÁcido cítrico 30 mg.mL⁻¹, 250 °C, 6 h, 180 rpm; ^cRST 30 mg.mL⁻¹, 200 °C, 600 rpm; ^dÁcido ascórbico como controlo positivo: 100.8 ± 0.41 µg ET/mg (94.9 %)

Da comparação dos NPSC obtidos pelos métodos de síntese aplicados, verificou-se que, para os ensaios realizado em CHAC, a quantidade de ED exerce influência na sua capacidade antioxidante (60.8 % → 70.0 %). Em particular, para os ensaios em CHMO, esta capacidade demonstrou uma tendência proporcional ao tempo de reação (68.2 % → 75.0 %).

A avaliação da influência dos métodos de purificação aplicados ao ensaio **NPSC-CHAC-XIII** sugere que os NPSC isolados exibem uma capacidade antioxidante inferior. Os NPSC purificados por cromatografia com Sephadex G-75 e por diálise apresentaram uma capacidade antioxidante de 51.3 ± 3.88 e 54.0 ± 1.33 µg ET/mg NPSC. Esta redução pode dever-se à remoção de outros constituintes, que possam contribuir positivamente para as propriedades antioxidantes, considerando a heterogeneidade da mistura que constitui os NPSC.

Os PsC reportados por Roy *et al.*,⁷² obtidos hidrotermicamente a partir de folhas de curcuma, revelaram uma capacidade antioxidante entre 80-90 %, equiparando-se ao ensaio realizado com ácido cítrico (**NPSC-CHAC-XVI**) e ao controlo positivo (ácido ascórbico), sendo possível inferir que os NPSC derivados dos RST exibem uma capacidade antioxidante destacável, embora ligeiramente inferior.

II.4.2. Atividade Antimicrobiana

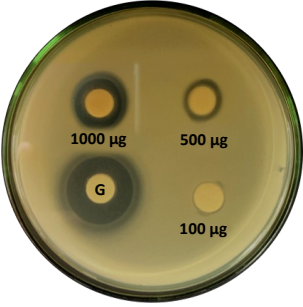
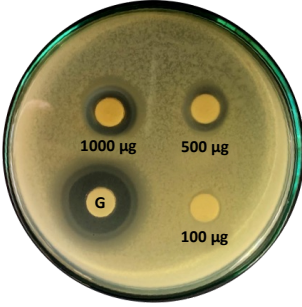
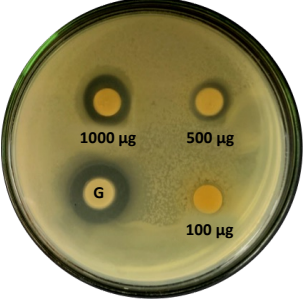
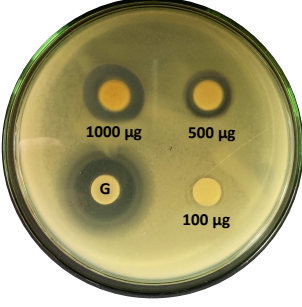
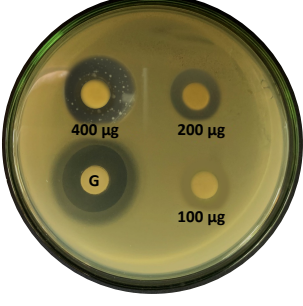
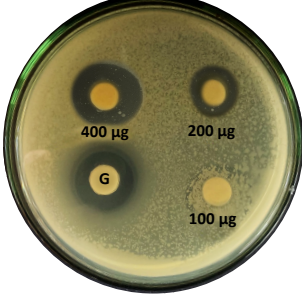
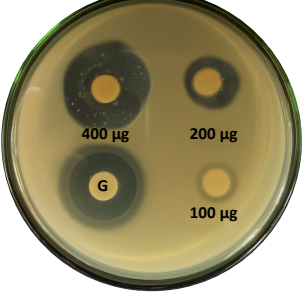
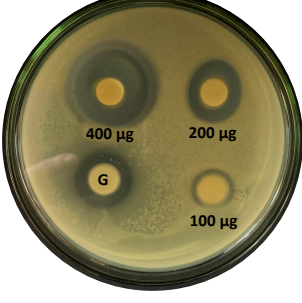
O estudo preliminar da potencial aplicação dos NPSC como agentes antimicrobianos contra duas estirpes bacterianas (*Escherichia coli* ATCC® 25922 (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 (Gram-positiva)) decorreu segundo uma técnica de sobreposição de *soft-agar*.^{109,110} Esta técnica permite avaliar o desempenho de dispersões aquosas dos NPSC como agentes antimicrobianos, através da medição dos halos de inibição formados. Adicionalmente, foi realizada a avaliação da atividade antimicrobiana através da determinação dos valores da concentração mínima inibitória (MIC) e da concentração mínima letal (MLC).¹¹¹

II.4.2.1. Ensaios de Difusão em Disco

De acordo com esta técnica, a atividade antimicrobiana dos NPSC foi avaliada através da interpretação visual dos halos de inibição do crescimento bacteriano em volta de discos impregnados com os NPSC e depositados na superfície do meio de cultura. A avaliação da atividade antimicrobiana dos NPSC surge da comparação com gentamicina, um antibiótico aminoglicosídeo ativo contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (controlo positivo). A água foi utilizada como controlo negativo destes ensaios.

Na Tabela II.18 encontram-se algumas das placas de Petri inoculadas e incubadas com discos contendo os NPSC obtidos em ensaios selecionados realizados por CHAC e por CHMO.

Tabela II.18. Atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus*, dos NPSC obtidos em ensaios selecionados: (a) NPSC-CHAC-I e (b) NPSC-CHAC-XIII (100, 500 e 1000 µg/disco); (c) NPSC-CHMO-IV e (d) NPSC-CHMO-VII (100, 200 e 400 µg/disco); Gentamicina (G; 10 µg/disco).

Ensaio	ED/RST	Espécie Bacteriana	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
NPSC-CHAC-I ^a	0.16		
NPSC-CHAC-XIII ^a	0.32		
NPSC-CHMO-IV ^b	0.16		
NPSC-CHMO-VII ^b	0.32		

Condições reacionais: ^aRST 30 mg.mL⁻¹, 250 °C, 6 h, 180 rpm; ^bRST 30 mg.mL⁻¹, 200 °C, 60', 600 rpm

Da análise da tabela, é possível identificar que os NPc inibem o crescimento bacteriano de uma forma dependente da massa presente nos discos. Em geral, verificou-se que os NPc obtidos por CHMO apresentam uma atividade antimicrobiana superior. Na Tabela II.19 apresentam-se os diâmetros de inibição do crescimento de *E. coli* e *S. aureus*, para todos os ensaios estudados.

Tabela II.19. Diâmetros de inibição do crescimento de *E. coli* e *S. aureus*, obtidos em ensaios de difusão em disco contendo NPc obtidos em ensaios selecionados.

Ensaio	Condições reacionais	Diâmetro de inibição (mm) ^d				
		100 µg/disco	200 µg/disco	400 µg/disco	500 µg/disco	1000 µg/disco
<i>E. coli</i>						
NPc-CHAC-I ^a	ED/RST = 0.16	*	–	–	13 ± 0.5	21 ± 1.0
NPc-CHAC-XIII ^a	ED/RST = 0.32	*	–	–	19 ± 0.5	23 ± 0.5
NPc-CHAC-XVI ^b	ED/ácido cítrico = 0.16	*	–	–	16 ± 1.0	19 ± 0.5
NPc-CHMO-I ^c	ED/RST = 0.16, 15'	*	22 ± 0.5	25 ± 1.0	–	–
NPc-CHMO-III ^c	ED/RST = 0.16, 30'	*	21 ± 0.5	24 ± 1.0	–	–
NPc-CHMO-IV ^c	ED/RST = 0.16, 60'	14 ± 1.0	23 ± 0.5	27 ± 0.5	–	–
NPc-CHMO-VII ^c	ED/RST = 0.32, 60'	12 ± 0.5	26 ± 1.0	33 ± 0.5	–	–
<i>S. aureus</i>						
NPc-CHAC-I ^a	ED/RST = 0.16	*	–	–	17 ± 1.0	22 ± 0.5
NPc-CHAC-XIII ^a	ED/RST = 0.32	*	–	–	17 ± 1.0	24 ± 0.5
NPc-CHAC-XVI ^b	ED/ácido cítrico = 0.16	*	–	–	13 ± 1.0	16 ± 0.5
NPc-CHMO-I ^c	ED/RST = 0.16, 15'	*	20 ± 0.5	23 ± 1.0	–	–
NPc-CHMO-III ^c	ED/RST = 0.16, 30'	*	22 ± 0.5	24 ± 0.5	–	–
NPc-CHMO-IV ^c	ED/RST = 0.16, 60'	*	22 ± 0.5	26 ± 0.5	–	–
NPc-CHMO-VII ^c	ED/RST = 0.32, 60'	13 ± 0.5	25 ± 0.5	31 ± 1.0	–	–

Condições reacionais: ^aRST 30 mg.mL⁻¹, 250 °C, 6 h, 180 rpm; ^bÁcido cítrico 30 mg.mL⁻¹, 250 °C, 6 h, 180 rpm; ^cRST 30 mg.mL⁻¹, 200 °C, 600 rpm; ^dGentamicina como controlo positivo (10 µg/disco): 27 ± 0.5 mm (*E. coli*) e 23 ± 0.5 mm (*S. aureus*); Não revelou atividade antimicrobiana (*); Não determinado (–)

Dos resultados obtidos, verificou-se que os NPsC revelaram inibição do crescimento das espécies bacterianas de forma não seletiva e bastante inferior à do antibiótico empregue como controlo. De referir ainda, que as bactérias em estudo demonstraram resistência à difusão de 100 µg da maioria dos NPsC sintetizados. De acordo com os valores de potencial ζ (*vide* Tabela II.16), é notória a correlação entre este parâmetro e a atividade antimicrobiana, onde se observou que uma carga superficial menos negativa, característica dos ensaios realizados por CHMO, contribuirá para a inibição das espécies bacterianas. Uma vez que, a pH fisiológico, a superfície das bactérias apresenta carga negativa, estima-se que ocorra uma fraca interação eletrostática entre os NPsC e a parede celular bacteriana, na sua forma direta. No entanto, os NPsC podem interagir com catiões bivalentes (*e.g.* Ca^{2+} e Mg^{2+}) presentes na membrana citoplasmática, provocando a sua destabilização com aumento de permeabilidade, lise e consequente morte celular.^{112,113}

Efetuando o estudo aos NPsC resultantes dos métodos de purificação aplicados ao ensaio **NPsC-CHAC-XIII** (ED/RST = 0.32, 250 °C, 6 h, 180 rpm), verificou-se que os NPsC isolados por cromatografia com Sephadex G-75 e por diálise apresentaram diâmetros de inibição médios de 21 ± 0.5 e 23 ± 0.5 mm, respetivamente, contra *E. coli* e *S. aureus* (1000 µg/disco). Os valores apresentados são indicativos de que o aumento da dispersividade conseguida com a aplicação dos métodos de purificação, não exerce uma influência significativa na atividade antimicrobiana.

II.4.2.2. Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Letal

De forma a avaliar quantitativamente a atividade antimicrobiana dos NPsC, determinaram-se a concentração mínima inibitória (MIC) e a concentração mínima letal (MLC). Para este propósito, seguiu-se um ensaio de microdiluição com inoculação das estirpes em meio líquido, utilizando resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido, sal de sódio) como agente marcador da viabilidade celular.¹¹¹ Na presença de células metabolicamente ativas, este agente é reduzido a resorufina, um composto que revela fluorescência.¹¹⁴

Para o efeito, foram selecionados os ensaios que se destacaram pela sua atividade antimicrobiana. Na Figura II.21 encontram-se representados os resultados para os NPSc obtidos no ensaio **NPSc-CHMO-VII** (ED/RST = 0.32, 200 °C, 60', 600 rpm), os quais se evidenciaram pela sua atividade antimicrobiana superior.

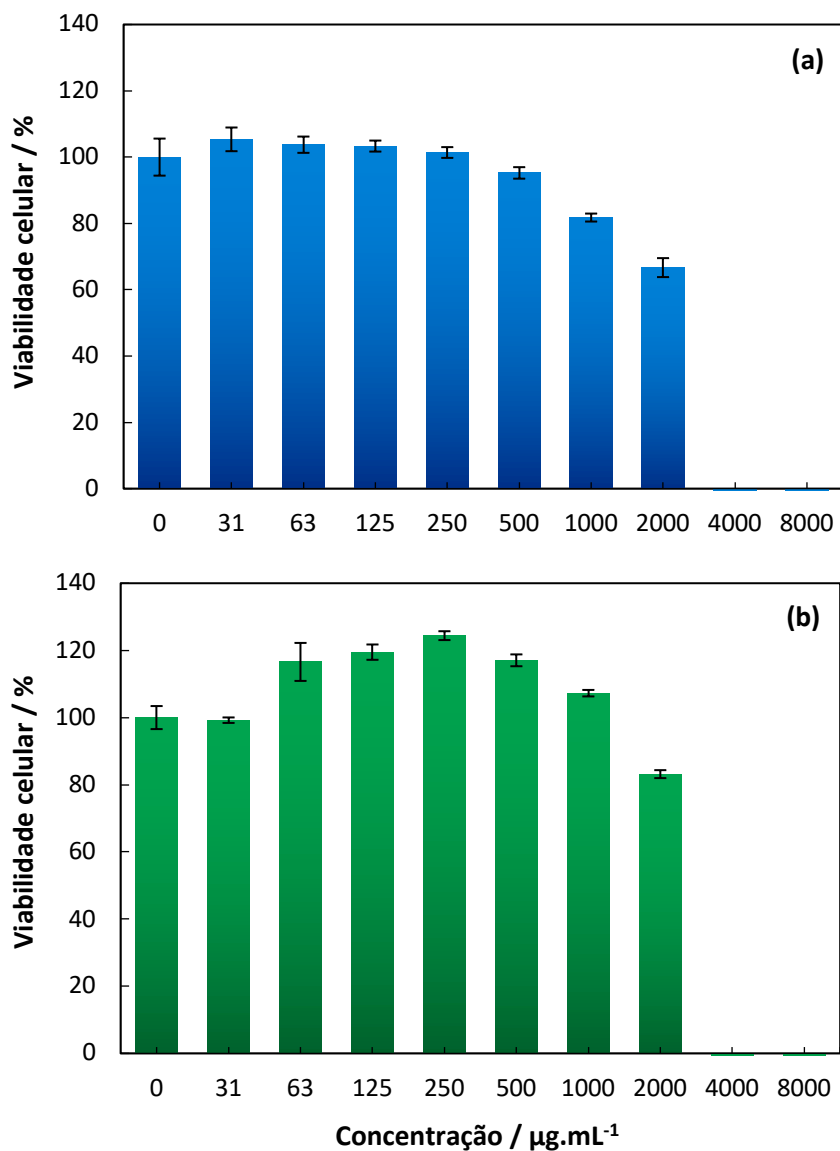


Figura II.21. Atividade antimicrobiana contra (a) *E. coli* e (b) *S. aureus*, dos NPSc-CHMO-VII a várias concentrações (31-8000 µg.mL⁻¹), expressa pelo decréscimo da viabilidade celular, determinada pelo método de microdiluição em meio líquido.

O valor MIC é definido como a concentração de agente antimicrobiano a partir da qual a viabilidade celular da espécie em estudo é inferior a 20 %, enquanto que o valor MLC indica a ausência de viabilidade celular (< 1 %).¹¹¹ Apesar de se apresentarem tipicamente como valores próximos, foi verificado para os **NPsC-CHMO-VII** um decréscimo brusco da viabilidade resultando em valores de MIC e MLC idênticos, sendo indicativo do seu mecanismo de atuação bactericida. Na Tabela II.20 apresentam-se os valores de MIC e MLC para as espécies bacterianas estudadas.

Tabela II.20. Valores MIC e MLC dos NPsC obtidos em ensaios selecionados, determinados pelo método de microdiluição em meio líquido para *E. coli* e *S. aureus*.

Ensaio	Condições reacionais	MIC ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		MLC ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Gentamicina	–	ND	ND	1000	500
NPsC-CHAC-I ^a	ED/RST = 0.16	> 8000	> 8000	ND	ND
NPsC-CHAC-XIII ^a	ED/RST = 0.32	> 8000	> 8000	ND	ND
NPsC-CHAC-XVI ^b	ED/ácido cítrico = 0.16	2000	2000	8000	8000
NPsC-CHMO-IV ^c	ED/RST = 0.16, 60'	ND	ND	8000	8000
NPsC-CHMO-VII ^c	ED/RST = 0.32, 60'	ND	ND	4000	4000

Condições reacionais: ^aRST 30 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 250 °C, 6 h, 180 rpm; ^bÁcido cítrico 30 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 250 °C, 6 h, 180 rpm; ^cRST 30 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 200 °C, 600 rpm; Não detetável (ND)

Dos resultados apresentados, conclui-se que os NPsC obtidos por CHMO são bactericidas contra *E. coli* e *S. aureus*. Para os NPsC obtidos por CHAC, verificou-se que o valor MIC não foi atingido no intervalo de concentrações estudado, indicando a necessidade de uma dose muito elevada (> 8000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) para ser alcançada inibição bacteriana.

Nanopontos de carbono de dimensões reduzidas derivados de sumo de limão, apresentaram valores de MLC inferiores (1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) aos dos NPsC do presente estudo.⁷¹ Ma *et al.*⁷⁰ obtiveram NPsC a partir de folhas de chá, que revelaram a inibição do crescimento de *E. coli* e *S. aureus* numa concentração de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, exibindo também melhores atividades antibacterianas, face aos NPsC sintetizados a partir de RST.

No entanto, estima-se que a tendência para a agregação dos NPsC derivados dos RST, identificada através de AFM (*vide* Figura II.14), tenha refletido a sua influência na atividade bactericida obtida, sendo conveniente em estudos futuros desta natureza, a garantia na sua desagregação prévia.

II.4.3. Citotoxicidade *in vitro*

A avaliação da citotoxicidade dos NPsC decorreu de acordo com um método colorimétrico, baseado na redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) a formazona por células vivas.^{115,116} A quantificação do efeito citotóxico decorreu através da avaliação da viabilidade de quatro linhas celulares após incubação com os NPsC, nomeadamente de células epiteliais renais de macaco verde africano (VERO ATCC® CCL-81), fibroblastos embrionários (NIH-3T3 ATCC® CRL-1658), células de sarcoma de murganho (S180 ATCC® TIB-66) e células tumorais do colo do útero de Henrietta Lacks (HeLa ATCC® CCL-2).

Na Figura II.22 são apresentados os resultados para os NPsC obtidos no ensaio **NPsC-CHAC-XII** (ED/RST = 0.08, 250 °C, 6 h, 180 rpm), os quais se destacaram pelas suas propriedades luminescentes.

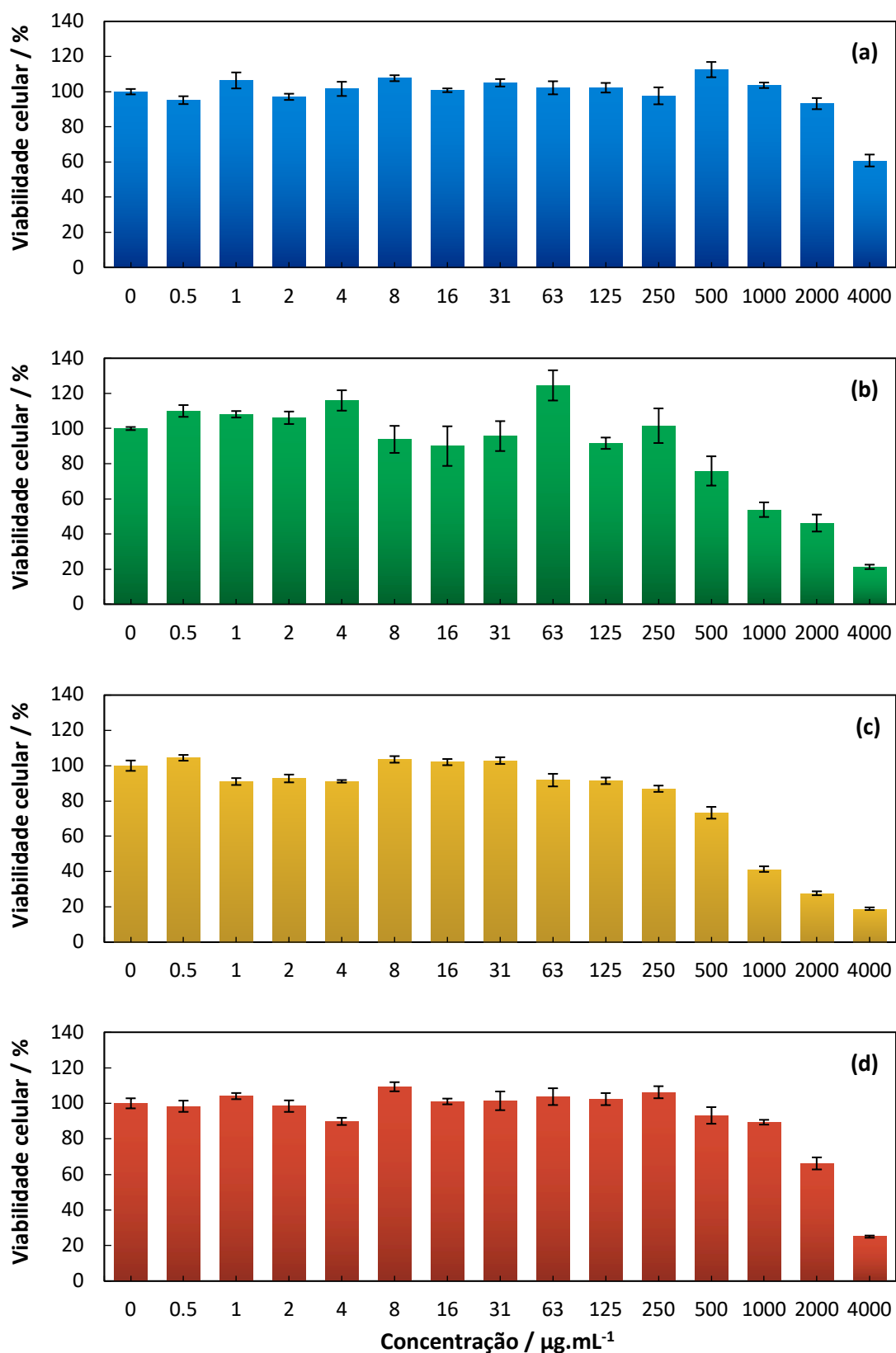


Figura II.22. Citotoxicidade celular contra as linhas celulares (a) VERO, (b) NIH-3T3, (c) S180 e (d) HeLa, dos NPsC-CHAC-XII a várias concentrações (0.5-4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), expressa pelo decréscimo da viabilidade celular, avaliada pelo método do MTT.

Um efeito é considerado citotóxico quando é verificada uma redução da viabilidade celular superior a 30 %, relativamente ao controlo negativo.¹¹⁷ Foi observado um decréscimo desta natureza, apenas para concentrações elevadas de NPc, revelando elevada biocompatibilidade para as células VERO até concentrações de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e para as células NIH-3T3 até 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Não obstante, as concentrações de NPc a partir das quais se verificou um efeito citotóxico excedem a gama típica de utilização em imagiologia, potenciando a sua aplicação como marcadores celulares. O mesmo efeito nas linhas celulares tumorais testadas demonstrou que ocorre morte significativa das células S180 para concentrações de NPc de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com um decréscimo na viabilidade celular de *ca.* 59 %. Para as células HeLa, este efeito foi verificado para concentrações de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com destruição de *ca.* 34 % das células.

Resultados adicionais sobre a citotoxicidade dos NPc, decorrentes dos métodos de purificação aplicados ao ensaio **NPc-CHAC-XIII** (ED/RST = 0.32, 250 °C, 6 h, 180 rpm), demonstraram que a aplicação dos NPc purificados por cromatografia com Sephadex G-75 e por diálise apresentaram, em geral, um efeito citotóxico superior (Tabela II.21), com exceção para as células VERO, que revelaram viabilidades celulares elevadas para a maior concentração de NPc estudada (4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Devido a limitações de quantidade dos NPc não purificados (**NPc-CHAC-XIII**), não foi realizada a análise comparativa entre estes e os nanomateriais purificados obtidos deste ensaio.

Tabela II.21. Efeito dos métodos de purificação na citotoxicidade, avaliada pelo método do MTT, contra as linhas celulares VERO, NIH-3T3, S180 e HeLa, dos NPc obtidos em ensaios selecionados.

Ensaio	Citotoxicidade ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	VERO	NIH-3T3	S180	HeLa
NPc-CHAC-XII^a	4000 (61 %)	1000 (48 %)	1000 (48 %)	2000 (66 %)
NPc-CHAC-XIII^b purificados por:				
Sephadex G-75	> 4000 (77 %)	1000 (70 %)	1000 (60 %)	0.5 (64 %)
Diálise	> 4000 (86 %)	2000 (63 %)	1000 (65 %)	500 (68 %)

Condições reacionais: RST 30 mg.mL^{-1} , ED/RST = ^a0.08 e ^b0.32, 250 °C, 6 h, 180 rpm

Os NPSC purificados por cromatografia com Sephadex G-75 revelaram um efeito citotóxico semelhante ao ensaio **NPSC-CHAC-XII**, para as células NIH-3T3 e S180. Já para a linha celular HeLa, ocorreu uma redução acentuada na viabilidade celular para baixas concentrações de NPSC ($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), demonstrando uma citotoxicidade bastante significativa.

A aplicação dos NPSC purificados por diálise revelou uma baixa citotoxicidade para todas as linhas celulares, equiparando-se à do ensaio **NPSC-CHAC-XII**. No entanto, a quantidade de aditivo superior ($0.08 \rightarrow 0.32$) poderá ter contribuído para o efeito citotóxico dos NPSC não purificados. Com exceção da adição dos NPSC purificados por cromatografia com Sephadex G-75 às células HeLa, o mesmo efeito foi verificado a uma concentração muito superior à tipicamente utilizada em aplicações (bio)sensoriais.

NPSC dopados com azoto, derivados de resíduos industriais do processamento do azeite, foram obtidos por Sousa *et al.*,⁶¹ com toxicidade mínima para células L929 a uma concentração de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, demonstraram biocompatibilidade para células animais semelhante à dos NPSC obtidos no presente trabalho.

Em estudos de toxicidade em células tumorais, Sousa *et al.*⁶¹ e Edison *et al.*⁶² referem níveis baixos de toxicidade dos NPSC dopados com azoto em células HeLa. No entanto, os NPSC derivados dos RST que foram purificados por cromatografia com Sephadex G-75, exibiram uma elevada citotoxicidade *in vitro* contra essa linha celular, tornando interessante a sua investigação aprofundada no tratamento de carcinomas.

II.4.4. Marcação Celular por Fluorescência

Tendo por base o estudo da citotoxicidade contra as linhas celulares referidas, foi de seguida testada a aplicação dos NPSC como marcadores celulares. Estes nanomateriais destacam-se relativamente aos fluoróforos orgânicos e inorgânicos atualmente utilizados, devido à sua excelente fotoestabilidade e baixa toxicidade.³⁴ Assim, o estudo de imagem *in vitro* decorreu através da avaliação da fluorescência num microscópio invertido, após incubação dos **NPSC-CHAC-XII** (ED/RST = 0.08, 250 °C, 6 h, 180 rpm) com células VERO, NIH-3T3, S180 e HeLa. Para o efeito foram selecionados os nanomateriais que exibiram melhor rendimento quântico de fluorescência e anteriormente utilizados nos estudos de citotoxicidade. A avaliação de luminescência intracelular dos NPSC

foi efetuada com excitação nas regiões do azul (330-385 nm), verde (460-490 nm) e vermelho (510-550 nm), e confrontada com células na ausência de NPc (controle).

Para as células VERO, as fotografias de fluorescência após incubação com os NPc encontram-se apresentadas na Figura II.23. As imagens obtidas demonstram a internalização dos NPc pelas células, encontrando-se maioritariamente distribuídos no citoplasma. No entanto, é também verificada a presença inferior de fluorescência na região perinuclear, indicando que os NPc permitem a identificação de várias estruturas subcelulares.

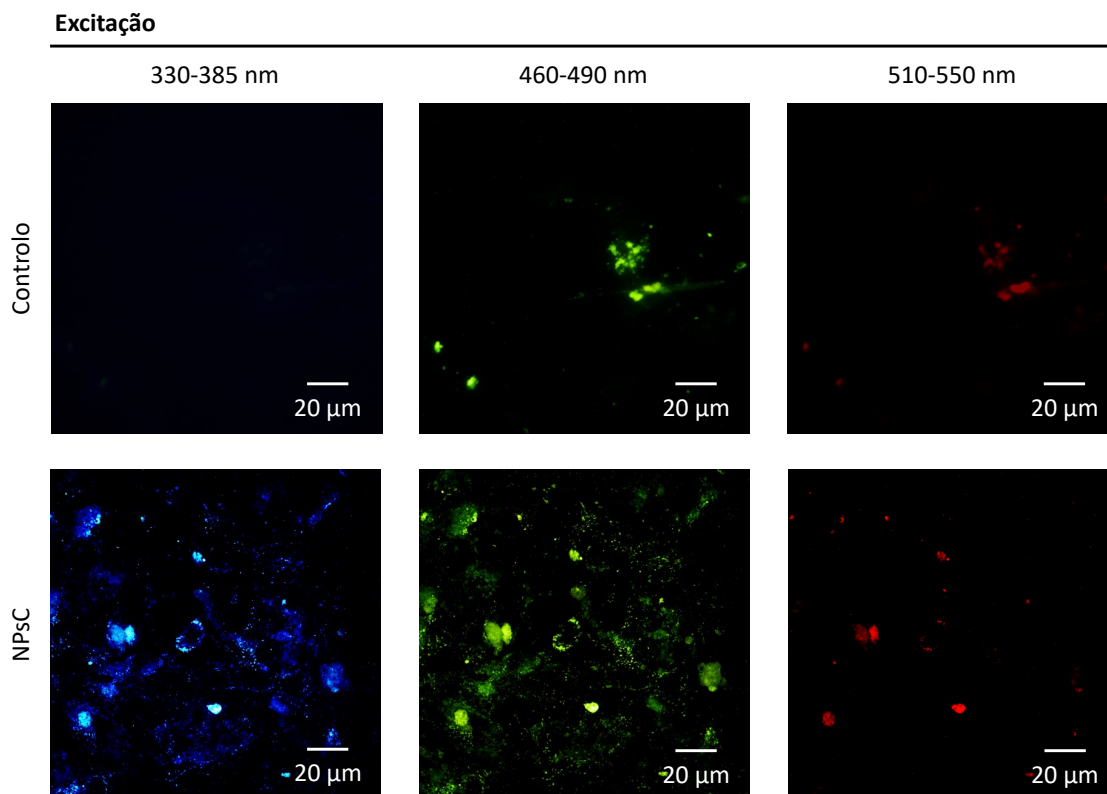


Figura II.23. Microscopia de fluorescência de células VERO após incubação com uma dispersão aquosa dos NPc-CHAC-XII ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$), ampliação 400 \times .

Na Figura II.24 apresentam-se as imagens de fluorescência para as células NIH-3T3, onde se verificou igualmente a internalização dos NPc. Em particular, note-se que os NPc encontram-se também localizados na região perinuclear e no citoplasma, sendo demonstrada uma boa permeabilidade por parte das células viáveis. No entanto, a presença relativa dos NPc no interior das células é inferior à internalização detetada nas células VERO, dada a sua presença extracelular abundante.

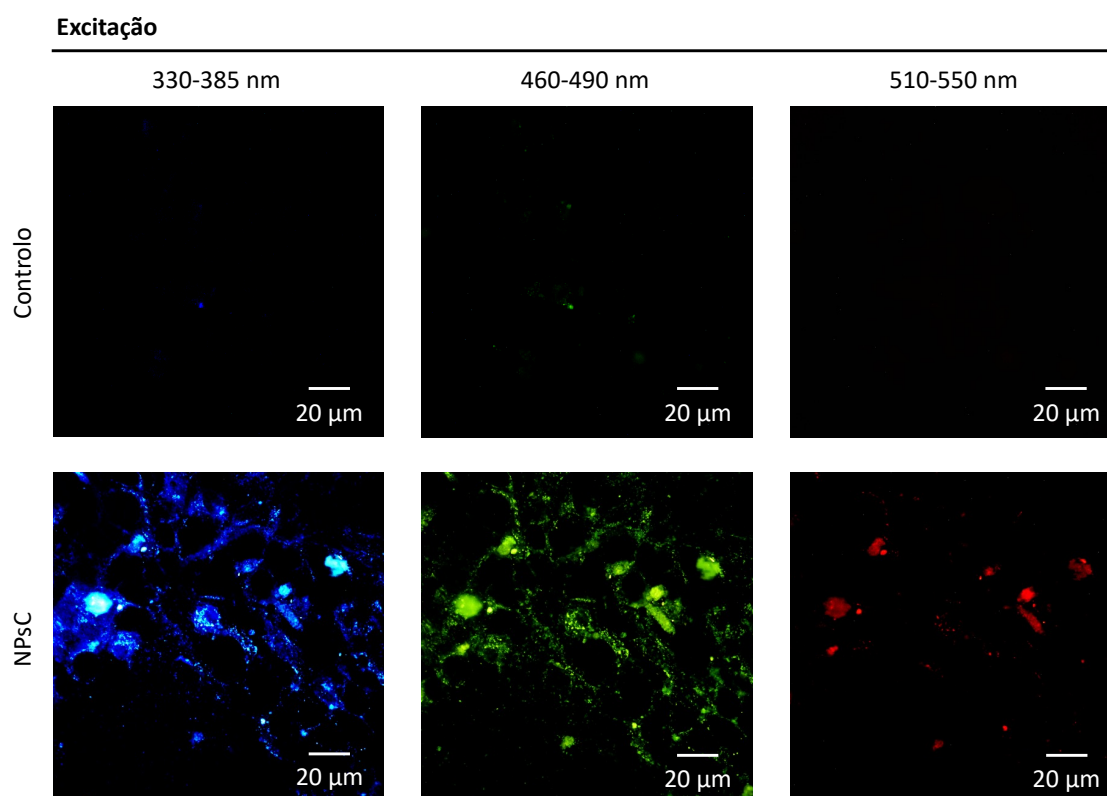


Figura II.24. Microscopia de fluorescência de células NIH-3T3 após incubação com uma dispersão aquosa dos NPcC-CHAC-XII ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), ampliação 400 \times .

De seguida, apresentam-se as fotografias de fluorescência para as células S180 após incubação com os NPcC (Figura II.25). Da avaliação das imagens obtidas, verificou-se que a aplicação dos NPcC resultou numa fluorescência uniforme e concentrada na região da membrana citoplasmática. Da comparação com as restantes linhas celulares apresentadas, observou-se a presença dos NPcC totalmente internalizados, demonstrando uma ótima permeabilidade das células que se encontram metabolicamente ativas.

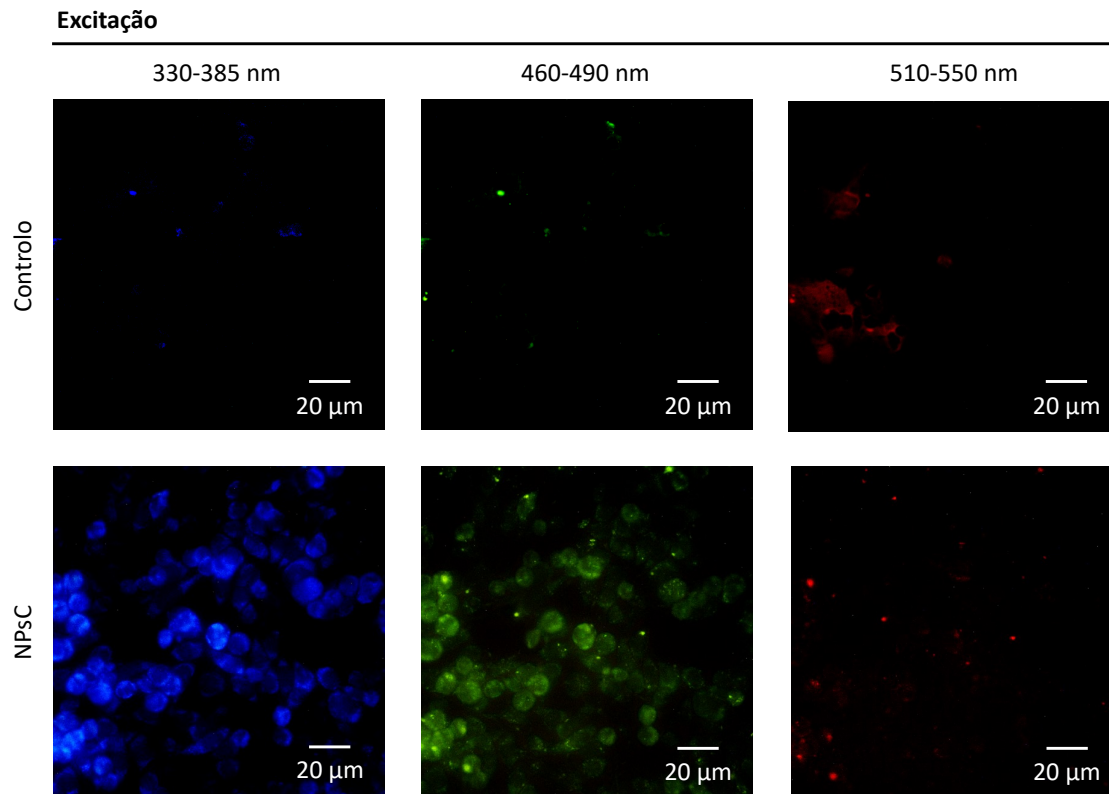


Figura II.25. Microscopia de fluorescência de células S180 após incubação com uma dispersão aquosa dos NPsC-CHAC-XII ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), ampliação 400 \times .

Por último, são apresentados na Figura II.26 os resultados obtidos para as células HeLa, após incubação dos NPsC. Neste caso, foi registado a sua interação com as células viáveis, alocando-se os NPsC maioritariamente na região do retículo endoplasmático, e em menor proporção na região perinuclear.

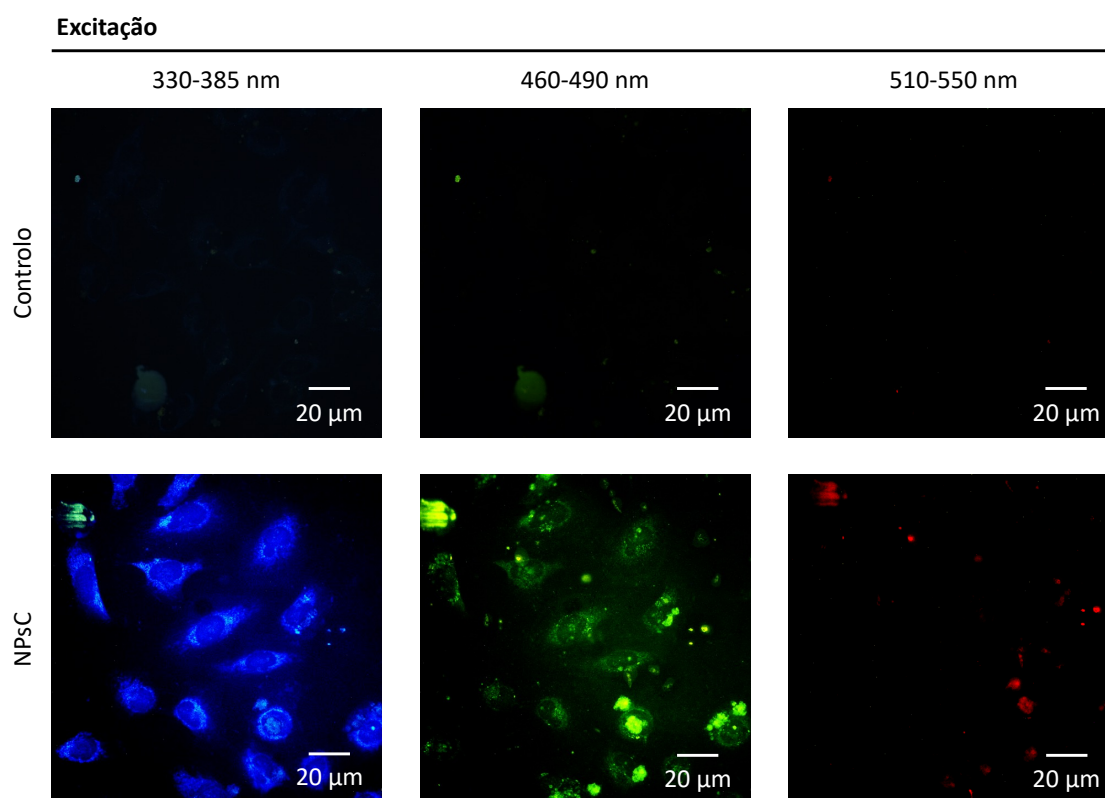


Figura II.26. Microscopia de fluorescência de células HeLa após incubação com uma dispersão aquosa dos NPsC-CHAC-XII ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$), ampliação 400 \times .

Da totalidade dos resultados apresentados, conclui-se que a identificação de diversas regiões celulares foi alcançada, com recurso às propriedades luminescentes dos NPsC. Apesar da sua fluorescência moderada, os NPsC revelaram, em geral, uma boa capacidade de marcação por fluorescência, demonstrando a sua potencial aplicação em imagem celular, complementada pela sua baixa toxicidade. Adicionalmente, a emissão sintonizável oferece uma vantagem adicional relativamente a outros fluoróforos, resultante da forte dependência do comprimento de onda de excitação anteriormente referida.

Estudos reportados na literatura sugerem a internalização de NPsC em células animais e tumorais, encontrando-se geralmente localizados de forma não específica na membrana celular, no citoplasma ou em ambos. Desta forma, a visualização de diversas regiões subcelulares é conseguida, demonstrando que os NPsC obtidos neste trabalho apresentam um desempenho idêntico ao de outros nanomateriais desta natureza.⁵⁹

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. PREÂMBULO

Neste Capítulo serão apresentados todos os reagentes utilizados, assim como as técnicas gerais e equipamento inerentes à execução do trabalho experimental. Constará ainda a descrição de todos os métodos de caracterização dos RST, da síntese e purificação dos NPsC, e das técnicas de avaliação da bioatividade dos NPsC.

Assim, o presente Capítulo inclui as seguintes Secções:

III.2. Reagentes, Material Biológico, Técnicas Gerais e Equipamento

III.3. Caracterização dos RST

III.4. Síntese e Purificação dos NPsC

III.5. Avaliação da Bioatividade dos NPsC

III.2. REAGENTES, MATERIAL BIOLÓGICO, TÉCNICAS GERAIS E EQUIPAMENTO

Os reagentes/solventes utilizados nas etapas de caracterização, síntese e purificação possuem pureza analítica e foram utilizados na forma em que foram recebidos. Os RST foram recolhidos de uma indústria portuguesa de transformação do tomate, a Sugal Portugal, S.A., nas instalações da Azambuja em setembro de 2021.

Os ensaios de síntese dos NPsC por carbonização hidrotérmica através de aquecimento convencional (CHAC) decorreram em reator de alta-pressão com vaso em aço inox da marca PARR, modelo 4560, com capacidade de 300 mL e controlado com sensores e controladores de pressão, temperatura e agitação também da marca PARR, modelo 4843. A síntese por carbonização hidrotérmica assistida por radiação micro-ondas (CHMO) foi realizada com recurso a um reator micro-ondas monomodo da marca Anton Paar, modelo Monowave 300, em tubos de *pyrex* com capacidade variável entre 10 e 30 mL.

As misturas reacionais obtidas, a jusante da etapa de síntese, foram filtradas por membrana de celulose regenerada com tamanho de poro de 0.2 μm . Dada a diferença de escala entre os dois métodos de síntese, foram utilizadas membranas de filtração (Whatman®, RC58) e filtros de seringa (Whatman®, Spartan) para CHAC e CHMO, respetivamente.

As determinações de pH durante a caracterização e síntese foram realizadas num aparelho de pH VWR, modelo UM 6100L.

Os espectros de ultravioleta-visível (UV-Vis) foram traçados num espectrofotómetro de UV-Vis Jasco V-750. Os reagentes e concentrações aplicadas em cada estudo encontram-se descritos em cada análise efetuada.

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos num espectrofotómetro Brüker Vertex 70 com uma resolução de 2 cm^{-1} , sendo as amostras suportadas em pastilhas de brometo de potássio (KBr).

Os espectros de fluorescência no estado estacionário foram traçados num espectrofluorímetro PerkinElmer LS45, a 20 °C, utilizando uma geometria a 90° e células de quartzo de 1 cm.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de protão (RMN ^1H , 300 e 400 MHz) foram realizados no espectrofotómetro Brüker AVANCE II+, utilizando D_2O como solvente.

As determinações do potencial ζ foram realizadas num equipamento de análise Malvern ZetaSizer Nanoseries, a 20 °C, utilizando as condições otimizadas resultantes do procedimento automático do equipamento.

A caracterização morfológica decorreu da interpretação das imagens topográficas e secções de corte transversal obtidas através de um microscópio de força atómica (AFM) Nanosurf NaioAFM em modo de força dinâmica, em área variável.

As análises elementares (AE) foram efetuadas no Serviço de Microanálise (C.A.C.T.I.) da Universidade de Vigo.

Os rendimentos quânticos de fluorescência foram determinados em água Millipore®, com recurso ao método do declive,¹¹⁸ utilizando como padrão sulfato de quinino (> 98 %, Fluka) em 0.1 M H₂SO₄ ($\Phi_F = 0.54$,¹¹⁹ com geometria a 90°).

A atividade antimicrobiana foi avaliada com recurso às espécies microbianas *Escherichia coli* ATCC® 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, manuseadas numa câmara de segurança biológica SafeFAST Classic 209.

As culturas de pré-inóculo dos microrganismos foram crescidas numa incubadora com agitação orbital Gallenkamp 10X 400, a 37 °C e 180 rpm. A incubação das culturas inoculadas em placa de Petri decorreu numa estufa Memmert BP 600, a 37 °C.

A interpretação dos resultados incluiu a comparação da atividade antimicrobiana para os diversos NPsC, utilizando gentamicina (Sigma-Aldrich) como controlo positivo. Para a determinação das concentrações mínima inibitória (MIC) e mínima letal (MLC) foi utilizada resazurina (> 85 %, Tokyo Chemical Industry) como agente indicador da viabilidade celular. A preparação das soluções de antibiótico em água desionizada e de resazurina em 1× PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) foram filtradas em membrana Filter-Lab® PES com diâmetro de poro de 0.22 μm .

A determinação dos valores MIC e MLC foi realizada através do registo da intensidade de fluorescência num Fluorímetro BMG LABTECH FLUOstar OPTIMA.

A atividade antioxidante foi avaliada através de leituras de absorvância num leitor de microplacas Bio-Rad 680.

Os ensaios *in vitro* de avaliação da citotoxicidade foram efetuados no Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT-NOVA), com recurso a diversas linhas celulares animais, entre elas, células epiteliais renais de macaco verde africano (VERO ATCC® CCL-81), fibroblastos embrionários de murganho (NIH-3T3 ATCC® CRL-1658) e células de sarcoma de murganho (S180 ATCC® TIB-66), bem como células tumorais do colo do útero (HeLa ATCC® CCL-2).

A determinação das concentrações celulares foi realizada numa câmara de contagem *Neubauer Improved*, através do método de exclusão do corante azul de tripano (GIBCO®, Thermo Fisher Scientific) utilizando um microscópio óptico invertido OLYMPUS CK2.

A incubação das microplacas decorreu numa estufa Heraeus HERAcCell 240, a 37 °C sob atmosfera humidificada de 5 % CO₂. A determinação da citotoxicidade foi efetuada através de leituras de absorvância num leitor de microplacas TECAN Infinite M200 PRO, utilizando MTT (> 98 %, PanReac) como agente indicador da viabilidade celular. A sua preparação inclui a dissolução em 1× PBS, e filtração em membrana Filter-Lab® PES com diâmetro de poro de 0.22 µm.

As imagens das linhas celulares estudadas foram adquiridas num microscópio de fluorescência invertido OLYMPUS BX51, utilizando filtros de excitação de 330-385 nm, 460-490 nm e 510-550 nm para a recolha de fotografias nas regiões do azul, verde e vermelho, respetivamente.

III.3. CARACTERIZAÇÃO DOS RST

III.3.1. Extração em Soxhlet

A caracterização dos RST foi efetuada com recurso a amostras do extrato aquoso obtido após extração em Soxhlet com 25 g de amostra extratada em 300 mL de água Millipore® durante 5 horas.

III.3.2. Quantificação de Sólidos Totais

A quantificação de sólidos totais nos RST foi efetuada através da evaporação de uma amostra de 100 mL à secura, sendo o resíduo resultante seco sob vácuo a 105 °C durante *ca.* 12-24 horas. A determinação de sólidos totais nos RST foi realizada em triplicado.

III.3.3. Quantificação de Compostos Fenólicos Totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu.^{88,89} Adicionou-se 1.5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (10 % v/v) a uma alíquota de 200 µL de extrato aquoso (previamente diluído). Após 5 minutos de incubação, adicionaram-se 1.5 mL de NaHCO₃ (60 g/L) e incubou-se a 90 minutos, a 25 °C. Após esse período, procedeu-se à leitura da absorvância a 725 nm. O conteúdo de compostos fenólicos foi quantificado com recurso a padrões de ácido gálico (> 97.5 %, Sigma-Aldrich) e ácido tânico recristalizado, numa gama e concentrações de 0-250 µg.mL⁻¹. A determinação de compostos fenólicos no extrato aquoso dos RST foi realizada em triplicado, e o controlo negativo foi efetuado com água Millipore®.

III.3.4. Quantificação de Flavonóides Totais

A determinação de flavonóides no extrato aquoso dos RST foi efetuada por um método espectrofotométrico⁹², baseado na formação de complexos entre os flavonóides e o alumínio. A uma alíquota de 1 mL de extrato aquoso de RST (previamente diluída), adicionaram-se 0.5 mL de uma solução de AlCl₃ (2 % m/v) e 0.5 mL de água Millipore®. Após agitação e incubação durante 10 minutos, a 25 °C, procedeu-se à leitura da absorvância a 427 nm. A quantificação de flavonóides foi efetuada com recurso a padrões de quercetina recristalizada, numa gama de concentrações de 0-100 µg.mL⁻¹. As leituras referentes ao extrato aquoso dos RST foram realizadas em triplicado, e o controlo negativo foi efetuado com água Millipore®.

III.3.5. Quantificação de Carbo-hidratos Totais

A quantificação dos açúcares totais foi efetuada com recurso a um método colorimétrico adaptado da literatura,⁹³ onde se verifica que os carbo-hidratos após tratamento com fenol e ácido sulfúrico concentrado sofrem redução, exibindo uma coloração amarelo-laranja estável. A uma alíquota de 0.5 mL do extrato aquoso dos RST (previamente diluída) adicionaram-se 0.5 mL de uma solução de fenol (80 % m/m). De seguida, adicionaram-se, rapidamente, 2.5 mL de H₂SO₄ a 96 % sobre a superfície da solução, sendo a solução resultante agitada vigorosamente e deixada em repouso durante 25 minutos, a 25 °C.

Decorrido esse período, procedeu-se à leitura da absorvância a 488 nm. O conteúdo de açúcares totais foi quantificado utilizando β -D-glucose (98 %, Alfa Aesar) como padrão, numa gama de concentrações de 0-50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. As leituras referentes ao extrato aquoso dos RST foram realizadas em triplicado, e o controlo negativo foi efetuado com água Millipore®.

III.3.6. Quantificação de Proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford,⁹⁶ utilizando o azul brilhante de Coomassie como reagente, que quando em contacto com proteínas, altera a cor castanha-avermelhada para azul intenso. A uma alíquota de 1 mL de extrato aquoso dos RST (previamente diluída) adicionou-se 1 mL de solução de azul brilhante de Coomassie (G250 \geq 0.06 % (m/m) em HCl (0.6 N); Bio-Rad), agitou-se e deixou-se em repouso durante 2 minutos. Após esse período, procedeu-se à leitura da absorvância a 620 nm. O teor em proteínas foi quantificado utilizando BSA (*Bovine Serum Albumin*; Acros Organics) como padrão, numa gama de concentrações de 0-25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. As leituras referentes ao extrato aquoso dos RST foram realizadas em triplicado, e o controlo negativo foi efetuado com água Millipore®.

III.3.7. Quantificação de Cloretos

A determinação de cloretos no extrato aquoso dos RST decorreu segundo o método do Mohr.⁹⁴ A uma alíquota de 10 mL foi adicionada 1 mL de K_2CrO_4 (5 % m/m). Efetuou-se a titulação com AgNO_3 0.1 M, até ao aparecimento permanente da cor vermelha resultante da formação de $\text{Ag}_2\text{Cr}_2\text{O}_4$. O ensaio para a determinação do conteúdo em cloretos nos RST foi efetuado em triplicado.

III.3.8. Quantificação de Nitratos

A uma alíquota de 100 μL de extrato aquoso dos RST (previamente diluída) adicionaram-se 0.4 mL de uma solução de ácido salicílico 5 % (m/v) em H_2SO_4 , sendo a solução resultante agitada e deixada em repouso à t.a. durante 20 minutos. Após esse período, adicionaram-se 9.5 mL de NaOH 2 N, agitou-se e procedeu-se à leitura da absorvância a 415 nm.⁹⁸

A quantificação de nitratos foi efetuada com recurso a padrões de NaNO_3 , numa gama de concentrações de $0\text{-}250 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As leituras referentes ao extrato aquoso dos RST foram realizadas em triplicado, e o controlo negativo foi efetuado com água Millipore®.

III.3.9. Quantificação de Lípidos

Para a quantificação do teor de lípidos nos RST foi realizada uma extração em Soxhlet de 25 g de RST em 300 mL de *n*-hexano, durante 5 horas. Decorrido esse período e após arrefecimento, o extrato resultante foi seco com MgSO_4 , filtrado por gravidade, evaporado a $T < 40 \text{ }^\circ\text{C}$ e seco sob vácuo a $40 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo o produto resultante quantificado. O ensaio para a determinação do conteúdo em lípidos nos RST foi efetuado em duplicado.

III.3.10. Quantificação de Cinzas

Os cadinhos de porcelana, previamente secos a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ durante uma hora, foram colocados na mufla a $575 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 4 horas. De seguida, foram arrefecidos num exsiccador até à t.a., e pesados. A cada cadinho foi adicionada uma quantidade conhecida de amostra (RST ou NPc), levou-se à ignição à chama e colocou-se na mufla a $575 \text{ }^\circ\text{C}$ durante *ca.* 12-24 horas. Decorrido esse período, foram arrefecidos num exsiccador até peso constante e o resíduo quantificado. Os ensaios para a determinação do conteúdo em cinzas nos RST e nos NPc foram efetuados em triplicado.

III.4. SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DOS NPc

A síntese dos NPc a partir dos RST foi efetuada através de carbonização hidrotérmica com recurso a duas estratégias de aquecimento, sendo elas o aquecimento convencional (CHAC) em reator de alta-pressão, e radiação micro-ondas (CHMO), num reator monomodo.

III.4.1. Síntese dos NPsC por CHAC

Num reator de aço inox de alta-pressão, foram colocadas *ca.* 4 g dos RST em 120 mL de água Millipore®, mediu-se o pH inicial da mistura reacional e adicionou-se o aditivo (quantidade variável), sendo novamente registado o pH. De seguida, o reator foi devidamente selado e as condições do ensaio selecionadas. Os aditivos em estudo incluem ED (> 99.5 %, Fluka), DET (99 %, Aldrich), melamina (99 %, Acros Organics), ureia recristalizada e *p*-FD (> 97 %, Fluka). As condições reacionais aplicadas encontram-se descritas na Secção II.3.1.1.

Foi ainda realizado um ensaio de referência (**NPsC-CHAC-XVI**), onde foram colocadas *ca.* 4 g de ácido cítrico (> 99.5 %, Sigma-Aldrich) em 120 mL de água Millipore®, mediu-se o pH inicial da mistura reacional e adicionaram-se 710 µL de ED como aditivo, correspondendo a um rácio mássico ED/ácido cítrico de 0.16, sendo novamente registado o pH. De seguida, o reator foi devidamente selado e selecionadas as condições do ensaio de 250 °C e 6 horas, com velocidade de agitação de 180 rpm.

III.4.2. Síntese dos NPsC por CHMO

Num tubo *pyrex*, foram colocadas tipicamente *ca.* 450 mg dos RST em 15 mL de água Millipore®, registou-se o pH inicial da mistura reacional, e adicionou-se o aditivo (quantidade variável), sendo novamente medido o pH. De seguida, foi adicionada uma barra magnética e o tubo foi selado com septo de *teflon* e colocado no reator de micro-ondas, sendo as condições do ensaio selecionadas. Os aditivos em estudo incluem os supracitados (*cf.* referidos para os ensaios de síntese por CHAC). As condições reacionais aplicadas encontram-se descritas na Secção II.3.1.2.

III.4.3. Isolamento e Purificação dos NPsC por Extração Líquido-Líquido

Após arrefecimento, foi registado o pH das misturas reacionais, sofrendo estas uma etapa de isolamento por filtração por membrana de celulose regenerada (CHAC) e por filtro de seringa (CHMO), com diâmetro de poro de 0.2 µm. O resíduo de filtração foi quantificado após secagem a 105 °C durante *ca.* 12-24 horas.

Os filtrados obtidos através dos ensaios de síntese por CHAC (*ca.* 110 mL) sofreram uma etapa de purificação com duas porções de 100 mL de CH₂Cl₂, seguida de duas porções de 100 mL de AcOEt. Adicionalmente, foi efetuada a remoção de solvente orgânico em presença residual através de evaporação, sendo a dispersão aquosa resultante armazenada em atmosfera inerte, a 4 °C. As fases orgânicas recolhidas nas etapas de purificação e clarificação sofreram evaporação e secagem a 105 °C, sendo quantificadas.

As misturas reacionais resultantes dos ensaios de síntese por CHMO sofreram um processo de purificação equivalente, onde apenas foi ajustada a proporção de solventes orgânicos nas etapas de purificação.

III.4.4. Purificação dos NPsC por Sephadex G-75

Uma amostra de 1 mL de **NPsC-CHAC-XIII** foi carregada numa coluna de cromatografia previamente preparada com Sephadex G-75 (Pharmacia Fine Chemicals), sendo recolhidas várias frações, que foram controladas através dos seus espetros de emissão de fluorescência (*cf.* descrição seguinte).

Previamente, *ca.* 6 mg de Sephadex G-75 foram suspensos em 300 mL de água Millipore®, sendo aquecida a 90 °C, com agitação, durante 3 horas. A suspensão foi mantida em repouso durante 5 dias. Recolheu-se o sobrenadante e lavou-se o gel com água Millipore® (três vezes) em banho de ultrassons. Transferiu-se o gel para uma coluna cromatográfica (*d* = 2.6 cm; *h* = 40 cm) e deixou-se repousar durante *ca.* 24 horas. Após a eluição, o enchimento foi reutilizado após sucessivas lavagens com água Millipore® (controlo da eficiência da lavagem recorrendo a leituras da intensidade de fluorescência do eluato).

III.4.5. Purificação dos NPsC por Diálise

Uma amostra de 6 mL de **NPsC-CHAC-XIII** foi carregada numa membrana Spectra/Por® 6 com *cut-off* de 1000 Da, procedendo ao processo de purificação contra 500 mL água Millipore® durante 4 dias, com recolha diária do permeado, sendo estas concentradas até *ca.* 20 mL. A eficiência da purificação foi controlada recorrendo a leituras da intensidade de fluorescência das frações de permeado, bem como do retentado.

III.5. AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DOS NPSC

A bioatividade dos NPSC foi avaliada através da quantificação das suas propriedades antioxidantes e atividade antimicrobiana. Foi ainda avaliado o efeito citotóxico dos NPSC em células animais.

III.5.1. Avaliação das Propriedades Antioxidantes

A avaliação da atividade antioxidante foi efetuada pelo método de inibição do radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico); 98 %, Sigma-Aldrich),^{107,108} baseado na redução da espécie catiónica, de coloração azul, à sua forma não radicalar, verificada pelo desaparecimento de cor. Numa microplaca de 96 poços Thermo Fisher Scientific, foram adicionados 290 µL de uma solução de radical ABTS (7 mM contendo 2.5 mM K₂S₂O₈ em água, ajustada à unidade de absorvância a 655 nm) e 10 µL de NPSC (massa variável), ou ácido ascórbico (> 99.7 %, Merck) como controlo. Após repouso durante 5 minutos, procedeu-se à leitura da absorvância a 655 nm. A quantificação da atividade antioxidante foi efetuada com recurso a padrões de trolox(ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) (97 %, Acros Organics), numa gama de concentrações de 0-1 mg.mL⁻¹. As leituras referentes aos ensaios foram realizadas em triplicado, e o controlo negativo foi efetuado com água desionizada.

III.5.2. Avaliação da Atividade Antimicrobiana

A determinação da atividade antimicrobiana dos NPSC decorreu através de uma adaptação do método de Kirby-Bauer.^{109,110} A inoculação das espécies microbianas (*E. coli* e *S. aureus*) obedeceu às normas M100 do CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*),¹²⁰ onde são descritos os procedimentos de preparação do pré-inóculo em meio MHB (*Mueller-Hinton Broth*; Oxoid), com ajuste da turbidez ao padrão 0.5 de McFarland (1.5×10⁸ CFU/mL; Liofilchem) após incubação *overnight*, a 37 °C e 180 rpm. A inoculação das suspensões celulares foi efetuada em meio MHS (*Mueller-Hinton Soft*), constituído por MHB suplementado com 0.5 % (m/v) de Agar Técnico (Oxoid), com deposição em placa de Petri sobre MHA (*Mueller-Hinton Agar*; Scharlau).

A atividade antimicrobiana foi efetuada através da técnica de suscetibilidade à difusão em disco de 9 mm, com impregnação com 50 µL dos NPsC (massa variável), gentamicina como controlo positivo (10 µg/disco) e água desionizada como controlo negativo (previamente esterilizada). O registo e análise dos resultados decorreu após um período de incubação *ca.* 18 horas a 37 °C.

Adicionalmente, a determinação dos valores MIC e MLC foi efetuada por um método colorimétrico de microdiluição em meio líquido,¹¹¹ baseado na redução de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido, sal de sódio) a resorufina por parte das células vivas,¹¹⁴ e seguindo as etapas prévias de preparação dos pré-inóculos das mesmas espécies microbianas. Numa microplaca de 96 poços estéril (VWR), foram adicionados 100 µL de suspensão celular previamente ajustada a 5×10^5 CFU/mL e 100 µL de NPsC (massa variável) a cada poço, com incubação *ca.* 18 horas a 37 °C. Após este período, adicionaram-se 20 µL/poço de uma solução 0.01 % (m/v) de resazurina em 1× PBS, pH 7.2 (previamente filtrada), seguindo-se uma re-incubação a 37 °C durante *ca.* 1-2 horas para interpretação visual dos resultados e leitura da intensidade de fluorescência ($\lambda_{exc} = 550$ nm, $\lambda_{em} = 650$ nm), utilizando-se como controlo negativo água desionizada (previamente esterilizada).

III.5.3. Avaliação da Citotoxicidade *in vitro*

A determinação da citotoxicidade dos NPsC *in vitro*, por quantificação da viabilidade celular, foi efetuada com recurso a uma adaptação do método colorimétrico do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), baseado na sua redução a formazona por parte das células viáveis.^{115,116}

Numa microplaca de 96 poços estéril (Orange Scientific), foram adicionados 100 µL de suspensão celular (1×10^5 células/poço; VERO, NIH-3T3, S180, HeLa) em meio DME (*Dulbecco's Modified Eagle*; GIBCO®, Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10 % (v/v) FBS (*Fetal Bovine Serum*; GIBCO®, Thermo Fisher Scientific), com incubação *ca.* 18 horas a 37 °C sob atmosfera humidificada de 5 % CO₂. Após este período, adicionaram-se 100 µL/poço de NPsC (massa variável), seguindo-se re-incubação *ca.* 18 horas, a 37 °C em atmosfera humidificada de 5 % CO₂, utilizando-se como controlo negativo água Millipore® (previamente esterilizada).

De seguida, descartou-se o sobrenadante e lavaram-se os poços com 1× PBS e adicionaram-se 100 µL/poço de uma solução 5 mg.mL⁻¹ MTT em 1× PBS seguida de incubação durante *ca.* 3 horas, a 37 °C sob atmosfera humidificada de 5 % CO₂. Após remoção do sobrenadante, adicionaram-se 100 µL/poço de uma solução 0.1 M Twenn® 20 (Bio-Rad) em isopropanol, para solubilização dos cristais de formazona, e registou-se a absorvância a 570 nm, com referência a 650 nm.

III.5.4. Marcação Celular por Fluorescência

A recolha das imagens por microscopia de fluorescência decorreu após incubação das linhas celulares (VERO, NIH-3T3, S180, HeLa) com os NPSC a uma concentração de 500 µg.mL⁻¹. Numa microplaca de 24 poços estéril (Orange Scientific), foram adicionados 500 µL de uma solução 0.15 % (m/v) gelatina em 1× PBS, após deposição de lamelas redondas (previamente esterilizadas) no fundo dos poços. De seguida, foi removido o volume em excesso e deixou-se secar durante 5 minutos. Adicionou-se 1-2 gotas de suspensão celular (1×10⁵ células/poço) em 500 µL de meio DME suplementado com 10 % (v/v) FBS, seguindo-se incubação *ca.* 18 horas, a 37 °C, sob atmosfera humidificada de 5 % CO₂. Após este período, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de meio DME fresco suplementado com 10 % (v/v) FBS, seguido de 50 µL/poço de NPSC (massa variável), e reincubação *ca.* 18 horas a 37 °C, sob atmosfera humidificada de 5 % CO₂. Após lavagem com meio DME fresco, depositou-se a lamela invertida sobre uma lâmina, hidratada com 1-2 gotas do sobrenadante e procedeu-se à aquisição das imagens.

IV. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

No presente trabalho foram obtidos com sucesso nanopontos de carbono (NPSC) através da aplicação de métodos sustentáveis de síntese hidrotérmica (aquecimento convencional e radiação micro-ondas), utilizando resíduos sólidos do tomate (RST) como fonte de carbono. Os novos nanomateriais exibiram propriedades destacáveis, nomeadamente as suas capacidades antioxidantes distintas, demonstrando simultaneamente rendimentos quânticos de fluorescência moderados. Dos NPSC obtidos, os resultantes de carbonização hidrotérmica assistida por radiação micro-ondas evidenciaram contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* atividade antibacteriana superior. Em geral, os NPSC demonstraram baixa toxicidade *in vitro* para as linhas celulares animais e humanas estudadas e elevada biocompatibilidade na sua aplicação como marcadores celulares. No entanto, é de salientar o efeito citotóxico elevado dos NPSC purificados por cromatografia com Sephadex G-75 para as células tumorais HeLa.

Perspetivando sobre a sintonização das propriedades dos NPSC às aplicações desejadas, deverão ser futuramente explorados outros métodos de síntese sustentável, como a sonicação e a mecanoquímica, bem como o estudo detalhado relativo aos métodos de purificação. Em particular, para a sua aplicação como agentes antimicrobianos, poderá ser estudada a sua capacidade de atuação contra outras espécies bacterianas, fungos ou vírus. Encontram-se em desenvolvimento métodos de modificação da carga superficial dos NPSC e a avaliação da sua influência na bioatividade destes nanomateriais.

Além das aplicações exploradas na presente dissertação, o estudo das potenciais aplicações dos NPSC poderá ser expandido. Como complemento à avaliação da citotoxicidade *in vitro* efetuada, estão previstos ensaios *in vivo* de avaliação da biocompatibilidade dos NPSC.

V. BIBLIOGRAFIA

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO 2019); Consultado a 21 de janeiro de 2023 em <http://www.fao.org/home/en/>.
2. International Market Analysis Research & Consulting (July 11st 2020); Consultado a 21 de janeiro de 2023 em <http://www.imarcgroup.com/global-tomato-processing-market>.
3. Bhatkar, N. S.; Shirkole, S. S.; Mujumdar, A. S.; Thorat, B. N. Drying of Tomatoes and Tomato Processing Waste: A Critical Review of the Quality Aspects. *Dry. Technol.* **2021**, *39* (11), 1720–1744.
4. Porretta, S. Tomato Seeds and Skins as a Source of Functional Compounds. In *Tomato Chemistry, Industrial Processing and Product Development*; Porretta, S., Ed.; Royal Society of Chemistry: London, 2019.
5. Heuvelink, E. *Tomatoes*, 2nd ed.; CABI Publishing: Cambridge, MA, 2018.
6. Strati, I. F.; Oreopoulou, V. Recovery of Carotenoids from Tomato Processing By-Products - A Review. *Food Res. Int.* **2014**, *65*, 311–321.
7. Gould, W. A. *Tomato Production, Processing and Technology*, 3rd ed.; CTI Publications: Batimore, MD, 2013.
8. Rock, C.; Yang, W.; Goodrich-Schneider, R.; Feng, H. Conventional and Alternative Methods for Tomato Peeling. *Food Eng. Rev.* **2012**, *4* (1), 1–15.
9. Garcia, E.; Barrett, D. M. Evaluation of Processing Tomatoes from Two Consecutive Growing Seasons: Quality Attributes, Peelability and Yield. *J. Food Process. Preserv.* **2006**, *30* (1), 20–36.
10. Lin, C. H.; Chen, B. H. Stability of Carotenoids in Tomato Juice during Storage. *Food Chem.* **2005**, *90* (4), 837–846.
11. Kaur, D.; Wani, A. A.; Oberoi, D. P. S.; Sogi, D. S. Effect of Extraction Conditions on Lycopene Extractions from Tomato Processing Waste Skin Using Response Surface Methodology. *Food Chem.* **2008**, *108* (2), 711–718.
12. Del Valle, M.; Cámara, M.; Torija, M. E. Chemical Characterization of Tomato Pomace. *J. Sci. Food Agric.* **2006**, *86* (8), 1232–1236.
13. Pathania, S.; Kaur, N. Utilization of Fruits and Vegetable By-Products for Isolation of Dietary Fibres and Its Potential Application as Functional Ingredients. *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre* **2022**, *27*, 100–295.

14. Herrera, P. G.; Sánchez-Mata, M. C.; Cámara, M. Nutritional Characterization of Tomato Fiber as a Useful Ingredient for Food Industry. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2010**, *11* (4), 707–711.
15. Sogi, D. S.; Sidhu, J. S.; Arora, M. S.; Garg, S. K.; Bawa, A. S. Effect of Tomato Seed Meal Supplementation on the Dough and Bread Characteristics of Wheat (PBW 343) Flour. *Int. J. Food Prop.* **2002**, *5* (3), 563–571.
16. Giannelos, P. N.; Sxizas, S.; Lois, E.; Zannikos, F.; Anastopoulos, G. Physical, Chemical and Fuel Related Properties of Tomato Seed Oil for Evaluating Its Direct Use in Diesel Engines. *Ind. Crops Prod.* **2005**, *22* (3), 193–199.
17. Laranjeira, T.; Costa, A.; Faria-Silva, C.; Ribeiro, D.; Ferreira de Oliveira, J. M. P.; Simões, S.; Ascenso, A. Sustainable Valorization of Tomato By-Products to Obtain Bioactive Compounds: Their Potential in Inflammation and Cancer Management. *Molecules* **2022**, *27* (5), 1701–1720.
18. Balehegn, M.; Duncan, A.; Tolera, A.; Ayantunde, A. A.; Issa, S.; Karimou, M.; Zampaligré, N.; André, K.; Gnanda, I.; Varijakshapanicker, P.; Kebreab, E.; Dubeux, J.; Boote, K.; Minta, M.; Feyissa, F.; Adesogan, A. T. Improving Adoption of Technologies and Interventions for Increasing Supply of Quality Livestock Feed in Low- and Middle-Income Countries. *Glob. Food Sec.* **2020**, *26*, 100–372.
19. Szabo, K.; Cătoi, A. F.; Vodnar, D. C. Bioactive Compounds Extracted from Tomato Processing By-Products as a Source of Valuable Nutrients. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2018**, *73* (4), 268–277.
20. Campos, D. A.; Gómez-García, R.; Vilas-Boas, A. A.; Madureira, A. R.; Pintado, M. M. Management of Fruit Industrial By-products—a Case Study on Circular Economy Approach. *Molecules* **2020**, *25* (2), 320–342.
21. Kang, C.; Huang, Y.; Yang, H.; Yan, X. F.; Chen, Z. P. A Review of Carbon Dots Produced from Biomass Wastes. *Nanomater.* **2020**, *10* (11), 1–24.
22. Jariwala, D.; Sangwan, V. K.; Lauhon, L. J.; Marks, T. J.; Hersam, M. C. Carbon Nanomaterials for Electronics, Optoelectronics, Photovoltaics, and Sensing. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (7), 2824–2860.
23. Kroto H. W.; Heath J. R.; O’Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E. This Week’s Citation Classic® C60 – The Third Man. *Nature* **1985**, *318*, 162–163.
24. Iijima, S. Helical Microtubules of Graphitic Carbon. *Nature* **1991**, *354*, 56–58.
25. Novoselov, K. S.; Geim, A. K.; Morozov, S. V; Jiang, D.; Zhang, Y.; Dubonos, S. V; Grigorieva, I. V; Firsov, A. A. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. *Science (1979)* **2004**, *306* (5696), 666–669.

-
26. Georgakilas, V.; Perman, J. A.; Tucek, J.; Zboril, R. Broad Family of Carbon Nanoallotropes: Classification, Chemistry, and Applications of Fullerenes, Carbon Dots, Nanotubes, Graphene, Nanodiamonds, and Combined Superstructures. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (11), 4744–4822.
 27. Xu, X.; Ray, R.; Gu, Y.; Ploehn, H. J.; Gearheart, L.; Raker, K.; Scrivens, W. A. Electrophoretic Analysis and Purification of Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotube Fragments. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (40), 12736–12737.
 28. Dong, Y.; Wang, R.; Li, G.; Chen, C.; Chi, Y.; Chen, G. Polyamine-Functionalized Carbon Quantum Dots as Fluorescent Probes for Selective and Sensitive Detection of Copper Ions. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (14), 6220–6224.
 29. Wang, Y.; Hu, A. Carbon Quantum Dots: Synthesis, Properties and Applications. *J. Mater. Chem. C* **2014**, *2* (34), 6921–6939.
 30. Zuo, P.; Lu, X.; Sun, Z.; Guo, Y.; He, H. A Review on Syntheses, Properties, Characterization and Bioanalytical Applications of Fluorescent Carbon Dots. *Mikrochim. Acta* **2016**, *183* (2), 519–542.
 31. Zhu, S.; Song, Y.; Zhao, X.; Shao, J.; Zhang, J.; Yang, B. The Photoluminescence Mechanism in Carbon Dots (Graphene Quantum Dots, Carbon Nanodots, and Polymer Dots): Current State and Future Perspective. *Nano Res.* **2015**, *8* (2), 355–381.
 32. Song, Y.; Zhu, S.; Shao, J.; Yang, B. Polymer Carbon Dots—a Highlight Reviewing Their Unique Structure, Bright Emission and Probable Photoluminescence Mechanism. *J. Polym. Sci. A* **2017**, *55* (4), 610–615.
 33. Kwon, W.; Do, S.; Won, D. C.; Rhee, S. W. Carbon Quantum Dot-Based Field-Effect Transistors and Their Ligand Length-Dependent Carrier Mobility. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5* (3), 822–827.
 34. Lim, S. Y.; Shen, W.; Gao, Z. Carbon Quantum Dots and Their Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (1), 362–381.
 35. Pathak, R.; Punetha, V. D.; Bhatt, S.; Punetha, M. Multifunctional Role of Carbon Dot-Based Polymer Nanocomposites in Biomedical Applications: A Review. *J. Mater. Sci.* **2023**, *58*, 6419–6443.
 36. Sun, Y. P.; Zhou, B.; Lin, Y.; Wang, W.; Fernando, K. A. S.; Pathak, P.; Mezziani, M. J.; Harruff, B. A.; Wang, X.; Wang, H.; Luo, P. G.; Yang, H.; Kose, M. E.; Chen, B.; Veca, L. M.; Xie, S. Y. Quantum-Sized Carbon Dots for Bright and Colorful Photoluminescence. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (24), 7756–7757.
 37. Lu, J.; Yang, J. X.; Wang, J.; Lim, A.; Wang, S.; Loh, K. P. One-Pot Synthesis of Fluorescent Carbon Nanoribbons, Nanoparticles, and Graphene by the Exfoliation of Graphite in Ionic Liquids. *ACS Nano* **2009**, *3* (8), 2367–2375.

38. Wolfbeis, O. S. An Overview of Nanoparticles Commonly Used in Fluorescent Bioimaging. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (14), 4743–4768.
39. Jiang, H.; Chen, F.; Lagally, M. G.; Denes, F. S. New Strategy for Synthesis and Functionalization of Carbon Nanoparticles. *Langmuir* **2010**, *26* (3), 1991–1995.
40. Choi, Y.; Choi, Y.; Kwon, O. H.; Kim, B. S. Carbon Dots: Bottom-Up Syntheses, Properties, and Light-Harvesting Applications. *Chem. Asian J.* **2018**, *13* (6), 586–598.
41. Zhu, S.; Meng, Q.; Wang, L.; Zhang, J.; Song, Y.; Jin, H.; Zhang, K.; Sun, H.; Wang, H.; Yang, B. Highly Photoluminescent Carbon Dots for Multicolor Patterning, Sensors, and Bioimaging. *Angew. Chem.* **2013**, *52* (14), 3953–3957.
42. Zhang, X.; Jiang, M.; Niu, N.; Chen, Z.; Li, S.; Liu, S.; Li, J. Natural-Product-Derived Carbon Dots: From Natural Products to Functional Materials. *Chem. Sus. Chem.* **2018**, *11* (1), 11–24.
43. Zhu, H.; Wang, X.; Li, Y.; Wang, Z.; Yang, F.; Yang, X. Microwave Synthesis of Fluorescent Carbon Nanoparticles with Electrochemiluminescence Properties. *Chem. Comm.* **2009**, *34*, 5118–5120.
44. Dang, H.; Huang, L. K.; Zhang, Y.; Wang, C. F.; Chen, S. Large-Scale Ultrasonic Fabrication of White Fluorescent Carbon Dots. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2016**, *55* (18), 5335–5341.
45. Lou, Y.; Hao, X.; Liao, L.; Zhang, K.; Chen, S.; Li, Z.; Ou, J.; Qin, A.; Li, Z. Recent Advances of Biomass Carbon Dots on Syntheses, Characterization, Luminescence Mechanism, and Sensing Applications. *Nano Select* **2021**, *2* (6), 1117–1145.
46. Rajesh, G. A.; John, V. L.; Santhosh, A. P.; Ambika, A. K. N.; Puthiyedath, V. T. Carbon Dots from Natural Sources for Biomedical Applications. *Part. Part. Syst. Charact.* **2022**, *39* (9), 2200017.
47. Hu, X.; Li, Y.; Xu, Y.; Gan, Z.; Zou, X.; Shi, J.; Huang, X.; Li, Z.; Li, Y. Green One-Step Synthesis of Carbon Quantum Dots from Orange Peel for Fluorescent Detection of Escherichia Coli in Milk. *Food Chem.* **2021**, *339*, 127775.
48. Yan, F.; Jiang, Y.; Sun, X.; Bai, Z.; Zhang, Y.; Zhou, X. Surface Modification and Chemical Functionalization of Carbon Dots: A Review. *Mikrochim. Acta* **2018**, *185* (9), 424–458.
49. Bourlinos, A. B.; Stassinopoulos, A.; Anglos, D.; Zboril, R.; Karakassides, M.; Giannelis, E. P. Surface Functionalized Carbogenic Quantum Dots. *Small* **2008**, *4* (4), 455–458.
50. Qu, D.; Zheng, M.; Zhang, L.; Zhao, H.; Xie, Z.; Jing, X.; Haddad, R. E.; Fan, H.; Sun, Z. Formation Mechanism and Optimization of Highly Luminescent N-Doped Graphene Quantum Dots. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 5294–5303.
51. Choi, Y.; Kim, S.; Choi, M. H.; Ryoo, S. R.; Park, J.; Min, D. H.; Kim, B. S. Highly Biocompatible Carbon Nanodots for Simultaneous Bioimaging and Targeted Photodynamic Therapy in Vitro and in Vivo. *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24* (37), 5781–5789.

-
52. Wu, Y.; van der Mei, H. C.; Busscher, H. J.; Ren, Y. Enhanced Bacterial Killing by Vancomycin in Staphylococcal Biofilms Disrupted by Novel, DMMA-Modified Carbon Dots Depends on EPS Production. *Colloids Surf. B* **2020**, *193*.
 53. Cao, L.; Meziani, M. J.; Sahu, S.; Sun, Y. P. Photoluminescence Properties of Graphene versus Other Carbon Nanomaterials. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46* (1), 171–182.
 54. He, C.; Xu, P.; Zhang, X.; Long, W. The Synthetic Strategies, Photoluminescence Mechanisms and Promising Applications of Carbon Dots: Current State and Future Perspective. *Carbon N Y* **2022**, *186*, 91–127.
 55. Yang, M.; Li, B.; Zhong, K.; Lu, Y. Photoluminescence Properties of N-Doped Carbon Dots Prepared in Different Solvents and Applications in PH Sensing. *J. Mater. Sci.* **2018**, *53* (4), 2424–2433.
 56. Tang, H.; Tang, Y.; Zhu, H.; Xiao, M.; Guo, M. Nitrogen-Doped Carbon Dots Based on Arginine and Maleic Acid for Fabrication of PVA Composite Films and Iron Fluorescence Probes. *J. Mol. Struct.* **2022**, *1251*, 132034.
 57. Costa, A. I.; Barata, P. D.; Moraes, B.; Prata, J. V. Carbon Dots from Coffee Grounds: Synthesis, Characterization and Detection of Noxious Nitroanilines. *Chemosensors* **2022**, *10* (3), 113–130.
 58. Dong, X.; Liang, W.; Meziani, M. J.; Sun, Y. P.; Yang, L. Carbon Dots as Potent Antimicrobial Agents. *Theranostics* **2020**, *10* (2), 671–686.
 59. Peng, Z.; Han, X.; Li, S.; Al-Youbi, A. O.; Bashammakh, A. S.; El-Shahawi, M. S.; Leblanc, R. M. Carbon Dots: Biomacromolecule Interaction, Bioimaging and Nanomedicine. *Coord. Chem. Rev.* **2017**, *343*, 256–277.
 60. Bi, J.; Li, Y.; Wang, H.; Song, Y.; Cong, S.; Li, D.; Zhou, D.; Zhu, B. W.; Tan, M. Physicochemical Properties and Cytotoxicity of Carbon Dots in Grilled Fish. *New J. Chem.* **2017**, *41* (16), 8490–8496.
 61. Sousa, D. A.; Ferreira, L. F. V.; Fedorov, A. A.; Rego, A. M. B. do; Ferraria, A. M.; Cruz, A. B.; Berberan-Santos, M. N.; Prata, J. V. Luminescent Carbon Dots from Wet Olive Pomace: Structural Insights, Photophysical Properties and Cytotoxicity. *Molecules* **2022**, *27* (19), 6768–6794.
 62. Edison, T. N. J. I.; Atchudan, R.; Sethuraman, M. G.; Shim, J. J.; Lee, Y. R. Microwave Assisted Green Synthesis of Fluorescent N-Doped Carbon Dots: Cytotoxicity and Bio-Imaging Applications. *J. Photochem. Photobiol. B* **2016**, *161*, 154–161.
 63. Dias, C.; Vasimalai, N.; Sárria, M. P.; Pinheiro, I.; Vilas-Boas, V.; Peixoto, J.; Espiña, B. Biocompatibility and Bioimaging Potential of Fruit-Based Carbon Dots. *Nanomaterials* **2019**, *9* (2), 199–218.

64. Li, Y.; Zhang, W.; Niu, J.; Chen, Y. Mechanism of Photogenerated Reactive Oxygen Species and Correlation with the Antibacterial Properties of Engineered Metal-Oxide Nanoparticles. *ACS Nano* **2012**, *6* (6), 5164–5173.
65. Ghirardello, M.; Ramos-Soriano, J.; Galan, M. C. Carbon Dots as an Emergent Class of Antimicrobial Agents. *Nanomaterials* **2021**, *11* (8), 1–24.
66. Li, F.; Cai, Q.; Hao, X.; Zhao, C.; Huang, Z.; Zheng, Y.; Lin, X.; Weng, S. Insight into the DNA Adsorption on Nitrogen-Doped Positive Carbon Dots. *RSC Adv.* **2019**, *9* (22), 12462–12469.
67. Li, P.; Sun, L.; Xue, S.; Qu, D.; An, L.; Wang, X.; Sun, Z. Recent Advances of Carbon Dots as New Antimicrobial Agents. *SmartMat* **2022**, *3* (2), 226–248.
68. Song, Z.; Wang, H.; Wu, Y.; Gu, J.; Li, S.; Han, H. Fabrication of Bis-Quaternary Ammonium Salt as an Efficient Bactericidal Weapon Against Escherichia Coli and Staphylococcus Aureus. *ACS Omega* **2018**, *3* (10), 14517–14525.
69. Bing, W.; Sun, H.; Yan, Z.; Ren, J.; Qu, X. Programmed Bacteria Death Induced by Carbon Dots with Different Surface Charge. *Small* **2016**, *12* (34), 4713–4718.
70. Ma, Y.; Zhang, M.; Wang, H.; Wang, B.; Huang, H.; Liu, Y.; Kang, Z. N-Doped Carbon Dots Derived from Leaves with Low Toxicity via Damaging Cytochrome for Broad-Spectrum Antibacterial Activity. *Mater. Today Commun.* **2020**, *24*, 101222.
71. Karimi, M.; Sadeghi, E.; Zahedifar, M. Carbon Quantum Dots Extracted from Natural Lemon Juice: Efficient Material for Fluorescence and Antibacterial Applications. *J. Adv. Biomed. Sci.* **2022**, *12* (2), 152–161.
72. Roy, S.; Ezati, P.; Rhim, J. W.; Molaei, R. Preparation of Turmeric-Derived Sulfur-Functionalized Carbon Dots: Antibacterial and Antioxidant Activity. *J. Mater. Sci.* **2022**, *57* (4), 2941–2952.
73. El-Shabasy, R. M.; Elsadek, M. F.; Ahmed, B. M.; Farahat, M. F.; Mosleh, K. M.; Taher, M. M. Recent Developments in Carbon Quantum Dots: Properties, Fabrication Techniques, and Bio-Applications. *Processes* **2021**, *9* (2), 338.
74. Gonçalves, H. M. R.; Duarte, A. J.; Esteves da Silva, J. C. G. Optical Fiber Sensor for Hg(II) Based on Carbon Dots. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26* (4), 1302–1306.
75. Sousa, D. A.; Costa, A. I.; Alexandre, M. R.; Prata, J. V. How an Environmental Issue Could Turn into Useful High-Valued Products: The Olive Mill Wastewater Case. *Sci. Total Environ.* **2019**, *647*, 1097–1105.
76. Khayal, A.; Dawane, V.; Amin, M. A.; Tirth, V.; Yadav, V. K.; Algahtani, A.; Khan, S. H.; Islam, S.; Yadav, K. K.; Jeon, B. H. Advances in the Methods for the Synthesis of Carbon Dots and Their Emerging Applications. *Polymers (Basel)* **2021**, *13* (18), 3190–3221.

-
77. Martins, N. C. T.; Ângelo, J.; Girão, A. V.; Trindade, T.; Andrade, L.; Mendes, A. N-Doped Carbon Quantum Dots/TiO₂ Composite with Improved Photocatalytic Activity. *Appl. Catal. B* **2016**, *193*, 67–74.
 78. Hu, Y.; Guan, R.; Zhang, C.; Zhang, K.; Liu, W.; Shao, X.; Xue, Q.; Yue, Q. Fluorescence and Photocatalytic Activity of Metal-Free Nitrogen-Doped Carbon Quantum Dots with Varying Nitrogen Contents. *Appl. Surf. Sci.* **2020**, *531*, 147344.
 79. Yao, Y.; Zhang, H.; Hu, K.; Nie, G.; Yang, Y.; Wang, Y.; Duan, X.; Wang, S. Carbon Dots Based Photocatalysis for Environmental Applications. *J. Environ. Chem. Eng.* **2022**, *10* (2), 107336.
 80. Wang, H.; Sun, P.; Cong, S.; Wu, J.; Gao, L.; Wang, Y.; Dai, X.; Yi, Q.; Zou, G. Nitrogen-Doped Carbon Dots for “Green” Quantum Dot Solar Cells. *Nanoscale Res. Lett.* **2016**, *11* (27), 1–6.
 81. Lin, H.; Yang, J.; Liu, Y. feng; Zeng, F. ju; Tang, X. S.; Yao, Z. qiang; Guan, H. ling; Xiong, Q.; Zhou, J. er; Wu, D. fu; Du, J. Stable and Efficient Hybrid Ag-In-S/ZnS@SiO₂-Carbon Quantum Dots Nanocomposites for White Light-Emitting Diodes. *Chem. Eng. J.* **2020**, *393*, 124654.
 82. Ding, Z.; Li, F.; Wen, J.; Wang, X.; Sun, R. Gram-Scale Synthesis of Single-Crystalline Graphene Quantum Dots Derived from Lignin Biomass. *Green Chem.* **2018**, *20* (6), 1383–1390.
 83. Huang, C.; Dong, H.; Su, Y.; Wu, Y.; Narron, R.; Yong, Q. Synthesis of Carbon Quantum Dot Nanoparticles Derived from Byproducts in Bio-Refinery Process for Cell Imaging and in Vivo Bioimaging. *Nanomaterials* **2019**, *9* (3), 387–398.
 84. He, C.; Lin, X.; Mei, Y.; Luo, Y.; Yang, M.; Kuang, Y.; Yi, X.; Zeng, W.; Huang, Q.; Zhong, B. Recent Advances in Carbon Dots for In Vitro/Vivo Fluorescent Bioimaging: A Mini-Review. *Front. Chem.* **2022**, *10*, 905475.
 85. Yang, J.; Gao, G.; Zhang, X.; Ma, Y. H.; Chen, X.; Wu, F. G. One-Step Synthesized Carbon Dots with Bacterial Contact-Enhanced Fluorescence Emission Property: Fast Gram-Type Identification and Selective Gram-Positive Bacterial Inactivation. *Carbon N Y* **2019**, *146*, 827–839.
 86. Karthik, S.; Saha, B.; Ghosh, S. K.; Pradeep Singh, N. D. Photoresponsive Quinoline Tethered Fluorescent Carbon Dots for Regulated Anticancer Drug Delivery. *Chemical Communications* **2013**, *49* (89), 10471–10473.
 87. Heredia-Guerrero, J. A.; Benítez, J. J.; Domínguez, E.; Bayer, I. S.; Cingolani, R.; Athanassiou, A.; Heredia, A. Infrared and Raman Spectroscopic Features of Plant Cuticles: A Review. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 1–14.
 88. Hajimahmoodi, M.; Moghaddam, G.; Ranjbar, A. M.; Khazani, H.; Sadeghi, N.; Oveisi, M. R.; Jannat, B. Total Phenolic, Flavonoids, Tannin Content and Antioxidant Power of Some Iranian Pomegranate Flower Cultivars (*Punica Granatum* L.). *Am. J. Plant Sci.* **2013**, *4* (9), 1815–1820.

89. Singleton, V. L.; and Rossi, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158.
90. Fărcaș, A. C.; Socaci, S. A.; Michiu, D.; Biriș, S.; Tofană, M. Tomato Waste as a Source of Biologically Active Compounds. *Food Sci. Technol.* **2019**, *76* (1), 85–88.
91. Perea-Domínguez, X. P.; Hernández-Gastelum, L. Z.; Olivas-Olguin, H. R.; Espinosa-Alonso, L. G.; Valdez-Morales, M.; Medina-Godoy, S. Phenolic Composition of Tomato Varieties and an Industrial Tomato By-Product: Free, Conjugated and Bound Phenolics and Antioxidant Activity. *J. Food Sci. Technol.* **2018**, *55* (9), 3453–3461.
92. Pełkal, A.; Pyrzyńska, K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal. Methods* **2014**, *7* (9), 1776–1782.
93. Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* **1956**, *28* (3), 350–356.
94. Nielsen, S. S. *Food Analysis*, 4th ed.; Food Science Texts Series; Springer US: Boston, MA, 2010.
95. Coelho, M. C.; Ghalamara, S.; Campos, D.; Ribeiro, T. B.; Pereira, R.; Rodrigues, A. S.; Teixeira, J. A.; Pintado, M. Tomato Processing By-Products Valorisation through Ohmic Heating Approach. *Foods* **2023**, *12* (4), 818–837.
96. Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
97. Lu, Z.; Wang, J.; Gao, R.; Ye, F.; Zhao, G. Sustainable Valorisation of Tomato Pomace: A Comprehensive Review. *Trends Food Sci.* **2019**, *86*, 172–187.
98. Cataldo, D. A.; Haroon, M. H.; Schrader, L. E.; Youngs, V. L. Rapid Colorimetric Determination of Nitrate in Plant Tissue by Nitration of Salicylic Acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **1975**, *6* (1), 71–80.
99. Silva, Y. P. A.; Borba, B. C.; Pereira, V. A.; Reis, M. G.; Caliari, M.; Brooks, M. S. L.; Ferreira, T. A. P. C. Characterization of Tomato Processing By-Product for Use as a Potential Functional Food Ingredient: Nutritional Composition, Antioxidant Activity and Bioactive Compounds. *Int. J. Food Sci.* **2019**, *70* (2), 150–160.
100. Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. *Determination of Ash in Biomass*; National Renewable Energy Laboratory: Golden, CO, 2008.
101. Song, Y.; Zhu, S.; Zhang, S.; Fu, Y.; Wang, L.; Zhao, X.; Yang, B. Investigation from Chemical Structure to Photoluminescent Mechanism: A Type of Carbon Dots from the Pyrolysis of Citric Acid and an Amine. *J. Mater. Chem. C* **2015**, *3* (23), 5976–5984.
102. Ray, S. C.; Saha, A.; Jana, N. R.; Sarker, R. Fluorescent Carbon Nanoparticle: Synthesis, Characterization and Bio-Imaging Application. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 18546–18551.

103. Mishra, L.; Behera, R. K.; Panigrahi, A.; Bera, K.; Sarangi, M. K. Aliphatic and Aromatic Amine Based Nitrogen-Doped Carbon Dots: A Comparative Photophysical Study. *J. Opt.* **2022**, *24* (4), 044011.
104. Javed, N.; O'Carroll, D. M. Carbon Dots and Stability of Their Optical Properties. *Part. Part. Syst. Charact.* **2021**, *38* (4), 2000271.
105. Mehta, A.; Zydney, A. L. Permeability and Selectivity Analysis for Ultrafiltration Membranes. *J. Membr. Sci.* **2005**, *249* (1–2), 245–249.
106. Zulfajri, M.; Dayalan, S.; Li, W. Y.; Chang, C. J.; Chang, Y. P.; Huang, G. G. Nitrogen-Doped Carbon Dots from Averrhoa Carambola Fruit Extract as a Fluorescent Probe for Methyl Orange. *Sensors* **2019**, *19* (22), 5008–5025.
107. Erel, O. A Novel Automated Direct Measurement Method for Total Antioxidant Capacity Using a New Generation, More Stable ABTS Radical Cation. *Clin. Biochem.* **2004**, *37* (4), 277–285.
108. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying An Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26* (9), 1231–1237.
109. Hudzicki, J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *Am. Soc. Microbiol.* **2009**.
110. Hockett, K. L.; Baltrus, D. A. Use of the Soft-Agar Overlay Technique to Screen for Bacterially Produced Inhibitory Compounds. *J. Vis. Exp.* **2017**, *119*, 55064.
111. Weinstein, M. P. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 9th ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Berwyn, PA, 2012.
112. Mendes, C. A. C.; Burdmann, E. A. Polymyxins-a Review Focusing on Their Nephrotoxicity. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **2010**, *56* (6), 752–758.
113. Halder, S.; Yadav, K. K.; Sarkar, R.; Mukherjee, S.; Saha, P.; Haldar, S.; Karmakar, S.; Sen, T. Alteration of Zeta Potential and Membrane Permeability in Bacteria: A Study with Cationic Agents. *Springerplus* **2015**, *4*, 672–686.
114. Prasad, S.; Francis Saleshier, M.; Krishnan, S.; Bharathi, P. Synthesis, Spectroscopic Studies, Antibacterial Activity, and Colorimetric Evaluation of the Time-Killing Assay for Newly Synthesized Chalcones Using Resazurin. *Pharm. Chem. J.* **2018**, *52* (6), 518–525.
115. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65* (2), 55–63.
116. Kuźma, Ł.; Wysokińska, H.; Rózalski, M.; Krajewska, U.; Kisiel, W. An Unusual Taxodione Derivative from Hairy Roots of *Salvia Austriaca*. *Fitoterapia* **2012**, *83* (4), 770–773.
117. International Organization for Standardization. *Biological Evaluation of Medical Devices – Tests for in Vitro Cytotoxicity (ISO EN 10993-5)*, 3rd ed.; Geneva, 2009.

118. Annon. *A Guide to Recording Fluorescence Quantum Yields*, Horiba Scientific.; Consultado a 15 de dezembro de 2022 em <http://www.horiba.com/>.
119. Melhuish, W. H. Quantum Efficiencies of Fluorescence of Organic Substances: Effect of Solvent and Concentration of the Fluorescent Solute. *J. Phys. Chem.* **1961**, 65 (2), 229–235.
120. Lewis II, J. S. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 31st ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Berwyn, PA, 2021.