



ISEL



**ESCOLA SUPERIOR DE
TECNOLOGIA DA SAÚDE
DE LISBOA**
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

Valorização de Resíduos do Processamento Industrial da Castanha na Síntese de Nanomateriais de Carbono Bioativos

MARIA RITA BEXIGA BARRA LUDOVINO

(Licenciada em Engenharia Biomédica)

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadores:

Doutora Alexandra Isabel Martins Paulo da Costa

Doutora Magda Sofia Soares Carvalho Cardoso Nobre Semedo

Júri:

Presidente: Doutor Luís Miguel Minhalma

Vogais:

Doutor Diogo Alexandre Cartaxo Sousa

Doutora Magda Sofia Soares Carvalho Cardoso Nobre Semedo

2 de dezembro de 2025

Valorização de Resíduos do Processamento Industrial da Castanha na Síntese de Nanomateriais de Carbono Bioativos

MARIA RITA BEXIGA BARRA LUDOVINO

(Licenciada em Engenharia Biomédica)

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadores:

Doutora Alexandra Isabel Martins Paulo da Costa

Doutora Magda Sofia Soares Carvalho Cardoso Nobre Semedo

Júri:

Presidente: Doutor Luís Miguel Minhalma

Vogais:

Doutor Diogo Alexandre Cartaxo Sousa

Doutora Magda Sofia Soares Carvalho Cardoso Nobre Semedo

2 de dezembro de 2025

Agradecimentos

À Professora Doutora Alexandra Costa e à Professora Doutora Magda Semedo, orientadoras deste trabalho, expressar o meu mais profundo agradecimento por todo o apoio, preocupação, ajuda e dedicação na realização deste trabalho, bem como por todo o conhecimento transmitido. Agradeço, acima de tudo, toda a confiança e a oportunidade de integração no projeto de investigação, que resultou nesta dissertação e me permitiu crescer e terminar este ciclo de estudos com mais conhecimento, confiança e competência a nível pessoal e profissional. Agradeço também o bom ambiente de trabalho proporcionado ao longo deste ano.

À Professora Doutora Patrícia Barata, pelas dúvidas esclarecidas e pelo apoio na realização deste trabalho, bem como a boa disposição que contribui também para o bom ambiente de trabalho no laboratório de Química Orgânica.

À Professora Doutora Ana Sofia Figueiredo, agradeço todos os conhecimentos transmitidos, duvidas esclarecidas e também todo o auxílio no que diz respeito à síntese de membranas.

À Professora Doutora Sónia Martins, pela disponibilidade e pelos conhecimentos transmitidos relativamente aos ensaios de atividade antibacteriana.

À minha colega e grande amiga Mariana Conduto, o meu agradecimento por toda a ajuda e disponibilidade no desenvolvimento deste trabalho experimental e na interpretação de resultados. Agradeço também todo o apoio emocional, companhia, paciência, motivação e, acima de tudo a amizade com que me presenteou não só no que a este trabalho diz respeito, mas desde o meu primeiro dia.

Ao meu amigo Rui Durão, por toda a amizade e companhia no laboratório de Química Orgânica.

Ao Doutor Fernando Cardoso, pela sua disponibilidade, os muitos conhecimentos transmitidos e toda a ajuda nos ensaios 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 interesse demonstrado e todo o auxílio 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 Agromontenegro, pela disponibilização dos Ouriços da Castanha que foram utilizados como biomassa neste trabalho.

Ao Instituto Politécnico de Lisboa pelo financiamento concedido através do projeto IPL/IDI&CA2024/CN2NDots_ISEL, Valorização de Resíduos do Processamento Industrial da Castanha na Síntese de Nanomateriais de Carbono Bioativos.

Aos amigos que o ISEL me deu e que ao longo destes anos se tornaram família, João Antunes, Rute Martins, Pedro Martinho, José Costa, Tiago Sousa, Ana Borges, Henrique Baptista e Marta Teixeira. Às amigas que levo da licenciatura para a vida e com quem sei que posso sempre contar, Marta Simões, Maria Antunes e Marta Baptista. Agradeço especialmente à Ana Rita Silva, Cláudia Marques, João Godinho e João Casaca, por todas as vezes que me incentivaram e por me ouvirem mesmo quando já não tinha nada para dizer, este mestrado foi melhor com vocês.

Agradeço aos meus afilhados Inês Dias, Tiago Pedro e Duarte Azevedo, pela amizade e carinho com que sempre me presentearam, tornando este percurso mais bonito e também mais divertido.

Aos que vêm de antes do ISEL e que mesmo não sabendo o que é um ponto de carbono me incentivam e me apoiam em tudo o que faço, Elisabete Rodrigues, José Pereira, Tomás Domingos, Mariana Reis, Leonor Martins, Erica Fontes, Mara Rodrigues, Leonardo Baptista e Tomé Madeira.

Um agradecimento especial à Beatriz Barbosa, a minha maior fã desde que me lembro, por todo o apoio e amizade incondicional. Agradeço também à minha outra família, Sofia, Marta e Alfredo Barbosa por todo o carinho.

Ao Miguel Quintanilha, agradeço todo o carinho, amor, companhia e sobretudo paciência que tornaram todo este processo mais fácil e muito mais leve. Esta é a prova de que não passo os dias sem fazer nada.

Ao meu primo, Duarte Leitão, com quem sei que posso sempre contar para uma boa gargalhada e à minha prima, Madalena Leitão, que celebra todas as minhas vitórias como se fossem suas e que, para mim, está sempre perto. Um grande agradecimento também à Margarete Ludovino pela tia que é e por todo o apoio que sempre me deu.

Ao meu irmão e maior dor de cabeça, João Diogo Ludovino, com quem posso sempre contar para me chatear um bocadinho mais e também para me fazer rir um bocadinho mais.

À minha avó Angélica Bexiga, por todo o apoio, paciência e amor incondicional com que me presenteia todos os dias e por todas velinhas acendidas ao longo deste ano para que ensaios experimentais corressesem bem. À minha avó Laurinda também por todo o

apoio, almoços de domingo e amor incondicional, mesmo quando não lhe ligo tanto quanto devia.

Por fim, o meu mais profundo e maior agradecimento aos meus pais, Célia e Cristiano Ludovino, que tanto fazem e fizeram por mim, e que sempre me encorajaram a seguir os meus sonhos, sobretudo os maiores. Agradeço todo o apoio, compreensão, amor e carinho com que sempre me presentearam e, em especial, toda a paciência ao longo da escrita e desenvolvimento deste trabalho.

Declaração de Integridade

Declaro que esta dissertação é o resultado da minha investigação pessoal e independente. O seu conteúdo é original e todas as fontes listadas nas referências bibliográficas foram consultadas e estão devidamente mencionadas no texto. Mais declaro que todas as referências científicas e técnicas relevantes para o desenvolvimento do trabalho estão devidamente citadas e constam das referências bibliográficas.

O autor

A handwritten signature in blue ink, reading "Mariana André", is written over a horizontal line.

Lisboa, 30 de setembro de 2025

Resumo

O presente trabalho final de mestrado teve como principal objetivo a valorização de resíduos agrícolas, nomeadamente ouriços da castanha (OsC), na síntese sustentável de nanopontos de carbono (NPsC), nanopartículas com propriedades luminescentes e biológicas, com grande potencial na área da biomédica, sobretudo ao nível da imagem médica.

A síntese dos NPsC foi realizada *via* carbonização hidrotérmica com aquecimento convencional (CHAC) dos OsC. A caracterização físico-química dos OsC e os métodos de síntese utilizados na obtenção dos NPsC serão apresentados e discutidos ao longo desta dissertação. De modo a estabelecer as melhores condições de síntese, tendo em vista aprimorar as propriedades óticas e biológicas dos NPsC, efetuou-se um *design* fatorial 2³, identificando-se como fatores significantes a natureza do aditivo, o tempo de reação e o rácio mássico aditivo/OsC.

A caracterização estrutural dos NPsC sintetizados foi estabelecida por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ressonância magnética de próton (RMN ¹H) e análise elementar (AE) e a sua caracterização morfológica foi avaliada por microscopia de força atómica (AFM). As propriedades fotofísicas recorreram à utilização de espectroscopia de absorção no estado fundamental (UV-Vis) e luminescência de estado estacionário. Foi também determinado o tempo de vida e o potencial ζ dos NPsC.

Foram exploradas *in vitro* algumas propriedades biológicas dos NPsC, nomeadamente a sua atividade antioxidante, pelo método do radical ABTS e a atividade anti-inflamatória, pelo método da inibição da desnaturação de proteína, bem como a sua atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*), pelo método da difusão em disco.

Avaliou-se ainda a sua citotoxicidade *in vitro* e *in vivo* recorrendo a linhas celulares animais tumorais (S180, HeLa) e não tumorais (VERO, NIH-3T3). A citotoxicidade *in vivo* foi avaliada utilizando o microcrustáceo *Artemia salina* como organismo modelo, tendo sido observada por microscopia de fluorescência a internalização dos NPsC.

Palavras-chaves: Nanopontos de carbono (NPsC), ouriços da castanha (OsC), carbonização hidrotérmica, fluorescência, propriedades biológicas.

Abstract

The main objective of this master's thesis was to valorize agricultural waste, namely chestnut husks (CNHs), in the sustainable synthesis of carbon nanodots (CNDs), nanoparticles with luminescent and biological properties, with great potential in the biomedical field, especially in medical imaging.

The synthesis of CNDs was carried out via hydrothermal carbonization with conventional heating (HCCH) of CNHs. The physical-chemical characterization of CNHs and the synthesis methods used to obtain CNDs will be presented and discussed throughout this dissertation. To establish the optimal synthesis conditions for enhancing the optical and biological properties of CNDs, a 2³ factorial design was employed. This analysis revealed that the significant factors in the CNDs synthesis are the nature of the additive, the reaction time, and the additive/CNHs ratio.

The structural characterization of the synthesized CNDs was established by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), proton magnetic resonance (¹H NMR), and elemental analysis (EA), and their morphological characterization was evaluated by atomic force microscopy (AFM). The photophysical properties were determined using fundamental state absorption spectroscopy (UV-Vis) and steady-state luminescence. The lifetime and ζ potential of the CNDs were also determined.

The biological properties of the CNDs were explored *in vitro*, including their antioxidant activity, assessed using the ABTS radical method; their anti-inflammatory potential, evaluated through the inhibition of protein denaturation; and their antibacterial activity against Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (*Escherichia coli*) bacteria, determined by the disc diffusion method.

The cytotoxicity of the CNDs was also evaluated *in vitro* using tumor (S180, HeLa) and non-tumor (VERO, NIH-3T3) animal cell lines. *In vivo* cytotoxicity was assessed employing the microcrustacean *Artemia salina* as a model organism, and the internalization of CNDs was observed by fluorescence microscopy.

Keywords: Carbon nanodots (CNDs), chestnut husks (CNHs), hydrothermal carbonization, fluorescence, biological properties.

Divulgação Científica

Do desenvolvimento deste trabalho de mestrado resultaram as seguintes comunicações em conferências:

- **Comunicações em Conferência Nacionais e Internacionais (Comunicações em painel):**
 1. Ludovino, M.R., Costa, A.I., Semedo, M.C., Barata, P.D., Martins, S., Figueiredo, A.S. (2025), *Carbon Nanomaterials from Chestnut Lignocellulosic Waste: High-Pressure Reactor and Autoclave Approaches*, XXIX Encontro Luso-Galego Português de Química (comunicação aceite e a apresentar de 10a 12 de novembro de 2025, Braga, Portugal). <https://xxixelgq.events.chemistry.pt/pt>.
 2. Ludovino, M.R., Costa, A.I., Semedo, M.C., Barata, P.D., Martins, S., Figueiredo, A.S., Cardoso, F.M.H. (2025), *Biomedical Applications of Green Carbon Nanomaterials from Chestnut Waste*, XXIX Encontro Luso-Galego Português de Química (comunicação aceite e a apresentar de 10 a 12 de novembro de 2025, Braga, Portugal). <https://xxixelgq.events.chemistry.pt/pt>.
 3. Ludovino, M.R., Costa, A.I., Barata, P.D., Semedo, M.C., Martins, S., Figueiredo, A.S. (2025), *Design of Experiments in the Optimization of Sustainable Synthesis of Carbon Nanomaterials from Chestnut Waste*, II International Meeting Molecules4Life, 10-12 de setembro, UTAD, Vila Real, Portugal. <https://molecules4life-2025.events.chemistry.pt/>.
 4. Ludovino, M.R., Costa, A.I., Barata, P.D., Semedo, M.C., Martins, S., Figueiredo, A.S. (2025), *Valorização de Resíduos Lignocelulósicos da Indústria da Castanha*, 8º Simpósio de Produção e Transformação de Alimentos em Ambiente Sustentável, 8 de junho, FCT-UNL, Lisboa, Portugal. (Prémio de melhor poster na área Ambiente Sustentável). <https://www.fct.unl.pt/noticias/agenda/2025/04/8-simposio-producao-e-transformacao-de-alimentos-em-ambiente-sustentavel>.
 5. Ludovino, M.R., Costa, A.I., Barata, P.D., Semedo, M.C., Martins, S., Figueiredo, A.S., *Síntese Verde de Pontos de Carbono Fluorescentes a partir de Ouriços de Castanha*, iFEQB² – 1º Fórum de Engenharia Química e Biológica e Biomédica,

6-9 de maio de 2025, ISEL-IPL, Lisboa, Portugal. <https://www.isel.pt/eventos/forum-de-engenharia-quimica-e-biologica-e-biomedica-ifeqb2-2025>.

6. Costa, A.I., Ludovino, M.R., Barata, P.D., Semedo, M.C., Martins, S. (2024), *Produção de Pontos de Carbono Fluorescentes com Potencial Antioxidante a partir dos Ouriços da Castanha*, XXVIII Encontro Galego-Português de Química (XXVIII EGPQ), 13-15 novembro, Vigo, Espanha. <https://www.encontrogalegoportugues.org/event-details/xxviii-encontro-galelgo-portugues-de-quimica>.

- **Comunicação Oral**

M. Rita Ludovino, Alexandra I. Costa, Patrícia D. Barata, Magda. C. Semedo, Sónia Martins, A. S. Figueiredo. “Síntese Verde de Pontos de Carbono Fluorescentes a Partir de Ouriços de Castanha”, 11^a Edição do Fórum de Engenharia Química e Biológica e Biomédica (iFEQB²), Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL), 6 a 9 de maio de 2025, Lisboa, Portugal.

Glossário, Abreviaturas e Símbolos

A

AAI	Atividade Anti-inflamatória
Abs	Absorvância
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
AC	Acetato de celulose
AcOEt	Acetato de etilo
AD	Aditivo
ADN	Ácido desoxirribonucleioco
AE	Análise Elementar
AFM	Microscopia de Força Atômica (<i>Atomic Force Microscopy</i>)
AM	Aquecimento em mufla
ANOVA	Análise de Variância

B

BHE	Barreira Hematoencefálica
BHT	Butil-hidroxitolueno
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)
CHAC	Carbonização Hidrotérmica por Aquecimento Convencional
c.o.	Comprimento de onda

D

def	Deformação
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido (<i>Dimethyl Sulfoxide</i>)

E

EAE	Extração Assistida por Enzimas
EC	<i>Half Maximal Effective Concentration</i>
ED	Etilenodiamina
<i>e.g.</i>	<i>exempli gratia</i> (do latim, por exemplo)
ET	Equivalentes de Trolox
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (do latim, referência a todos)

F	
FBS	Soro fetal bovino (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (<i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i>)
G	
GAE	Equivalentes de Ácido Gálico
GFP	Proteínas verdes fluorescentes (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
H	
HaCaT	Linha não tumoral de queratinócitos
HAT	Doação de átomos de hidrogénio
HeLa	Linha celular tumoral do colo do útero de Henrietta Lacks
HT-29	Linha celular tumoral de adenocarcinoma colorretal humano
I	
IC	Concentração de inibição (<i>Inibitory Concentration</i>)
L	
L929	Linha celular não tumoral de fibroblastos de murganho
LED	Díodo emissor de luz (<i>Light Emission Diode</i>)
M	
MAE	Extração assistida por micro-ondas (<i>Microwave Assisted Extraction</i>)
MCF-7	Linha celular tumoral humana de cancro da mama
MHB	<i>Mueller-Hinton Broth</i>
MIC	Concentração Mínima Inibitória (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
MLC	Concentração Mínima Letal (<i>Minimum Lethal Concentration</i>)
m.r.	Mistura reacional
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
N	
NCsC	Nanocristais de celulose
NIH 3T3	Linha celular de fibroblastos embrionários de murganho
NMsC	Nanomateriais de Carbono
NPsC	Nanopontos de Carbono
NPsC/OsC_XX	Designação atribuída aos nanopontos de carbono sintetizados a partir de ouriços da castanha, em que XX é o número do ensaio
O	
o.m.	Organismos mortos
OsC	Ouriços da Castanha

P	
PBS	Tampão fosfato salino (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PEF	Extração com pulso de campo elétrico
PLE	Extração por líquidos pressurizados
PsC	Pontos de Carbono
R	
RAF	Formação de adutos com radicais
RAP	Reator de alta-pressão
RAW 264.7	Linha celular tumoral de macrófagos de murganho
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Protão
RGD	Péptidos arginina-glicina-ácido aspártico
RNS	Espécies reativas de nitrogénio (<i>Nitrogen Oxygen Species</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigénio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RSM	Metodologia de Resposta de Superfície
S	
S180	Linha celular de sarcoma de murganho
SET	Doação de eletrões
SET-PT	Doação de eletrão seguida de protão
SPE	Extração com fluidos supercríticos
T	
t.a.	Temperatura ambiente
TEM	Microscopia eletrónica de transmissão (<i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TNT	Trinitrotolueno
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8 tetrametilcromano-2-carboxílico
U	
u.a.	Unidades arbitárias
UAE	Extração assistida por ultrassons
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Espetroscopia de Ultravioleta - Visível
V	
VERO	Linha celular epitelial renal de macaco verde africano
vs.	<i>Versus</i>

Símbolos

ζ	Potencial zeta
λ	Comprimento de onda
Φ_F	Rendimento quântico de fluorescência

Índice de Figuras

Figura I.1. Castanea sativa Mill.	5
Figura I.2. Composição morfológica da castanha.....	7
Figura I.3. Constituição e aplicações da biomassa lignocelulósica (adaptado de Okolie et al.). ¹⁷	9
Figura I.4. Estruturas de grafeno, diamante, óxido de grafeno e pontos de carbono. ⁵³	14
Figura I.5. Metodologias de síntese de PsC (adaptado de Khairol Anuar et al. ⁵⁶).	15
Figura I.6. Utilização de PsC em biomedicina (adaptado de Bartkowski et al.). ¹⁴⁷	27
Figura II.1. Apanha da castanha e desperdício do ouriço. ¹⁵⁸	35
Figura II.2. Espetros de FTIR dos OsC e do extrato aquoso (pastilha de KBr).	36
Figura II.3. Espetro de FTIR das cinzas da biomassa OsC (pastilha de KBr).	39
Figura II.4. Espetro de FTIR do resíduo insolúvel retido na membrana (pastilha de KBr).	48
Figura II.5. Espetro de FTIR das frações orgânicas do ensaio NPsC/OsC_13 (pastilha de KBr).	49
Figura II.6. Espetros de FTIR dos NPsC sintetizados por CHAC (pastilha de KBr). ...	51
Figura II.7. Espetros de FTIR dos NPsC sintetizados por CHAC em reator Parr e mufla (pastilha de KBr).	52
Figura II.8. Espetros de RMN ¹ H de dispersões aquosas de NPsC/OsC_01, NPsC/OsC_04 e NPsC/OsC_02 (400 MHz, D ₂ O, 25 °C); *solvente residual.....	53
Figura II.9. Espetro de FTIR das cinzas do ensaio NPsC/OsC_06 (pastilha KBr).	55
Figura II.10. Imagem topográfica 2D (altura) / campo de visão próximo de 1.0 μm ² dos NPsC (ED/OsC = 0.08 (A) e 0.16 (B), 250 °C, 6h, 180 rpm).	56
Figura II.11. Imagem topográfica e de amplitude 3D (altura) / campo de visão de 1.9 × 1.9 μm ² dos NPsC (ED/OsC = 0.08 (A) e 0.16 (B), 250 °C, 6h, 180 rpm).	57
Figura II.12. Espetros de UV-Vis (linha contínua), excitação (linha tracejada; monitorizados a 460 nm) e emissão (linha traço-ponto; λ _{exc} = 380 nm), dos NPsC/OsC_02 (castanho) e NPsC/OsC_04 (verde); [0.1 mg/mL].	58
Figura II.13. Espetros de emissão da solução aquosa NPsC_10; [0.1 mg/mL]; excitação a diferentes comprimentos de onda (λ _{exc} 300-400 nm).	59
Figura II.14. Dispersão aquosa de NPsC irradiada com a. luz visível e b. luz UV (λ _{exc} = 366 nm).	59
Figura II.15. Espetros de emissão dos NPsC/OsC_14, [0.1 mg/mL], sob irradiação contínua (1h; λ _{exc} = 380 nm).	60

Figura II.16. Gráficos de superfície de resposta (3D) dos modelos desenvolvidos para a variação de teor de sólidos nos NPsC, utilizando como aditivo a. ED e b. ureia. As variáveis independentes não representadas nos gráficos foram mantidas a uma temperatura de 250 °C e o aquecimento em reator de alta-pressão Parr (RAP).	63
Figura II.17. Gráficos de superfície de resposta (3D) dos modelos desenvolvidos para a variação de Φ_F nos NPsC, utilizando como aditivo a. ED e b. ureia. As variáveis independentes não representadas nos gráficos foram mantidas a uma temperatura de 250 °C e o aquecimento em reator de alta-pressão Parr (RAP).	64
Figura II.18. Gráficos de superfície de resposta (3D) dos modelos desenvolvidos para a variação de AAI nos NPsC utilizando como aditivo a. ED e b. ureia. As variáveis independentes não representadas nos gráficos foram mantidas a uma temperatura de 250 °C e o aquecimento em reator de alta-pressão Parr (RAP).	65
Figura II.19. Atividade Antioxidante (%) dos NPsC; [1 mg/mL], determinada pelo método de inibição do radical ABTS.	66
Figura II.20. Ensaios de difusão em disco, após incubação da <i>E. coli</i> com a. NPsC/OsC_03 (1000 e 500 μ g/disco) e NPsC/OsC_01 (1000 e 500 μ g/disco) e b. NPsC/OsC_04 (1000 e 500 μ g/disco) e NPsC/OsC_06 (1000 μ g/disco), sendo o controle positivo gentamicina (G, 10 μ g) e o controle negativo água estéril.	68
Figura II.21. Ensaios de difusão em disco, após incubação de <i>S. aureus</i> com a. NPsC/OsC_03 (1000 e 500 μ g/disco) e NPsC/OsC_01 (1000 e 500 μ g/disco) e b. NPsC/OsC_04 (1000 e 500 μ g/disco) e NPsC/OsC_15 (1000 μ g/disco), sendo o controle positivo gentamicina (G, 10 μ g) e o controle negativo água estéril.	69
Figura II.22. Atividade anti-inflamatória (%) dos NPsC; [1 mg/mL].	70
Figura II.23. Citotoxicidade celular dos NPsC/OsC_05 (ED/OsC = 0.32), 0 – 1.0 mg/mL, contra as linhas celulares não tumorais a. VERO e b. NIH-3T3, segundo o método do MTT.	73
Figura II.24. Citotoxicidade celular dos NPsC/OsC_05 (ED/OsC = 0.32), 0 – 1.0 mg/mL, nas linhas celulares tumorais a. S180 e b. HeLa, segundo o método do MTT.	74
Figura II.25. Ensaio de citotoxicidade in vivo após incubação da <i>A. salina</i> com a solução aquosa de NPsC/OsC_05 (0 – 1.0 mg/mL) e cromato de potássio (1mg/mL), durante 24h e 48h.....	75
Figura II.26. <i>A. salina</i> ao microscópio ótico, para identificação do seu trato intestinal (ampliação 100x).	77
Figura II.27. Fotografias de microscopia de fluorescência da <i>A. salina</i> após internalização da solução aquosa NPsC/OsC_05, a diferentes concentrações: a. 0.25 mg/mL e b. 1.00 mg/mL (ampliação 200x).	78

Índice de Tabelas

Tabela II.1. Caracterização físico-química dos OsC.	40
Tabela II.2. Compostos bioativos presentes nos OsC.....	40
Tabela II.3. Efeito da natureza do aditivo nas propriedades dos NPsC.....	42
Tabela II.4. Efeito do rácio biomassa/aditivo nas propriedades dos NPsC.....	43
Tabela II.5. Efeito do rácio biomassa/aditivo nas propriedades dos NPsC.....	43
Tabela II.6. Efeito do tempo de residência nas propriedades dos NPsC.....	44
Tabela II.7. Efeito do tempo de residência nas propriedades dos NPsC.....	44
Tabela II.8. Efeito do tempo de residência nas propriedades dos NPsC.....	45
Tabela II.9. Efeito do tempo de residência nas propriedades dos NPsC, com Ureia/OsC = 0.16.	45
Tabela II.10. Efeito do rácio ED/OsC nas propriedades dos NPsC.	46
Tabela II.11. Efeito do tempo de residência nas propriedades dos NPsC.	46
Tabela II.12. Efeito de permeação por membranas no rendimento quântico de fluorescência e teor de sólidos.....	50
Tabela II.13. Efeito da natureza do aditivo e do rácio mássico ED/OsC na composição elementar dos NPsC obtidos por aquecimento em reator Parr.....	54
Tabela II.14. Potencial ζ de dispersões aquosas de NPsC (1 mg/mL).	55
Tabela II.15. Modelos matemáticos desenvolvidos para o design experimental, em função dos parâmetros estudados (A. Aditivo, B. Tempo, C. Rácio aditivo/OsC) e respetivos coeficientes de determinação (R^2), expresso em coeficientes codificado (-1) e (+1).	62
Tabela II.16. Matriz de ensaios para a análise do Design Experimental.	62
Tabela II.17. Atividade Antioxidante em percentagem dos NPsC, sintetizados sob diferentes condições reacionais, determinada pelo método de inibição do radical ABTS.	67
Tabela II.18. Atividade anti-inflamatória em percentagem dos NPsC, sintetizados sob diferentes condições reacionais.	71
Tabela II.19. Efeito do rácio ED/OsC dos NPsC sintetizados na viabilidade celular das linhas VERO, NIH-3T3, S180 e HeLa.	72
Tabela III.1. Matriz de ensaios do Design Experimental.....	92

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	vii
Abstract	ix
Divulgação Científica	xi
Glossário, Abreviaturas e Símbolos	xiii
Índice de Figuras	xvii
Índice de Tabelas	xix
I. INTRODUÇÃO	1
I.1. PREÂMBULO.....	3
I.2. A CASTANHA.....	5
I.2.1. A Castanha em Portugal	6
I.2.2. Resíduos Resultantes do Processamento da Castanha.....	7
I.2.3. Extração e Isolamento de Compostos Bioativos	10
I.2.4. Métodos de Doseamento de Compostos Bioativos	11
I.3. NANOMATERIAIS DE CARBONO	13
I.3.1. Estrutura de Nanomateriais de Carbono	14
I.3.2. Síntese de Nanopontos de Carbono	14
I.3.3. Propriedades Fotofísicas	19
I.3.4. Bioatividade e Biocompatibilidade.....	21
I.4. APLICAÇÕES DE NANOMATERIAIS DE CARBONO	26
I.4.1. Biossensores	27
I.4.2. Imagiologia Médica	28
I.4.3. Nanomedicina e Teranóstica	28
II. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
II.1. PREÂMBULO.....	33
II.2. CARACTERIZAÇÃO DOS OURIÇOS DA CASTANHA.....	35
II.2.1. Caracterização Estrutural.....	36
II.2.2. Quantificação de Compostos Fenólicos Totais	36
II.2.3. Quantificação de Hidratos de Carbono Totais	37
II.2.4. Quantificação de Polissacáridos	37
II.2.5. Quantificação de Proteínas Totais.....	38
II.2.6. Quantificação de Lípidos.....	38
II.2.7. Quantificação de Cinzas	39
II.2.8. Caracterização Global dos OsC.....	40
II.3. NANOPONTOS DE CARBONO A PARTIR DOS OURIÇOS DAS CASTANHAS	41

II.3.1. Síntese de NPsC por Carbonização Hidrotérmica por Aquecimento Convencional	41
II.3.1.1. Carbonização Hidrotérmica em Reator de Alta-Pressão Parr	41
II.3.1.2. Carbonização Hidrotérmica em Mufla	45
II.3.2. Purificação dos Nanopontos de Carbono	47
III.3.2.1. Isolamento por Filtração em Membrana	47
II.3.2.2. Purificação por Extração Líquido-Líquido	48
II.3.2.3. Purificação por Membrana	49
II.3.3. Caracterização Estrutural	50
II.3.4. Caracterização Morfológica	56
II.3.5. Propriedades Fotofísicas	57
II.4. <i>DESIGN</i> EXPERIMENTAL	61
II.5. AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DOS NPsC	66
II.5.1. Atividade Antioxidante	66
II.5.2. Atividade Antibacteriana	68
II.5.3. Atividade Anti-inflamatória	70
II.5.4. Avaliação da Citotoxicidade	71
II.5.5. Marcação Celular por Fluorescência	76
III. PARTE EXPERIMENTAL	79
III.1. PREÂMBULO	81
III.2. REAGENTES, MATERIAL BIOLÓGICO, TÉCNICAS GERAIS E EQUIPAMENTO	83
III.3. CARACTERIZAÇÃO DOS OsC	86
III.3.1. Extração em Autoclave	86
III.3.2. Quantificação de Compostos Fenólicos Totais	86
III.3.3. Quantificação de Hidratos de Carbono Totais	87
III.3.4. Quantificação de Polissacáridos	87
III.3.5. Quantificação de Proteína Total	88
III.3.6. Quantificação de Lípidos Totais	89
III.3.7. Quantificação de Sólidos Totais	89
III.3.8. Quantificação de Cinzas	89
III.4. SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DOS NPsC	89
III.4.1. Síntese de Nanopontos de Carbono	89
III.4.2. Purificação de Nanopontos de Carbono	90
III.5. <i>DESIGN</i> EXPERIMENTAL	92
III.6. AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DOS NPsC	93
III.6.1. Avaliação da Atividade Antioxidante	93
III.6.2. Avaliação da Atividade Antibacteriana	94

III.6.3. Avaliação da Atividade Anti-inflamatória	94
III.6.4. Avaliação da Citotoxicidade	95
III.6.5. Marcação Celular por Fluorescência.....	97
IV. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	99
V. BIBLIOGRAFIA.....	101

I. INTRODUÇÃO

I.1. PREÂMBULO

O presente trabalho tem como tema a síntese sustentável de nanopontos de carbono (NPsC) fluorescentes, utilizando ouriços da castanha (OsC), proveniente da Serra da Padrela, como biomassa. Os ouriços da castanha não são normalmente aproveitados, resultando em desperdício. Contudo, possuem propriedades interessantes, que lhes conferem potencial para aplicações na área da biomédica, promovendo-se uma economia circular.

Neste capítulo será apresentada uma revisão de literatura onde se descrevem as principais características da castanha e dos ouriços da castanha, a sua origem e as suas propriedades bioquímicas. Os métodos empregues no isolamento de biocompostos com valor acrescentado a partir da biomassa em estudo encontram-se também descritos.

No que diz respeito à síntese de PsC serão abordados os diferentes tipos de nanoestruturas, bem como os seus métodos de síntese. As propriedades fotofísicas e biológicas e as suas potenciais áreas de aplicação serão também descritas.

O presente Capítulo inclui assim as seguintes Secções:

I.2. A Castanha

I.3. Nanomateriais de Carbono

I.4. Aplicações de Nanomateriais de Carbono

I.2. A CASTANHA

O castanheiro europeu pertence à família *Fagaceae*, integrando o género *Castanea*, o qual compreende diversas espécies distribuídas por três regiões principais: Europa e bacia do Mediterrâneo, onde predomina a *Castanea sativa Mill.* (Figura I.1.), Ásia, onde se encontram espécies como a *Castanea crenata*, a *Castanea mollissima*, a *Castanea seguinii* e a *Castanea henryi* e América do Norte, com a *Castanea dentata* e a *Castanea pumila* como espécies dominantes.¹



Figura I.1. *Castanea sativa Mill.*

A distribuição destas espécies pelos diferentes continentes foi influenciada por diversos fatores, incluindo os hábitos vegetativos, características do fruto e da madeira, porte da árvore, resistência a fatores bióticos e abióticos, bem como a sua adaptabilidade a diferentes ambientes. De forma geral, estas espécies desenvolvem-se preferencialmente em solos profundos, pouco compactos e com pH ácido, variando entre 4.0 e 6.5.¹

Os frutos secos são elementos típicos da dieta mediterrânica, estando associados a menores taxas de mortalidade por doenças coronárias e cancro nas populações que seguem este padrão alimentar. Estes benefícios têm sido amplamente atribuídos à presença de compostos com atividade antioxidante. As castanhas, nozes e nozes-pecãs destacam-se por apresentarem um elevado teor de compostos antioxidantes, o que reforça a importância do seu consumo regular no contexto de uma alimentação saudável.²

Em comparação com outros frutos secos, a castanha destaca-se pelo seu baixo teor em gordura e elevado teor em água (ca. 50%), sendo os restantes 50% maioritariamente hidratos de carbono. Estes constituem uma importante fonte energética, complementada pela presença de proteínas com elevado valor biológico e fibras

alimentares. As fibras presentes contribuem para o controlo da glicemia e dos níveis de colesterol, ao retardarem a absorção de açúcares, lípidos e alguns minerais, nomeadamente o sódio.^{3,4,5}

Para além disso, a castanha contém compostos essenciais à proteção celular, nomeadamente vitaminas (B6, C, E e ácido fólico) e minerais como cálcio, cobre, ferro, manganês, magnésio, potássio, fósforo, selénio e zinco. Os compostos fenólicos presentes na castanha e nos ouriços (especialmente taninos), responsáveis pela sua atividade antioxidante, têm sido associados a efeitos benéficos ao nível da saúde, nomeadamente propriedades anticancerígenas, anti-inflamatórias e antidiabéticas.^{3,5,6,7,8}

O ouriço da castanha corresponde aproximadamente a 20 % do seu peso, sendo uma fonte de biocompostos fenólicos e fibra, com propriedades antioxidantes muito interessantes. Segundo Pinto *et al.*⁹, os ouriços da castanha (OsC) são constituídos maioritariamente por hidratos de carbono (entre 60 a 80 %), apresentando, à semelhança da castanha, um baixo teor em gordura e proteínas. Também em matéria inorgânica, apresentam teores baixos.

I.2.1. A Castanha em Portugal

Em Portugal, o castanheiro assume um papel de elevada relevância para a economia nacional, não apenas pela produção de madeira de qualidade superior, mas também pelo seu fruto, amplamente valorizado. A castanha (*Castanea sativa Mill.*), fruto nutricionalmente rico, é tradicionalmente consumida cozida ou assada, integrando tanto preparações doces como salgadas, e pode ser facilmente incorporada numa alimentação equilibrada. Nos últimos anos, a procura deste fruto tem vindo a aumentar, em grande parte devido ao crescente interesse do setor agroindustrial por produtos naturalmente isentos de glúten.^{3,10}

A principal região produtora deste fruto localiza-se em Trás-os-Montes, sendo classificada como região demarcada, a qual representa cerca de 84% da produção nacional, assumindo assim um papel determinante na economia local e na preservação do património paisagístico nacional.²

A nível mundial, Portugal destaca-se como um dos principais produtores de castanha, com uma produção anual estimada em cerca de 45.000 toneladas.¹⁰ A maior parte desta produção é adquirida por empresas de média e grande dimensão, onde as castanhas são sujeitas a processos de limpeza, desinfeção e calibração, antes de serem

comercializadas para consumo em fresco, o que reflete a sua elevada qualidade. Estima-se que apenas cerca de 10.000 toneladas sejam destinadas à transformação, realizada maioritariamente em pequena escala no mercado nacional.¹⁰

I.2.2. Resíduos Resultantes do Processamento da Castanha

Em termos morfológicos, a castanha encontra-se envolvida por um invólucro espinhoso denominado ouriço, o qual se abre no final do verão ou início do outono, libertando os frutos. Cada castanha é revestida por uma casca externa, designada por pericarpo e, entre esta e o miolo, encontra-se ainda uma película fina, semelhante a papel, de difícil remoção denominada tegumento, tal como apresentado na Figura I.2.¹¹



Figura I.2. Composição morfológica da castanha.

A produção de castanha destinada à comercialização envolve várias etapas de processamento, que variam consoante o tipo de mercado-alvo. O produto pode ser comercializado sob a forma de castanha *in natura*, congelada, semi-processada ou como produto transformado.⁴

No caso das castanhas semi-processadas, o tratamento inclui a sua separação por variedades, determinação do calibre (parâmetro que influencia o destino comercial), remoção da casca externa e da película interna, bem como o congelamento, quando aplicável. Este tipo de processamento não só valoriza o produto, como também permite prolongar o seu tempo de conservação, facilitando a sua disponibilidade para fornecimento ao longo de todo o ano.⁴

No segundo tipo de mercado, correspondente à transformação industrial, o valor acrescentado ao produto é ampliado através da conversão da castanha em derivados como puré, glacê, farinha, entre outros. Antes de serem submetidas aos processos específicos de transformação para o produto pretendido, as castanhas passam por

etapas preliminares de preparação, como a separação, calibração, descasque e eventual congelamento, tal como descrito anteriormente.⁴

Do processamento e transformação das castanhas resultam subprodutos de menor valor comercial (folhas, cascas e ouriços) que, apesar de frequentemente subaproveitados, apresentam também um elevado teor de compostos fenólicos e, conseqüentemente, de agentes antioxidantes, tendo assim um elevado potencial para serem reaproveitados.^{3,12} Dos vários compostos fenólicos identificados nestes subprodutos, destacam-se os ácidos fenólicos, os flavonoides e os taninos.^{13,14}

Apesar da alta qualidade da castanha produzida em Portugal, recentemente este setor enfrenta desafios significativos, com prejuízos económicos estimados em cerca de 15 milhões de euros anuais. Um dos principais problemas é o aparecimento de podridão ou infestação por larvas (“bicho”), que afeta entre 15 - 30 % da produção, bem como a perda de água, que compromete a qualidade do fruto e inviabiliza a sua comercialização. Embora a castanha possa ser conservada em fresco durante 6 a 8 meses ou utilizada na produção de produtos processados, em anos de elevada produção nem sempre é possível assegurar o escoamento de toda a colheita, resultando em desperdício e perdas económicas adicionais.¹⁰

O modelo industrial linear continua a dominar a satisfação das necessidades materiais e energéticas, exercendo elevada pressão sobre os recursos naturais e o ambiente. Os recursos fósseis, além de contribuírem para a destruição da camada de ozono, são finitos. A par disso, a recolha, o tratamento e a reciclagem de resíduos sólidos, especialmente em zonas urbanas, tornaram-se uma preocupação crescente em vários países desenvolvidos e em desenvolvimento, devido ao impacto ambiental. O rápido crescimento populacional e industrial tem contribuído para o aumento significativo da produção de resíduos sólidos orgânicos, incluindo lamas de depuração, estrume, resíduos alimentares, resíduos agrícolas e a fração orgânica dos resíduos urbanos. Neste contexto, a adoção de recursos alternativos e de processos renováveis é essencial para garantir a sustentabilidade a longo prazo.¹⁵

A transição para uma economia circular, em particular para uma bioeconomia circular, é crucial para uma gestão eficiente dos recursos. Esta assenta na reutilização de materiais e na aplicação de processos de base biológica que simulam os mecanismos naturais de sustentabilidade, promovendo a circularidade e o uso eficiente dos recursos.¹⁵

A valorização biotecnológica dos resíduos orgânicos surge, assim, como uma estratégia central para mitigar impactos ambientais e integrar fluxos residuais nos ciclos

produtivos, reforçando o papel da bioeconomia na transição para modelos sustentáveis.¹⁵

Neste contexto, os resíduos provenientes da indústria agroalimentar têm vindo a assumir particular relevância, sendo cada vez mais valorizados, não só pelo seu baixo custo, mas também pelo seu elevado potencial para gerar benefícios económicos e ambientais.¹³ Esta valorização tem impulsionado o desenvolvimento de aplicações orientadas para o aproveitamento eficiente dos subprodutos agroindustriais.

A biomassa lignocelulósica, composta por celulose, hemicelulose e lignina, representa uma das principais fontes renováveis para a produção de materiais com valor acrescentado. Estes resíduos, provenientes maioritariamente da agricultura, são abundantes, económicos e renováveis, o que os torna ideais para uma bioeconomia circular sustentável.¹⁶

A sua composição rica em carbono, bem como em elementos como azoto, hidrogénio e oxigénio, torna-os particularmente adequados para a síntese de nanocristais de celulose (NCsC) e nanopontos de carbono (NPsC). A produção de NPsC a partir de resíduos lignocelulósicos permite transformar biomassa de baixo valor em materiais úteis, de forma ambientalmente benigna.¹⁶

Num contexto nacional, os subprodutos do castanheiro, nomeadamente folhas, cascas e ouriços, enquadram-se neste grupo e apresentam elevado potencial para a produção destes nanomateriais.

A Figura I.3 apresenta um esquema com as possíveis aplicações da biomassa lignocelulósica.



Figura I.3. Constituição e aplicações da biomassa lignocelulósica (adaptado de Okolie *et al.*).¹⁷

Para além do seu potencial enquanto matéria-prima lignocelulósica para a produção de nanomateriais, os resíduos do castanheiro apresentam diversas propriedades funcionais que reforçam o seu interesse no contexto da bioeconomia circular.

As folhas do castanheiro têm demonstrado propriedades bioativas com potencial aplicação na proteção contra lesões no ADN, na prevenção da diabetes, na atividade antibacteriana e na proteção da pele contra danos causados pelo stress oxidativo.^{13,18,19}

A casca, por sua vez, pode ser valorizada como adsorvente de metais pesados ou como substituto do fenol em formulações com propriedades adesivas, incluindo aplicações no tingimento de peles com sais de crómio.^{20,21}

Os ouriços da castanha, que são geralmente descartados no solo após a colheita, favorecendo a proliferação de larvas,⁷ têm demonstrado potencial antimicrobiano significativo, nomeadamente contra a *Helicobacter pylori*, ao potenciar a eficácia de antibióticos como a claritromicina e o metronidazol.²² Foram aplicados como coagulantes naturais no tratamento de águas residuais, demonstrando elevada eficiência na remoção de matéria orgânica quando em conjunto com o processo foto-Fenton.²³ Numa perspetiva de biorrefinaria, os ouriços podem servir como fonte de açúcares fermentáveis para a produção de bacteriocinas por *Lactobacillus plantarum*, após pré-tratamento alcalino e hidrólise enzimática.²⁴

1.2.3. Extração e Isolamento de Compostos Bioativos

Os extratos provenientes de plantas são normalmente uma combinação de vários biocompostos com diferentes propriedades, sendo necessária para a sua identificação e caracterização efetuar-se uma extração.²⁵ Alguns dos métodos tradicionais consistem na extração contínua em Soxhlet, maceração e extração a quente por refluxo, sendo que estes dependem normalmente da utilização de solventes orgânicos, com eficiência variável, não sendo adequados para potenciais aplicações dos biocompostos na área da saúde.²⁶

Tendo em conta a toxicidade destes solventes e a necessidade de métodos mais sustentáveis e eficientes, surgem métodos de extração como o pulso de campo elétrico (PEF), por fluidos supercríticos (SPE), assistida por ultrassons (UAE) e por micro-ondas (MAE), por líquidos pressurizados (PLE) e assistida por enzimas (EAE). A preservação dos biocompostos extraídos da biomassa promove maior segurança a nível da saúde.²⁶

Relativamente à extração por PLE, esta baseia-se essencialmente na utilização de altas pressões e temperaturas que afetam a cinética da reação, possibilitando extrações com

um alto rendimento. Não precisam necessariamente de ser utilizados solventes orgânicos, uma vez que o alto rendimento permite a utilização de solventes verdes como a água. Pode ser utilizada uma autoclave para a extração por PLE, sendo que o solvente (água) entra em contacto com a matriz a altas temperaturas e pressões, obtendo-se um maior rendimento de extração e bioatividade dos biocompostos.²⁷⁻²⁹

I.2.4. Métodos de Doseamento de Compostos Bioativos

A castanha e os ouriços da castanha possuem, como referido anteriormente, vários compostos bioativos, que estarão relacionados com as propriedades que apresentam. Assim, na presente secção encontra-se uma contextualização das técnicas utilizadas para o doseamento de compostos fenólicos totais, hidratos de carbono totais, polissacáridos (sulfatados e β -(1,3)-D-glucanos), proteínas e lípidos, presentes na biomassa utilizada neste trabalho.

I.2.4.1. Métodos Colorimétricos

Os métodos colorimétricos são métodos analíticos simples, que permitem quantificar biocompostos através de uma correlação direta entre a absorvância e a quantidade de biocomposto presente, que corresponde a uma concentração.³⁰

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários, produzidos pelas vias metabólicas de plantas, que possuem propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, anticancerígenas e de proteção do sistema cardiovascular.³¹ Um tipo de composto fenólicos são os taninos, que se encontram abundantemente nos ouriços da castanha, podendo este ter benefícios a nível da saúde.⁸ Assim, podem ser quantificados através do método de Folin-Ciocalteu, inicialmente descrito por Folin e Ciocalteu³², em 1927, que se baseia no aparecimento de uma coloração azul intensa, cuja absorvância pode ser lida a 760 nm.³³ Esta coloração aparece na sequência dos estados de menor oxidação do reagente de Folin-Ciocalteu quando o mesmo é reduzido na presença de compostos fenólicos.

Para a quantificação de hidratos de carbono, que constituem maioritariamente os ouriços da castanha, foi utilizado o método do fenol sulfúrico, originalmente desenvolvido por DuBois *et al.*³⁴, em 1956 e otimizado por Masuko *et al.*³⁵, em 2005. Este consiste na desidratação das moléculas de hidratos de carbono pelo ácido sulfúrico e posterior reação destas com o fenol, resultando numa coloração acastanhada estável.

Os produtos da reação com o fenol-sulfúrico absorvem na região do visível, a 490 nm, permitindo assim a quantificação dos hidratos de carbono presentes.

Os β -(1,3)-*D*-glucanos são um tipo de polissacáridos com estrutura em tripla hélice, e têm sido detetados essencialmente em cereais e em cogumelos, encontrando-se associados a efeitos pré-bióticos, que levam a inúmeros benefícios ao nível da saúde, como controlo do colesterol e dos níveis de glucose no sangue, efeito de proteção contra doenças cardiovasculares, hipertensão e cancro.³⁶ Para a sua quantificação pode ser utilizado o método do corante Congo Red, que se baseia na interação específica que ocorre entre o corante Congo Red e os β -(1,3)-*D*-glucanos resultando num desvio batocrómico no espetro de absorção de 488 para 516 nm (>20 m).³⁷

Os polissacáridos sulfatados são uma família de polissacáridos caracterizados pela presença de grupos sulfato que lhes conferem carga negativa, conferindo a estas macromoléculas elevada atividade biológica, nomeadamente propriedades anticoagulantes, anti-inflamatórias, anti-tumorais, antivirais, redução de colesterol.³⁸ A sua quantificação pode ser efetuada através do método altamente específico do corante azul de toluidina, modificado por Hahn *et al.*³⁹, que se baseia na interação específica entre o corante catiónico azul de toluidina e os grupos sulfato presentes nos polissacáridos, através de interações electroestáticas, estabelecendo uma relação linear entre o decréscimo da absorvância a 632 nm e a concentração destes polissacáridos.⁴⁰

A castanha contém elevados teores de proteínas⁸, sendo que a sua identificação e quantificação é convencionalmente realizada através do método descrito por Bradford⁴¹, em 1976. Este é um método rápido e sensível na determinação da concentração de proteínas, baseando-se na interação que ocorre entre o corante brilhante azul de coomassie G-250 e os grupos amino das proteínas, formando um complexo proteína-corante corado de fácil deteção, ocorrendo um desvio batocromático de 465 para 595 nm, alterando a sua coloração original acastanhada para uma coloração azulada.

I.2.4.1. Quantificação de Lípidos

Apesar de estarem presentes em menor quantidade, a castanha e também constituída por lípidos, mais precisamente por ácidos gordos livres, sendo assim relevante a sua quantificação nos ouriços da castanha.⁸

A extração contínua em Soxhlet é um método bastante utilizado na extração de lípidos e de outros biocompostos, sendo considerado um método convencional de simples

execução. Nesta técnica são efetuados ciclos sucessivos onde ocorre a vaporização e condensação do solvente, o qual permanece em contacto com a biomassa.^{42,43}

O método de extração por fluidos supercríticos é uma alternativa para a extração de lípidos, sendo que as suas principais vantagens são a não utilização de solventes tóxicos. Podem ser utilizados dióxido de carbono ou *n*-propano como solventes, sendo o *n*-propano uma alternativa que acarreta um baixo custo, maior eficiência e menor tempo de extração. Quando o fluido supercrítico é difundido pela biomassa consegue penetrar e arrastar consigo os biocompostos presentes na matriz, sendo que estes vão precipitar quando o fluido deixar de se encontrar em condições supercríticas e voltar ao estado gasoso.^{44,45}

I.3. NANOMATERIAIS DE CARBONO

O carbono, elemento amplamente distribuído na natureza, encontra-se sob diversas formas alotrópicas como a grafite e o diamante, e tem vindo a assumir um papel cada vez mais relevante na área da nanotecnologia. Nos últimos anos, os nanomateriais à base de carbono têm despertado um grande interesse científico devido às suas propriedades físico-químicas únicas e ao seu vasto potencial de aplicação diversas áreas.⁴⁶

Entre os principais nanomateriais de carbono (NMsC) destacam-se os nanotubos de carbono⁴⁷, os derivados de fulerenos⁴⁸, os derivados de grafeno⁴⁹ e, mais recentemente, os pontos de carbono (PsC). Embora os três primeiros apresentem propriedades eletrónicas promissoras, a baixa solubilidade em água e a instabilidade da fluorescência na região do visível limitam as suas aplicações.⁴⁶ Os PsC apresentam diversas vantagens, como boa biocompatibilidade, elevada solubilidade em água, estabilidade química, baixa toxicidade, boa condutividade elétrica e relevantes propriedades luminescentes, tornando-os materiais extremamente promissores para múltiplas aplicações.⁵⁰

A descoberta dos PsC remonta a 2004, quando Xu *et al.*⁵¹ observaram, de forma não intencional, nanopartículas de carbono fluorescentes durante um processo de purificação de nanotubos de carbono de parede simples, utilizando o método de descarga elétrica por arco. Em 2006, Sun *et al.*⁵² designaram oficialmente estas nanopartículas com fluorescência estável como PsC.

I.3.1. Estrutura de Nanomateriais de Carbono

A classificação dos nanomateriais de carbono pode basear-se na sua dimensionalidade: estruturas bidimensionais (2D) incluem folhas de grafeno, estruturas unidimensionais (1D) onde se incluem nanotubos e nanofios ultrafinos e ainda estruturas de dimensão zero (0D), como os PsC, pontos de grafeno, pontos de óxido de grafeno e nanodiamantes (Figura I.4.).⁵³

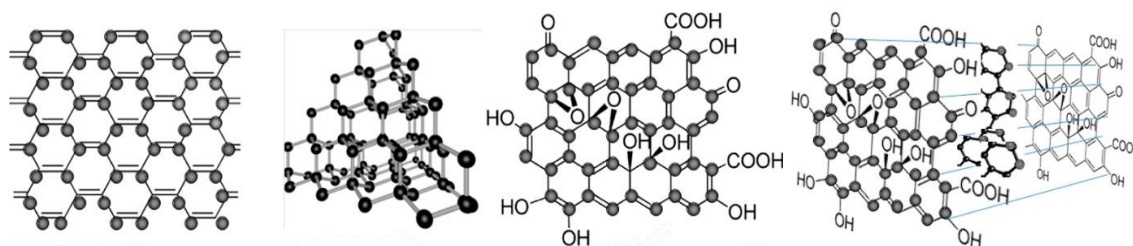


Figura I.4. Estruturas de grafeno, diamante, óxido de grafeno e pontos de carbono.⁵³

Os PsC são considerados materiais altamente versáteis, com estruturas menos definidas em comparação com outros materiais de carbono, podendo ser sintetizados por diversos métodos.

Estruturalmente, os PsC apresentam predominantemente ligações carbono-carbono com hibridização sp^2 , características de estruturas como o grafeno. No entanto, contêm também uma proporção significativa de ligações Csp^3 , semelhantes às encontradas no diamante. Esta combinação sugere a existência de um sistema de conjugação π , análogo ao das folhas de grafeno, embora de forma possivelmente irregular devido à presença dos referidos grupos funcionais.⁵³

I.3.2. Síntese de Nanopontos de Carbono

Os nanopontos de carbono podem ser sintetizados por dois tipos diferentes de metodologias, designadas por *top-down* e *bottom-up*.

As estratégias *top-down* baseiam-se na quebra de grandes estruturas de carbono, os precursores. Esta clivagem pode ocorrer por descarga elétrica por arco, ablação a laser ou métodos de esfoliação, nomeadamente síntese assistida por ultrassons, corte oxidativo, métodos eletroquímicos, hidrotérmico ou solvotérmico. Este tipo de metodologia origina estruturas de carbono com uma estrutura química semelhante à do precursor e apresenta também maior potencial para produção em larga escala.⁵⁴

Por outro lado, nas metodologias *bottom-up*, os PsC são formados a partir das reações de pequenas moléculas orgânicas, utilizando-se como estratégias de carbonização a pirólise, a síntese assistida por micro-ondas e ainda métodos hidrotérmicos ou solvotérmicos. Estes métodos, recorrem à utilização de precursores de baixo custo, apesar da sua complexidade e tempo de síntese, permitem a obtenção de estruturas estáveis, facilmente funcionalizáveis e com um rendimento quântico de fluorescência relativamente elevado.^{46,55}

Na Figura I.5 encontram-se representadas as diferentes metodologias de síntese de PsC.

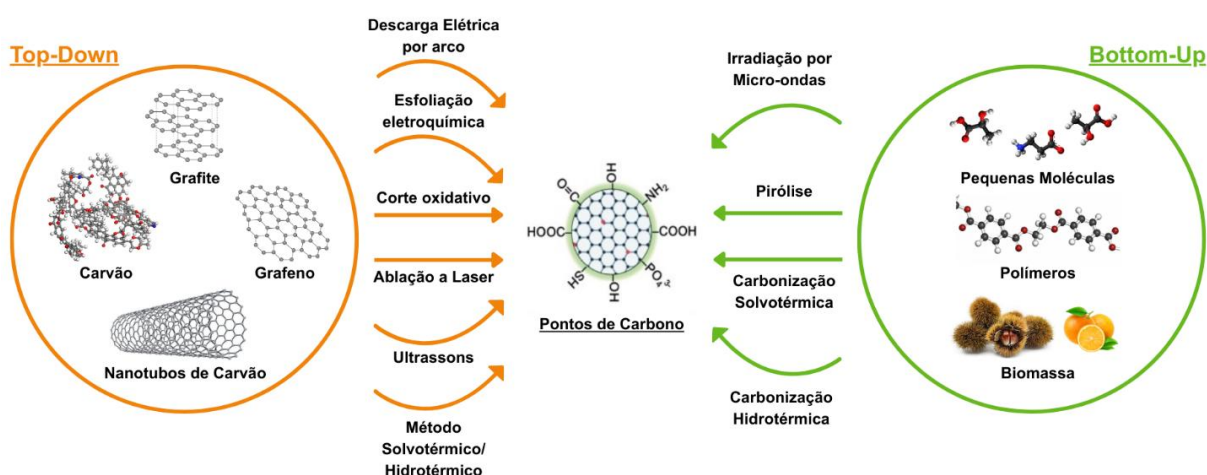


Figura I.5. Metodologias de síntese de PsC (adaptado de Khairol Anuar *et al.*⁵⁶).

I.3.2.1. Métodos *Top-Down*

Nos métodos *top-down*, estruturas de maiores dimensões, como o grafeno, nanotubos de carbono, fibras de carbono, folhas de óxido de grafeno e carvão ativado, sofrem clivagem ou esfoliação, originando estruturas de menor dimensão, com hibridização sp^2 .^{54, 55}

A descarga elétrica por arco foi o método que conduziu à descoberta dos pontos de carbono, por Xu *et al.*⁵¹, durante a purificação de nanotubos de parede simples. Foram preparadas suspensões aquosas estáveis de nanotubos de carbono carregados, sendo a fuligem descarregada por arco elétrico oxidada com HNO_3 e extraída com $NaOH$, resultando em suspensões estáveis de nanotubos em bruto. A realização de eletroforese em gel de agarose e esferas de vidro permitiu a identificação, separação e recolha de material fluorescente quando sob luz UV ultra-violeta ($\lambda = 365 \text{ nm}$), vindo este a ser identificado como PsC. Apesar de ter sido uma descoberta relevante, este método é

atualmente mais utilizado na síntese de nanotubos de carbono, em detrimento da produção de PsC por esta via.⁵⁴

O método de ablação a laser foi desenvolvido por Sun *et al.*⁵², sendo a primeira técnica de produção de PsC em ambiente controlado. O alvo de carbono consistia numa mistura de pó de grafite com cimento, submetido à ação de um laser Nd:YAG. A técnica envolve três passos principais: absorção do pulso de energia pelo carbono, emissão de elétrons por efeito fotoelétrico e termiônico e ainda a criação de um campo elétrico repulsivo que provoca a fragmentação do material.⁵⁷ Os PsC obtidos apresentaram um rendimento quântico de fluorescência relativamente baixo (4-10 %).⁵² Apesar da possibilidade de aumentar o rendimento por modificação posterior, as condições extremas de temperatura e pressão tornam esta estratégia menos eficiente a nível energético e ambiental. O ajuste dos parâmetros de ablação a laser permite controlar características dos materiais, nomeadamente o tamanho, sendo que se observou uma diminuição no rendimento quântico de fluorescência com o aumento da dimensão dos PsC.^{54,58}

O corte oxidativo é uma técnica frequentemente utilizada, que se baseia na oxidação de estruturas de carbono sp^2 com ácidos fortes, formando-se defeitos de superfície que facilitam a formação de PsC. Estes apresentam grupos -OH na superfície, que lhes conferem boa solubilidade em água, podendo posteriormente ser funcionalizados. Devido às preocupações ambientais associadas ao uso de ácidos fortes, Hu *et al.*⁵⁹ exploraram uma síntese verde e de baixo custo utilizando carvão como precursor e peróxido de hidrogénio como oxidante, obtendo PsC com rendimento mássico elevado (50-60 %) e com comprovada atividade fotocatalítica.⁵⁵

A esfoliação eletroquímica baseia-se em reações de oxidação-redução numa célula eletroquímica, onde materiais de carbono são utilizados como elétrodos. A oxidação promove a quebra de ligações e reorganização das estruturas em PsC.^{58,54} Li *et al.*⁶⁰ utilizaram varas de grafite como elétrodos, numa solução de NaOH/EtOH, sintetizando PsC com um rendimento quântico de fluorescência de 12 %.⁶⁰

O método solvotérmico envolve o aquecimento do sistema a temperaturas superiores ao ponto de ebulição do solvente orgânico, provocando um aumento de pressão, promovendo a clivagem de ligações e reorganização em PsC. O método hidrotérmico recorre a utilização de água como solvente, tornando o método mais sustentável. Estes processos, dependendo do precursor utilizado podem classificar-se como *top-down* ou *bottom-up*.⁶¹ Tian *et al.*⁶² utilizaram grafite, peróxido de hidrogénio e dimetilformamida como solvente, obtendo nanopontos de grafeno com rendimento quântico de fluorescência de 15 %.⁶²

Na síntese assistida por ultrassons ocorre cavitação, resultando na formação e colapso de microbolhas, que originam a fragmentação das estruturas de carbono.⁵⁵ Recorrendo a esta metodologia, Zhu *et al.*⁶³ sintetizaram nanopontos de grafeno a partir de óxido de grafeno, com rendimentos quânticos de *ca.* 28 %.

I.3.2.2. Métodos *Bottom-Up*

As abordagens *bottom-up* utilizam precursores classificados em três categorias: moléculas constituintes da biomassa (*e.g.* ácido cítrico, glucose, ácido ascórbico), componentes estruturais da biomassa (*e.g.* celulose, hemicelulose, lignina) e biomassa natural (*e.g.* casca de amendoim, casca de moluscos, pólen de pinheiro).⁵⁶

Na síntese assistida por micro-ondas, pequenas moléculas orgânicas sofrem carbonização muito rapidamente, sendo por isso um método muito vantajoso, minimizando os gastos energéticos, contribuindo para uma maior sustentabilidade ambiental.⁵⁸ Os PsC sintetizados por este método, apresentam rendimentos quânticos relativamente elevados quando comparados a outros métodos *top-down*, podendo citar-se alguns exemplos de precursores empregues na sua obtenção, nomeadamente crisálidas de bicho da seda⁶⁴, membranas da casca de ovo⁶⁵, casca de caranguejo⁶⁶, casca de cebola⁶⁷ e rosas⁶⁸.

Na carbonização hidrotérmica, os precursores orgânicos previamente selecionados são colocados num reator apropriado na presença de solvente e a mistura é submetida a elevada temperatura e pressão, sob atmosfera oxidativa ou inerte.⁵⁸ Este método tem conduzido a resultados muito promissores uma vez que não apresenta toxicidade, é ambientalmente sustentável, tem baixo custo associado e a técnica é de simples execução.⁶⁹ Da vasta diversidade de precursores já utilizados, destacam-se como exemplos o ácido ascórbico,⁷⁰ batata doce e casca de laranja,⁷¹ casca de limão,⁷² folhas de bambu,⁷³ casca de uva,⁷⁴ grãos e borras de café,^{75,76} sumo de maçã⁷⁷ e também rabanetes.⁷⁸

Zhao *et al.*⁷⁹ sintetizaram PsC funcionalizados com nitrogénio, a partir de ácido cítrico e dietilenotriamina, com rendimento quântico de fluorescência de *ca.* 85 %, boa biocompatibilidade e estabilidade em condições salinas. Utilizando casca de kiwi como precursor, Atchudan *et al.*⁸⁰ sintetizaram pontos de carbono com um rendimento quântico de 18 % e baixa citotoxicidade, revelando-se adequados para marcação celular.

Zhuang *et al.*⁸¹ demonstraram que é possível sintetizar nanopontos de nitreto de carbono grafitico com rendimento de ca. 16 %, alta estabilidade e baixa toxicidade, a partir de urina, utilizando o método hidrotérmico.

Para o método de carbonização solvotérmica, um exemplo de síntese mais sustentável é a utilização de pólen de pinheiro.⁸²

A pirólise é um método bastante comum para a síntese de PsC, ocorrendo a degradação térmica de precursores orgânicos a altas temperaturas, sob vácuo ou em atmosfera inerte.⁶⁹ Esta metodologia tem sido explorada utilizando como precursores casca de melancia⁸³, sementes de lichia⁸⁴, casca de amendoim⁸⁵ e também casca de durião (*Durio zibethinus*, uma árvore da família das *Malvaceae*, muito encontrada no Oriente).⁸⁶

I.3.2.3. Funcionalização da Superfície

Apesar de o precursor escolhido para a síntese dos pontos de carbono poder influenciar as suas propriedades luminescentes, o rendimento quântico de fluorescência, sem qualquer tipo de modificação superficial, é geralmente baixo.⁶⁹ Neste contexto, a funcionalização da superfície dos PsC desempenha um papel fundamental na modulação das suas propriedades óticas, nomeadamente no aumento do rendimento quântico de fluorescência, no desvio das bandas espectrais de absorção e na diminuição do *band-gap* de energia, permitindo assim a regulação da energia emitida. Em geral, uma maior oxidação superficial dos PsC gera mais defeitos na superfície, o que contribui para a diminuição do *band-gap* e, conseqüentemente, para a modulação da emissão.⁵⁶

Durante os processos de síntese, é comum a incorporação de grupos funcionais, nomeadamente grupos hidroxilo, carbonilo e carboxilo. Estes grupos, ao permanecerem expostos na superfície dos pontos de carbono contribuem para uma melhoria das suas propriedades químicas e óticas.⁵³ Uma das estratégias mais utilizadas para potenciar estas propriedades é a modificação da superfície, que permite não só melhorar as propriedades óticas e eletrônicas, como também proteger os PsC de impurezas, promovendo a sua estabilidade e o aumento da sua fluorescência intrínseca.

Ao contrário da dopagem com heteroátomos, a modificação da superfície pode ser utilizada para alterar a estrutura superficial e aumentar o número de sítios ativos, potenciando a sua reatividade específica e a hidrofobicidade. Os PsC podem ser funcionalizados com diversos agentes de passivação, nomeadamente polímeros, compostos orgânicos, iões, ADN ou proteínas.^{87,88} O método mais comum envolve

ligações covalentes ou não covalentes, como ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas com pequenas moléculas orgânicas.⁸⁹

Esta alteração deve-se à sobreposição das orbitais atômicas dos heteroátomos com as dos átomos de carbono e ao efeito eletrônico *push-pull* gerado pela sua introdução.⁹⁰ O agente dopante pode ser um único átomo ou uma combinação, incluindo metais (e.g. cobre, gadolínio ou manganês) ou não-metais (e.g. silício, fósforo, enxofre e, o mais comum, nitrogênio).⁸⁷

I.3.3. Propriedades Fotofísicas

Embora possam ser implementadas estratégias de síntese diferenciadas, nomeadamente o modo de aquecimento conducente à carbonização, as fontes de carbono e a natureza dos aditivos, os PsC exibem, em geral, propriedades óticas semelhantes.⁵⁵

Os PsC apresentam absorção ótica máxima na região do ultravioleta (UV) que variam entre 250 e 350 nm, bem como um *cut-off* de absorção que se estende até à região do visível/início do infravermelho. A banda observada a ca. 240 nm é atribuída à transição eletrónica $\pi-\pi^*$ das ligações C=C, sendo a banda a aproximadamente 350 nm, associado a transições $\pi-\pi^*$ de ligações C=O, C-N ou C-OH, provenientes de grupos funcionais carboxilo ou amina presentes na superfície dos PsC.⁹¹ A modificação da superfície e a dopagem com heteroátomos podem alterar o espectro de emissão dos PsC, provocando frequentemente um desvio espectral para a região do vermelho.

A fotoluminescência é uma das propriedades mais relevantes dos PsC, sendo responsável pelo seu vasto potencial de aplicação. No entanto, a origem da fluorescência dos PsC ainda não se encontra completamente estabelecida. Considera-se que a mesma pode resultar de três mecanismos principais: efeito de confinamento quântico, defeitos de superfície, bem como da incorporação de fluoróforos.⁹²

O efeito de confinamento quântico é um fenómeno que ocorre quando os PsC apresentam um tamanho inferior ao raio de excitação de Bohr. Quanto menor o tamanho das nanopartículas, maior a *band-gap* entre as bandas de valências e de condução, resultando num desvio da emissão para a região do azul e numa transição ótica mais eficiente na região do ultravioleta-visível (UV-Vis).⁸⁹

Os domínios π -conjugados são considerados os principais responsáveis pela emissão, sendo que a sua modulação permite alterar a cor da fluorescência emitida. Um maior

número de domínios π -conjugados reduz a *band-gap*, promovendo um desvio da emissão para a região do vermelho.⁹²

Como já descrito anteriormente, a superfície dos PsC pode ser funcionalizada com uma grande diversidade de grupos funcionais. Quando excitados, os elétrons podem ser capturados por estados de defeito associados a esses grupos, localizados entre a banda de valência e a banda de condução. O retorno ao estado fundamental resulta na emissão de luz visível a diferentes comprimentos de onda. Um maior grau de oxidação da superfície conduz à formação de mais defeitos, diminuindo o *band-gap* e provocando um desvio da emissão para comprimentos de onda superiores.⁹²

A incorporação de fluoróforos pode ocorrer espontaneamente durante a carbonização de pequenas moléculas orgânicas, como a glucose. A desidratação e reorganização estrutural dos precursores origina estruturas emissoras, frequentemente com emissão independente do comprimento de onda de excitação e com elevados rendimentos quânticos de fluorescência.⁹² A determinação da dependência do espectro de emissão em relação ao comprimento de onda de excitação permite inferir a origem da fluorescência.⁸⁹ Em geral, o comprimento de onda de emissão e a sua intensidade variam com o comprimento de onda de excitação, sendo que o máximo de emissão surge nas regiões do verde e do azul. A modificação da superfície e a dopagem com heteroátomos também influenciam estas propriedades, tal como o precursor utilizado.⁵⁸

Uma das propriedades mais relevantes destes materiais é o rendimento quântico de fluorescência (Φ_F).⁵⁸ Esta característica quantifica o número de fótons emitidos relativamente ao número de fótons absorvidos e mesmo depende das técnicas de síntese e da composição dos precursores, nomeadamente da origem da biomassa proveniente de resíduos da indústria agrícola.¹⁶ Refira-se como exemplo, PsC sintetizados a partir de casca de castanha exibiram rendimentos quânticos entre 1-4 %;⁹³ tendo o mesmo grupo de investigação obtido nanomateriais provenientes de outras fontes com rendimentos quânticos de fluorescência até 24 %.⁹⁴⁻⁹⁶

Outra propriedade de enorme relevância nestes PsC é a sua fotoestabilidade, propriedade essencial para diversas aplicações. A ocorrência de fotodegradação nos nanomateriais pode ser limitante sobretudo ao nível da bioimagem, uma vez que os NPsC não só sofrem alterações ao nível da sua fluorescência, como também a sua biocompatibilidade fica comprometida.⁹⁷ Para um material ser considerado fotoestável, a intensidade da emissão de luz deve permanecer constante durante períodos prolongados de irradiação contínua.⁹⁸ Dager *et al.*⁹⁹ sintetizaram NPsC utilizando sementes de funcho por pirólise e obtiveram um rendimento quântico de 9.5 %. As

nanopartículas foram submetidas a irradiação contínua com lâmpada de xénon durante quatro horas, tendo a sua intensidade de fluorescência permanecido constante ao longo do tempo.

I.3.4. Bioatividade e Biocompatibilidade

Bioatividade é a capacidade de um composto ou de um material ter um efeito específico ou induzir uma resposta biológica dentro de um organismo ou tecido vivo, que pode incluir efeitos benéficos, como a ação terapêutica de um medicamento ou um biomaterial que provoca uma resposta desejável do hospedeiro, mas também efeitos adversos, como toxicidade ou efeitos secundários. A bioatividade é avaliada através de ensaios biológicos *in vivo* e/ou *in vitro* que avaliam a influência de uma substância em vários processos biológicos, desde a ligação a alvos moleculares até ao impacto em sistemas celulares ou fisiológicos completos.¹⁰⁰

Segundo a norma ISO 10993-1:2018,¹⁰¹ biocompatibilidade é a capacidade de um material realizar a sua função no hospedeiro sem provocar efeitos tóxicos aos sistemas biológicos, propriedade essencial para aplicações biomédicas, uma vez que assegura que o material não induza efeitos indesejados nem represente riscos à segurança clínica.^{56,102}

Raramente um material é considerado biocompatível para todas as suas possíveis aplicações, uma vez que depende não só das propriedades do material, como também da área de aplicação pretendida.¹⁰³

I.3.4.1. Atividade Antibacteriana

Um grande número de doenças infecciosas, como por exemplo a pneumonia ou a osteomielite têm origem em bactérias patogénicas, que podem levar a estados graves de meningite ou septicemia.¹⁰⁴ O atual aumento da resistência bacteriana a antibióticos diminui a eficácia de tratamento contra inúmeras bactérias patogénicas, sendo considerada uma ameaça à saúde humana e uma preocupação global. Nomeadamente, registou-se um aumento de resistência antibacteriana para a *Escherichia coli* e para a *Staphylococcus aureus*, ambas consideradas das bactérias mais resistentes que podem provocar septicemia e mesmo a morte.¹⁰⁵ Assim, é pertinente o desenvolvimento de compostos antibacterianos que possam atuar como substitutos dos antibióticos.

Extratos de ouriços da castanha demonstraram atividade antibacteriana relevante, inibindo o crescimento de diversas estirpes como a *Alternaria alternata* e a *Fusarium*

solani.¹⁰⁶ Contra a *S. aureus*, o extrato alcoólico obtido dos OsC demonstrou atividade antibacteriana.¹⁰⁷ A relevância destes estudos reside no facto de se utilizar um composto com propriedades antibacterianas por si só para a síntese de pontos de carbono, que têm demonstrado também propriedades antibacterianas interessantes, aliado à sua baixa toxicidade para com células mamíferas e à capacidade de interagir com micro-organismos, tornam-se assim bastante promissores.⁵⁶

Os efeitos antimicrobianos dos pontos de carbono devem-se essencialmente a dois tipos de mecanismo: destruição física e degradação bioquímica.¹⁰⁴

A destruição de estruturas e componentes essenciais nas bactérias representa a destruição física, sendo que podem ser destruídas estruturas regiões extremamente importantes como a parede celular, membrana celular, citoplasma, proteínas e nucleóide.¹⁰⁴ A interação e adsorção dos PsC com as bactérias ocorre devido às forças de van der Waals, ligações de hidrogénio e forças electrostáticas, sendo que os PsC podem levar à morte bacteriana através do rompimento e perturbações na permeabilidade da membrana célula, bem como ligações ao ADN.¹⁰⁸ Wang *et al.*¹⁰⁹ sintetizaram PsC a partir de ácido tartárico e *m*-aminofenol apresentando esta atividade antibacteriana e uma eficiência até 99 % para bactérias Gram-positivas, como é o caso da *Staphylococcus aureus*.

A degradação bioquímica ocorre através de efeitos foto térmicos ou fotodinâmicos, que ocorrem na sequência de estimulação externa, podendo esta ser efetuado com uma combinação de ambos os efeitos, obtendo-se uma maior eficiência.¹⁰⁴ A nível fototérmico, o metabolismo das bactérias é altamente dependente das suas enzimas, pelo que um aumento de temperatura, que pode resultar de PsC que convertam a luz em calor, se traduz na desnaturação das mesmas e numa maior vulnerabilidade por parte das bactérias.¹¹⁰ A nível fotodinâmico, os PsC possuem a capacidade de produzir espécies reativas de oxigénio (ROS) quando foto excitados, sendo que estas espécies são conhecidas pela sua capacidade de inibir ou matar micro-organismos. Assim, Tian *et al.*¹¹¹ obtiveram PsC com atividade antibacteriana e uma eficiência de 99 % quando combinados com glucose, relativamente à *Escherichia coli*, uma bactéria Gram-negativa. Estes PsC foram capazes de induzir a morte celular das bactérias pela elevada quantidade de ROS produzidos com incidência de luz solar.

1.3.4.2. Atividade Antioxidante

A oxidação excessiva provoca stress oxidativo, que se encontra relacionado com o envelhecimento precoce¹¹², doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer¹¹³, e com

o aparecimento e desenvolvimento de células cancerígenas.¹¹⁴ Assim, a atividade antioxidante mostra-se especialmente relevante para a saúde.

Vários produtos naturais, como o ouriço da castanha apresentam propriedades antioxidantes devido aos compostos presentes na sua composição, sendo neste caso um dos mais relevantes para a neutralização de radicais livres o ácido elágico, também presente em diversos frutos vermelhos.¹¹⁵ Contudo, também os PsC têm demonstrado possuir propriedades antioxidantes sintéticas, além das capacidades oxidantes anteriormente referidas, relacionadas com a produção de ROS.^{116,117}

Os PsC são compostos por um núcleo rico em ligações duplas de carbono não saturadas, conferindo-lhes uma elevada disponibilidade de eletrões. Esta estrutura, juntamente com os grupos funcionais na superfície permite-lhes neutralizar radicais livres. A atividade antioxidante dos PsC pode ocorrer através de doação de eletrões (SET), doação de átomos de hidrogénio (HAT), doação de eletrão seguida de protão (SET-PT) e a formação de adutos com radicais (RAF). Para além destes mecanismos diretos, os PsC podem ainda atuar indiretamente através da quelação de metais de transição. Desta forma, conseguem prevenir reações de oxidação e contribuir para a redução do stress oxidativo.^{116,117}

Deng *et al.*¹¹⁸ sintetizaram PsC a partir de extratos aquosos de brócolos, que apresentaram uma alta capacidade antioxidante devido à abundância de ligações duplas de carbono e grupos amina na superfície, com EC₅₀ de 22.4 µg/mL para ABTS•⁺.

O método do radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) é frequentemente utilizado para a determinação da atividade antioxidante de compostos. Este ensaio mede a capacidade de um composto neutralizar o radical livre ABTS•⁺, tendo sido inicialmente descrito por Miller *et al.*¹¹⁹ e posteriormente otimizado por Re *et al.*¹²⁰ No seu estado natural, o ABTS é incolor, mas, quando oxidado na presença de persulfato de potássio, adquire uma coloração azul-esverdeada. A neutralização por compostos antioxidantes reverte a coloração para incolor, permitindo quantificar a capacidade antioxidante dos mesmos.

I.3.4.3. Atividade Anti-inflamatória

O processo de inflamação é considerado a defesa primária do organismo, uma vez que pode desencadear a ativação de células imunitárias e não imunitárias, protegendo o hospedeiro de agentes patogénicos, regenerando tecidos e repondo a homeostasia. A inflamação está frequentemente associada à dor e envolve muitos processos biológicos,

como o aumento da permeabilidade vascular, o aumento da desnaturação de proteínas e a alteração da membrana.¹²¹

Quando a inflamação aguda não consegue controlar a desregulação provocada, pode-se desencadear uma inflamação crónica, cuja acumulação de ROS e espécies reativas de nitrogénio (RNS), que atacam as células do hospedeiro, tornam a inflamação uma condição autoimune.¹²² Uma ampla gama de doenças progressivas encontram-se associadas a esta condição, sendo algumas delas doenças cardiovasculares, neurológicas, diabetes, distúrbios metabólicos, e cancro.^{121,123} Os anti-inflamatórios comumente usados para o tratamento de condições inflamatórias são anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) ou corticosteroides, que desenvolvem vários efeitos.¹²¹ Assim, a procura e o desenvolvimento de compostos com atividade anti-inflamatória aumentaram consideravelmente nos últimos anos.

É reportado na literatura que a atividade anti-inflamatória nos PsC depende fortemente do tipo de grupos funcionais presentes na superfície dos mesmos. Ayaz *et al.*¹²⁴ sintetizaram PsC a partir de alfarroba, utilizando como aditivo alginato, álcool polivinílico e polietilenoglicol. Os resultados demonstraram que os funcionalizados com alginato eram pró-inflamatórios, sendo que os funcionalizados com álcool polivinílico apresentaram forte atividade anti-inflamatória e os funcionalizados com polietilenoglicol demonstraram atividade anti-inflamatória moderada, podendo ser utilizados como transportadores de fármacos.

Kong *et al.*¹²⁵ sintetizaram por carbonização hidrotérmica PsC a partir de etilenodiamina, fenilenodiamina e etanol. Estes apresentaram potencial no tratamento de doenças inflamatórias, uma vez que demonstraram atividade anti-inflamatória controlando a produção de ROS *in vivo*.

I.3.4.4. Citotoxicidade

Apesar das propriedades apresentadas anteriormente, a aplicabilidade dos PsC na nanomedicina depende igualmente da avaliação da sua citotoxicidade. Encontra-se reportado na literatura que os pontos de carbono exibem biocompatibilidade satisfatória, não provocando danos após internalização nas células e podendo ser excretados através das vias metabólicas, não sendo assim considerados citotóxicos.¹¹⁶ Contudo é também reportado que esta característica depende de fatores como a concentração, fotoestabilidade e densidade de carga na superfície dos PsC, o que se encontra relacionado com a fonte de carbono as condições de síntese, nomeadamente tempo de

residência e temperatura, que afetam também outras características físico-químicas dos PsC.^{56,126,127}

A citotoxicidade é considerada quando um composto provoca destruição ou comprometimento das células, podendo manifestar-se sob a forma de lise celular, inibição do crescimento celular ou apoptose. Os mecanismos associados à citotoxicidade podem estar relacionados com genotoxicidade, stress oxidativo e inflamação. A genotoxicidade, quando persistente, pode desencadear inflamação, morte celular ou até mesmo cancro, comprometendo o sistema imunológico. Assim, a determinação da citotoxicidade é indispensável na avaliação do potencial de aplicação de novos compostos, garantindo-se a segurança biológica.¹²⁸

A citotoxicidade *in vitro* pode ser avaliada determinando a viabilidade celular das células após exposição ao material em estudo, através do método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), em que através da conversão do MTT em cristais de formazona é determinada a atividade mitocondrial. Assim, qualquer aumento ou diminuição na atividade mitocondrial encontra-se linearmente correlacionado com o número de células vivas, que caso os PsC sejam citotóxicos, diminui.¹²⁹

Chen *et al.*¹³⁰ sintetizaram seis tipos de PsC a partir de diferentes compostos naturais, como bambu, ananás, raízes e caule, apresentando estes uma baixa toxicidade. A avaliação da citotoxicidade foi realizada através do ensaio MTT, utilizando quatro linhas celulares: RAW 264.7, MCF-7 e HT-29 (linhas tumorais) e HaCaT (linha não tumoral). Os resultados demonstraram a sua potencial aplicação e bioimagem e como nanotransportadores.

Ensaio de toxicidade *in vivo* permitem uma compreensão mais abrangente dos efeitos biológicos e da biodistribuição dos PsC num organismo vivo, sendo fundamentais para avaliar o potencial de aplicação em sistemas biológicos complexos. No geral, é reportado na literatura que os PsC exibem baixa toxicidade ou são não tóxicos, sendo excretados de organismos vivos através de vias metabólicas normais, com acumulação no interior do corpo negligenciável.¹²⁷

É comum a utilização do peixe-zebra (*Danio rerio*) como modelo de organismo vivo em ensaios de toxicidade *in vivo*, devido às suas vias metabólicas semelhantes às dos mamíferos, rápido desenvolvimento embrionário *ex vivo*, sequência genómica já determinada e transparência ótica.¹³¹ A *Artemia salina* é um organismo modelo também utilizado em ensaios de toxicidade, uma vez que está facilmente disponível a um baixo custo, e possui uma alta taxa de eclosão, um curto ciclo de vida e uma grande capacidade de adaptação a situações extremas, sendo no entanto altamente sensível a

compostos tóxicos, especialmente 2 dias após a sua eclosão.¹³² A ausência de corda dorsal torna estes microcrustáceos isentos de autorizações de centros éticos, sendo uma alternativa à utilização de outros organismos como o peixe-zebra e o murganho.¹³³

A partir de um poluente orgânico presente em águas industriais, Chen *et al.*¹³⁴ sintetizaram nanopontos de carbono a partir de uma síntese verde. Estes possuíam excelentes propriedades luminescentes e uma biotoxicidade muito reduzida, tendo esta sido testada *in vitro*, através do ensaio de MTT em células tumorais HeLa e *in vivo*, no peixe-zebra. A biotoxicidade reduzida dos PsC demonstrou ser menor do que a apresentada pelo poluente.

Foi efetuado um estudo de toxicidade por Soledad-Flores *et al.*¹³⁵ em PsC sintetizados por irradiação de micro-ondas, a partir de *D-(+)-Glucose* e polietilenimina ramificada, com água desionizada como solvente. Os ensaios foram realizados *in vivo*, com a *A. salina*, durante 48 horas, tendo os resultados demonstrado a não toxicidade dos PsC, relacionada com a sua estabilidade. Também Thirumalaivasan *et al.*¹³⁶ demonstraram a não toxicidade e segurança dos PsC através de ensaios de toxicidade *in vivo* com a *A. salina*, reforçando o seu potencial para aplicações biomédicas. Os PsC foram sintetizados a partir resíduos de embalagens de fast-food não biodegradáveis e fucoidan, um polissacárido sulfatado presente em algas marinhas.

I.4. APLICAÇÕES DE NANOMATERIAIS DE CARBONO

Decorrente das propriedades anteriormente descritas, os NPsC apresentam um vasto leque de aplicações em diversas áreas. Na indústria alimentar, tem sido avaliada a sua utilização na deteção de agentes patogénicos¹³⁷, na análise de aditivos alimentares¹³⁸, na avaliação da composição nutricional,¹³⁹ na monitorização de embalagens¹⁴⁰ e também na deteção de resíduos de pesticidas.¹⁴¹ O seu potencial no tratamento de água¹⁴², na deteção de explosivos, como o trinitrotolueno (TNT),¹⁴³ na conversão de energia solar, nomeadamente em células solares¹⁴⁴ e na degradação de poluentes atmosféricos, como o dióxido de carbono (CO₂), através de processos de fotocatalise, tem também sido explorado.¹⁴⁵ A sua aplicabilidade na produção de díodos emissores de luz (LEDs) foi igualmente investigada na última década.¹⁴⁶ Neste contexto, estão

apresentadas na Figura I.6 utilizações dos NPsC no domínio da biomedicina, sendo algumas delas posteriormente descritas.

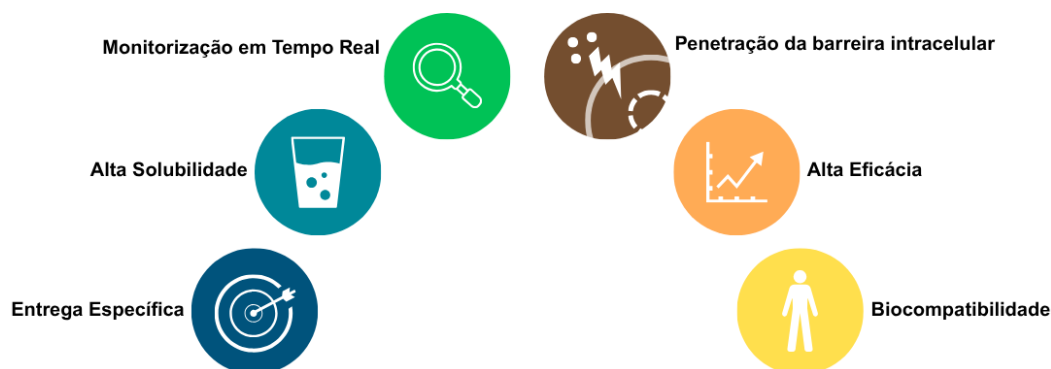


Figura I.6. Utilização de PsC em biomedicina (adaptado de Bartkowski *et al.*).¹⁴⁷

I.4.1. Biossensores

Devido às excelentes propriedades fluorescentes exibidas pelos pontos de carbono, especialmente os sintetizados a partir de biomassa, os quais exibem uma superfície com grande diversidade de grupos funcionais, estes nanomateriais têm sido amplamente explorados como biossensores.⁴⁶ A sua capacidade de interagir com aniões, metais pesados e moléculas específicas, resulta em alterações quantificáveis da intensidade de fluorescência, possibilitando a deteção seletiva e sensível dessas espécies.⁵⁰

Utilizando diferentes tipos de biomassa lignocelulósica, Qiu *et al.*¹⁴⁸ sintetizaram por carbonização hidrotérmica, nanopontos de carbono que exibiram boa solubilidade em água, elevada fotoestabilidade, exibindo excelente sensibilidade na deteção de iões Fe^{3+} . Apesar de exibirem um rendimento quântico relativamente baixo (1.66 %), demonstraram ser eficazes na deteção deste metal, cuja presença em alimentos ou água pode causar efeitos adversos à saúde humana.

O ião arsenito (AsO_3^{3-}) que pode estar presente na água é altamente tóxico e cancerígeno, sendo a sua monitorização ambiental de extrema importância. Pooja *et al.*¹⁴⁹ sintetizaram PsC por pirólise assistida por irradiação micro-ondas, utilizando ácido cítrico e cisteamina como precursores e funcionalizaram a sua superfície com grupos tiol recorrendo a ditiotreitól; a presença do ião arsenito induziu a um aumento da fluorescência quantificável.

A deteção de substâncias não metálicas como o ião nitrito (NO_2^-) também tem sido estudada. Este ião, utilizado como aditivo na conservação de carnes, está associado a

riscos acrescidos de doenças como o cancro ou a hipertensão. Zhang *et al.*¹⁵⁰ sintetizaram PsC com rendimento quântico de fluorescência 37.8 %, a partir de sementes de ginkgo ou noqueira do Japão, por carbonização hidrotérmica, os quais revelaram elevada seletividade e sensibilidade para este ião.

I.4.2. Imagiologia Médica

Considerando as suas propriedades fluorescentes, a sua baixa toxicidade e excelente biocompatibilidade, os NPsC revelam-se altamente promissores para aplicações em imagem médica, uma técnica fundamental para a visualização de processos biológicos em tempo real, como a distribuição de fármacos no organismo.⁵⁶ Contrariamente aos nanopontos semicondutores metálicos, que apresentam toxicidade significativa, ou corantes orgânicos como as *green fluorescent proteins* (GFP), que sofrem fotodegradação, os NPsC revelam-se como uma alternativa segura, fotoestável e ambientalmente sustentável.^{46,50}

Zhang *et al.*¹⁵¹ sintetizaram NPsC a partir da pele de grão de café, os quais apresentaram uma boa capacidade antioxidante, elevada fotoestabilidade e biocompatibilidade. Testes realizados em murganhos revelaram que os PsC se acumularam principalmente nas células tumorais e no fígado, sem interferência em funções vitais. Os murganhos encontravam-se vivos mesmos após 6 dias da aplicação, o que demonstra uma excelente biocompatibilidade *in vivo*.

Estudos semelhantes foram realizados por Gudimella *et al.*,¹⁵² utilizando como precursores, cascas de frutas cítricas, obtendo nanopartículas altamente solúveis em água, com ótimas propriedades fluorescentes, elevada biocompatibilidade e baixa toxicidade. A funcionalização com ácido fólico permitiu uma marcação celular eficiente, observável a diferentes comprimentos de onda.

I.4.3. Nanomedicina e Teranóstica

A maioria dos nanomateriais já utilizados em nanomedicina e teranóstica não demonstram quaisquer atividade luminescente, o que torna os PsC particularmente interessantes para estas aplicações.⁵⁸ Para além dos biossensores e da imagem celular que inclui a monitorização de núcleos celulares, os PsC têm sido utilizados na entrega dirigida de fármacos e genes, bem como em terapia fotodinâmica, oferecendo soluções promissoras para o diagnóstico precoce e tratamento de várias doenças, nomeadamente do foro oncológico ou infeções graves.¹⁵³

A entrega de fármacos por NPsC também se tem revelado altamente promissora, sendo os NPsC funcionalizados seletivamente de forma a reconhecer alvos celulares específicos. Zhao *et al.*¹⁵⁴ sintetizaram PsC com dupla resposta ao pH/redox, permitindo a libertação seletiva do fármaco em ambientes tumorais de maior acidez. A funcionalização dos PsC com péptidos arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) facilitou a penetração do fármaco cisplatina nas células, induzindo a morte celular seletiva em células cancerígenas, sendo possível o rastreamento por fluorescência.

A terapia fotodinâmica é atualmente um tratamento não invasivo contra o cancro que utiliza compostos fotossensíveis ativados por luz para gerar espécies reativas de oxigénio (ROS), que induzem a apoptose das células cancerígenas.¹⁴⁷ Foram sintetizados PsC a partir de amido por Bi *et al.*,¹⁵⁵ recorrendo a pirólise, tendo os PsC sido co-dopados com átomos de nitrogénio e de fluór. Estes PsC demonstraram capacidade de gerar radicais OH e aniões O_2^- quando irradiados com luz LED, o que induziu a apoptose das células cancerígenas.

Como vetores não virais de transferência genética, os PsC demonstram também elevado potencial. O processo de transferência genética consiste na introdução de material genético exógeno nas células, com o objetivo de estudar funções génicas, corrigir mutações ou desenvolver terapias para diversas doenças. Vetores virais tradicionais apresentam riscos biológicos consideráveis, enquanto os PsC se revelam como uma alternativa mais segura. Através de interações electroestáticas, os PsC catiónicos formam complexos de carga negativa com o material genético, facilitando a sua entrada nas células por endocitose mediada.¹⁴⁷ Zhang *et al.*¹⁵⁶ sintetizaram PsC a partir de ácido cítrico e penta-etilenoamina, através de síntese assistida por irradiação micro-ondas. Os PsC formaram complexos eletrostáticos com ADN numa proporção mássica de 2:1, demonstrando elevada capacidade de transfecção genética.

Um dos maiores desafios no tratamento eficiente de doenças neurológicas é a penetração da barreira hematoencefálica (BHE). Os PsC têm demonstrado capacidade de ultrapassar esta barreira, viabilizando a entrega de fármacos ao sistema nervoso central. Leblanc *et al.*¹⁵⁷ sintetizaram PsC a partir de *D*-glucose, explorando a capacidade desta molécula facilitar a penetração da BHE, observando-se acumulação dos PsC no cérebro.

II. RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.1. PREÂMBULO

Como descrito anteriormente, há um interesse crescente no desenvolvimento de NPsC sustentáveis, não só devido às propriedades que demonstram na área biológica, possibilitando diversas aplicações, como também pela vertente ambiental, promovendo uma bioeconomia circular. Os ouriços da castanha não têm nenhuma aplicação concreta, sendo normalmente deixados no solo, onde promovem a proliferação de larvas e resultam em desperdícios no setor agrícola e financeiro.

No presente Capítulo será apresentada a caracterização físico-química da biomassa OsC, quantificando-se alguns dos biocompostos presentes e o conteúdo em sólidos totais e cinzas, bem como a sua caracterização estrutural.

No que diz respeito aos NPsC, serão abordadas as condições de síntese por carbonização hidrotérmica com aquecimento convencional (CHAC), em reator Parr e em mufla. Será também efetuada uma caracterização estrutural e morfológica dos NPsC, recorrendo a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), ressonância magnética nuclear de protão (RMN ^1H), análise elementar (AE) e microscopia de força atômica (AFM). As propriedades fotofísicas serão avaliadas por espectroscopia de absorção no estado estacionário (UV-Vis) e espectroscopia de fluorescência no estado estacionário.

Por fim, serão ainda estudadas algumas atividades biológicas dos NPsC sintetizados, nomeadamente propriedades antioxidantes, atividade antibacteriana, atividade anti-inflamatória, citotoxicidade *in vitro* e *in vivo* e o seu potencial para marcação celular por fluorescência.

Paralelamente, de forma a otimizar as condições de síntese dos NPsC para a maximização do teor de sólidos, do rendimento quântico de fluorescência, bem como de algumas das suas bioatividades, nomeadamente atividade antioxidante e anti-inflamatória, foi desenvolvido um planeamento experimental fatorial. Constam assim as seguintes Secções no presente Capítulo:

II.2. Caracterização dos Ouriços da Castanha

II.3. Síntese de Nanopontos de Carbono

II.4. *Design* Experimental

II.5. Avaliação da Bioatividade dos NPsC

II.2. CARACTERIZAÇÃO DOS OURIÇOS DA CASTANHA

A síntese sustentável de NPsC apresentada neste trabalho recorreu à utilização da biomassa proveniente dos ouriços da castanha (OsC), um desperdício muito abundante na indústria agroalimentar do processamento deste fruto. Os ouriços utilizados foram fornecidos pela indústria Agromontenegro, uma das maiores empresas em Portugal responsável pela produção e comercialização da castanha, decorrente da colheita em 2024, na sua exploração de soutos situados na Serra da Padrela. Na Figura II.1 encontra-se representada a apanha da castanha e separação do fruto e do ouriço.



Figura II.1. Apanha da castanha e desperdício do ouriço.¹⁵⁸

Nesta Seção serão descritos os métodos empregues na caracterização deste resíduo recorrendo a procedimentos descritos na literatura. Os ouriços foram inicialmente triturados para promover a homogeneização das amostras, procedendo-se à identificação e quantificação de alguns biocompostos, bem como à determinação do teor de cinzas.

A caracterização dos OsC foi assim realizada a partir de extratos aquosos de coloração acastanhada, obtidos por extração em autoclave utilizando apenas água como solvente em razões biomassa:solvente 1:5, 1:10 e 1:20, tendo-se obtido um teor em sólidos totais médio de 21.26 ± 6.46 mg/mL.

Entre os extratos obtidos, selecionou-se o da razão 1:20, uma vez que foi o que apresentou os maiores conteúdos de biomoléculas. Paralelamente, a quantificação de lípidos foi realizada num extrato obtido por extração contínua em extrator Soxhlet com recurso a *n*-hexano como solvente.

II.2.1. Caracterização Estrutural

A espectroscopia de FTIR foi utilizada para identificar os principais grupos funcionais presentes quer nos OsC, quer no respetivo extrato aquoso (Figura II.2).

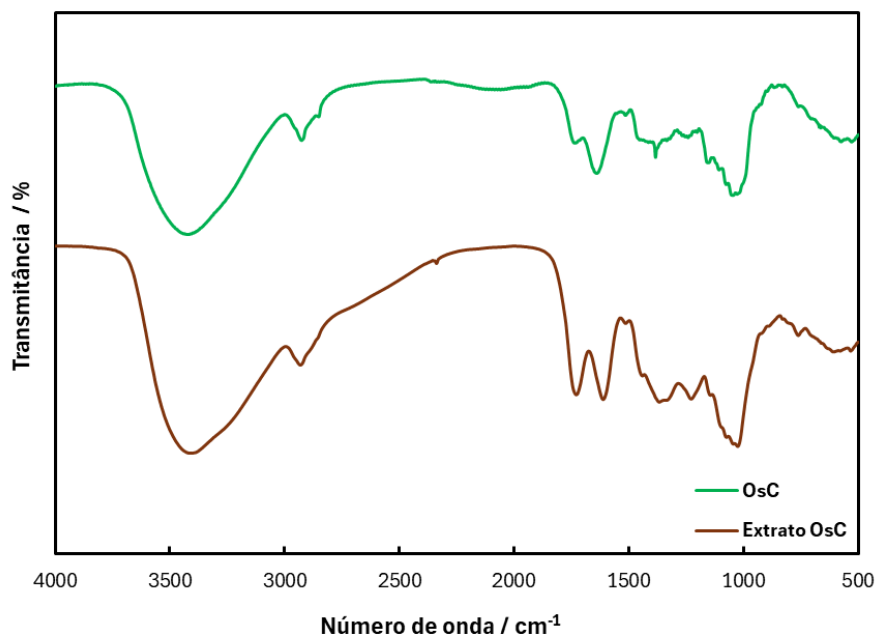


Figura II.2. Espectros de FTIR dos OsC e do extrato aquoso (pastilha de KBr).

Da análise dos espectros de infravermelho é possível observar uma banda a 3418 cm^{-1} correspondente à ligação de extensão de O-H (larga) presente em estruturas fenólicas e alifáticas, bandas características de biomassas de origem lenhosa. As bandas presentes a 2924 e 2850 cm^{-1} são características das vibrações de extensão das ligações C-H de cadeias alifáticas, presentes nos ácidos gordos que constituem a lignina. As bandas a 1731 e 1640 cm^{-1} são atribuíveis às vibrações de extensão C=O e C=C. Na região das vibrações de deformação estão presentes bandas a 1476 , 1385 , 1320 , 1239 , 1105 , 1085 , 1080 e 1055 cm^{-1} referentes a ligações C-H, C-C, C-O e O-H e tipicamente presentes em compostos lignocelulósicas.¹⁵⁹

A análise elementar (AE) de uma amostra de OsC apresentou teores de 45.17 % C, 5.18 % H, 0.37 % N, 47.13 % O (calc.) e < 0.3 % S, corrigidos com o teor de cinzas obtido (cf. referido na Secção II.2.7).

II.2.2. Quantificação de Compostos Fenólicos Totais

Para a quantificação de compostos fenólicos totais no extrato aquoso de OsC foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu, adaptado do método descrito por Reis *et al.*¹⁶⁰.

Obteve-se um teor de 68.06 ± 0.79 mg GAE/g OsC de compostos fenólicos, o que corresponde a 6.81 % a da biomassa.

Num estudo de Pinto *et al.*⁹ encontram-se reportados valores de 56.20 ± 3.43 mg GAE/g de biomassa seca, para ouriços provenientes da região de Trás-os-Montes, região da qual provêm os OsC e valores de 92.24 ± 1.19 e 85.28 ± 0.70 mg GAE/g de biomassa seca, para ouriços provenientes da região da Beira-Alta e Minho, respetivamente. Os valores obtidos encontram-se ligeiramente acima do esperado. Estas diferenças podem ser devidas a alterações na humidade dos solos onde as castanhas são cultivadas, que se refletem num aumento da quantidade de biocompostos presentes na biomassa.⁹

II.2.3. Quantificação de Hidratos de Carbono Totais

Os hidratos de carbono totais presentes no extrato aquoso de OsC foram quantificados através do método do fenol-sulfúrico, adaptado do descrito por Masuko *et al.*³⁵ Obteve-se um teor de 89.05 ± 1.01 mg/g OsC de hidratos de carbono, correspondendo a 8.91 % da biomassa.

O valor obtido encontra-se abaixo dos valores descritos na literatura; Pinto *et al.*⁹ indicam teores de 67.87 ± 0.17 % para os ouriços provenientes de Trás-os-Montes. Embora os valores reportados na literatura sejam muito variáveis, o teor obtido é bastante inferior, podendo ser justificado pelo processo de extração e solvente utilizados, uma vez que a água tem dificuldade em penetrar no ouriço da castanha, devido à cera e resina que possui também na sua composição, bem como à presença de carboidratos insolúveis em água, comprometendo a extração efetiva destes biocompostos.¹⁶¹

II.2.4. Quantificação de Polissacáridos

II.2.4.1. Quantificação de β -(1,3)-D-glucanos

Os β -(1,3)-D-glucanos com estrutura em tripla hélice presentes no extrato aquoso de OsC foram quantificados através do método do corante Congo Red, descrito por Semedo *et al.*³⁷ Os resultados obtidos indicaram um conteúdo de 9.21 ± 1.47 mg/g OsC, correspondendo a um teor de 0.92 % de β -(1,3)-D-glucanos na biomassa. Na literatura não se encontra descrita a quantificação de β -(1,3)-D-glucanos presentes em OsC, nem na castanha. Contudo, Costa-Trigo *et al.*¹⁶¹ identificaram um teor de 20.04 ± 0.18 % de glucanos nos ouriços da castanha secos, sendo este valor bastante superior, uma vez que se refere ao conteúdo de glucanos totais presentes na biomassa. À semelhança

do descrito para os hidratos de carbono totais, o baixo teor de β -(1,3)-*D*-glucanos determinado pode resultar da utilização de água como solvente de extração e do facto do método utilizado detetar especificamente β -(1,3)-*D*-glucanos com estrutura em tripla hélice.

II.2.4.2. Quantificação de Polissacáridos Sulfatados

Para a quantificação de polissacáridos sulfatados nos OsC, aplicou-se o método do corante azul de toluidina, adaptado do descrito por Hahn *et al.*³⁹ O teor obtido a partir do extrato aquoso foi de 3.97 % da composição da biomassa, correspondendo a 39.69 ± 0.25 mg/g OsC.

Não se encontram reportados na literatura valores relativos à quantidade de polissacáridos sulfatados para este tipo de resíduo. No entanto, é expectável que este valor seja baixo uma vez que este biocomposto é normalmente mais abundante em organismos aquáticos, nomeadamente em algas marinhas e microalgas.³⁸

II.2.5. Quantificação de Proteínas Totais

A quantificação de proteínas totais presentes no extrato aquoso de OsC foi efetuada pelo método adaptado do descrito por Bradford *et al.*,⁴¹ sendo obtido um teor de 0.74 % de proteínas na composição da biomassa, equivalente a 6.91 ± 0.23 mg/g OsC.

Era expectável um baixo teor de proteínas, pois a própria castanha possui um baixo teor deste biocomposto, encontrando-se de acordo com o reportado na literatura. Pinto *et al.*⁹ reportam um teor de proteínas nos ouriços da castanha de 3.14 ± 0.15 %, para os oriundos da região de Trás-os-Montes e 2.22 ± 0.01 e 3.16 ± 0.09 %, para as castanhas produzidas nas regiões da Beira-Alta e Minho, respetivamente. As discrepâncias observadas podem ser justificadas, uma vez mais, pelas distintas condições edafoclimáticas no desenvolvimento destas culturas, as quais exercem influência direta na composição em biocompostos.⁹

II.2.6. Quantificação de Lípidos

Foi aplicado o método gravimétrico após extração contínua em Soxhlet, utilizando *n*-hexano como solvente para determinar o teor de lípidos, tendo-se obtido um teor de 1.13 %, correspondente a 11.32 ± 0.35 mg/g OsC.

À semelhança do conteúdo de proteínas, era também expectável um baixo teor em lípidos uma vez que esta é uma das características nutricionais da castanha mais conhecidas. Encontra-se reportado na literatura por Pinto *et al.*⁹ um valor de 1.59 ± 0.01 % para os OsC provenientes de Trás-os-Montes e 0.85 ± 0.00 e 1.19 ± 0.01 % para os ouriços das regiões da Beira-Alta e Minho, respetivamente, validando os resultados obtidos.

II.2.7. Quantificação de Cinzas

O teor de matéria inorgânica presente na biomassa foi avaliado recorrendo à determinação de cinzas dos OsC. Obteve-se um valor de 2.06 ± 0.22 %, equivalente a 20.59 ± 2.20 mg/g biomassa, estando este valor concordante com o descrito na literatura (1.80 ± 0.06 % para os OsC provenientes de Trás-os-Montes e 1.37 ± 0.05 e 5.61 ± 0.27 % para os ouriços das regiões da Beira-Alta e Minho, respetivamente).⁹

O espectro de FTIR das cinzas de OsC encontra-se apresentado na Figura II.3, observando-se uma banda proeminente a 1416 cm^{-1} , que identifica a presença de carbonatos, uma vez que a mesma é característica de vibrações de extensão C=O assimétricas.

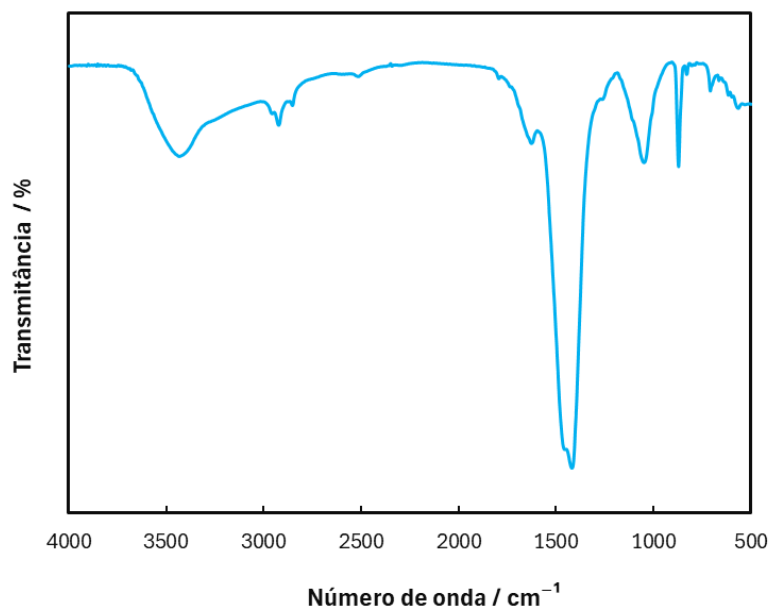


Figura II.3. Espectro de FTIR das cinzas da biomassa OsC (pastilha de KBr).

II.2.8. Caracterização Global dos OsC

A caracterização físico-química da biomassa encontra-se descrita na Tabela II.1, sendo a quantificação dos compostos bioativos presentes nos OsC apresentados na Tabela II.2.

Tabela II.1. Caracterização físico-química dos OsC.

Parâmetro	OsC
Sólidos Totais (mg/mL)	21.26 ± 6.46
Cinzas (%)	2.06 ± 0.22
Microanálise (%)	45.17 C, 5.18 H, 0.37 N, 47.13 O (calc.) e < 0.3 S

Valores médios ± DP dos replicados.

Tabela II.2. Compostos bioativos presentes nos OsC.

Biocomposto	Composição
Fenólicos Totais ¹ (mg GAE/g OsC)	68.06 ± 0.79
Hidratos de Carbono Totais ¹ (mg/g OsC)	89.05 ± 1.01
β -(1,3)-D-glucanos ¹ (mg/g OsC)	9.21 ± 1.47
Polissacáridos sulfatados ¹ (mg/g OsC)	39.69 ± 0.25
Proteínas ¹ (mg/g OsC)	6.91 ± 0.23
Lípidos ² (mg/g OsC)	11.32 ± 0.35

¹Quantificação realizada a partir do extrato aquoso; ²Quantificação realizada a partir do extrato de *n*-hexano; valores médios ± DP dos replicados.

Tal como referido anteriormente, os biocompostos disponíveis na biomassa dependem de vários fatores, nomeadamente das condições e métodos de extração, bem como das próprias condições edafoclimáticas em que se desenvolvem os OsC (e.g. em solos mais húmidos, os biocompostos são preservados mais facilmente).⁹

Recorreu-se à extração em autoclave utilizando água como solvente, no entanto, para a extração de alguns biocompostos, nomeadamente os hidratos de carbono totais e polissacáridos, este solvente apresenta limitações, pois a água tem dificuldade em penetrar no ouriço da castanha e alguns destes biocompostos possuem baixa solubilidade em água, reduzindo assim a eficiência da extração.¹⁶¹ Outro fator potencialmente determinante na composição química dos OsC refere-se ao momento da colheita, realizada quando estes já se encontravam secos e caídos no solo, o que pode ter alterado algumas de suas propriedades químicas.

II.3. NANOPONTOS DE CARBONO A PARTIR DOS OURIÇOS DAS CASTANHAS

A propriedades e características dos NPsC sintetizados são abordadas nesta Seção, sendo comparadas as condições de síntese, de modo a determinar quais as que mais influenciam determinadas propriedades e quais as mais vantajosas. Os NPsC foram caracterizados estruturalmente e morfologicamente e foram exploradas as suas propriedades luminescentes, nomeadamente a sua fotoestabilidade e a sua luminescência ajustável.

II.3.1. Síntese de NPsC por Carbonização Hidrotérmica por Aquecimento Convencional

Na obtenção dos NPsC foi utilizada como metodologia de síntese a carbonização hidrotérmica por aquecimento convencional (CHAC), recorrendo a aquecimento em reator de alta-pressão Parr (RAP) e aquecimento em mufla (AM). Nesta Seção serão explorados os dois métodos de aquecimento aplicando diferentes condições reacionais (e.g. temperatura, tempo de residência, natureza do aditivo) e o seu efeito nas propriedades fotofísicas dos NPsC obtidos. Será apresentada a caracterização estrutural e ótica dos NPsC e determinados os rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F) recorrendo à utilização de sulfato de quinino em H_2SO_4 0.1 M, como padrão de referência (*vide* Seção III.2). Será igualmente determinado o tempo de vida de fluorescência dos NPsC e ainda, o seu potencial ζ .

II.3.1.1. Carbonização Hidrotérmica em Reator de Alta-Pressão Parr

Os ensaios de CHAC foram realizados em RAP em vaso de aço-inox, onde foram adicionadas ca. 3 g de OsC e 100 mL de água ultrapura. Como fonte de nitrogénio para a funcionalização dos NPsC foram testados dois aditivos, nomeadamente etilenodiamina (ED) e ureia em diferentes rácios mássicos aditivo/OsC. Sendo um dos objetivos do presente trabalho realizar o *design* experimental para algumas das condições reacionais em estudo, todos os ensaios em reator Parr foram realizados em duplicado.

As condições reacionais foram selecionadas com base em estudos anteriores desenvolvidos pelo grupo de investigação.⁹⁴⁻⁹⁶

A presença de nitrogénio na superfície dos NPsC favorece a sua funcionalização diversificada, possibilitando a modulação das suas propriedades. Neste contexto, procurou-se avaliar de que forma a natureza do aditivo influencia as características dos

NPsC, em particular o seu rendimento mássico, o teor de sólidos e o rendimento quântico de fluorescência (Φ_F), propriedade de particular interesse para aplicações biológicas.

Foram utilizadas preferencialmente aminas alifáticas na funcionalização dos NPsC, uma vez que de acordo com Mishra *et al.*,¹⁶² a utilização de aminas aromáticas resulta numa redução do rendimento quântico de fluorescência, embora possa proporcionar um desvio batocrómico no seu espectro de fluorescência. Tal deve-se à introdução de processos adicionais de desexcitação não radiativa, promovidos pela presença do anel aromático.

Os ensaios iniciais tiveram como objetivo avaliar a influência da natureza do aditivo, bem como a sua ausência nas características dos nanomateriais produzidos. Nos ensaios apresentados, as m.r. foram sujeitas a tratamento hidrotérmico durante 6 horas, a 250 °C, com velocidade de agitação de 180 rpm e um rácio mássico aditivo/OsC de 0.16 (Tabela II.3).

Tabela II.3. Efeito da natureza do aditivo nas propriedades dos NPsC.

Ensaio	Aditivo	Rendimento NPsC (%)	Teor de Sólidos (mg/mL)	Φ_F (%) ^a
NPsC/OsC_01	-	7.6	2.54	6.8
NPsC/OsC_02	ED	12.9	5.21	19.8
NPsC/OsC_03	Ureia	5.6	2.73	6.3

Condições reacionais: OsC = 30 mg/mL, 250 °C, 6h, 180 rpm, rácio aditivo/OsC = 0.16; ^a λ_{exc} = 380 nm.

Verifica-se que os NPsC funcionalizados com ED apresentam um maior rendimento mássico e um teor de sólidos superior, bem como um rendimento quântico que se destaca significativamente quando comparado com os valores resultantes dos ensaios com ureia ou mesmo na ausência de qualquer aditivo. Os NPsC obtidos na presença de ureia apresentam um rendimento mássico inferior comparativamente aos NPsC sem aditivo, apresentando, no entanto, teores de sólidos e Φ_F semelhantes.

Estes resultados estão de acordo com o esperado, considerando a estrutura das aminas utilizadas. A ED é uma amina alifática com forte carácter nucleofílico, o que lhe confere a capacidade de doar eletrões e passivar os defeitos de superfície. Por outro lado, a ureia possui um grupo carbonilo, que retira densidade eletrónica aos grupos amina, reduzindo a sua nucleofilia.

Tendo em vista a avaliação da influência do rácio mássico aditivo/OsC nas características e propriedades óticas anteriormente referidas, foram realizados ensaios com diferentes rácios para os dois tipos de aditivos.

Uma vez que se demonstrou anteriormente que na presença de ED foram obtidos NPsC com propriedades mais promissoras, os ensaios que de seguida se apresentam foram realizados, na sua maioria, na presença deste aditivo.

Na Tabela II.4 são apresentados os resultados obtidos onde foi variado o rácio de ED.

Tabela II.4. Efeito do rácio biomassa/aditivo nas propriedades dos NPsC.

Ensaio	ED/OsC	Rendimento NPsC (%)	Teor de Sólidos (mg/mL)	Φ_F (%) ^a
NPsC/OsC_04	0.08	7.9	3.22	24.6
NPsC/OsC_02	0.16	12.9	5.21	19.8
NPsC/OsC_05	0.32	14.9	7.28	12.7

Condições reacionais: OsC = 30 mg/mL, 250 °C, 6h, 180 rpm; ^a λ_{exc} = 380 nm.

Verifica-se que o aumento do rácio mássico ED/OsC se traduz num aumento do rendimento mássico e do teor de sólidos, embora o rendimento quântico de fluorescência diminua significativamente com o aumento do teor da amina.

Por outro lado, os ensaios realizados na presença de ureia (Tabela II.5) revelaram um decréscimo em todos os parâmetros (rendimento mássico em NPsC, teor de sólidos e rendimento quântico).

Tabela II.5. Efeito do rácio biomassa/aditivo nas propriedades dos NPsC.

Ensaio	Ureia/OsC	Rendimento NPsC (%)	Teor de Sólidos (mg/mL)	Φ_F (%)
NPsC/OsC_06	0.08	9.6	3.57	10.7 ^a
NPsC/OsC_03	0.16	5.6	2.73	6.3 ^b

Condições reacionais: OsC = 30 mg/mL, 250 °C, 6h, 180 rpm; ^a λ_{exc} = 340 nm. ^b λ_{exc} = 380 nm.

Ao contrário do observado para o aditivo ED, para a ureia um aumento do rácio mássico ureia/OsC traduz-se num menor rendimento mássico e menor teor de sólidos, sendo também o seu rendimento quântico de fluorescência inferior.

Wang *et al.*¹⁶³ demonstraram que existe uma relação direta entre a quantidade de aditivo e as propriedades óticas. Após se atingir o valor ótimo que originou o máximo de Φ_F , verificou-se um decréscimo acentuado desta propriedade com o aumento do rácio

mássico de aditivo, o que pode justificar a variação de Φ_F apresentada nas Tabelas II.4. e II.5.

O tempo de residência da m.r. é um parâmetro determinante nas propriedades destes nanomateriais, tendo sido avaliados diferentes tempos de carbonização sob condições hidrotérmicas a 250 °C, com velocidade de agitação de 180 rpm e diferentes rácios mássicos de ED (Tabela II.6 e II.7).

Tabela II.6. Efeito do tempo de residência nas propriedades dos NPsC.

Ensaio	Tempo (h)	Rendimento NPsC (%)	Teor de Sólidos (mg/mL)	Φ_F (%) ^a
NPsC/OsC_07	4	10.9	3.94	18.7
NPsC/OsC_04	6	7.9	3.22	24.6
NPsC/OsC_08	12	8.3	2.98	22.5

Condições reacionais: OsC = 30 mg/mL, rácio mássico ED/OsC = 0.08, 250 °C, 6h, 180 rpm; ^a λ_{exc} = 380 nm.

Para um rácio ED/OsC de 0.08 e tempo de residência de 6h, foi atingido o rendimento quântico mais elevado (25%), decrescendo ligeiramente para tempos de reação superiores (23%), embora para 4h de reação tenha sido atingido o maior rendimento mássico em NPsC (11%).

O teor de sólidos não é diretamente influenciado pelo tempo de reação, mantendo-se praticamente constante para os tempos estudados.

Tabela II.7. Efeito do tempo de residência nas propriedades dos NPsC.

Ensaio	Tempo (h)	Rendimento NPsC (%)	Teor de Sólidos (mg/mL)	Φ_F (%)
NPsC/OsC_09	4	12.6	4.98	18.3 ^a
NPsC/OsC_02	6	12.9	5.21	19.8 ^a
NPsC/Osc_10	12	14.1	5.64	16.2 ^b

Condições reacionais: OsC = 30 mg/mL, rácio mássico ED/OsC = 0.16, 250 °C, 180 rpm; ^a λ_{exc} = 380 nm; ^b λ_{exc} = 340 nm.

Os resultados obtidos mostram que o melhor rendimento quântico (19.8%) foi obtido para um tempo de reação de 6h, embora a diferença não seja significativa quando comparada com os tempos de 4h e 6h (18.3 % e 16.2%, respetivamente). Quer os rendimentos mássicos, quer o teor de sólidos, apresentaram valores muito semelhantes para os tempos de reação testados. Refira-se, que NPsC obtidos a partir de ácido cítrico, molécula simples e utilizada em ensaios modelo em condições reacionais equivalentes,

apresentam Φ_F da mesma ordem de grandeza, o que confere a estes NPsC sintetizados elevado potencial para aplicações na área da bioimagem.¹⁶⁴

Ensaio análogos foram realizados utilizando ureia como fonte de nitrogénio (Tabela II.8).

Tabela II.8. Efeito do tempo de residência nas propriedades dos NPsC.

Ensaio	Tempo (h)	Rendimento NPsC (%)	Teor de Sólidos (mg/mL)	Φ_F (%) ^a
NPsC/OsC_11	4	9.2	3.34	11.8
NPsC/OsC_06	6	9.6	3.57	10.7

Condições reacionais: OsC = 30 mg/mL, 250 °C, 180 rpm, rácio ureia/OsC = 0.08; ^a λ_{exc} = 340 nm.

Os resultados obtidos revelam que o aumento do tempo de reação não teve impacto nas propriedades em estudo.

Uma avaliação análoga foi realizada utilizando ureia como aditivo (Tabela II.9.).

Tabela II.9. Efeito do tempo de residência nas propriedades dos NPsC, com Ureia/OsC = 0.16.

Ensaio	Tempo (h)	Rendimento NPsC (%)	Teor de Sólidos (mg/mL)	Φ_F (%)
NPsC/OsC_12	4	9.6	3.94	8.0 ^a
NPsC/OsC_03	6	5.6	2.73	6.3 ^b

Condições reacionais: OsC = 30 mg/mL, 250 °C, 180 rpm, rácio ureia/OsC = 0.16; ^a λ_{exc} = 340 nm. ^b λ_{exc} = 380 nm.

Para um rácio mássico ureia/OsC superior (0.16), o aumento do tempo de residência diminuiu significativamente o rendimento mássico (ca. 10% → 6%), sendo os Φ_F muito semelhantes. Estes resultados são concordantes com dados da literatura, verificando-se que um aumento do tempo de residência se traduz num aumento do Φ_F , sendo atingido um valor ótimo, a partir do qual ocorre um decréscimo significativo desta propriedade.

Esta variação permite inferir que curtos períodos de reação não conduzem à carbonização completa da biomassa, comprometendo a funcionalização da superfície dos NPsC.¹⁶⁰ Bandi *et al.*¹⁶⁵ demonstraram o efeito do tempo de reação nas propriedades dos PsC a partir de casca de cebola por um processo de carbonização hidrotérmica.

II.3.1.2. Carbonização Hidrotérmica em Mufla

Paralelamente, foram também realizados ensaios via CHAC recorrendo a aquecimento em mufla (AM), de modo a comparar o efeito das diferentes fontes de aquecimento nas propriedades dos NPsC. Os ensaios em mufla foram realizados num reator de aço-inox

com vaso de Teflon, onde se adicionaram ca. 900 mg de OsC e 30 mL de água ultrapura. Como fonte de nitrogénio, apenas se testou ED, com diferentes rácios mássicos ED/OsC (Tabela II.10), tendo todos os ensaios sido realizados em duplicado.

Tabela II.10. Efeito do rácio ED/OsC nas propriedades dos NPsC.

Ensaio	ED/OsC	Rendimento NPsC (%)	Teor de Sólidos (mg/mL)	Φ_F (%) ^a
NPsC/OsC_13	0.08	11.2	11.45	7.9
NPsC/OsC_14	0.16	13.5	6.15	5.6
NPsC/OsC_15	0.32	13.7	9.6	3.4

Condições reacionais: OsC = 30 mg/mL, 170 °C, 12h; ^a λ_{exc} = 380 nm.

Os resultados obtidos revelam que o aumento do rácio mássico conduz a uma diminuição do Φ_F , embora sem grande expressão no rendimento em NPsC.

Foi também avaliado o efeito do tempo de residência nas propriedades dos NPsC para um rácio mássico ED/OsC de 0.32 (Tabela II.11). Os resultados obtidos mostram que uma diminuição do tempo de reação (12h → 6h) não produz um efeito significativo no Φ_F , verificando-se um ligeiro aumento no teor de sólidos, bem como no rendimento mássico que sofreu um aumento de ca. 5 %.

Tabela II.11. Efeito do tempo de residência nas propriedades dos NPsC.

Ensaio	Tempo (h)	Rendimento NPsC (%)	Teor de Sólidos (mg/mL)	Φ_F (%) ^a
NPsC/OsC_15	12	13.7	9.6	3.4
NPsC/OsC_16	6	18.4	11.8	4.2

Condições reacionais: OsC = 30 mg/mL, rácio ED/OsC = 0.16, 170 °C; ^a λ_{exc} = 380 nm.

Os resultados obtidos permitem concluir que a carbonização hidrotérmica no reator Parr origina NPsC com Φ_F mais elevados, tendo sido alcançados valores até ca. 25%, nunca tendo os NPsC obtidos por carbonização em mufla obtidos tais valores. Estes resultados revelam-se muito promissores, quando comparados com os NPsC obtidos a partir da carbonização de ouriços de castanha, trabalho recentemente desenvolvido no grupo de investigação por Borges *et al.*¹⁶⁶ Por outro lado, o teor de sólidos dos NPsC obtidos *via* mufla foi mais elevado (11.8 mg/mL vs. 6.2 mg/mL), não se verificando diferença no rendimento mássico entre os dois métodos (18.9 % no reator Parr e 18.4 % na mufla).

II.3.2. Purificação dos Nanopontos de Carbono

Decorrente do processo de síntese, a mistura reacional apresenta, para além dos NPsC, moléculas inorgânicas provenientes dos OsC que sofreram carbonização. Estas moléculas podem interferir com as propriedades luminescentes intrínsecas dos NPsC, pelo que se torna imprescindível a sua remoção, de modo a garantir que a fluorescência observada é proveniente unicamente dos NPsC, contribuindo este processo para uma melhoria das suas propriedades.

Assim, após cada ensaio, foram realizadas várias etapas de purificação, nomeadamente filtração da m.r. por membrana de acetato de celulose, seguida de extração líquido-líquido com solventes orgânicos apropriados, designadamente CH_2Cl_2 e AcOEt.

Posteriormente os NPsC/OsC_01, NPsC/OsC_08 e NPsC/OsC_11 foram purificados utilizando membranas de acetato de celulose, previamente preparadas para este fim, exibindo tamanho de poros de 17.4 nm (AC22) e 80.6 nm (AC30), com o intuito de remover quaisquer moléculas com peso molecular superior a 10.45 e 21.45 kDa, respetivamente.

III.3.2.1. Isolamento por Filtração em Membrana

A purificação dos NPsC sintetizados envolveu uma filtração por membrana de acetato de celulose regenerada, com um tamanho de poro 0.2 μm . O resíduo insolúvel retido na membrana, de coloração acastanhada, foi seco a 105 °C e, posteriormente quantificado, sendo isolados os NPsC como soluções aquosas de coloração amarela-acastanhada.

Os ensaios em reator de alta-pressão apresentaram *ca.* 25 % de resíduo insolúvel, sendo obtidos valores bastante superiores nos ensaios resultantes do aquecimento em mufla (*ca.* 48.8 %), valores calculados em função da massa inicial de biomassa e de aditivo.

Na Figura II.4 é apresentado o espectro de FTIR do resíduo insolúvel após evaporação à *secura* a 105 °C, resultante do ensaio realizado na presença de ureia como aditivo (Ureia/OsC = 0.16, 250 °C, 6 h) e RAP.

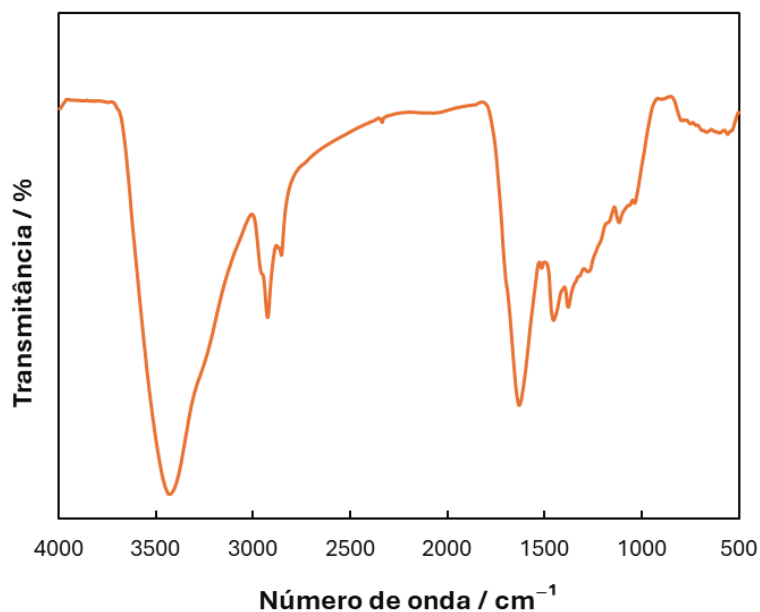


Figura II.4. Espectro de FTIR do resíduo insolúvel retido na membrana (pastilha de KBr).

O espectro apresenta uma banda a 3429 cm^{-1} , correspondente à ligação O-H (banda alargada), acompanhada de uma banda de extensão N-H (ombro) presente a *ca.* 3255 cm^{-1} , seguidas das bandas características das vibrações C-H de grupos alquila. A 1627 cm^{-1} observa-se uma banda correspondente às extensões C=C e C=N, sendo estas características de pontos de carbono.⁸⁹ Algumas das bandas a menores números de onda, nomeadamente abaixo de 1400 cm^{-1} , surgem bandas características deste tipo de biomassa, nomeadamente as bandas que ocorrem de $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$, podem ser atribuídas a vibrações originadas por carboidratos.¹⁵⁹

II.3.2.2. Purificação por Extração Líquido-Líquido

Após a filtração foram efetuadas extrações líquido-líquido com CH_2Cl_2 e AcOEt, sendo a remoção do solvente orgânico residual presente na fase aquosa removido por evaporação, sendo a mesma posteriormente armazenada sob atmosfera inerte a $4\text{ }^\circ\text{C}$. As fases orgânicas, à semelhança do resíduo insolúvel foram levadas à secura a $105\text{ }^\circ\text{C}$ e quantificadas.

Os ensaios realizados em reator de alta-pressão originaram resíduos *ca.* 2.4% para a fração de CH_2Cl_2 e *ca.* 1.2% para a fração proveniente de AcOEt. O rendimento mássico global de conversão médio foi $28.3 \pm 0.2\%$. Para os ensaios em mufla, obtiveram-se resíduos das frações de resíduo de CH_2Cl_2 e de AcOEt *ca.* 2.5% e 0.25% , respetivamente. O rendimento mássico global de conversão foi em média $51.5 \pm 0.87\%$.

Na Figura II.5 apresenta-se o espectro de FTIR das frações orgânicas após evaporação à secura a 105 °C, da carbonização dos OsC realizada em mufla com rácio ED/OsC = 0.08, 170 °C e 12h de tempo de residência.

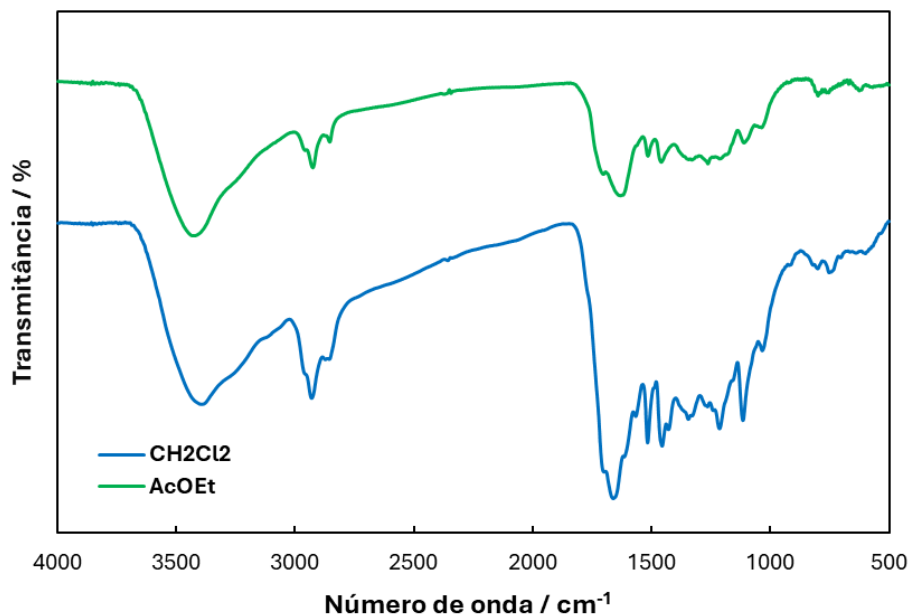


Figura II.5. Espectro de FTIR das frações orgânicas do ensaio NPsC/OsC_13 (pastilha de KBr).

É possível observar que os espectros de ambas as frações orgânicas apresentam perfis semelhantes. As bandas observadas a ca. 3400 cm⁻¹ correspondem às vibrações de extensão O-H, que indicam a presença de grupos alifáticos. A 2924 cm⁻¹ é possível observar bandas atribuíveis às ligações C-H e a ca. 1640 cm⁻¹ observam-se bandas que correspondentes às ligações C=O.

II.3.2.3. Purificação por Membrana

Adicionalmente, efetuou-se a purificação de algumas dispersões aquosas de NPsC previamente selecionadas, utilizando membranas de acetato de celulose sintetizadas para o efeito, cujo procedimento se encontra descrito na Secção III.4.2.3.

Submeteram-se três soluções aquosas de NPsC ao processo de purificação, utilizando uma membrana AC30, com tamanho médio de poro 80.6 nm (21.45 kDa), tendo o respetivo permeado sido sujeito a nova filtração com uma membrana AC22, com um tamanho médio de poro 17.4 nm (10.45 kDa) e avaliada a fluorescência das diferentes frações.

Segundo Li *et al.*⁶⁰ e Bao *et al.*,¹⁶⁷ o tamanho dos NPsC pode influenciar a fluorescência dos mesmos, estando tamanhos menores associados a propriedades luminescentes

superiores. Embora esta correlação não seja ainda consensual, pretendeu-se avaliar se ocorreria uma melhoria na luminescência.

Os resultados obtidos relativamente ao Φ_F antes e após permeação encontram-se na Tabela II.12.

Tabela II.12. Efeito de permeação por membranas no rendimento quântico de fluorescência e teor de sólidos.

Ensaio	Teor de Sólidos (mg/mL)	Φ_F (%)	Φ_F (%) concentrado	Φ_F (%) permeado
NPsC/OsC_01-AC30	1.90	6.8	4.1	5.7
NPsC/OsC_01-AC22	0.70	-	5.0	5.3
NPsC/OsC_08-AC30	2.60	22.5	18.6	19.9
NPsC/OsC_11-AC30	1.70	11.8	8.1	8.7

O rendimento quântico das diferentes frações/ensaios não sofreram alteração significativa decorrente dos procedimentos de filtração por membrana de AC, não tendo sido possível confirmar se houve uma melhoria das propriedades fotofísicas dos NPsC. Contudo, é de realçar que não tendo sido permeado a totalidade do volume de solução aquosa, condição necessária para uma comparação entre o concentrado e o permeado, ainda estariam presentes no concentrado, NPsC de menor tamanho.

Visualmente, observaram-se diferenças entre o concentrado e o permeado, permitindo afirmar que houve uma purificação eficiente das dispersões aquosas de NPsC. As soluções aquosas e o concentrado apresentavam partículas insolúveis precipitadas, enquanto o permeado se apresentou como uma solução homogénea, não sendo perceptível a presença de precipitado. Estruturas de maior peso molecular (> 21.45 kDa) terão ficado retidas no concentrado.

II.3.3. Caracterização Estrutural

A caracterização estrutural dos NPsC foi realizada por espectroscopia de FTIR, RMN¹H e análise elementar. Ressalva-se que, em virtude da natureza heterogénea dos NPsC sintetizados, a caracterização estrutural não pode ser considerada exaustiva, nem totalmente inequívoca.

Na sequência das propriedades avaliadas em cima e da comparação entre as duas fontes de aquecimento, pretendeu-se avaliar de que modo os métodos de aquecimento influenciam a estrutura dos NPsC. Na Figura II.6. apresentam-se os espectros de FTIR

dos NPsC obtidos em reator Parr (NPsC/OsC_04, ED/OsC = 0.08, 250 °C, 6h, 180 rpm) e em mufla (NPsC/OsC_13, ED/OsC = 0.08, 170 °C, 12h, 180 rpm).

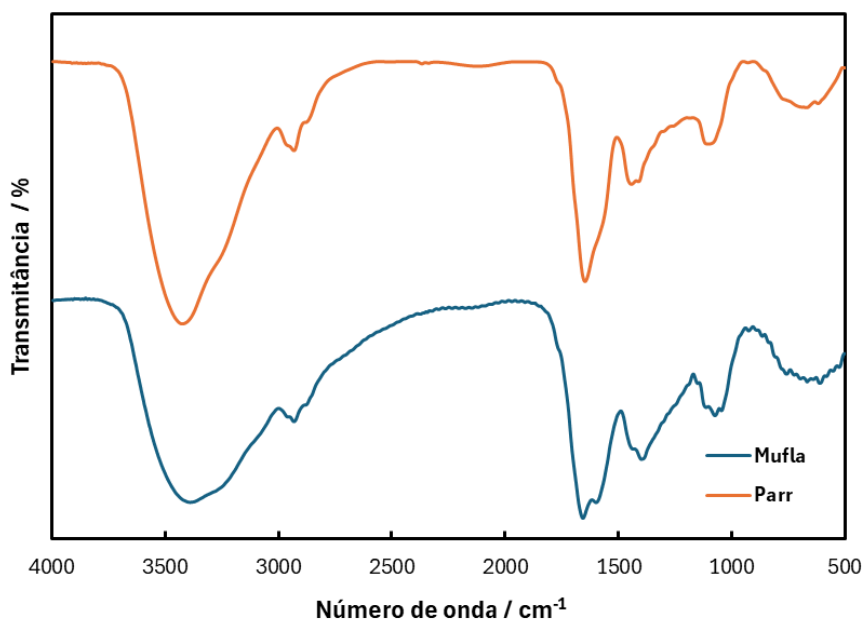


Figura II.6. Espectros de FTIR dos NPsC sintetizados por CHAC (pastilha de KBr).

Verifica-se que os perfis de ambos os espectros são muito semelhantes e da sua análise identifica-se a 3433 cm^{-1} uma banda correspondente à ligação O-H (larga), acompanhada de um ombro a *ca.* 3230 cm^{-1} atribuído à extensão da ligação N-H. As bandas presentes a 2924 e 2932 cm^{-1} correspondem à presença de grupos alifáticos. As bandas de extensão atribuíveis à existência de ácidos/carboxilatos e amidas são observáveis a *ca.* 1649 cm^{-1} (C=O) e a *ca.* 1600 cm^{-1} (C=C e C=N), estando presentes as bandas de extensão C-C a *ca.* 1421 (CH_2 def) e 1408 cm^{-1} (CH_3 def).

Os espectros de FTIR resultantes dos ensaios realizados em reator Parr com a variação do rácio mássico aditivo/OsC são apresentados na Figura II.7.

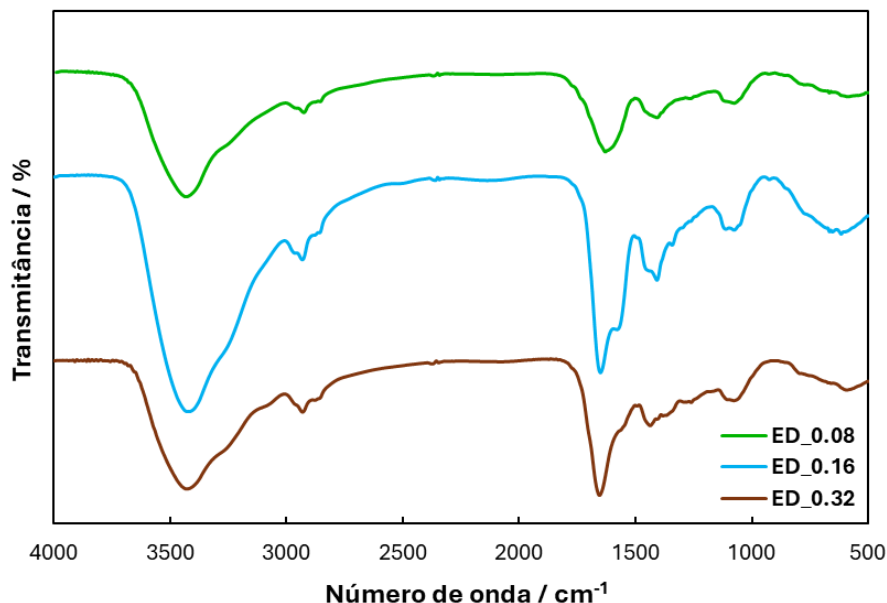


Figura II.7. Espectros de FTIR dos NPsC sintetizados por CHAC em reator Parr e mufla (pastilha de KBr).

Os espectros apresentam bandas a 3433, 3418 e 3425 cm^{-1} correspondentes à ligação O-H (larga) e à banda de extensão N-H (ombro) a 3251 3236 e a 3242 cm^{-1} . As bandas que ocorrem a 2925, 2930 e cm^{-1} sugerem a presença de grupos alifáticos. As extensões C=C e C=N são responsáveis pelas bandas observadas a 1629, 1651 e 1654 cm^{-1} , enquanto a extensão C-C é responsável pelas bandas a 1408 e 1437 cm^{-1} .

Não se verificaram diferenças significativas que sugiram alterações estruturais no NPsC quando alterado o rácio mássico aditivo/OsC. As bandas observadas são as bandas típicas identificadas em pontos de carbono.

De modo a complementar a análise estrutural dos nanomateriais produzidos foram também traçados os espectros de RMN ^1H das dispersões aquosas dos NPsC obtidos em reator Parr na ausência de qualquer fonte de nitrogénio (NPsC/OsC_01) e com rácios de ED 0.08 e 0.16 (NPsC/OsC_04 e NPsC/OsC_02, respetivamente) (Figura II.8).

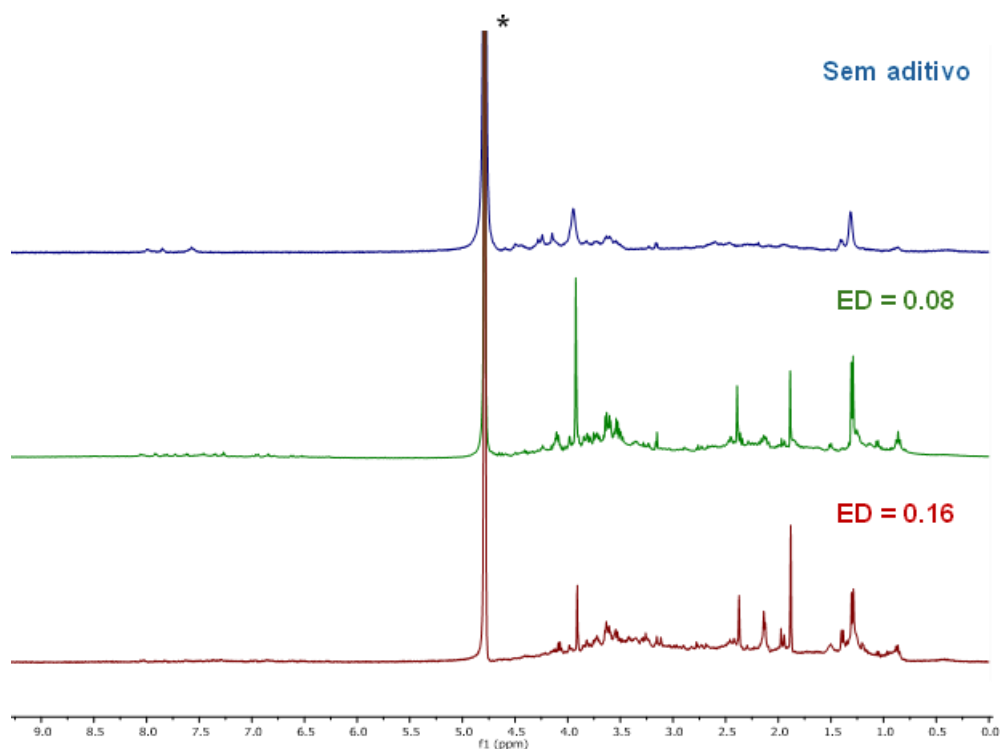


Figura II.8. Espetros de RMN ^1H de dispersões aquosas de NPsC/OsC_01, NPsC/OsC_04 e NPsC/OsC_02 (400 MHz, D_2O , 25 °C); *solvente residual.

Os espectros apresentados exibem majoritariamente sinais 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. Na região dos prótons aromáticos, os sinais são imperceptíveis, não se podendo atribuir ressonâncias a prótons dessa natureza.

Na Tabela II.13 são apresentados os valores resultantes da análise elementar dos NPsC obtidos com diferentes tipos de aditivo e também com variação do rácio mássico aditivo/OsC, tendo os respetivos teores elementares sido corrigidos com o respetivo teor de cinzas.

Tabela II.13. Efeito da natureza do aditivo e do rácio mássico ED/OsC na composição elementar dos NPsC obtidos por aquecimento em reator Parr.

Ensaio	Condições Reacionais	Microanálise				Cinzas (%)
		% C	% H	% N	% O (calc.)	
NPsC/OsC_01	—	45.44	5.38	2.51	35.55	11.11
NPsC/OsC_04	ED/OsC = 0.08	46.77	5.94	7.13	36.34	3.82
NPsC/OsC_02	ED/OsC = 0.16	50.07	7.11	10.03	29.19	3.61
NPsC/OsC_05	ED/OsC = 0.32	50.93	6.99	14.55	24.66	2.88
NPsC/OsC_06	Ureia/OsC = 0.08	49.80	5.67	5.04	33.48	6.01
NPsC/OsC_03	Ureia/OsC = 0.16	45.73	5.15	6.22	34.30	8.61

Condições reacionais: OsC 30 mg/mL, 250 °C, 6 h, 180 rpm; < 0.03 % S.

Da análise dos resultados obtidos verifica-se que o incremento de ED se reflete no aumento do teor de nitrogénio (2.52 % → 14.55 % na presença de ED como aditivo), sendo essa tendência menor para os NPsC obtidos na presença de ureia (6.22 % para o rácio de OsC/ureia = 0.16).

Estes resultados, quando correlacionados com o rendimento quântico de fluorescência, permitem inferir que conteúdos mais elevados de ED não conduzem ao incremento desse parâmetro, verificando-se um decréscimo com o aumento do rácio mássico ED/OsC (25 % → 13 %); comportamento idêntico foi observado nos ensaios realizados na presença de ureia (11 % → 6 %).

A realização de ensaios antimicrobianos, recorrendo à utilização de uma dada substância, permite avaliar a interação sinérgica ou aditiva entre uma substância e um microorganismo, a qual, caso exista, sugere a existência de potencial antimicrobiano.¹⁶⁸ A quantificação da carga superficial dos NPsC, recorrendo à determinação do potencial ζ , permite assim correlacionar as características superficiais com a capacidade antimicrobiana que os NPsC possam apresentar.

Na Tabela seguinte são apresentados os potenciais ζ determinados.

Tabela II.14. Potencial ζ de dispersões aquosas de NPsC (1 mg/mL).

Ensaio	Condições reacionais ^a	Rendimento NPsC (%)	Teor Sólidos (mgmL ⁻¹)	Potencial ζ (mV)
NPsC/OsC_01	—	7.60	2.54	-15.86 ± 0.16
NPsC/OsC_04	ED/OsC = 0.08	7.90	3.22	-16.64 ± 0.70
NPsC/OsC_02	ED/OsC = 0.16	12.10	4.77	-21.90 ± 1.85
NPsC/OsC_05	ED/OsC = 0.32	14.90	7.28	-24.42 ± 0.41
NPsC/OsC_06	Ureia/OsC = 0.08	9.60	3.57	-29.92 ± 0.38
NPsC/OsC_03	Ureia/OsC = 0.16	5.60	2.73	-14.44 ± 0.45

Condições reacionais: OsC 30 mg/mL, 250 °C, 6 h, 180 rpm.

A diversidade de grupos funcionais na superfície dos NPsC reflete-se na intensidade de carga negativa, sugerindo a presença de grupos ácidos/carboxilatos, podendo o seu conteúdo estar associado à diminuição do rácio mássico aditivo/OsC. A ocorrência de carga superficial negativa contribui para uma boa estabilidade coloidal dos NPsC.¹⁶⁹

Os NPsC obtidos revelaram valores de potencial ζ progressivamente mais negativos (-16.64 ± 0.70 → -24.42 ± 0.41) com o incremento do rácio mássico de ED/OsC, ocorrendo comportamento oposto quando utilizada a ureia como aditivo (-29.92 ± 0.38 → -14.44 ± 0.45).

As cinzas dos NPsC foram também avaliadas, encontrando-se na Figura II.9 espectro de FTIR (NPsC/OsC_06, ureia/OsC = 0.08, 250 °C. 6h, Parr).

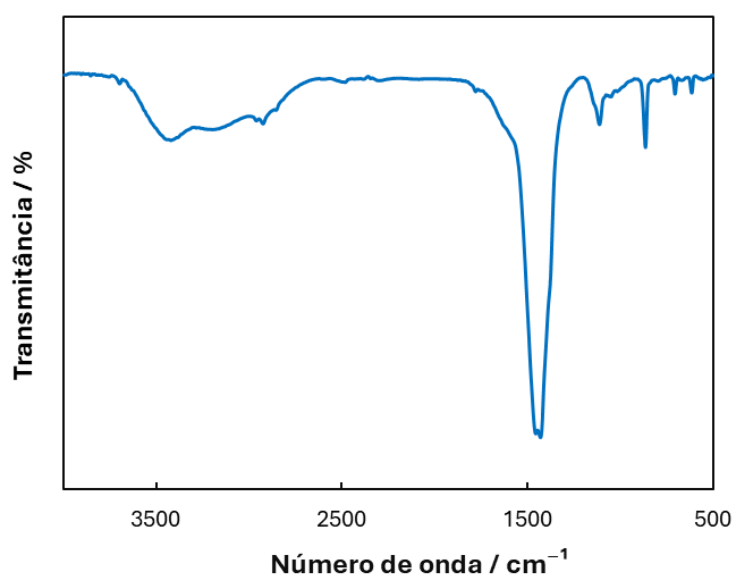


Figura II.9. Espectro de FTIR das cinzas do ensaio NPsC/OsC_06 (pastilha KBr).

À semelhança do espectro apresentado na Figura II.3, é possível identificar bandas a ca. 1433 cm^{-1} , características de vibrações de extensão C=O assimétricas, corroborando a presença de carbonatos.

II.3.4. Caracterização Morfológica

Um dos objetivos propostos no desenvolvimento do presente trabalho foi explorar as potenciais aplicações biológicas dos NPsC, contudo, quer a sua inclusão, quer a consequente internalização nas membranas biológicas é dependente do seu tamanho. Assim, foi realizada a análise morfológica recorrendo a Microscopia de Força Atômica (AFM).

Foram selecionados para o estudo os NPsC/OsC_04 e NPsC/OsC_02 obtidos com diferentes rácios mássicos de ED (0.08 e 0.16, respetivamente).

Na Figura II.10. são apresentadas as imagens topográficas dos NPsC avaliados (ED/OsC = 0.08 **(A)** e 0.16 **(B)**, 250 °C, 6 h, 180 rpm).

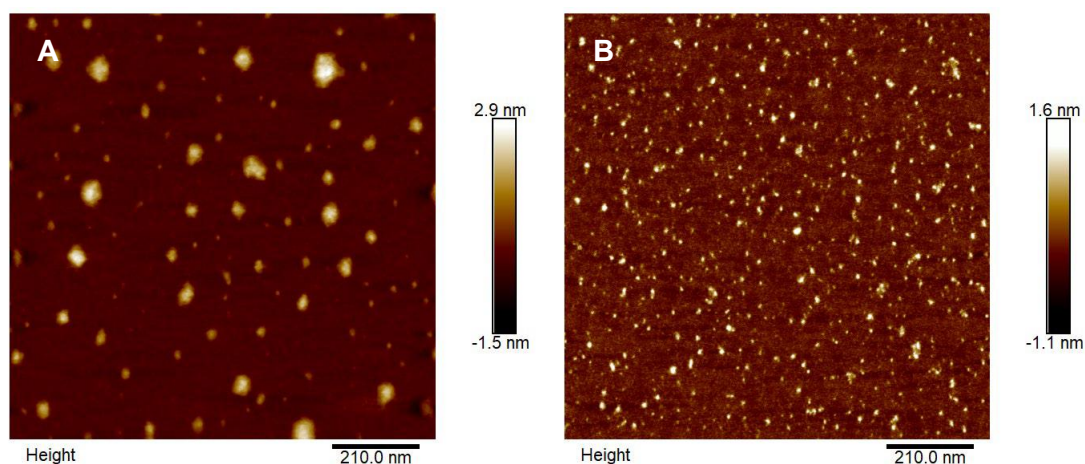


Figura II.10. Imagem topográfica 2D (altura) / campo de visão próximo de $1.0\ \mu\text{m}^2$ dos NPsC (ED/OsC = 0.08 **(A)** e 0.16 **(B)**, 250 °C, 6h, 180 rpm).

As imagens permitem identificar na maior ampliação (Figura II.11.), partículas individuais, não sendo evidente fenômenos de agregação, exibindo alturas que variaram entre 0.04 e 2.4 nm **(A)** e 0.02 e 2.0 nm **(B)**.

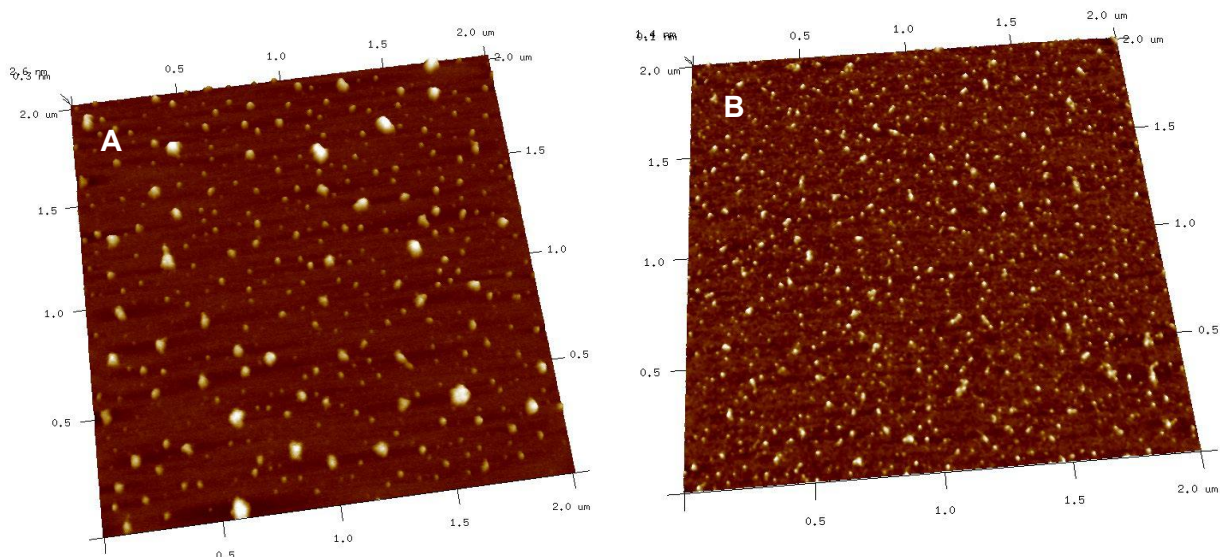


Figura II.11. Imagem topográfica e de amplitude 3D (altura) / campo de visão de $1.9 \times 1.9 \mu\text{m}^2$ dos NPc (ED/OsC = 0.08 (A) e 0.16 (B), 250 °C, 6h, 180 rpm).

Atendendo à dimensão identificada nas imagens topográficas é possível inferir a existência de partículas com morfologia *quasi*-esférica.

II.3.5. Propriedades Fotofísicas

A determinação das propriedades fotofísicas de materiais luminescentes são bastante relevantes, sobretudo tendo em conta a possível aplicabilidade dos NPc em bioimagem. Para tal recorreu-se à espectroscopia de absorção no estado fundamental (UV-Vis) e à espectroscopia de fluorescência no estado estacionário.

Na Figura II.12 encontram-se representados os espectros de UV-Vis, emissão e excitação de NPc sintetizados com diferentes rácios mássicos de ED/OsC (0.08 e 0.16), em reator Parr, sob as mesmas condições (250 °C, 6h), tendo-se obtido Φ bastante relevantes (24.62 e 19.8 %, respetivamente).

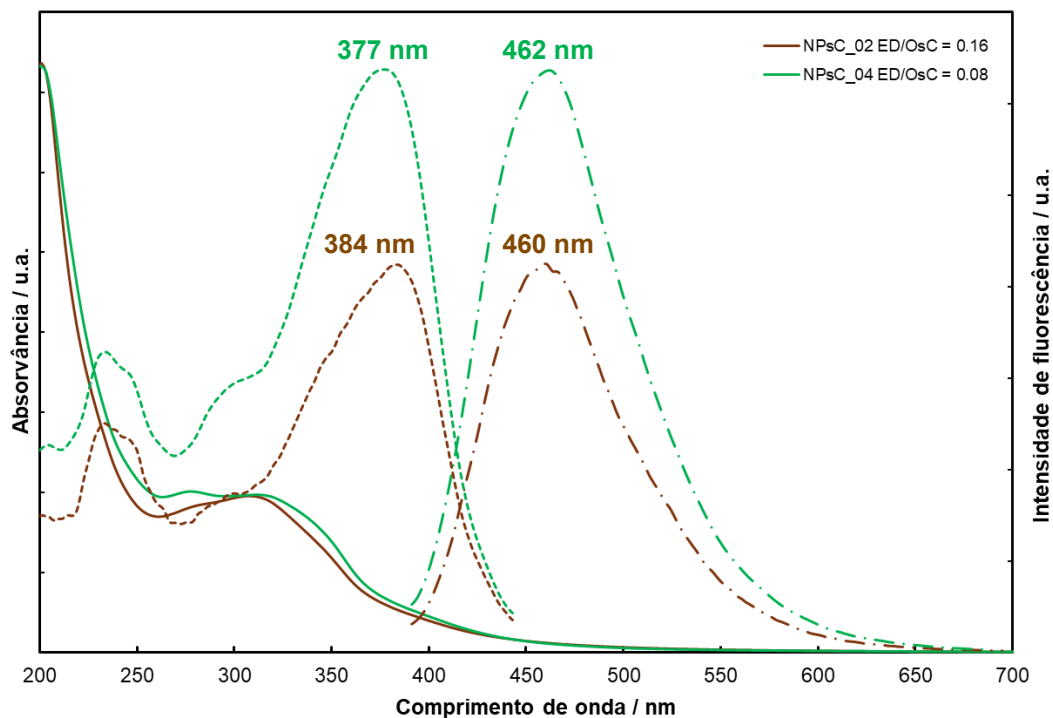


Figura II.12. Espectros de UV-Vis (linha contínua), excitação (linha tracejada; monitorizados a 460 nm) e emissão (linha traço-ponto; $\lambda_{exc} = 380$ nm), dos NPsC/OsC_02 (castanho) e NPsC/OsC_04 (verde); [0.1 mg/mL].

Nos espectros de UV-Vis distinguem-se dois picos, um a ca. 280 nm, que corresponde às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ das ligações C=C no centro de carbono e outro a ca. 310 nm, que corresponde às transições $n \rightarrow \pi^*$ de ligações C=O.⁵⁵ As dispersões aquosas de NPsC, quando excitadas a $\lambda_{exc} = 380$ nm, emitem na região do azul, apresentando um máximo de emissão a ca. 460 nm. Comparando os espectros obtidos para as soluções aquosas NPsC/OsC_02 e NPsC/OsC_04, com rácios mássicos ED/OsC de 0.16 e 0.08, respetivamente, não se observam diferenças significativas nos seus perfis.

A utilização de ED como aditivo permitiu a obtenção de NPsC com ϕ_F moderados (11 a 25 %), sendo de forma geral superiores aos ϕ_F obtidos para NPsC sintetizados com ureia (6 a 12 %) (*vide* Secção II.3.1).

Segundo Ozyurt *et al.*,⁵⁵ PsC com emissão na zona do verde e do azul possuem emissão dependente do comprimento de onda de excitação, o que ocorre devido à sua heterogeneidade de tamanho e composição. Na Figura II.13 encontram-se representados os espectros de emissão da solução aquosa de NPsC/OsC_10 (ED/OsC = 0.16, 250 °C, 12 h), excitada a diferentes comprimentos de onda.

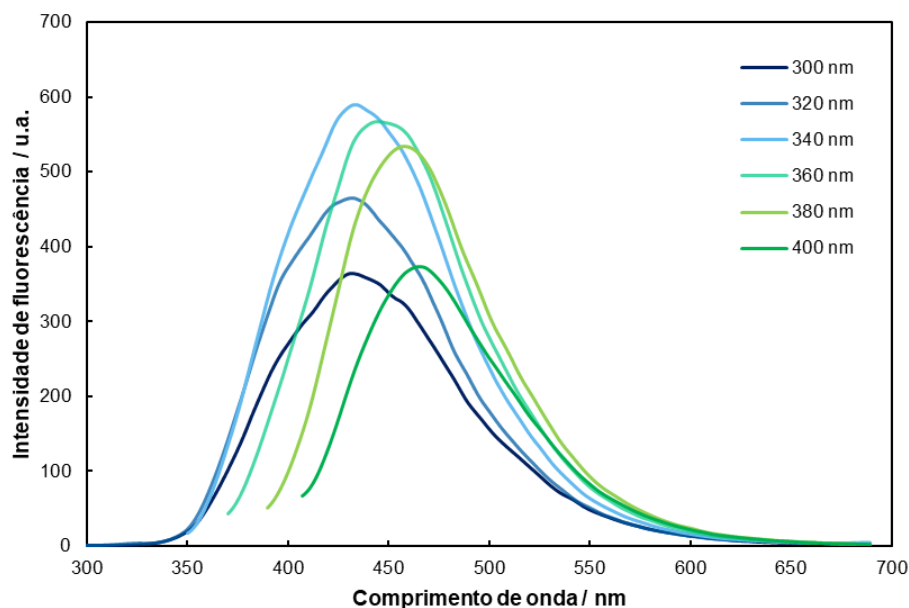


Figura II.13. Espectros de emissão da solução aquosa NPSC_10; [0.1 mg/mL]; excitação a diferentes comprimentos de onda (λ_{exc} 300-400 nm).

Da análise dos espectros de emissão é possível confirmar a dependência existente entre o comprimento de onda de excitação e o comprimento de onda de emissão, acompanhado de um desvio batocrômico progressivo para a região do vermelho. Este comportamento reflete a capacidade de fotoluminescência ajustável dos NPSC sintetizados, propriedade de particular importância para aplicações biomédicas.

Observa-se ainda que o máximo de intensidade de fluorescência é obtido para o λ_{exc} = 340 nm, tendo sido este o comprimento de onda de excitação selecionado na determinação do Φ_f .

Na Figura II.14. observa-se a luminescência dos NPSC na região do azul, quando irradiados com luz UV.

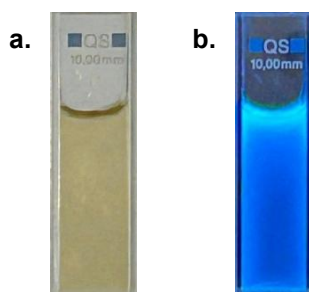


Figura II.14. Dispersão aquosa de NPSC irradiada com **a.** luz visível e **b.** luz UV (λ_{exc} = 366 nm).

Adicionalmente, foi registado o decaimento da intensidade de fluorescência de uma dispersão aquosa de NPsC, com recurso a fluorescência resolvida no tempo, tendo sido obtidos tempos de vida que variaram de 5.78 a 7.80 ns.

Estes valores estão alinhados com tempos de vida reportados para NPsC obtidos a partir de diferentes tipos de biomassa de origem agroindustrial; foram registados tempos de vida de 6.20 ns e 7.80 ns para NPsC sintetizados a partir de águas residuais do processamento do azeite e de resíduos da indústria do tomate, respetivamente.^{96,170}

Para uma possível aplicação dos NPsC em bioimagem é necessário garantir que estes nanomateriais apresentam fotoestabilidade sob irradiação contínua. Na Figura II.15 encontram-se os espectros de emissão adquiridos ao longo de 1 hora de irradiação contínua ao comprimento de onda de 380 nm.

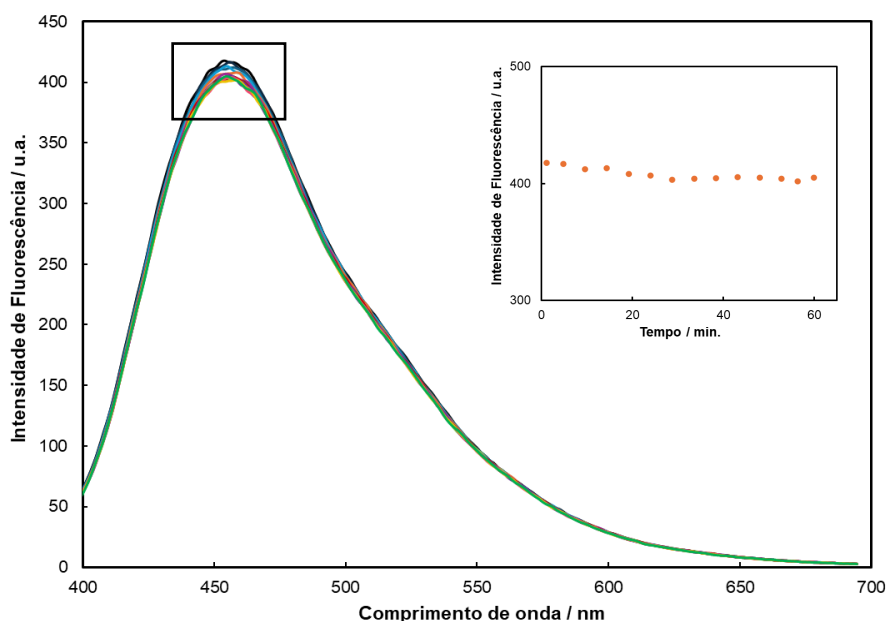


Figura II.15. Espectros de emissão dos NPsC/OsC_14, [0.1 mg/mL], sob irradiação contínua (1h; $\lambda_{exc} = 380$ nm).

O decréscimo da intensidade de fluorescência observado foi negligenciável. Assim, é possível concluir que os NPsC sintetizados são fotoestáveis, exibindo forte potencial para aplicação na área da bioimagem.

II.4. DESIGN EXPERIMENTAL

Tal como anteriormente descrito na Secção II.3.1, pretendeu-se avaliar de que forma as diferentes condições de síntese influenciam as propriedades dos NPsC e simultaneamente, identificar a estratégia de otimização do processo de síntese dos nanomateriais de carbono em estudo.

Para o efeito, foi efetuado um planeamento experimental, que consistiu num *design* fatorial de 2^3 e que englobou a realização de 8 ensaios em duplicado, que se encontram identificados na Tabela III.1, e recorreu-se ao *software* Design Expert 13.0.1.0 o qual permitiu utilizar uma metodologia de resposta de superfície, em que foram consideradas como variáveis independentes o aditivo (ED e ureia), o rácio mássico aditivo/OsC (0.08 e 0.16) e o tempo de residência (4 e 6 h). As restantes condições de síntese, nomeadamente a temperatura (250 °C) e o aquecimento em reator de alta-pressão Parr (RAP) foram mantidas constantes. As variáveis dependentes da alteração das condições que se estudaram foram o rendimento quântico de fluorescência e o teor de sólidos. As atividades antioxidante e anti-inflamatória dos NPsC foram também estabelecidas como resposta do *design* experimental, *cf.* descrito na Secção III.5.

No que respeita à atividade antioxidante, o modelo matemático obtido não apresentou significância estatística ($p = 0.7875$), o que indica que as variáveis analisadas não afetam esta propriedade dos NPsC sintetizados. Este resultado pode dever-se à estabilidade observada nos valores de atividade antioxidante, que se mantiveram semelhantes, independentemente do aditivo, rácio aditivo/OsC e tempo de residência.

Na Tabela II.15 são apresentadas as equações dos modelos ajustados, para determinação das respostas a estudar. As equações expressas em coeficientes codificados permitem a identificação do impacto de cada parâmetro na resposta final. De salientar, que com exceção do modelo obtido para a determinação da atividade antioxidante pelo método do radical ABTS, os coeficientes de correlação das equações dos restantes modelos são superiores a 0.90, o que indicia a forte relação entre as variáveis em estudo e, assim, a significância de cada modelo.

Tabela II.15. Modelos matemáticos desenvolvidos para o *design* experimental, em função dos parâmetros estudados (A. Aditivo, B. Tempo, C. Rácio aditivo/OsC) e respectivos coeficientes de determinação (R^2), expresso em coeficientes codificado (-1) e (+1).

Resposta	Equação dos Modelos	R^2
Teor de Sólidos	$4.34 - 0.0206 A + 0.2281 B + 0.6794 C - 0.2906 AB - 0.0069 AC + 0.2444 BC - 0.1869 ABC$	0.9234
Φ_F	$13.39 + 5.43 A + 0.6406 B - 1.40 C + 1.24 AB + 0.3481 AC - 0.4881 BC - 0.3706 ABC$	0.9748
Atividade Anti-inflamatória	$96.85 - 9.37 A - 4.07 B - 9.83 C - 1.16 AB - 6.38 AC - 2.48 BC - 3.17 ABC$	0.9078

Na Tabela II.16. estão reunidos os valores de resposta obtidos e previstos pelos modelos; a sua semelhança valida assim a previsão de respostas do modelo para a determinação das melhores condições de síntese, tendo em vista o teor de sólidos, o Φ_F e a atividade anti-inflamatória dos NPsC.

Tabela II.16. Matriz de ensaios para a análise do *Design* Experimental.

Ensaio	Fatores Obtidos			Fatores Previstos		
	Teor de Sólidos (mg/mL)	Φ_F (%)	AAI (Inibição %)	Teor de Sólidos (mg/mL)	Φ_F (%)	AAI (Inibição %)
NPsC_02	5.21	19.8	70.1	4.99	19.3	60.4
NPsC_02'	4.77	18.8	50.7			
NPsC_04	3.22	24.6	109.7	3.53	23.1	104.1
NPsC_04'	3.84	21.6	98.5			
NPsC_09	4.98	18.3	87.2	5.00	17.3	82.2
NPsC_09'	5.02	16.3	77.1			
NPsC_07	3.94	18.7	106.3	3.77	17.7	103.3
NPsC_07'	3.60	16.6	100.3			
NPsC_03	2.73	6.3	99.9	6.00	6.0	100.6
NPsC_03'	3.20	5.8	101.2			
NPsC_06	3.57	10.7	105.5	3.76	9.8	106.1
NPsC_06'	3.96	8.8	106.7			
NPsC_12	3.94	8.0	99.3	4.10	7.5	105.0
NPsC_12'	4.26	6.9	110.7			
NPsC_11	3.34	11.8	109.2	3.59	10.7	113.3
NPsC_11'	3.84	9.6	117.4			

NPsC sintetizados a 250 °C, reator Parr.

Através da tabela anterior, verifica-se que a previsão dos valores dos modelos, estão de acordo com o esperado, uma vez que estes se apresentam como médias dos valores reais duplicados, ou seja, entre os dois valores obtidos experimentalmente para cada ensaio.

Relativamente ao teor de sólidos, obteve-se um modelo matemático, que prevê de que forma é influenciado pelas variáveis independentes, através de uma análise estatística por ANOVA, que demonstrou ser significativa ($p < 0.0007$). Na Figura II.16 observam-se os gráficos de superfície de resposta do modelo desenvolvido, observando-se de que forma varia o teor de sólido dos NPsC.

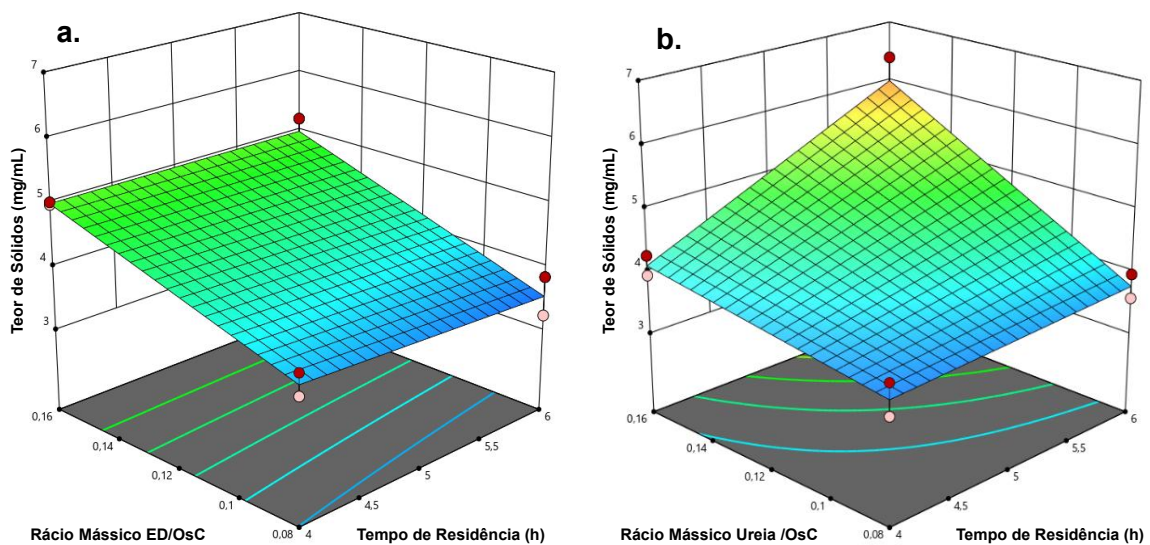


Figura II.16. Gráficos de superfície de resposta (3D) dos modelos desenvolvidos para a variação de teor de sólidos nos NPsC, utilizando como aditivo **a.** ED e **b.** ureia. As variáveis independentes não representadas nos gráficos foram mantidas a uma temperatura de 250 °C e o aquecimento em reator de alta-pressão Parr (RAP).

Através dos gráficos de superfície apresentados (Figura II.16) é possível observar que, quando utilizada ED como aditivo, o parâmetro que mais influencia o teor de sólidos obtido para os NPsC sintetizados é o rácio mássico ED/OsC, sendo que o seu aumento se traduz num maior teor de sólidos. O aumento do tempo de residência traduz-se num menor teor de sólidos, contudo, este não provoca alterações muito significativas. No caso da ureia, foi possível obter valores mais elevados de teor de sólidos com o aumento do rácio mássico ureia/OsC e o aumento do tempo de residência, sendo que estes influenciam no valor de teor de sólidos obtidos. Em geral, os NPsC sintetizados com ureia como aditivo são mais suscetíveis a variações no teor de sólidos, podendo também

atingir valores mais elevados. O fator que mais influenciou a propriedade em estudo foi o rácio mássico aditivo/OsC (61.5 %).

Paralelamente, foi igualmente estudado o Φ_F , tendo sido desenvolvido um modelo matemático através de uma análise estatística ANOVA, que se mostrou significativa ($p < 0.0001$). A Figura II.17 apresenta os gráficos de superfície de resposta do modelo desenvolvido, observando-se de que forma varia o Φ_F dos NPsC.

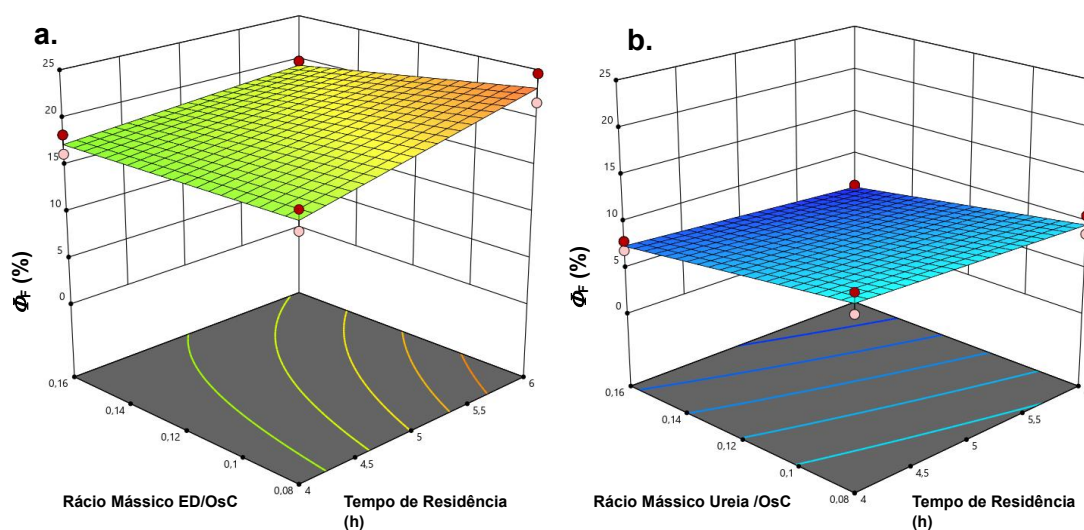


Figura II.17. Gráficos de superfície de resposta (3D) dos modelos desenvolvidos para a variação de Φ_F nos NPsC, utilizando como aditivo **a.** ED e **b.** ureia. As variáveis independentes não representadas nos gráficos foram mantidas a uma temperatura de 250 °C e o aquecimento em reator de alta-pressão Parr (RAP).

Para os NPsC sintetizados com ED, um aumento do tempo de residência e uma diminuição do rácio mássico traduz-se num aumento de Φ_F . Por outro lado, quando é utilizada ureia como aditivo, uma diminuição do tempo de residência e do rácio mássico possibilitam a obtenção de rendimentos quânticos de fluorescência mais elevados. Comparando os NPsC sintetizados com ED ou com ureia como aditivo, obtém-se valores mais altos quando utilizada ED, sendo o fator que mais influenciou o Φ_F foi a escolha do aditivo utilizado no processo de síntese (84.9 %).

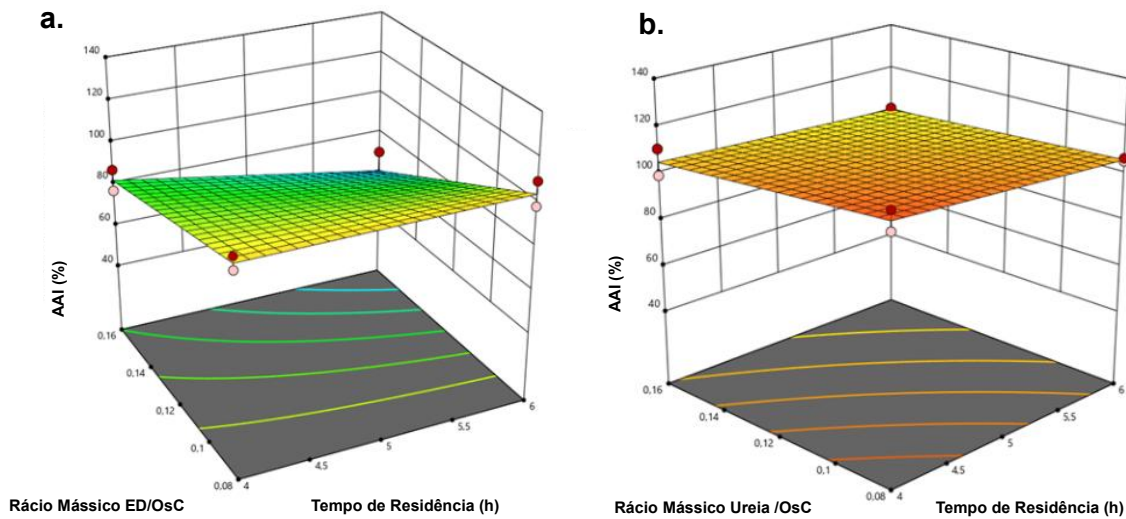


Figura II.18. Gráficos de superfície de resposta (3D) dos modelos desenvolvidos para a variação de AA1 nos NPsC utilizando como aditivo **a.** ED e **b.** ureia. As variáveis independentes não representadas nos gráficos foram mantidas a uma temperatura de 250 °C e o aquecimento em reator de alta-pressão Parr (RAP).

À semelhança dos anteriores modelos, o obtido para a atividade anti-inflamatória, também se revelou significativo, aplicando uma análise estatística ANOVA ($p < 0.0014$). Através dos gráficos de superfície apresentados na Figura II.18, é possível observar que os NPsC sintetizados com ED, apresentam um aumento de atividade anti-inflamatória com a diminuição do tempo de residência e do rácio mássico. Por outro lado, nos NPsC sintetizados com ureia, a variação das condições de síntese não se traduz em variações significativas nos valores de atividade anti-inflamatória, sendo, no entanto, o maior valor obtido também para um menor tempo de residência e rácio mássico. Em geral, obtêm-se valores de atividade anti-inflamatória quando utilizada ureia como aditivo, sendo os fatores que mais influenciam esta propriedade, a natureza do aditivo (30.8 %) e o rácio aditivo/OsC (33.83 %).

Globalmente, as conclusões obtidas suportam os resultados anteriormente apresentados na Secção II.3.1.1. Contudo, através do *design* experimental foi possível ter uma melhor perceção da forma como os parâmetros de síntese estudados afetam as respostas obtidas, em particular para o teor de sólidos, quando se utiliza ureia como aditivo. Anteriormente, apenas com dois ensaios, observou-se que o aumento do rácio mássico ureia/OsC, se traduziu numa diminuição do teor de sólidos. Contudo, através *design* fatorial de 2^3 e da sua análise estatística, verificou-se precisamente o contrário, justificando a grande mais-valia em utilizar esta ferramenta.

II.5. AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DOS NP_sC

II.5.1. Atividade Antioxidante

Para a avaliação da atividade antioxidante dos NP_sC foi efetuado o método do radical ABTS. Estudou-se esta propriedade para todos os NP_sC sintetizados, bem como os filtrados pela membrana de acetato de celulose, numa concentração de 1 mg/mL.

Os resultados são apresentados na Figura II.19, onde foram incluídos os controlos positivos, nomeadamente ácido ascórbico, ácido gálico, BHT (butil-hidroxitolueno) e trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8 tetrametilcromano-2-carboxílico), utilizados para fins comparativos.

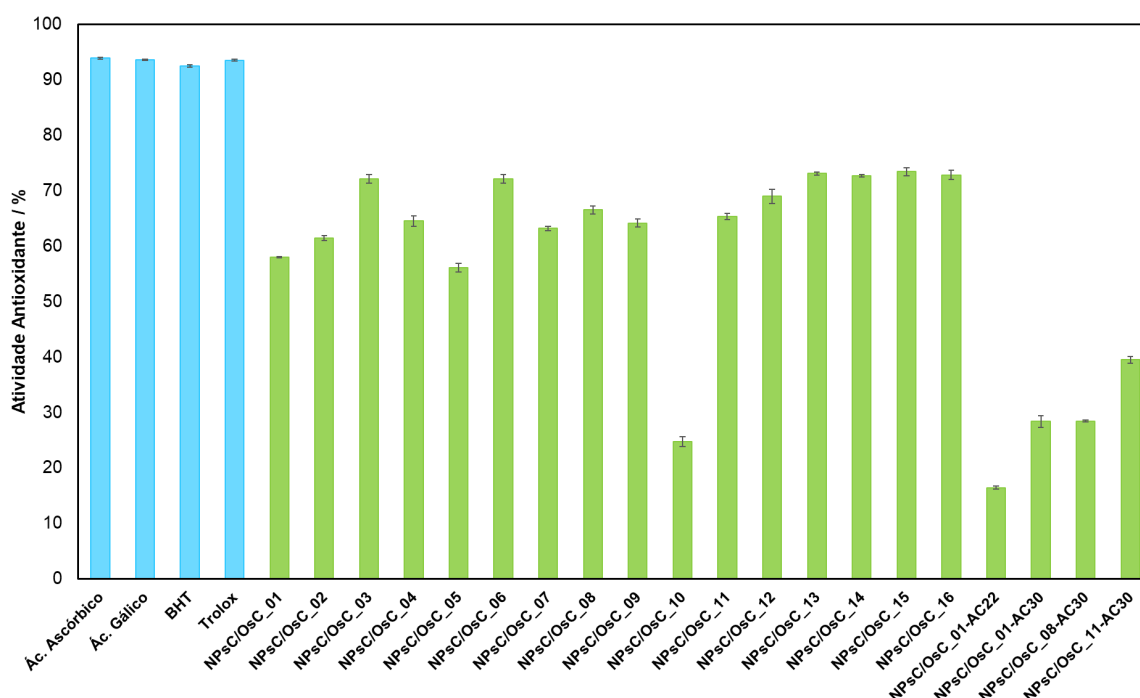


Figura II.19. Atividade Antioxidante (%) dos NP_sC; [1 mg/mL], determinada pelo método de inibição do radical ABTS.

Os NP_sC sintetizados apresentaram uma alta capacidade antioxidante, mesmo quando comparado com os controlos positivos, tendo sido obtido o máximo de 73.46 ± 0.72 % para os NP_sC/OsC_15, obtidos por síntese com aquecimento em mufla, sendo os valores comparáveis com dados reportados na literatura.¹⁷¹

Da análise dos valores apresentados na Tabela II.17. verifica-se que os NP_sC funcionalizados com ureia apresentam maior atividade antioxidante comparativamente com os funcionalizados com ED.

Na generalidade, não se verificam variações significativas que permitam estabelecer uma correlação entre os valores de atividade antioxidante e as condições reacionais empregues. Contudo, é de salientar a atividade antioxidante de 58.04 ± 0.09 % obtida para os NPsC/OsC_01, resultantes de síntese na ausência de qualquer aditivo, indicando que os grupos funcionais provenientes da própria biomassa, serão os responsáveis por esta propriedade.

Os NPsC filtrados através das membranas de acetato de celulose foram os que apresentaram diferenças mais significativas ao nível da atividade antioxidante. Nas soluções aquosas de NPsC podem encontrar-se biocompostos de maior peso molecular que podem ter influenciado os valores obtidos e o processo de filtração terá contribuído para a diminuição da atividade antioxidante observada.

Tabela II.17. Atividade Antioxidante em percentagem dos NPsC, sintetizados sob diferentes condições reacionais, determinada pelo método de inibição do radical ABTS.

Ensaio	Condições Reacionais				Atividade Antioxidante ($\mu\text{g ET/mg NPsC}$)
	Reator	Aditivo	Rácio AD/OsC	Tempo de Residência (h)	
NPsC/OsC_01	Parr	-	-	6	348.18 ± 0.53
NPsC/OsC_02	Parr	ED	0.16	6	368.77 ± 2.44
NPsC/OsC_03	Parr	Ureia	0.16	6	432.84 ± 4.90
NPsC/OsC_04	Parr	ED	0.08	6	387.08 ± 5.37
NPsC/OsC_05	Parr	ED	0.32	6	336.74 ± 4.66
NPsC/OsC_06	Parr	Ureia	0.08	6	433.00 ± 4.82
NPsC/OsC_07	Parr	ED	0.08	4	379.29 ± 2.40
NPsC/OsC_08	Parr	ED	0.08	12	399.17 ± 4.53
NPsC/OsC_09	Parr	ED	0.16	4	384.88 ± 4.30
NPsC/OsC_10	Parr	ED	0.16	12	148.43 ± 5.42
NPsC/OsC_11	Parr	Ureia	0.08	4	392.17 ± 3.41
NPsC/OsC_12	Parr	Ureia	0.16	4	413.82 ± 7.42
NPsC/OsC_13	Mufla	ED	0.08	12	438.76 ± 1.66
NPsC/OsC_14	Mufla	ED	0.16	12	302.41 ± 3.05
NPsC/OsC_15	Mufla	ED	0.32	12	440.77 ± 4.32
NPsC/OsC_16	Mufla	ED	0.32	6	437.01 ± 4.91
NPsC/OsC_01-AC30	Parr	-	-	6	98.52 ± 1.54
NPsC//OsC_01-AC22	Parr	-	-	6	176.30 ± 3.96
NPsC/OsC_08-AC30	Parr	ED	0.08	4	170.65 ± 1.18
NPsC/OsC_11-AC30	Parr	ED	0.16	12	236.95 ± 3.82

Tendo em conta os elevados valores de atividade antioxidante obtidos seria pertinente em trabalho futuro, determinar os valores de IC50, sendo que estes permitem estabelecer a quantidade de antioxidante necessária para inibir 50 % dos radicais de ABTS.

II.5.2. Atividade Antibacteriana

A atividade antibacteriana dos NPsC foi avaliada pela técnica da suscetibilidade à difusão em disco, recorrendo à utilização de duas estirpes bacterianas, *Escherichia coli* ATCC® 25922 (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 (Gram-positiva).

Utilizou-se como controlo positivo o antibiótico gentamicina (10 µg) e como controlo negativo, água estéril. De modo a avaliar a influência da quantidade de NPsC no crescimento bacteriano aplicaram-se diferentes massas em cada ensaio, 500 e 1000 µg, respetivamente.

Não se detetou qualquer atividade antibacteriana contra a *E. coli*, sendo o único diâmetro de inibição observado associado ao antibiótico.

A título de exemplo, dos resultados obtidos, na Figura II.20, estão apresentados os diâmetros de inibição obtidos após incubação da *E. coli* com os NPsC/OsC_03 (ureia/OsC = 0.16, 250 °C, 6h, Parr) e NPsC/OsC_01 (sem aditivo, 250 °C, 6h, Parr), NPsC/OsC_04 (ED/OsC = 0.08, 250°C, 6h, Parr), NPsC/OsC_06 (ureia/OsC = 0.08, 250 °C, 6h, Parr).

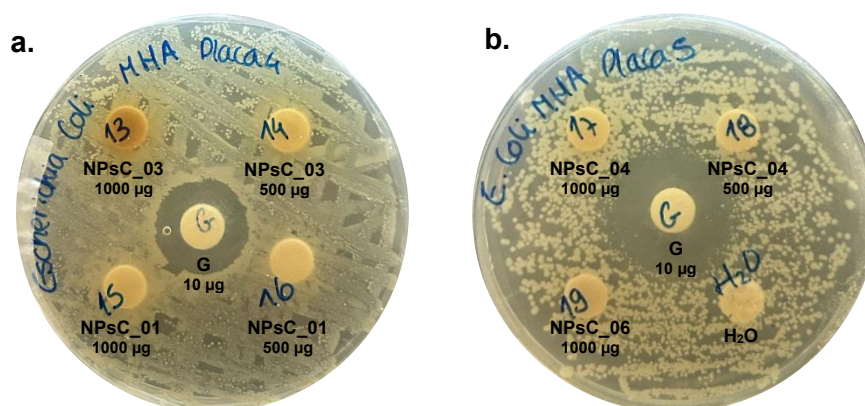


Figura II.20. Ensaio de difusão em disco, após incubação da *E. coli* com **a.** NPsC/OsC_03 (1000 e 500 µg/disco) e NPsC/OsC_01 (1000 e 500 µg/disco) e **b.** NPsC/OsC_04 (1000 e 500

$\mu\text{g}/\text{disco}$) e NPsC/OsC_06 (1000 $\mu\text{g}/\text{disco}$), sendo o controle positivo gentamicina (G, 10 μg) e o controle negativo água estéril.

Alguns dos resultados obtidos para a atividade antibacteriana dos NPsC contra a espécie bacteriana *S. aureus*, nomeadamente NPsC/OsC_02 (ED/OsC = 0.16, 250 °C, 6h, Parr), NPsC/OsC_05 (ED/OsC = 0.32, 250 °C, 6h, Parr), NPsC/OsC_03 (ureia/OsC = 0.16, 250 °C, 6h, Parr), NPsC/OsC_01 (sem aditivo, 250 °C, 6h, Parr), são apresentados na Figura II.21.

Foi detetada atividade antibacteriana para a menor massa de NPsC/OsC_03 (500 $\mu\text{g}/\text{disco}$), resultando num diâmetro de inibição de 1.2 ± 0.0 cm. À semelhança do observado para a *E. coli*, para os restantes discos impregnados com NPsC, não se verificou atividade antibacteriana, observando-se apenas um único diâmetro de inibição correspondente ao do controle positivo.

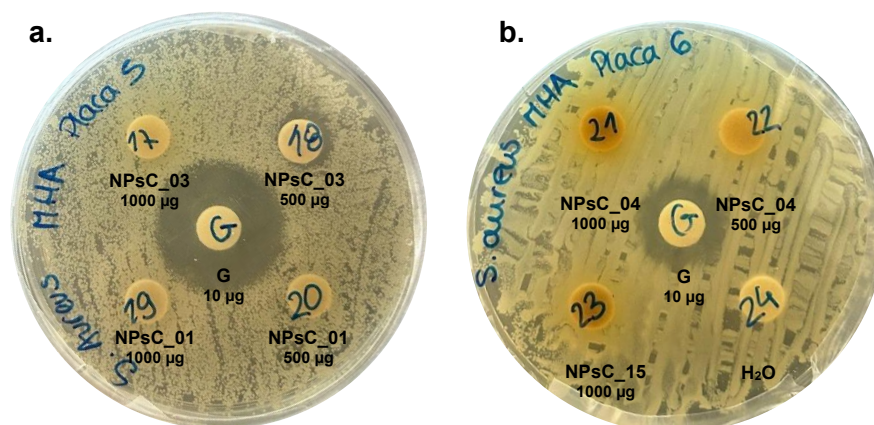


Figura II.21. Ensaio de difusão em disco, após incubação de *S. aureus* com **a.** NPsC/OsC_03 (1000 e 500 $\mu\text{g}/\text{disco}$) e NPsC/OsC_01 (1000 e 500 $\mu\text{g}/\text{disco}$) e **b.** NPsC/OsC_04 (1000 e 500 $\mu\text{g}/\text{disco}$) e NPsC/OsC_15 (1000 $\mu\text{g}/\text{disco}$), sendo o controle positivo gentamicina (G, 10 μg) e o controle negativo água estéril.

Apesar de Zhang *et al.*¹⁰⁸ e Wang *et al.*¹⁰⁹ terem sintetizado com sucesso pontos de carbono com atividade antibacteriana contra bactérias gram-negativas (*E. coli*) e gram-positivas (*S. aureus*), os PsC sintetizados por Liang *et al.*¹⁷² não apresentaram atividade antibacteriana contra as espécies estudadas.

Os extratos de OsC obtidos por Pinto *et al.*,⁹ embora não tenham sido utilizados na síntese de pontos de carbono, não exibiram atividade antibacteriana.

Os ensaios efetuados foram muito preliminares, sendo que será pertinente a deteção dos valores da Concentração Mínima Inibitória (MIC) e da Concentração Mínima Letal

(MLC) de forma a corroborar os resultados obtidos, em particular para os resultados registados pelo NPSc/OsC_03 para a bactéria *S. aureus*.

II.5.3. Atividade Anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória foi avaliada para os NPSc anteriormente estudados no *design* experimental, numa concentração de 1 mg/mL, através da análise da percentagem de inibição da desnaturação de proteína. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura II.22.

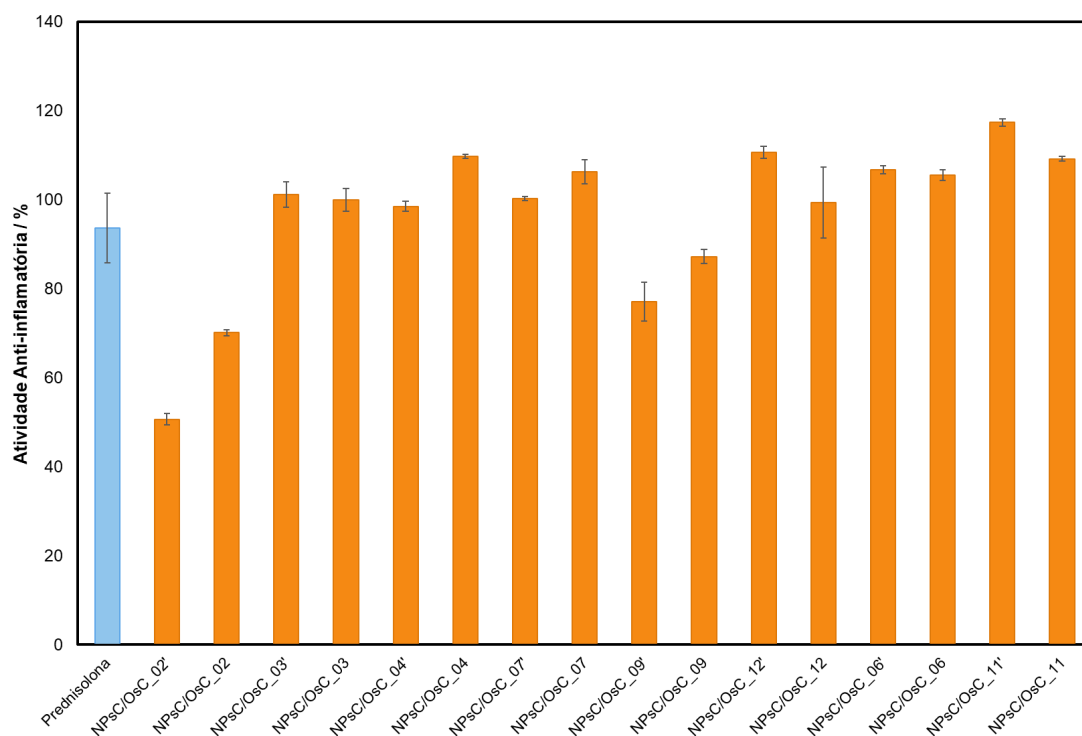


Figura II.22. Atividade anti-inflamatória (%) dos NPSc; [1 mg/mL].

Na generalidade, os NPSc apresentaram uma relevante atividade anti-inflamatória, mesmo quando comparado com o controlo positivo (prednisolona), numa concentração de 50 µg/mL, sendo o valor máximo obtido de 117.35 ± 0.83 % com a solução aquosa de NPSc/OsC_11'.

Os valores mais baixos de atividade anti-inflamatória foram obtidos os NPSc/OsC_02 (50.65 ± 1.28 % e 70.13 ± 0.67 %), em que se utilizou ED como aditivo. Também os valores obtidos para os NPSc/OsC_09 com ED apresentaram valores de atividade anti-inflamatória mais baixos do que a maioria dos restantes NPSc (77.11 ± 4.34 % e 87.20 ± 1.56 %), o que corrobora a análise efetuada com o *design* experimental.

Na Tabela II.18. é possível observar que as variações nos valores obtidos de atividade anti-inflamatória confirmam o *design* experimental. Verificam-se valores mais elevados

quando se utilizou ureia como aditivo, sendo clara a diminuição de atividade anti-inflamatória para NPsC obtidos na presença de ED (ED/OsC = 0.16).

Tabela II.18. Atividade anti-inflamatória em percentagem dos NPsC, sintetizados sob diferentes condições reacionais.

Ensaio	Condições Reacionais				Atividade Anti-inflamatória (%)
	Reator	Aditivo	Rácio AD/OsC	Tempo de Residência (h)	
NPsC/OsC_02'	Parr	ED	0.16	6	50.65 ± 1.28
NPsC/OsC_02	Parr	ED	0.16	6	70.13 ± 0.67
NPsC/OsC_03'	Parr	Ureia	0.16	6	101.18 ± 2.87
NPsC/OsC_03	Parr	Ureia	0.16	6	99.94 ± 2.62
NPsC/OsC_04'	Parr	ED	0.08	6	98.48 ± 1.16
NPsC/OsC_04	Parr	ED	0.08	6	109.73 ± 0.45
NPsC/OsC_07'	Parr	ED	0.08	4	100.27 ± 0.45
NPsC/OsC_07	Parr	ED	0.08	4	106.25 ± 2.73
NPsC/OsC_09'	Parr	ED	0.16	4	77.11 ± 4.34
NPsC/OsC_09	Parr	ED	0.16	4	87.20 ± 1.56
NPsC/OsC_12'	Parr	Ureia	0.16	4	110.65 ± 1.35
NPsC/OsC_12	Parr	Ureia	0.16	4	99.32 ± 7.95
NPsC/OsC_06'	Parr	Ureia	0.08	6	106.70 ± 0.96
NPsC/OsC_06	Parr	Ureia	0.08	6	105.48 ± 1.16
NPsC/OsC_11'	Parr	Ureia	0.08	4	117.35 ± 0.83
NPsC/OsC_11	Parr	Ureia	0.08	4	109.18 ± 0.57

II.5.4. Avaliação da Citotoxicidade

II.5.4.1. *In vitro*

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos NPsC sintetizados foi efetuada através do método colorimétrico MTT, quantificando-se a viabilidade celular em duas linhas celulares animais tumorais, S180 ATCC® TIB-66 (células de sarcoma de murganho) e HeLa ATCC® CCL-2 (células humanas de carcinoma do colo do útero) e duas linhas celulares animais não tumorais, NIH-3T3 ATCC® CRL-1658 (fibroblastos embrionários) e VERO ATCC® CCL-81 (células epiteliais renais de macaco verde africano).

Foram selecionados NPsC obtidos por RAP (250 °C, 6h), na presença de ED como aditivo, com diferentes rácios mássicos ED/OsC (0.08, 0.16 e 0.32), uma vez que as suas propriedades fotofísicas sugeriam ser os nanomateriais mais promissores para aplicação em bioimagem. A norma ISO 10993-5¹⁷³ descreve que um composto é

considerado citotóxico quando provoca uma diminuição para menos de 70 % na viabilidade celular, sendo que quanto maior for essa diminuição, maior o potencial citotóxico.

Na Tabela II.19 são apresentados os resultados obtidos para a citotoxicidade dos NPsC, na concentração da solução aquosa em que os mesmos são considerados citotóxicos e a percentagem de citotoxicidade, relativamente à viabilidade celular.

Tabela II.19. Efeito do rácio ED/OsC dos NPsC sintetizados na viabilidade celular das linhas VERO, NIH-3T3, S180 e HeLa.

Ensaio	ED/OsC	Citotoxicidade ($\mu\text{g/mL}$)			
		VERO	NIH-3T3	S180	HeLa
NPsC/OsC_04	0.08	n.d.	n.d.	1000 (60 %)	31 (36 %)
NPsC/OsC_02	0.16	n.d.	n.d.	n.d.	16 (42 %)
NPsC/OsC_05	0.32	n.d.	n.d.	n.d.	31 (33 %)

n.d. - Citotoxicidade não detetada

A análise dos valores registados permite inferir que os NPsC sintetizados não apresentaram citotoxicidade para as linhas celulares não tumorais (VERO e NIH-3T3). Nos ensaios realizados com a linha tumoral S180, apenas os NPsC/OsC_04 apresentaram citotoxicidade para a concentração mais alta (1000 $\mu\text{g/mL}$), ocorrendo uma redução de viabilidade celular em 60 %. Para a linha tumoral HeLa, todos os NPsC testados apresentaram citotoxicidade; para NPsC/OsC_04 e NPsC/OsC_05 para a concentração 31 $\mu\text{g/mL}$, ocorrendo uma redução na viabilidade celular de 36 e 33 %, respetivamente e para NPsC/OsC_02 a diminuição de viabilidade celular de 42 % verificou-se para a concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$.

Nas condições do ensaio, é de realçar que o ensaio NPsC/OsC_04 aparenta possuir propriedades anti-tumorais relativamente às duas linhas celulares testadas, não se detetando citotoxicidade para células não tumorais, sendo estes resultados bastante promissores.

De modo a visualizar a variação de viabilidade celular para as diferentes concentrações de NPsC testados, nas Figuras II.23 e II.24 encontram-se representadas as viabilidades celulares para células não tumorais e tumorais, respetivamente, para os NPsC/OsC_05 (ED/OsC = 0.32).

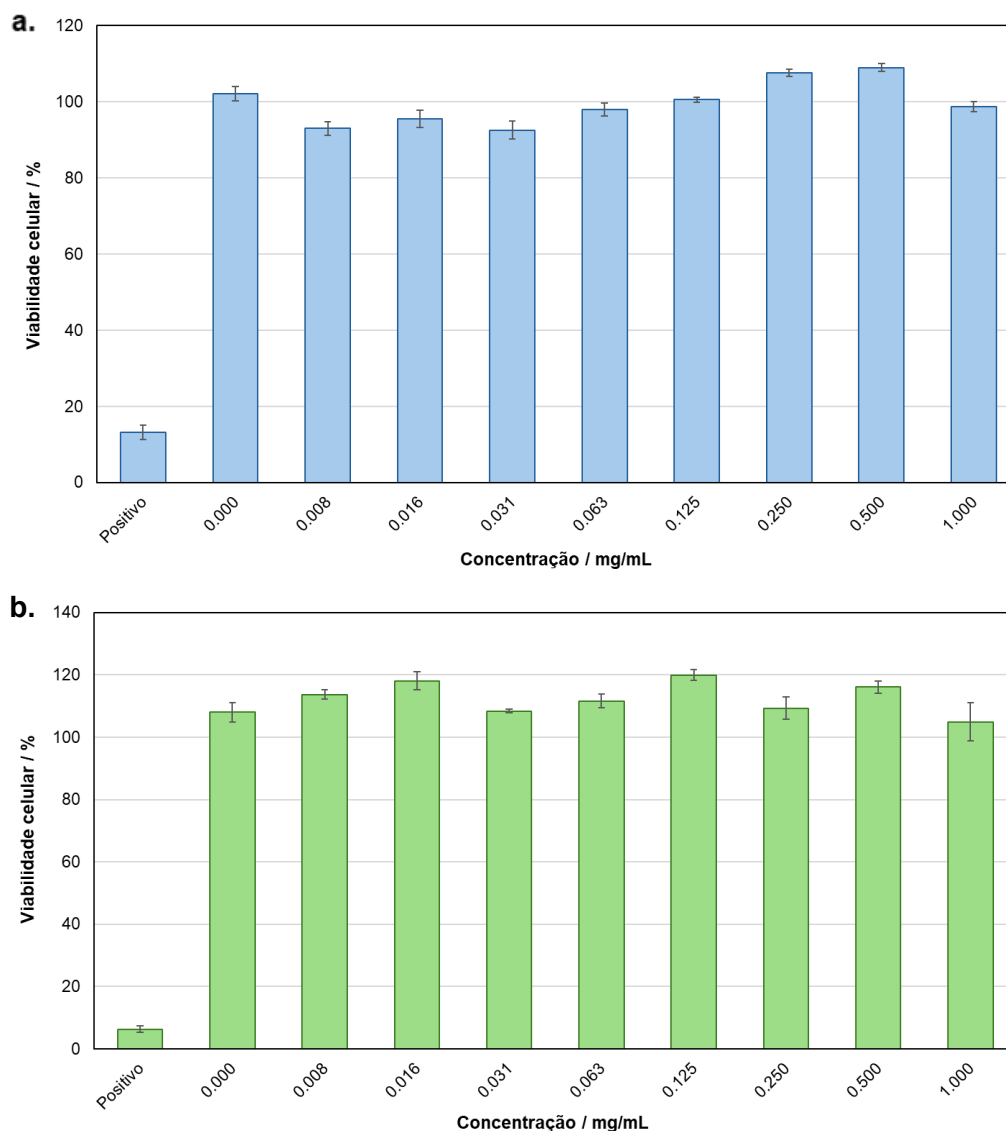


Figura II.23. Citotoxicidade celular dos NPsC/OsC_05 (ED/OsC = 0.32), 0 – 1.0 mg/mL, contra as linhas celulares não tumorais **a.** VERO e **b.** NIH-3T3, segundo o método do MTT.

Tal como descrito anteriormente, não se observam variações significativas na viabilidade celular que indiquem a citotoxicidade das soluções aquosas de NPsC para as linhas celulares não tumorais VERO e NIH-3T3. Apenas o controlo positivo tetrametiletenodiamina (TEMED; 1 mg/mL) apresentou citotoxicidade.

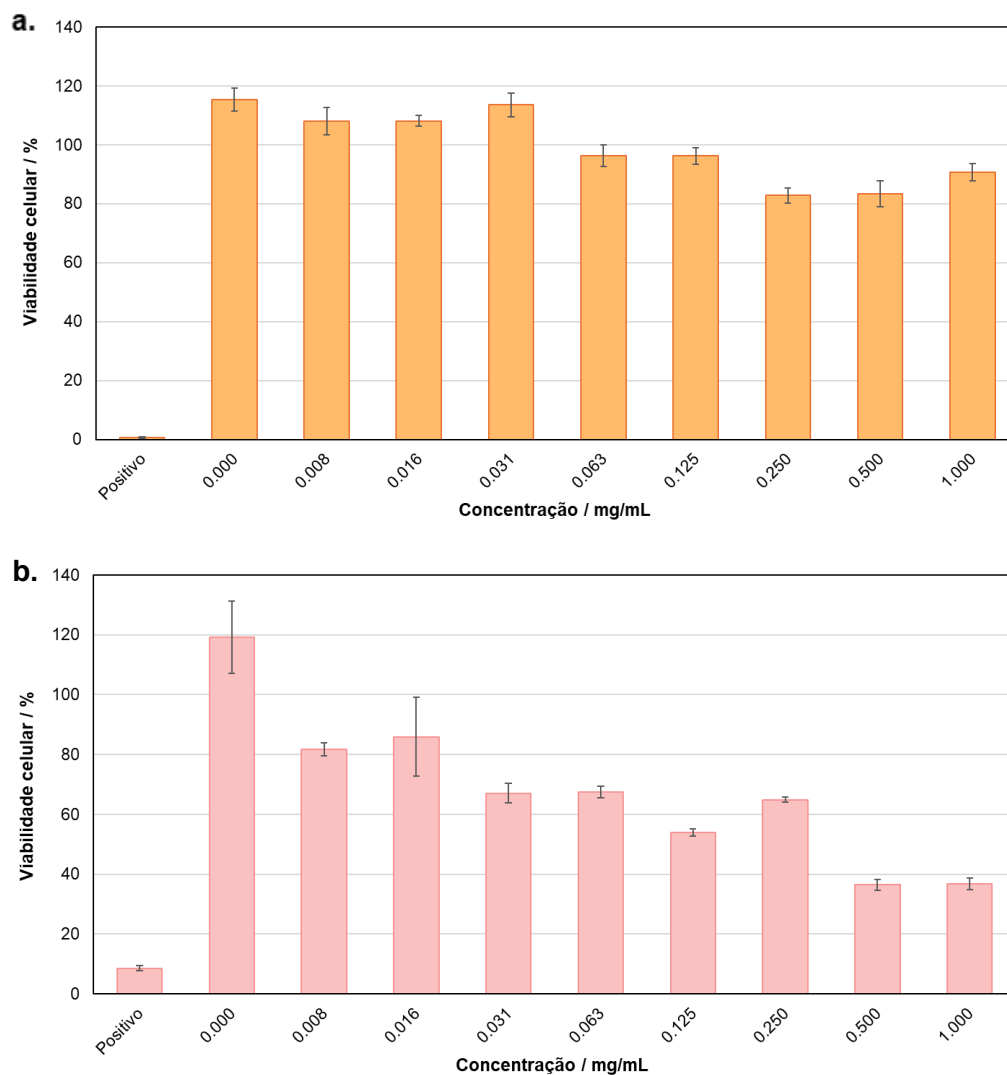


Figura II.24. Citotoxicidade celular dos NPsC/OsC_05 (ED/OsC = 0.32), 0 – 1.0 mg/mL, nas linhas celulares tumorais **a.** S180 e **b.** HeLa, segundo o método do MTT.

Os NPsC/OsC_05 não apresentaram citotoxicidade para a linha tumoral S180; embora se tenha verificado uma redução da viabilidade celular, o decréscimo não foi significativo (cerca de 20%), no entanto, considera-se que é prematuro afirmar a ausência de citotoxicidade destes NPsC.

Na linha tumoral de células humanas HeLa, observa-se citotoxicidade a baixas concentrações, nomeadamente na concentração de 0.031 mg/mL, acompanhado de um decréscimo acentuado na viabilidade celular com o aumento da concentração, revelando-se este resultado bastante promissor.

Havrdova *et al.*¹⁷⁴ sintetizaram PsC com grupos de quaternários de amónio, que apresentaram citotoxicidade apenas contra a linha não tumoral de fibroblastos de

murganho (L929), não provocando qualquer dano, nem alteração, na viabilidade celular da linha celular NIH-3T3.

Os NPsC sintetizados por Barata *et al.*,⁹⁶ a partir de resíduos sólidos do tomate, apresentaram também elevada citotoxicidade *in vitro* para a linha celular tumoral HeLa, verificando-se citotoxicidade para linhas celulares animais normais apenas a concentrações muito superiores às aplicadas em medicina.

Os extratos de OsC obtidos por Pinto *et al.*,⁹ apesar de não terem sido utilizados na síntese de NPsC, não demonstraram por si só qualquer efeito na viabilidade celular de uma linha celular não tumoral de queratinócitos (células HaCaT), até concentrações de 100 µg/mL.

II.5.4.2. *In vivo*

De forma complementar ao estudo de citotoxicidade *in vitro* realizados, efetuou-se também um estudo de citotoxicidade *in vivo*, sendo o organismo modelo escolhido a *Artemia salina*. Quantificou-se a taxa de mortalidade do microcrustáceo após 24 e 48 horas de incubação com os mesmos NPsC aplicados anteriormente no ensaio de citotoxicidade *in vitro* (NPsC/OsC_04, NPsC/OsC_02 e NPsC/OsC_05'), utilizando uma gama de concentrações de 0-1.000 mg/mL. Como controlo positivo foi utilizado cromato de potássio (1 mg/mL) e como controlo negativo água estéril.

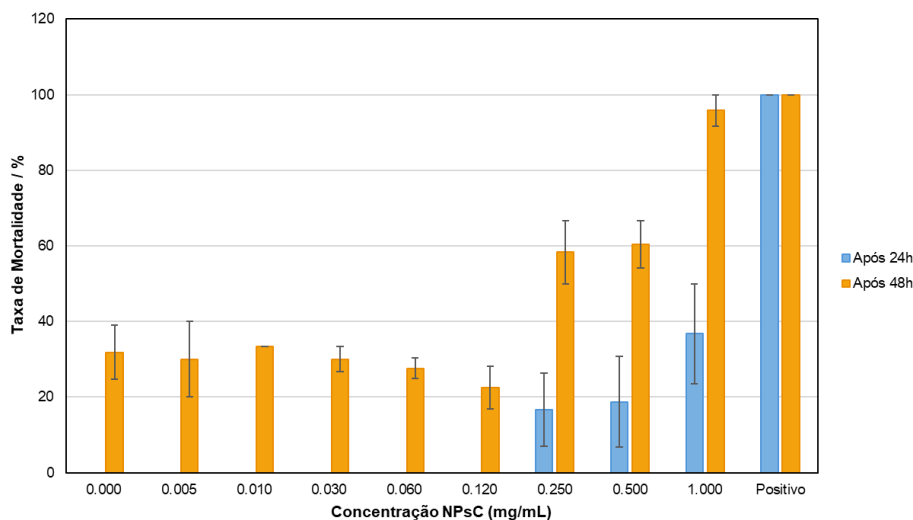


Figura II.25. Ensaio de citotoxicidade *in vivo* após incubação da *A. salina* com a solução aquosa de NPsC/OsC_05 (0 – 1.0 mg/mL) e cromato de potássio (1mg/mL), durante 24h e 48h.

Da análise da Figura II.25 é possível concluir que após 24 horas, a solução aquosa de NPsC/OsC_05 à concentração de 1 mg/mL, apresenta algum efeito citotóxico, sendo a taxa de mortalidade *ca.* 37 ± 13 %. Decorridas 48 horas, observou-se um aumento da

taxa de mortalidade, mesmo para o ensaio do controlo negativo. Contudo, os valores mais significativos de toxicidade ocorrem para concentrações acima de 0.250 mg/mL, ocorrendo para esta concentração um aumento na taxa de mortalidade (ca. $58 \pm 8 \%$). Para a concentração de 0.500 mg/mL o valor obtido é ca. $60 \pm 6 \%$, atingindo-se a maior taxa de mortalidade na concentração de 1.000 mg/mL (ca. $96 \pm 4\%$).

É importante salientar que embora os NPsC/OsC_05 aparentem apresentar citotoxicidade elevada a concentrações mais elevadas, as condições de realização do ensaio são bastante específicas, sendo que as *A. salina* se encontram num espaço confinando, não lhes sendo fornecida fonte de alimento.

Após inúmeras repetições dos ensaios de citotoxicidade *in vivo*, não foi possível determinar se as soluções aquosas de NPsC/OsC_04 e NPsC/OsC_02 possuem efeitos citotóxicos nos microcrustáceos. No ensaio em branco, mesmo após 24 horas, observaram-se valores de taxa de mortalidade muito elevados que não permitiram corroborar os resultados obtidos nesses mesmos ensaios.

Li *et al.*¹⁷⁵ sintetizaram PsC com o intuito de avaliar a toxicidade dos nanomateriais em organismos marinhos, que coexistem a diferentes profundidades. Os microcrustáceos *A. salina*, que se encontram na camada média do ambiente estudado, retiveram PsC no seu trato intestinal, dificultando a sua alimentação e, a longo prazo, comprometendo a sua sobrevivência.

Também Liu *et al.*¹⁷⁶ sintetizaram PsC com o objetivo de avaliar o risco que constituem para ecossistemas aquáticos. Os seus resultados demonstraram que a radioatividade na água teve um aumento de 80 %. Para ambos os micro-organismos estudados observaram-se efeitos a nível estrutural que dificultaram a sua alimentação e desenvolvimento, apresentando toxicidade.

A radioatividade encontrada na água pode também ter ocorrido nos ensaios, ainda que em menor escala. Contudo, considerou-se que também a forma de exposição afeta os valores de toxicidade obtidos, sendo que a ingestão destes compostos se demonstra prejudicial, o que pode também ter ocorrido.¹⁷⁶

II.5.5. Marcação Celular por Fluorescência

O estudo de marcação celular por fluorescência teve como objetivo a avaliação do potencial de aplicação dos NPsC em imagiologia, observando-se a internalização das soluções aquosas nas *A. salina*. A fluorescência foi avaliada a comprimentos de onda de excitação na região do azul (330-385 nm) e na região do verde (460-490 nm).

Após incubação dos microcrustáceos com as soluções aquosas de NPsC, procedeu-se à recolha das fotografias, obtidas com recurso a um microscópio de fluorescência invertido.

Na Figura II.26 é possível observar-se o organismo modelo antes da aplicação da solução aquosa de NPsC, sendo possível a identificação do seu trato intestinal.



Figura II.26. *A. salina* ao microscópio ótico, para identificação do seu trato intestinal (ampliação 100x).

Segundo Li *et al.*,¹⁷⁵ a internalização dos NPsC nas *A. salina* ocorre ao nível do seu trato intestinal, reduzindo a sua taxa de filtração, podendo assim comprometer a sua viabilidade.

Através da análise das fotografias representadas na Figura II.27 (refira-se que nas figuras C e D se suspeita da existência de duas *A. salina* sobrepostas), é possível observar-se uma maior fluorescência no centro do microcrustáceo, o que corresponde ao seu trato intestinal, verificando-se assim uma internalização eficaz dos NPsC. A verificação da internalização aliada à fluorescência verificada confirma o potencial das soluções aquosas para serem empregues em imagiologia médica.

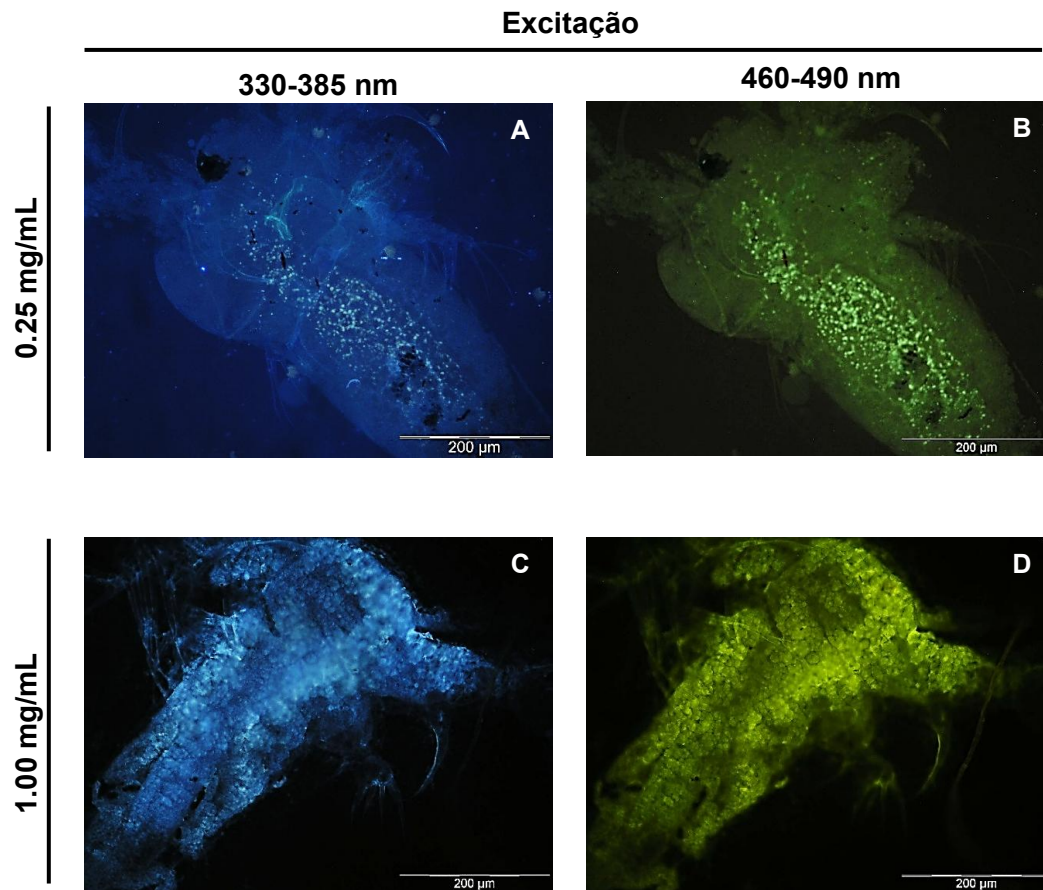


Figura II.27. Fotografias de microscopia de fluorescência da *A. salina* após internalização da solução aquosa NPsC/OsC_05, a diferentes concentrações: **a.** 0.25 mg/mL e **b.** 1.00 mg/mL (ampliação 200x).

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. PREÂMBULO

Ao longo deste Capítulo serão apresentados os reagentes, o material biológico, as técnicas gerais, os métodos e os equipamentos utilizados no decorrer do trabalho experimental. Serão igualmente descritos os procedimentos utilizados na caracterização da biomassa estudada, os ouriços da castanha, designados ao longo do texto por OsC. Os métodos de síntese, isolamento, purificação e caracterização estrutural dos NPsC, bem como as técnicas utilizadas na avaliação das suas propriedades biológicas encontram-se também apresentados.

Deste modo, o Capítulo encontra-se organizado nas seguintes Secções:

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

III.3. Caracterização dos OsC

III.4. Síntese e Purificação dos NPsC

III.5. *Design* Experimental

III.6. Avaliação da Bioatividade dos NPsC

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

Todos os reagentes e solventes utilizados ao longo das etapas que constituem este projeto possuem pureza analítica, tendo os mesmos sido utilizados na forma em que foram recebidos.

Em novembro de 2024, os Ouriços da Castanha (OsC) foram recolhidos manualmente pela empresa Agromontenegro, uma indústria portuguesa dedicada à produção, calibração, esterilização e embalagem essencialmente de castanha, proveniente da Serra da Padrela e Carrazedo de Montenegro. Após receção, os OsC foram conservados à temperatura ambiente em ambiente seco.

Para a extração dos biocompostos dos OsC foi efetuada uma extração em autoclave (AJC, modelo Uniclave 88), tendo sido utilizados para os doseamentos dos biocompostos presentes nos extratos dois leitores de microplacas (BMG Labtec, modelo FLUOstar OPTIMA; a 510, 550 e 620 nm e o BioTek, modelo Synergy 2, a 760 nm).

A síntese dos NPsC foi efetuada por carbonização hidrotérmica com aquecimento convencional (CHAC), tendo sido utilizados para o efeito dois tipos de reatores. Foi utilizado um reator de alta pressão (Parr, modelo 4560), constituído por um vaso de inox com capacidade máxima de 300 mL, equipado com sensores e controladores de pressão, temperatura e agitação (Parr, modelo 4843). Adicionalmente foi utilizada uma mufla como fonte de aquecimento convencional (Nabertherm, modelo B 170), utilizando reatores de aço-inox com vaso de Teflon, com capacidade máxima de 50 mL. Para todos os ensaios o solvente utilizado foi água ultrapura (Millipore, Milli-Q®).

O pH da mistura reacional (m.r.) foi sempre avaliado num aparelho de pH (VWR, modelo MU 6100L), nomeadamente antes e após a adição de aditivo e posteriormente à síntese.

As misturas reacionais obtidas foram filtradas com recurso a membrana de celulose regenerada, com poro de tamanho 0.2 μm (Whatman™, RC58).

Os espectros de ultravioleta-visível (UV-Vis) foram traçados num espectrofotómetro de UV-Vis (Jasco, modelo V-750), num intervalo de comprimento de onda (c.o.) de 200 a 800 nm. Os espectros de fluorescência no estado estacionário foram obtidos num espectrofluorímetro (PerkinElmer, modelo LS45) a 25 °C, com uma geometria a 90° e células de quartzo de percurso ótico de 1 cm. O intervalo de c.o. escolhido foi de 200 a 700 nm para os espectros de excitação e de 300 a 700 nm para os espectros de emissão.

Os espectros de UV-Vis e os de fluorescência foram traçados para soluções de NPsC de concentração 0.1 mg/mL.

As determinações do potencial ζ (5 leituras) foram realizadas num Malvern ZetaSizer Nanoseries, a 20 °C, utilizando as condições otimizadas do procedimento automático do equipamento.

A análise topográfica por microscopia de força atômica (AFM) foi realizada num Veeco Multimode 8 Nanoscope V, no Serviço de Nanotecnologia e Análise de Superfícies (C.A.C.T.I.) da Universidade de Vigo, Espanha. As imagens foram processadas pelo *software* Nanoscope Analysis V.1.9. A amostra de NPsC (com uma concentração de aproximadamente 6 mg/mL) foi sonicada ca. 10 min para dispersar possíveis agregados. Após esse período, 5 μ L da amostra foram depositados por *spin coating* (800 rpm, durante 3 s e 1600 rpm, durante 10 s) em substratos de mica, esfoliados várias vezes antes da deposição e seca ao ar a t.a..

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

Os rendimentos quânticos de fluorescência foram determinados em água ultrapura Millipore®, através do método do declive.¹⁷⁷ A curva de calibração foi obtida utilizando sulfato de quinino (> 98%, Fluka) em H₂SO₄ 0.1 M como padrão ($\Phi_F = 0.54$,¹⁷⁸ em condições de equilíbrio com o ar e geometria a 90°), cujo c.o. de emissão varia entre 400 e 600 nm.¹⁷⁸ A densidade ótica das amostras e do padrão foram sempre mantidas abaixo de 0.05 ao comprimento de onda de excitação, de modo a prevenir o efeito de filtro interno.¹⁷⁹

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram traçados com recurso a um espectrofotómetro (Brüker, modelo Vertex 70), com resolução de 4 cm⁻¹, numa gama de 4000 a 500 cm⁻¹. As amostras foram suportadas em pastilhas de brometo de potássio (KBr), as quais foram obtidas numa prensa hidráulica manual (Carver®, modelo 4350CE).

Para a determinação da atividade antioxidante foi utilizado um leitor de microplacas (BMG Labtec, modelo FLUOstar OPTIMA) e a absorvância registada a 620 nm. Para a quantificação dos compostos fenólicos, a 760 nm, foi utilizado um leitor de microplacas (BioTek, modelo Synergy 2). A determinação da atividade anti-inflamatória foi efetuada num espectrofotómetro UV-Vis (UV-3100PC VWR).

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada numa câmara de segurança biológica SafeFAST Classic 209, onde se manipularam as espécies *Escherichia coli* ATCC® 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923. As culturas de pré-inóculo foram preparadas em incubadora com agitação orbital Gallenkamp 10X 400, a 37 °C e 120 rpm. Posteriormente, as culturas inoculadas em placas de Petri foram incubadas numa estufa Memmert BP 600, também a 37 °C.

Para todos os ensaios, utilizou-se a gentamicina (Sigma-Aldrich), dissolvida em água desionizada, como controlo positivo, e água desionizada estéril como controlo negativo

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* e *in vivo* foram realizados no Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa (IHMT-NOVA). Para os ensaios *in vitro*, utilizaram-se células epiteliais renais de macaco verde africano (VERO ATCC® CCL-81), fibroblastos embrionários murinos (NIH-3T3 ATCC® CRL-1658) e células de sarcoma de murganho (S180 ATCC® TIB-66).

As contagens celulares foram efetuadas com recurso a um microscópio invertido OLYMPUS CK2 e ao método de exclusão do corante azul de tripano (GIBCO®, Thermo Fisher Scientific), utilizando uma câmara de contagem Neubauer Improved (Superior Marienfeld). As suspensões celulares foram então distribuídas em placas de cultura de 96 poços (Orange Scientific) e incubadas a 37 °C, sob atmosfera humidificada contendo 5 % de CO₂, numa estufa HERAcCell 240 (Heraeus).

Todos os ensaios foram conduzidos numa câmara de fluxo laminar horizontal (TL 2448). A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de MTT (> 98 %, PanReac), sendo a absorvância medida num leitor de microplacas TECAN Infinite M200 PRO.

Nos ensaios de citotoxicidade *in vivo*, utilizaram-se organismos vivos *Artemia salina* (Artemio Pur, JBL), cuja contagem foi realizada num microscópio ótico invertido OLYMPUS CK2.

As imagens obtidas nos ensaios de microscopia de fluorescência foram adquiridas num microscópio invertido OLYMPUS BX51, utilizando filtros de excitação de 330–385 nm e 460–490 nm, para a recolha de imagens nas regiões do azul e do verde, respetivamente.

III.3. CARACTERIZAÇÃO DOS OsC

III.3.1. Extração em Autoclave

Para avaliar as características e propriedades dos OsC, a biomassa selecionada para a síntese de NPsC, foi necessário começar por efetuar a extração das biomoléculas presentes nos mesmos, tendo sido utilizado o método de extração em autoclave, com água ultrapura Millipore® como único solvente.

Definiram-se três rácios de biomassa (OsC): solvente (H₂O), designadamente 1:5, 1:10 e 1:20. De seguida, foi efetuada a extração em autoclave (AJC, modelo Uniclave 88), a 121 °C, durante 30 minutos.

De modo a serem recuperados os extratos, os mesmos foram submetidos a dois ciclos de centrifugação, o primeiro a 5000 rpm durante 20 minutos e o segundo a 10000 rpm durante 15 minutos, numa centrífuga refrigerada de bancada (Hermle, modelo Z 383 K). Os extratos aquosos foram armazenados em tubos Falcon a -20 °C, sendo quantificados posteriormente quanto ao seu conteúdo de biocompostos, nomeadamente de β -(1,3)-D-glucanos, compostos fenólicos totais, hidratos de carbono totais, polissacáridos sulfatados, proteína total, sólidos totais e cinzas.

O doseamento de lípidos nos OsC foi efetuado por gravimetria após extração contínua em Soxhlet, durante 4 horas, tendo sido utilizado *n*-hexano como solvente. Esta metodologia encontra-se descrita na Secção III.3.6.

III.3.2. Quantificação de Compostos Fenólicos Totais

Os compostos fenólicos totais foram quantificados através do método de Folin-Ciocalteu, adaptado do método descrito por Reis *et al.*,¹⁶⁰ que se baseia no aparecimento de uma coloração azul intensa, resultado dos estados de menor oxidação do reagente de Folin-Ciocalteu quando o mesmo é reduzido na presença de compostos fenólicos. Numa microplaca de 96 poços (NUNC) foram colocados 30 μ L de amostra (extratos), 120 μ L de Na₂CO₃ 75 g/L e 150 μ L de reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) diluído de 1:10 em água ultrapura, perfazendo um volume final de 300 μ L. De seguida, a microplaca foi colocada numa estufa (Mettler, modelo 600) a 40 °C durante 30 minutos.

Como branco, foi utilizada água ultrapura, ácido gálico (Sigma-Aldrich) 0.25 mg/mL como padrão, numa gama que variou de 0-250 μ g/mL, tendo todos os ensaios sido realizados em triplicado.

Num leitor de microplacas (BioTek, modelo Synergy 2) foi lida a absorvância a 760 nm, sendo os compostos fenólicos totais quantificados em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/g de OsC.

III.3.3. Quantificação de Hidratos de Carbono Totais

Os hidratos de carbono totais foram quantificados pelo método do fenol-sulfúrico, adaptado do método descrito por Masuko *et al.*,³⁵ o qual consiste na desidratação das moléculas de hidratos de carbono pelo ácido sulfúrico e posterior reação destas com o fenol, resultando na coloração observada. Para uma microplaca de 96 poços (NUNC) foram pipetados 50 µL de amostra, 30 µL de fenol 5 % (m/v) e 150 µL de ácido sulfúrico concentrado, perfazendo um volume total de 230 µL. As microplacas foram colocadas a 90 °C num banho termostaticado (GFL, modelo 1002), durante 5 minutos. Após arrefecimento até à temperatura ambiente foi efetuada a leitura da absorvância a 510 nm num leitor de microplacas (BMG Labtec, modelo FLUOstar OPTIMA).

Os ensaios em branco foram realizados com água ultrapura. Como padrão foi utilizada *D*-glucose 2 mg/mL (>99 %, Fluka), numa gama de concentração de 0-2000 µg/mL. Os ensaios realizados foram todos efetuados em triplicado.

Os hidratos de carbono quantificados foram expressos em mg/g de OsC.

III.3.4. Quantificação de Polissacáridos

III.3.4.1. Quantificação de β -(1,3)-*D*-glucanos

Para o doseamento de β -(1,3)-*D*-glucanos com estrutura em tripla hélice foi utilizado o método do corante Congo Red, descrito por Semedo *et al.*,³⁷ baseado na interação específica que ocorre entre o corante Congo Red e os β -(1,3)-*D*-glucanos com este tipo de estrutura e que resulta num desvio batocrómico no espetro de absorção. A m.r. foi colocada numa microplaca de 96 poços (NUNC), contendo 140 µL de amostra e 140 µL de uma solução de corante Congo Red (Sigma-Aldrich) 0.017 % (m/v) em tampão fosfato salino (PBS) pH 7.2.

Foram realizados três ensaios em branco, constituídos por misturas reacionais distintas: água ultrapura e corante Congo Red 0.017 % (m/v), água ultrapura e PBS e amostra e PBS. O padrão utilizado foi β -(1,3)-*D*-glucano de cevada (Sigma-Aldrich) 0.2 mg/mL, foi dissolvido inicialmente em NaOH 1M e, posteriormente neutralizado com HCl, e utilizado numa gama de 0-50 µg/mL. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

Para a determinação da absorvância a 510 nm foi utilizado um leitor de microplacas (BMG Labtec, modelo FLUOstar OPTIMA), e corrigida através da equação seguinte:

$$\text{Abs}_{510 \text{ nm}} = (\text{Abs}_{\text{Amostra}} - \text{Abs}_{\text{Branco 1}}) - (\text{Abs}_{\text{Branco 3}} - \text{Abs}_{\text{Branco 2}}) \quad (\text{III.1})$$

A quantificação foi expressa em mg de β -(1,3)-D-glucanos/g de OsC.

III.3.4.2. Quantificação de Polissacáridos Sulfatados

A quantificação de polissacáridos sulfatos foi efetuada pelo método do corante azul de toluidina, adaptado do descrito por Hahn *et al.*,³⁹ que se baseia na interação específica entre o corante catiónico azul de toluidina e os grupos sulfato presentes nos polissacáridos. Inicialmente, para uma microplaca de 96 poços (NUNC), pipetaram-se 50 μL de amostra e 150 μL de uma solução de corante azul de toluidina [(7-amino-8-metil-fenotiazin-3-ilideno)-dimetil amónia, Fluka] 0,05 mg/mL, em PBS. Posteriormente, a microplaca foi colocada no escuro durante *ca.* 5 minutos.

Para o ensaio em branco foi utilizada água ultrapura. A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão de sulfato de Dextrano 200000 Da (Sigma-Aldrich), numa gama 0-130 $\mu\text{g/mL}$. Os ensaios foram todos efetuados em triplicado.

Na leitura da absorvância a 620 nm foi utilizado um leitor de microplacas ((BMG Labtec, modelo FLUOstar OPTIMA). A quantificação dos polissacáridos sulfatados foi expressa em mg de polissacáridos sulfatados/g de OsC.

III.3.5. Quantificação de Proteína Total

Para a quantificação da proteína total presente nos extratos aquosos obtidos foi utilizado o método de ligação do corante azul de Coomassie, descrito inicialmente por Bradford com adaptações.⁴¹ Numa microplaca de 96 poços (NUNC) foram adicionados 100 μL de amostra e 100 μL de reagente de Bradford (Bio-Rad, Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent). De seguida, a microplaca foi mantida em condições de ausência de luz durante *ca.* 5 minutos. Após os cinco minutos de repouso procedeu-se à leitura da absorvância a 550 nm, num leitor de microplacas (BMG Labtec, modelo FLUOstar OPTIMA). A quantificação foi expressa em mg de proteína/g de OsC.

O ensaio em branco foi efetuado com água ultrapura e como padrão foi utilizada albumina do soro bovino (BSA; Acros Organics) 0.2 mg/mL, na gama de 0-20 $\mu\text{g/mL}$. Tal como nos restantes doseamentos, os ensaios foram efetuados em triplicado.

III.3.6. Quantificação de Lípidos Totais

A quantificação de lípidos foi realizada procedendo a extração contínua sólido-líquido num sistema Soxhlet, ao longo de 4 horas, utilizando *n*-hexano como solvente. O extrato obtido foi filtrado por gravidade, o solvente evaporado num evaporador rotativo (Büchi, R200), o resíduo seco a 65°C (estufa Memmert, modelo U40) e, posteriormente, quantificado. O ensaio foi efetuado em duplicado.

III.3.7. Quantificação de Sólidos Totais

De modo a determinar os sólidos totais presentes no extrato aquoso dos OsC, foram liofilizados 15 mL (UNIEQUIP, UNICRYO MC-2L-60°), tendo posteriormente sido feita a pesagem do sólido obtido. Este procedimento foi realizado para cada um dos extratos aquosos obtidos.

III.3.8. Quantificação de Cinzas

Para a quantificação do teor de cinzas proveniente da biomassa e dos NPsC, inicialmente secaram-se cadinhos de porcelana em estufa (Wtc Binder, modelo E28), a 105 °C, durante 12 horas. De seguida, os cadinhos foram colocados na mufla (Nabertherm, Controller B 170, modelo L9/11/B170 0401079), a 575 °C, durante 12-24 horas. Quando arrefecidos à temperatura ambiente, num exsiccador, foram tarados e adicionada uma massa conhecida de biomassa e NPsC. Colocaram-se novamente os cadinhos na estufa, a 105 °C, durante 12-24 horas, tendo-se de seguida iniciado a sua ignição à chama. Por fim, os cadinhos foram colocados na mufla, a 575 °C, durante 12-24 horas, sendo posteriormente arrefecidos, num exsiccador, até à temperatura ambiente, quantificando-se o resíduo restante. Todos os ensaios foram efetuados em duplicado.

III.4. SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DOS NPsC

III.4.1. Síntese de Nanopontos de Carbono

A síntese de NPsC a partir dos ouriços da castanha foi efetuada por carbonização hidrotérmica, tendo-se recorrido a duas metodologias de aquecimento distintas: aquecimento num reator de alta-pressão Parr e aquecimento em mufla, num reator de aço inox com vaso de Teflon.

III.4.1.1. Carbonização Hidrotérmica em Reator de Alta-Pressão Parr

No reator de alta-pressão Parr foram colocados *ca.* 3 g de OsC e 100 mL de água ultrapura Millipore®. Procedeu-se à medição do pH da mistura inicial, adicionou-se o aditivo e procedeu-se novamente à medição do pH. O reator foi então cuidadosamente selado, definindo-se as condições reacionais (tempo de residência e temperatura), iniciando-se de seguida a reação de carbonização. Após arrefecimento da mistura reacional, o pH final foi medido.

Nos diferentes ensaios variaram-se o tempo de reação, o rácio mássico aditivo/OsC e o aditivo (etilenodiamina (ED) (> 99.5 %, Fluka) e ureia recristalizada).

As condições experimentais aplicadas em cada ensaio encontram-se descritas na Secção II.3.1.1.

III.4.1.2. Carbonização Hidrotérmica em Mufla

Para o método de carbonização hidrotérmica em mufla, foi utilizado um reator de aço inox com vaso de Teflon, contendo *ca.* 900 mg de OsC e 30 mL de água Millipore®. À semelhança do método em reator de alta-pressão, procedeu-se à medição do pH nos diferentes momentos do processo. O reator foi devidamente selado e colocado na mufla nas condições previamente estabelecidas (tempo de residência e temperatura). Após arrefecimento da m.r., foi medido o pH final.

Nestes ensaios variou-se a quantidade de aditivo (apenas se realizaram ensaios com ED) e o tempo de reação, encontrando-se as condições reacionais descritas na Secção II.3.1.2.

III.4.2. Purificação de Nanopontos de Carbono

III.4.2.1. Isolamento por Filtração em Membrana

As misturas reacionais obtidas quer por aquecimento em reator de alta-pressão, quer por aquecimento em mufla, foram isoladas por filtração, sendo utilizada uma membrana de acetato de celulose regenerada com diâmetro de poro 0.2 µm. O resíduo orgânico retido foi quantificado após secagem na estufa (Wtc Binder, modelo E28) a 105°C, durante 24 horas.

III.4.2.2. Purificação por Extração Líquido-Líquido

Procedeu-se à purificação do filtrado proveniente da etapa anterior, por extração líquido-líquido realizada em duas etapas sucessivas, com recurso a solventes orgânicos (CH_2Cl_2 e AcOEt).

Os filtrados obtidos dos ensaios em maior escala (carbonização em reator de alta-pressão) foram extraídos com CH_2Cl_2 (2x 50 mL, seguidas de AcOEt (2x50 mL). Para os filtrados da síntese em mufla, utilizaram-se 2x15 mL de CH_2Cl_2 e 2x 15 mL de AcOEt.

Com o objetivo de eliminar o solvente orgânico residual, as dispersões aquosas de NPsC foram submetidas a evaporação sob vácuo a 90 °C. O volume final da dispersão de NPsC foi registado, tendo sido estas armazenadas em atmosfera inerte a 4 °C. As fases orgânicas recolhidas durante as extrações foram igualmente evaporadas e os resíduos secos a 105 °C em estufa para posterior quantificação.

Para a determinação do teor de sólidos nas dispersões aquosas de NPsC, foi retirada uma porção conhecida (2 mL - 5 mL), consoante o volume total, a qual foi posteriormente seca a 105 °C na estufa e quantificada.

III.4.2.3. Purificação por Membrana

Como etapa de purificação adicional foi efetuada uma purificação por membranas de acetato de celulose sintetizadas a partir de acetato de celulose, formamida e acetona, em volumes variáveis conforme o tamanho de poro pretendido. Medidos os volumes para um recipiente, este foi colocado a agitar durante ca. 16 horas a uma temperatura de 24.2 °C.

Após a agitação obteve-se uma mistura viscosa que foi espalhada finamente sobre vidro, colocando-se em banho de gelo para formar as membranas, que foram conservadas a 4 °C.

Externamente determinaram-se as características das membranas, sendo que as AC22 apresentaram um *cut-off* de moléculas com peso molecular superior a 10.45 kDa e as AC30 superior a 21.45 kDa. As suas permeabilidades hidráulicas foram 2.7 e 39.6 $\text{kg/m}^2\cdot\text{h}\cdot\text{bar}$, resultando num tamanho médio de poro de 17.4 e 80.6 nm, respetivamente.

Para a compactação das membranas, foram realizados 3 ciclos numa célula de permeação (amicon® 8050, pressão máxima de 75 psi), a uma pressão de 1.2 bar (20 % superior à pressão de trabalho).

III.5. DESIGN EXPERIMENTAL

Como descrito anteriormente, um dos objetivos delineados foi determinar quais as melhores condições de síntese dos NP_sC *via* CHAC, em reator Parr. Para tal, efetuou-se um estudo para três parâmetros operacionais, nomeadamente a natureza do aditivo utilizado (ED ou ureia), o rácio mássico aditivo/OsC (0.08 ou 0.16) e o tempo de residência (4 ou 6 h). O seu planeamento experimental consistiu num design factorial de 2³ com 8 ensaios em duplicado. Os níveis, positivo (+) e negativo (-), foram determinados com base em ensaios preliminares descritos anteriormente na secção III.4.1.1. A temperatura foi mantida constante nos diversos ensaios (250 °C).

As respostas em estudo foram o teor de sólidos, o rendimento quântico de fluorescência (Φ_F), a atividade antioxidante e a atividade anti-inflamatória (AAI).

A matriz correspondente ao *design* experimental encontra-se apresentada na Tabela III.1.

Tabela III.1. Matriz de ensaios do *Design* Experimental.

Ensaio	Fatores		
	A - Tipo de Aditivo	B – Tempo de Residência (h)	C – Rácio Mássico aditivo/OsC
NP _s C_02	ED (+)	6 (+)	0,16 (+)
NP _s C_02'			
NP _s C_04	ED (+)	6 (+)	0,08 (-)
NP _s C_04'			
NP _s C_09	ED (+)	4 (-)	0,16 (+)
NP _s C_09'			
NP _s C_07	ED (+)	4 (-)	0,08 (-)
NP _s C_07'			
NP _s C_03	Urea (-)	6 (+)	0,16 (+)
NP _s C_03'			
NP _s C_06	Urea (-)	6 (+)	0,08 (-)
NP _s C_06'			
NP _s C_12	Urea (-)	4 (-)	0,16 (+)
NP _s C_12'			
NP _s C_11	Urea (-)	4 (-)	0,08 (-)
NP _s C_11'			

Todos os NP_sC foram sintetizados a 250 °C, em reator Parr.

A equação do modelo fatorial segue a forma da equação (III.2),¹⁸⁰ apresentada abaixo, onde o y corresponde às respostas previstas para cada modelo (teor de sólidos (mg/mL), rendimento quântico de fluorescência, atividade antioxidante (%) e atividade anti-inflamatória (%)), β_0 é a média total das respostas, β os coeficientes de regressão e X as variáveis em estudo (natureza do aditivo, tempo de residência (h) e rácio mássico aditivo/OsC).

$$y = \beta_0 + \beta_A X_A + \beta_B X_B + \beta_C X_C + \beta_{AB} X_A X_B + \beta_{AC} X_A X_C + \beta_{BC} X_B X_C + \beta_{ABC} X_A X_B X_C \quad (\text{III.2})$$

A análise estatística dos modelos foi efetuada através da metodologia de resposta de superfície (RSM), por análise de variância (ANOVA) múltipla, com um nível de confiança de 95 %, utilizando-se para tal a versão do software Design Expert 13.0.1.0. Determinaram-se as condições ótimas de síntese e de que modo os diferentes parâmetros reacionais influenciam algumas das suas propriedades, nomeadamente o teor de sólidos, o Φ_F , a atividade antioxidante e a atividade anti-inflamatória dos NPsC sintetizados.

III.6. AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DOS NPsC

III.6.1. Avaliação da Atividade Antioxidante

As propriedades antioxidantes dos NPsC foram avaliadas através do método do radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico); 98 %, Sigma-Aldrich). Na presença de compostos com atividade antioxidante, ocorre redução da espécie radicalar catiónica $\text{ABTS}^{\bullet+}$, resultando numa alteração da coloração da solução, de azul-esverdeado para incolor, proporcional à concentração de antioxidante presente. O método utilizado foi o descrito por Re *et al.*¹²⁰

A solução de radical ABTS foi preparada numa concentração de 7 mM, em persulfato de potássio (2.5 mM, em água ultrapura), mantida ao abrigo da luz durante ca. 18 horas. Após este período, a solução foi diluída em PBS pH 7.4 e ajustada à unidade de absorvância a 620 nm. Para cada ensaio foram pipetados 290 μL desta solução para uma microplaca de 96 poços (NUNC), aos quais foram adicionados 10 μL da solução aquosa de NPsC com concentração de 1 mg/mL. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

Como controlo negativo, utilizou-se água ultrapura e, como controlos positivos, foram utilizadas soluções de 1mg/mL de ácido ascórbico (99.7 %, Merck), ácido gálico (Sigma-

Aldrich), BHT (2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol, Scharlau) e trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico; 98 %, Sigma Aldrich).

A curva de calibração foi efetuada com soluções padrão de trolox, em triplicado, numa gama de concentrações entre 0 e 0.6 mg/mL, com o objetivo de determinar a atividade antioxidante dos NPsC, expressa em equivalentes de trolox (ET) por mg de NPsC.

III.6.2. Avaliação da Atividade Antibacteriana

Para a avaliação da atividade antibacteriana foi utilizada a técnica da suscetibilidade à difusão em disco, adaptada do método de Kirby-Bauer.¹⁸¹

Começou por se preparar o pré-inoculo em meio MHB (Mueller-Hinton Broth; BioLife), das bactérias a testar *Escherichia coli* ATCC® 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, sendo a turbidez ajustada ao padrão 0.5 de McFarland (1.5x10⁸ CFU/mL; Liofilchem), após incubação *overnight*, a 37 °C e 180 rpm. Os procedimentos de inoculação das espécies bacterianas obedeceram às normas do M100 do CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*).¹⁸²

Posteriormente foi efetuada a inoculação das suspensões celulares em placas de petri com meio sólido MHA (*Mueller-Hinton Agar*), preparado a partir de MHB com 1.7 % de agar (Labkem). Adicionaram-se os discos de 9 mm de diâmetro, previamente esterilizados, impregnados com 50 µL de solução de NPsC (20 mg/mL e 10 mg/mL), sendo o controlo positivo uma solução 0.2 mg/mL de gentamicina e o controlo negativo água ultrapura estéril.

Após ca. 18 horas de incubação a 37 °C, mediram-se os diâmetros de inibição de crescimento microbiano correspondentes.

III.6.3. Avaliação da Atividade Anti-inflamatória

A avaliação da atividade anti-inflamatória dos NPsC teve por base o método da inibição da desnaturação da albumina, adaptado do descrito por Alamgeer *et al.*¹⁸³.

A 0.2 mL de uma solução de albumina de ovo a 1% (m/V), foram adicionados 0.6 mL de PBS (pH = 6.4) e 0.2 mL de solução aquosa de NPsC, a 1 mg/mL. As misturas reacionais foram incubadas num banho termoestático (GFL, modelo 1002), a 37 °C, durante 20 min, sendo posteriormente submetidas a um novo período de incubação de 10 min, a 70 °C. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, foram registadas as

absorvâncias a 660 nm (espectrofotômetro UV-Vis, UV-3100PC VWR). Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

Utilizou-se como controlo negativo água ultrapura Millipore® e como controlo positivo, soluções do anti-inflamatório corticosteroide prednisolona (Angelini) em diferentes concentrações (50, 100 e 500 µg/mL).

Dado que as amostras em estudo apresentavam coloração foi também registada a absorvância do branco para o controlo positivo e para as amostras. A atividade anti-inflamatória foi determinada através da percentagem de inibição da desnaturação da proteína, tendo sido calculada através da Equação III.3.¹⁸³.

$$\% \text{ Inibição} = \frac{Abs_{\text{controlo negativo}} - (Abs_{\text{amostra}} - Abs_{\text{branco amostra}})}{Abs_{\text{controlo negativo}}} \times 100 \quad (\text{III.3})$$

III.6.4. Avaliação da Citotoxicidade

III.6.4.1. *In vitro*

Para a avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos NPsC recorreu-se a uma adaptação do método colorimétrico MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]), o qual permite quantificar o metabolismo celular, estando este associado à viabilidade celular.¹⁸⁴ Este método baseia-se na capacidade das células viáveis, através do seu metabolismo, reduzirem o reagente de coloração amarela MTT a formazona, um composto de coloração violeta.

As linhas celulares animais tumorais testadas foram as células humanas de carcinoma do colo do útero (HeLa ATCC® CCL-2) e as células de sarcoma de murganho (S180 ATCC® TIB-66). Como modelos de linhas animais celulares normais foram utilizadas as células epiteliais renais de macaco verde africano (VERO ATCC® CCL-81) e fibroblastos embrionários de camundongo (NIH-3T3 ATCC® CRL-1658).

As linhas celulares encontravam-se inicialmente criopreservadas a -80 °C, em soro fetal bovino (FBS; *Fetal Bovine Serum*; GIBCO®, Thermo Fisher Scientific) suplementado com 8-10 % de DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*, MARCA). Para o seu desenvolvimento, após descongelamento foi adicionado meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Biowest), seguido de incubação a 37 °C (Heraeus, modelo HERA Cell 240) sob atmosfera humidificada de 5 % CO₂, até à formação de aglomerados de células.

Após o estabelecimento da cultura de células, iniciou-se o processo de expansão celular. No caso da linha celular S180, a suspensão das células foi realizada com

raspagem mecânica, enquanto para as linhas HeLa, VERO e NIH-3T3 foi utilizada tripsina para o destacamento celular. As células em suspensão foram divididas em frascos adicionais DMEM suplementado com Soro Newborn, Serumplus® e glutamina.

Quando se obteve uma maior concentração celular iniciaram-se os ensaios, tendo sido adicionados a uma placa de 96 poço (Orange Scientific) 150 µL de suspensão celular (1×10^5 células/poço) em DMEM suplementado com 10 % (v/v) FBS, com incubação durante 24 horas a 37 °C sob atmosfera humidificada de 5 % de CO₂. Após o tempo de incubação e de se verificar que o fundo de cada poço se encontrava coberto por células, adicionaram-se 150 µL de solução de NPsC previamente esterilizados por filtração (concentração variada, por diluição seriada) a cada poço, tendo-se incubado novamente durante ca. 18 horas. Os ensaios foram efetuados em quadruplicado, tendo sido utilizado como controlo negativo água ultrapura estéril e como controlo positivo TEMED.

Decorridas as 18 horas, descartou-se o sobrenadante e lavaram-se os poços com PBS, adicionando-se a cada poço 100 µL de uma solução de MTT 0.5 mg/mL em PBS e incubando-se novamente durante ca. 3 horas a 37 °C sob atmosfera humidificada de 5 % CO₂. Após este período, o sobrenadante foi novamente removido e adicionaram-se 100 µL/poço de uma solução 0.1 M de Tween® 20 (Bio-Rad) em isopropanol, para solubilização dos cristais de formazona. Por fim, a absorvância foi lida a 570 nm, com referência a 650 nm, num leitor de microplacas (TECAN Infinite M200 PRO).

III.6.4.2. *In vivo*

A citotoxicidade *in vivo* foi avaliada utilizando o microcrustáceo *Artemia Salina*, cujos ovos apresentam baixo custo e elevada taxa de eclosão, sendo o método utilizado adaptado do descrito por Lima *et al.*^{185,186} Os ovos (JBL, Artemio Pur) foram colocados num recipiente apropriado para a sua eclosão, contendo uma solução salina previamente preparada, composta por 23 g de NaCl, 11 g de MgCl₂.6H₂O, 4 g de Na₂SO₄, 1.3 g de CaCl₂.2H₂O e 0.7 g de KCl, em 1 L de água ultrapura. Após um período de incubação de 48 horas à temperatura ambiente, sob luz constante, foi possível observar-se a eclosão dos microcrustáceos, que puderam então ser utilizados nos ensaios de toxicidade.

Numa microplaca de 96 poços estéril (Orange Scientific), foram adicionados 150 µL da solução salina contendo *A. Salina*, estimando-se a presença de 8 náuplios por poço. Antes da adição das soluções aquosas de NPsC, procedeu-se à contagem dos organismos mortos (o.m.) por observação num microscópio ótico invertido (OLYMPUS CK2), com o objetivo de determinar o número de organismos mortos previamente ao

ensaio. De seguida, adicionaram-se 150 µL das soluções de NPsC, preparadas por diluições em cascata, a cada poço. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. A microplaca foi tapada e incubada à temperatura ambiente durante um período de 24-48 horas.

Após o período de incubação, foi novamente efetuada a contagem dos organismos mortos, recorrendo ao microscópio. Posteriormente, adicionaram-se 1-2 gotas de lixívia em cada poço, com o objetivo de induzir a morte total dos organismos, permitindo assim a contagem final do número total de *A. salina* presentes em cada poço. A percentagem de morte foi representada em função da concentração de NPsC, sendo esta determinada de acordo com a equação seguinte:

$$\% \text{ Morte} = \frac{(N^{\circ} \text{ o.m. após incubação} - N^{\circ} \text{ o.m. inicial})}{(N^{\circ} \text{ total de organismos} - N^{\circ} \text{ o.m. inicial})} \times 100 \quad (\text{III.4})$$

III.6.5. Marcação Celular por Fluorescência

Para a aquisição das fotografias por microscopia de fluorescência (OLYMPUS, BX51) foi utilizado o organismo modelo escolhido anteriormente, com o intuito de se observar a internalização dos NPsC pelo mesmo. Os microcrustáceos foram incubados com a dispersão aquosa de NPsC, a uma concentração de 1 mg/mL, numa microplaca de 24 poços estéril (Orange Scientific) durante ca. 3 horas. De seguida, depositou-se uma gota de solução com as *A. salina* e os NPsC sobre uma lâmina e colocou-se uma lamela, tendo esta repousado durante ca. 15 minutos no escuro, antes da aquisição das fotografias.

Tendo em conta os resultados de citotoxicidade previamente observados para as células HeLa, considerou-se pertinente avaliar de que forma internalizariam os NPsC sintetizados nestas linhas celulares. Para o efeito, depositaram-se lamelas redondas, previamente esterilizadas, nos poços de uma microplaca de 24 poços estéril (Orange Scientific), adicionando-se 500 µL de gelatina em PBS 0.15 % (m/v). Decorridos ca. 10 minutos, removeu-se o volume em excesso e lavaram-se todos os poços com DMEM suplementado com 10 % (v/v) FBS. Adicionou-se 1 mL de células em suspensão, de modo a cobrir o fundo poço, procedendo-se a nova incubação, durante ca. 24 horas, sob atmosfera humidificada de 5 % CO₂.

Decorrido o tempo de incubação, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se a cada poço 900 µL de DMEM suplementado com 10 % (v/v) FBS e 100 µL de solução aquosa de NPsC, perfazendo uma concentração de 1 mg/mL. Seguiu-se a incubação da linha celular com os NPsC durante ca. 18 horas, sob atmosfera humidificada de 5 % CO₂.

Os poços foram lavados com DMEM, após o tempo de incubação, sendo as lamelas colocadas sobre uma lâmina hidratada com duas gotas de sobrenadante.

No entanto, por motivos logísticos, não foi possível adquirir as imagens por microscopia de fluorescência, o que impediu a observação do modo como ocorre a internalização nas células dos NPsC sintetizados.

IV. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

No presente trabalho obtiveram-se com êxito nanopontos de carbono (NPsC) por carbonização hidrotérmica assistida por aquecimento convencional (CHAC) em reator de alta-pressão e em mufla, utilizando-se como percursores ouriços da castanha (OsC). O processo de carbonização apresenta um carácter sustentável, possibilitando o aproveitamento de resíduos agrícolas, favorecendo a implementação de uma economia circular.

Foram exploradas diferentes condições de síntese e avaliou-se de que modo as mesmas influenciaram algumas das propriedades dos NPsC. Através de um *design* experimental foram estabelecidas as condições de síntese que influenciaram quatro propriedades específicas, nomeadamente o teor de sólidos, o rendimento quântico de fluorescência, a atividade antioxidante e a anti-inflamatória, obtendo-se gráficos de superfície que permitiram a previsão dessas propriedades. Nas propriedades fotofísicas destacam-se rendimentos quânticos de fluorescência muito relevantes, sobretudo quando utilizada etilenodiamina (ED) como aditivo, atingindo *ca.* 25 %. Avaliada a sua morfologia por AFM, verificou-se que os NPsC sintetizados ocorrem como partículas individuais, *quasi*-esféricas, não havendo evidência de fenómenos de agregação.

Foram também exploradas as propriedades biológicas, as quais se revelaram muito promissoras, nomeadamente a atividade antioxidante e a atividade anti-inflamatória, atingindo valores bastante elevados. A citotoxicidade *in vivo* tem também bastante relevância, uma vez que às concentrações testadas não foi detetada citotoxicidade para células não tumorais, verificando-se, no entanto, citotoxicidade para a linha celular tumoral humana (HeLa), a baixas concentrações. A visualização do microcrustáceo *A. salina* através da microscopia de fluorescência possibilitou inferir-se da potencial aplicação dos NPsC na área de imagem médica.

Relativamente às condições de síntese, será relevante explorar outras condições que possam influenciar as propriedades dos nanomateriais de carbono, nomeadamente testar alterações de temperatura, tipo de aditivo e arejamento. Perspetivando a grande diversidade de aplicações para os NPsC, será pertinente também explorar outras propriedades, nomeadamente a entrega de fármacos, a marcação celular, bem como a atividade antibacteriana, recorrendo a outras espécies bacterianas e fungos patogénicos.

Tendo em conta as dificuldades observadas na obtenção de resultados de citotoxicidade *in vivo* com a *A. salina*, seria também importante a realização de novos ensaios, mantendo-se ou alterando-se o organismo modelo. Quanto à avaliação da citotoxicidade, uma vez que os NPsC apresentaram toxicidade contra células HeLa a baixas concentrações, seria importante realizar a microscopia de fluorescência de modo a observar como os NPsC são internalizados no interior das células.

V. BIBLIOGRAFIA

- (1) Mellano, M. G.; Beccaro, G. L.; Donno, D.; Marinoni, D. T.; Boccacci, P.; Canterino, S.; Cerutti, A. K.; Bounous, G. Castanea Spp. Biodiversity Conservation: Collection and Characterization of the Genetic Diversity of an Endangered Species. *Genet. Resour. Crop Evol.* **2012**, *59* (8), 1727–1741. <https://doi.org/10.1007/s10722-012-9794-x>.
- (2) Borges, O.; Gonçalves, B.; De Carvalho, J. L. S.; Correia, P.; Silva, A. P. Nutritional Quality of Chestnut (*Castanea Sativa* Mill.) Cultivars from Portugal. *Food Chem.* **2008**, *106* (3), 976–984. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.011>.
- (3) Braga, M.; Araújo, S. D. S.; Sales, H.; Pontes, R.; Nunes, J. Portuguese Castanea Sativa Genetic Resources: Characterization, Productive Challenges and Breeding Efforts. *Agriculture* **2023**, *13* (8), 1629. <https://doi.org/10.3390/agriculture13081629>.
- (4) Guineacut;, R. P. F.; Costa, C.; Florencedil;a, S. G.; Correia, P. M. R. A Review of the Use of Chestnut in Traditional and Innovative Food Products. *J. Nuts* **2022**, No. Online First. <https://doi.org/10.22034/jon.2022.1953486.1155>.
- (5) Rodrigues, M. Â.; Barreira, J. C. M.; Ferreira, I. C. F. R.; Bento, A. Estimativa quantificada dos subprodutos do castanheiro e algumas utilizações potenciais. *Rev. Ciênc. Agrár.* **2021**, *Vol. 43 N.º nsp2*, 57-63 Páginas. <https://doi.org/10.19084/RCA.19711>.
- (6) Tatipamula, V. B.; Kukavica, B. Phenolic Compounds as Antidiabetic, Anti-Inflammatory, and Anticancer Agents and Improvement of Their Bioavailability by Liposomes. *Cell Biochem. Funct.* **2021**, *39* (8), 926–944. <https://doi.org/10.1002/cbf.3667>.
- (7) Vázquez, G.; Fernández-Agulló, A.; Gómez-Castro, C.; Freire, M. S.; Antorrena, G.; González-Álvarez, J. Response Surface Optimization of Antioxidants Extraction from Chestnut (*Castanea Sativa*) Bur. *Ind. Crops Prod.* **2012**, *35* (1), 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.022>.
- (8) Trezza, A.; Barletta, R.; Geminiani, M.; Frusciant, L.; Olmastroni, T.; Sannio, F.; Docquier, J.-D.; Santucci, A. Chestnut Burrs as Natural Source of Antimicrobial Bioactive Compounds: A Valorization of Agri-Food Waste. *Appl. Sci.* **2024**, *14* (15), 6552. <https://doi.org/10.3390/app14156552>.
- (9) Pinto, D.; Rodrigues, F.; Braga, N.; Santos, J.; Pimentel, F. B.; Palmeira-de-Oliveira, A.; Oliveira, M. B. P. P. The Castanea Sativa Bur as a New Potential

- Ingredient for Nutraceutical and Cosmetic Outcomes: Preliminary Studies. *Food Funct.* **2017**, 8 (1), 201–208. <https://doi.org/10.1039/C6FO01469K>.
- (10) Laranjo, J. G.; Pires, A.; Pinto, J. Â.; Marques, D.; Martins, A.; Carneiro, R. *Valorização da castanha e otimização da sua produção*, 1^a.; RefCast – Associação Portuguesa da Castanha: Vila Real, 2022.
- (11) Donis-González, I. R. Management of Microbial Decay of Fresh and Peeled Chestnuts in Michigan. **2015**.
- (12) Rodrigues, F.; Santos, J.; Pimentel, F. B.; Braga, N.; Palmeira-de-Oliveira, A.; Oliveira, M. B. P. P. Promising New Applications of *Castanea Sativa* Shell: Nutritional Composition, Antioxidant Activity, Amino Acids and Vitamin E Profile. *Food Funct.* **2015**, 6 (8), 2854–2860. <https://doi.org/10.1039/C5FO00571J>.
- (13) Pinto, D.; Braga, N.; Rodrigues, F.; Oliveira, M. *Castanea Sativa* Bur: An Undervalued By-Product but a Promising Cosmetic Ingredient. *Cosmetics* **2017**, 4 (4), 50. <https://doi.org/10.3390/cosmetics4040050>.
- (14) De Vasconcelos, M. D. C. B. M.; Bennett, R. N.; Quideau, S.; Jacquet, R.; Rosa, E. A. S.; Ferreira-Cardoso, J. V. Evaluating the Potential of Chestnut (*Castanea Sativa* Mill.) Fruit Pericarp and Integument as a Source of Tocopherols, Pigments and Polyphenols. *Ind. Crops Prod.* **2010**, 31 (2), 301–311. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.11.008>.
- (15) Venkata Mohan, S.; Varjani, S.; Pant, D.; Sauer, M.; Chang, J.-S. Circular Bioeconomy Approaches for Sustainability. *Bioresour. Technol.* **2020**, 318, 124084. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124084>.
- (16) Magagula, L. P.; Masemola, C. M.; Ballim, M. A.; Tetana, Z. N.; Moloto, N.; Liganiso, E. C. Lignocellulosic Biomass Waste-Derived Cellulose Nanocrystals and Carbon Nanomaterials: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23 (8), 4310. <https://doi.org/10.3390/ijms23084310>.
- (17) Okolie, J. A.; Nanda, S.; Dalai, A. K.; Kozinski, J. A. Chemistry and Specialty Industrial Applications of Lignocellulosic Biomass. *Waste Biomass Valorization* **2021**, 12 (5), 2145–2169. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01123-0>.
- (18) Basile, A.; Sorbo, S.; Ricciardi, L.; Ferrara, S.; Montesano, D.; Castaldo Cobianchi, R.; Vuotto, M. L.; Ferrara, L. Antibacterial and Allelopathic Activity of Extract from *Castanea Sativa* Leaves. In *Fitoterapia*; 2000; Vol. 71, pp S110–S116.
- (19) Almeida, I. F.; Costa, P. C.; Bahia, M. F. Evaluation of Functional Stability and Batch-to-Batch Reproducibility of a *Castanea Sativa* Leaf Extract with Antioxidant Activity. *AAPS PharmSciTech* **2010**, 11 (1), 120–125. <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9360-9>.

-
- (20) Vázquez, G.; Calvo, M.; Freire, M. S.; González-Alvarez, J.; Antorrena, G. Chestnut Shell as Heavy Metal Adsorbent: Optimization Study of Lead, Copper and Zinc Cations Removal. *Volume 172*. Journal of Hazardous Materials. December 30, 2009, pp 1402–1414.
- (21) Vázquez, G.; González-Alvarez, J.; Santos, J.; Freire, M. S.; Antorrena, G. Evaluation of Potential Applications for Chestnut (*Castanea Sativa*) Shell and Eucalyptus (*Eucalyptus Globulus*) Bark Extracts. **2009**, *29*, 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.07.004>.
- (22) Schiavone, M. L.; Barletta, R.; Trezza, A.; Geminiani, M.; Millucci, L.; Figura, N.; Santucci, A. Green Chemistry Within the Circular Bioeconomy to Harness Chestnut Burr Extract's Synergistic Antimicrobial Activity Against *Helicobacter Pylori*. *Molecules* **2025**, *30* (2), 324. <https://doi.org/10.3390/molecules30020324>.
- (23) Martins, R. B.; Jorge, N.; Lucas, M. S.; Raymundo, A.; Barros, A. I. R. N. A.; Peres, J. A. Food By-Product Valorization by Using Plant-Based Coagulants Combined with AOPs for Agro-Industrial Wastewater Treatment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19* (7), 4134. <https://doi.org/10.3390/ijerph19074134>.
- (24) Costa-Trigo, I.; Paz, A.; Otero-Penedo, P.; Outeiriño, D.; Pérez Guerra, N.; Domínguez, J. M. Enhancing the Saccharification of Pretreated Chestnut Burrs to Produce Bacteriocins. *J. Biotechnol.* **2021**, *329*, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.01.010>.
- (25) Sasidharan, S.; Chen, Y.; Saravanan, D.; Sundram, K.; Latha, L. Extraction, Isolation And Characterization Of Bioactive Compounds From Plants' Extracts. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2010**, *8* (1). <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v8i1.60483>.
- (26) Zaky, A. A.; Witrowa-Rajchert, D.; Nowacka, M. Revolution of Bioactive Compound Extraction: Impacts on Food Safety, Health, and Sustainability. *Food Saf. Health* **2025**, *3* (3), 315–333. <https://doi.org/10.1002/fsh3.70012>.
- (27) Serna-Loaiza, S.; Adamcyk, J.; Beisl, S.; Kornpointner, C.; Halbwirth, H.; Friedl, A. Pressurized Liquid Extraction of Cannabinoids from Hemp Processing Residues: Evaluation of the Influencing Variables. *Processes* **2020**, *8* (11), 1334. <https://doi.org/10.3390/pr8111334>.
- (28) Qin, L.; Fu, Y.; Yang, F.; Chang, Z.; Zou, C.; Gao, H.; Jiang, D.; Jia, C. Effects of Polysaccharides Autoclave Extracted from *Flammulina Velutipes* Mycelium on Freeze-Thaw Stability of Surimi Gels. *LWT* **2022**, *169*, 113941. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113941>.
- (29) da Silva, L. C.; Souza, M. C.; Sumere, B. R.; Silva, L. G. S.; da Cunha, D. T.; Barbero, G. F.; Bezerra, R. M. N.; Rostagno, M. A. Simultaneous Extraction and

- Separation of Bioactive Compounds from Apple Pomace Using Pressurized Liquids Coupled On-Line with Solid-Phase Extraction. *Food Chem.* **2020**, *318*, 126450. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126450>.
- (30) Gomes, J.; Batra, J.; Chopda, V. R.; Kathiresan, P.; Rathore, A. S. Chapter 25 - Monitoring and Control of Bioethanol Production From Lignocellulosic Biomass. In *Waste Biorefinery*; Bhaskar, T., Pandey, A., Mohan, S. V., Lee, D.-J., Khanal, S. K., Eds.; Elsevier, 2018; pp 727–749. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63992-9.00025-2>.
- (31) Crizel, R. L.; Zandoná, G. P.; Rossi, R. C.; Ferreira, C. D.; Hoffmann, J. F. 4.22 - Solid-Phase Extraction for Determination of Phenolic Compounds in Food and Beverage. In *Comprehensive Sampling and Sample Preparation (Second Edition)*; Soylak, M., Ed.; Academic Press: Oxford, 2025; pp 707–721. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15978-7.00001-1>.
- (32) Folin, O.; Ciocalteu, V. Tyrosine and Tryptophane in Proteins. *J. Biol. Chem.* **1927**, *73* (2), 627–648.
- (33) Pérez, M.; Dominguez-López, I.; Lamuela-Raventós, R. M. The Chemistry Behind the Folin–Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)Phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. *J. Agric. Food Chem.* **2023**, *71* (46), 17543–17553. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04022>.
- (34) DuBois, Michel.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, Fred. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* **1956**, *28* (3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
- (35) Masuko, T.; Minami, A.; Iwasaki, N.; Majima, T.; Nishimura, S.-I.; Lee, Y. C. Carbohydrate Analysis by a Phenol–Sulfuric Acid Method in Microplate Format. *Anal. Biochem.* **2005**, *339* (1), 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001>.
- (36) Bobade, H.; Gupta, A.; Sharma, S. Chapter 20 - Beta-Glucan. In *Nutraceuticals and Health Care*; Kour, J., Nayik, G. A., Eds.; Academic Press, 2022; pp 343–358. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89779-2.00013-2>.
- (37) Semedo, M. C.; Karmali, A.; Fonseca, L. A High Throughput Colorimetric Assay of β -1,3-d-Glucans by Congo Red Dye. *J. Microbiol. Methods* **2015**, *109*, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.12.020>.
- (38) Muthukumar, J.; Chidambaram, R.; Sukumaran, S. Sulfated Polysaccharides and Its Commercial Applications in Food Industries—A Review. *J. Food Sci. Technol.* **2021**, *58* (7), 2453–2466. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04837-0>.
- (39) Hahn, T.; Schulz, M.; Stadtmüller, R.; Zayed, A.; Muffler, K.; Lang, S.; Ulber, R. A Cationic Dye for the Specific Determination of Sulfated Polysaccharides. *Anal. Lett.* **2016**, *49*, 1948–1962. <https://doi.org/10.1080/00032719.2015.1126839>.

- (40) Gębczyńska, S.; Gdowska, J.; Mikos, A.; Gawrońska, I.; Janas, T.; Czogalla, A.; Janas, T. Toluidine Blue for the Determination of Binding of Anionic Polysaccharides to Lipid Raft Domains by Absorption Spectroscopy.
- (41) 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* (1), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- (42) Joshi, K.; Kumar, P.; Kataria, R. Microbial Carotenoid Production and Their Potential Applications as Antioxidants: A Current Update. *Process Biochem.* **2023**, *128*, 190–205. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.02.020>.
- (43) Arun, K. B.; Madhavan, A.; Anoopkumar, A. N.; Surendhar, A.; Liz Kuriakose, L.; Tiwari, A.; Sirohi, R.; Kuddus, M.; Rebello, S.; Kumar Awasthi, M.; Varjani, S.; Reshmy, R.; Mathachan Aneesh, E.; Binod, P.; Sindhu, R. Integrated Biorefinery Development for Pomegranate Peel: Prospects for the Production of Fuel, Chemicals and Bioactive Molecules. *Bioresour. Technol.* **2022**, *362*, 127833. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127833>.
- (44) Khaw, K.-Y.; Parat, M.-O.; Shaw, P. N.; Falconer, J. R. Solvent Supercritical Fluid Technologies to Extract Bioactive Compounds from Natural Sources: A Review. *Molecules* **2017**, *22* (7), 1186. <https://doi.org/10.3390/molecules22071186>.
- (45) da Silva, C. M.; Zanqui, A. B.; Gohara, A. K.; de Souza, A. H. P.; Cardozo-Filho, L.; Visentainer, J. V.; Rovigatti Chiavelli, L. U.; Bittencourt, P. R. S.; da Silva, E. A.; Matsushita, M. Compressed N-Propane Extraction of Lipids and Bioactive Compounds from Perilla (*Perilla Frutescens*). *J. Supercrit. Fluids* **2015**, *102*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.03.016>.
- (46) Dong, Z.; Qi, J.; Yue, L.; Zhou, H.; Chen, L.; Gu, J.; He, Y.; Wu, H. Biomass-Based Carbon Quantum Dots and Their Agricultural Applications. *Plant Stress* **2024**, *11*, 100411. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100411>.
- (47) Zhang, D.; Sun, J.; Lee, L.; Castro, J. Overview of Ultrasonic Assisted Manufacturing Multifunctional Carbon Nanotube Nanopaper Based Polymer Nanocomposites. *Eng. Sci.* **2020**. <https://doi.org/10.30919/es5e1002>.
- (48) Lin, H.-S.; Matsuo, Y. Functionalization of [60]Fullerene through Fullerene Cation Intermediates. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (80), 11244–11259. <https://doi.org/10.1039/C8CC05965A>.
- (49) Clancy, A. J.; Bayazit, M. K.; Hodge, S. A.; Skipper, N. T.; Howard, C. A.; Shaffer, M. S. P. Charged Carbon Nanomaterials: Redox Chemistries of Fullerenes, Carbon Nanotubes, and Graphenes. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (16), 7363–7408. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00128>.

- (50) Zhu, L.; Shen, D.; Wu, C.; Gu, S. State-of-the-Art on the Preparation, Modification, and Application of Biomass-Derived Carbon Quantum Dots. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2020**, *59* (51), 22017–22039. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.0c04760>.
- (51) 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. <https://doi.org/10.1021/ja040082h>.
- (52) 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. <https://doi.org/10.1021/ja062677d>.
- (53) Demchenko, A. P.; Dekaliuk, M. O. Novel Fluorescent Carbonic Nanomaterials for Sensing and Imaging. *Methods Appl. Fluoresc.* **2013**, *1* (4), 042001. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/1/4/042001>.
- (54) Manzoor, S.; Dar, A. H.; Dash, K. K.; Pandey, V. K.; Srivastava, S.; Bashir, I.; Khan, S. A. Carbon Dots Applications for Development of Sustainable Technologies for Food Safety: A Comprehensive Review. *Appl. Food Res.* **2023**, *3* (1), 100263. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100263>.
- (55) Ozyurt, D.; Kobaisi, M. A.; Hocking, R. K.; Fox, B. Properties, Synthesis, and Applications of Carbon Dots: A Review. *Carbon Trends* **2023**, *12*, 100276. <https://doi.org/10.1016/j.cartre.2023.100276>.
- (56) Khairol Anuar, N. K.; Tan, H. L.; Lim, Y. P.; So'aib, M. S.; Abu Bakar, N. F. A Review on Multifunctional Carbon-Dots Synthesized From Biomass Waste: Design/ Fabrication, Characterization and Applications. *Front. Energy Res.* **2021**, *9*, 626549. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2021.626549>.
- (57) Xiao, J.; Liu, P.; Wang, C. X.; Yang, G. W. External Field-Assisted Laser Ablation in Liquid: An Efficient Strategy for Nanocrystal Synthesis and Nanostructure Assembly. *Prog. Mater. Sci.* **2017**, *87*, 140–220. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2017.02.004>.
- (58) Gayen, B.; Palchoudhury, S.; Chowdhury, J. Carbon Dots: A Mystic Star in the World of Nanoscience. *J. Nanomater.* **2019**, *2019*, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2019/3451307>.
- (59) Hu, S.; Wei, Z.; Chang, Q.; Trinchì, A.; Yang, J. A Facile and Green Method towards Coal-Based Fluorescent Carbon Dots with Photocatalytic Activity. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *378*, 402–407. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.04.038>.

- (60) Li, H.; He, X.; Kang, Z.; Huang, H.; Liu, Y.; Liu, J.; Lian, S.; Tsang, C. H. A.; Yang, X.; Lee, S.-T. Water-Soluble Fluorescent Carbon Quantum Dots and Photocatalyst Design. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (26), 4430–4434. <https://doi.org/10.1002/anie.200906154>.
- (61) González, C. M. O.; Morales, E. M. C.; Tellez, A. de M. N.; Quezada, T. E. S.; Kharissova, O. V.; Méndez-Rojas, M. A. Chapter 18 - CO₂ Capture by MOFs. In *Handbook of Greener Synthesis of Nanomaterials and Compounds*; Kharisov, B., Kharissova, O., Eds.; Elsevier, 2021; pp 407–448. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822446-5.00018-6>.
- (62) Tian, R.; Zhong, S.; Wu, J.; Jiang, W.; Shen, Y.; Jiang, W.; Wang, T. Solvothermal Method to Prepare Graphene Quantum Dots by Hydrogen Peroxide. *Opt. Mater.* **2016**, *60*, 204–208. <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2016.07.032>.
- (63) Zhu, Y.; Wang, G.; Jiang, H.; Chen, L.; Zhang, X. One-Step Ultrasonic Synthesis of Graphene Quantum Dots with High Quantum Yield and Their Application in Sensing Alkaline Phosphatase. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (5), 948–951. <https://doi.org/10.1039/c4cc07449a>.
- (64) Feng, J.; Wang, W.-J.; Hai, X.; Yu, Y.-L.; Wang, J.-H. Green Preparation of Nitrogen-Doped Carbon Dots Derived from Silkworm Chrysalis for Cell Imaging. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4* (3), 387–393. <https://doi.org/10.1039/C5TB01999K>.
- (65) Wang, Q.; Liu, X.; Zhang, L.; Lv, Y. Microwave-Assisted Synthesis of Carbon Nanodots through an Eggshell Membrane and Their Fluorescent Application. *Analyst* **2012**, *137* (22), 5392–5397. <https://doi.org/10.1039/C2AN36059D>.
- (66) Yao, Y.-Y.; Gedda, G.; Girma, W. M.; Yen, C.-L.; Ling, Y.-C.; Chang, J.-Y. Magnetofluorescent Carbon Dots Derived from Crab Shell for Targeted Dual-Modality Bioimaging and Drug Delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (16), 13887–13899. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b01599>.
- (67) Bankoti, K.; Rameshbabu, A. P.; Datta, S.; Das, B.; Mitra, A.; Dhara, S. Onion Derived Carbon Nanodots for Live Cell Imaging and Accelerated Skin Wound Healing. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5* (32), 6579–6592. <https://doi.org/10.1039/C7TB00869D>.
- (68) Feng, Y.; Zhong, D.; Miao, H.; Yang, X. Carbon Dots Derived from Rose Flowers for Tetracycline Sensing. *Talanta* **2015**, *140*, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.038>.
- (69) Kang, C.; Huang, Y.; Yang, H.; Yan, X. F.; Chen, Z. P. A Review of Carbon Dots Produced from Biomass Wastes. *Nanomaterials* **2020**, *10* (11), 2316. <https://doi.org/10.3390/nano10112316>.

- (70) Zhang, B.; Liu, C.; Liu, Y. A Novel One-Step Approach to Synthesize Fluorescent Carbon Nanoparticles. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, *2010* (28), 4411–4414. <https://doi.org/10.1002/ejic.201000622>.
- (71) Prasannan, A.; Imae, T. One-Pot Synthesis of Fluorescent Carbon Dots from Orange Waste Peels. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2013**, *52* (44), 15673–15678. <https://doi.org/10.1021/ie402421s>.
- (72) Tyagi, A.; Tripathi, K. M.; Singh, N.; Choudhary, S.; Gupta, R. K. Green Synthesis of Carbon Quantum Dots from Lemon Peel Waste: Applications in Sensing and Photocatalysis. *RSC Adv.* **2016**, *6* (76), 72423–72432. <https://doi.org/10.1039/C6RA10488F>.
- (73) Liu, Y.; Zhao, Y.; Zhang, Y. One-Step Green Synthesized Fluorescent Carbon Nanodots from Bamboo Leaves for Copper(II) Ion Detection. *Sens. Actuators B Chem.* **2014**, *196*, 647–652. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.02.053>.
- (74) Li, J.; Zhang, L.; Li, P.; Zhang, Y.; Dong, C. One Step Hydrothermal Synthesis of Carbon Nanodots to Realize the Fluorescence Detection of Picric Acid in Real Samples. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, *258*, 580–588. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.11.096>.
- (75) Zhang, W.; Jia, L.; Guo, X.; Yang, R.; Zhang, Y.; Zhao, Z. Green Synthesis of Up- and down-Conversion Photoluminescent Carbon Dots from Coffee Beans for Fe³⁺ Detection and Cell Imaging. *Analyst* **2019**, *144* (24), 7421–7431. <https://doi.org/10.1039/C9AN01953G>.
- (76) 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). <https://doi.org/10.3390/chemosensors10030113>.
- (77) Mehta, V. N.; Jha, S.; Basu, H.; Singhal, R. K.; Kailasa, S. K. One-Step Hydrothermal Approach to Fabricate Carbon Dots from Apple Juice for Imaging of Mycobacterium and Fungal Cells. *Sens. Actuators B Chem.* **2015**, *213*, 434–443. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.02.104>.
- (78) Liu, W.; Diao, H.; Chang, H.; Wang, H.; Li, T.; Wei, W. Green Synthesis of Carbon Dots from Rose-Heart Radish and Application for Fe³⁺ Detection and Cell Imaging. *Sens. Actuators B Chem.* **2017**, *241*, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.10.068>.
- (79) Guo, Y.; Zhao, W. Hydrothermal Synthesis of Highly Fluorescent Nitrogen-Doped Carbon Quantum Dots with Good Biocompatibility and the Application for Sensing Ellagic Acid. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2020**, *240*, 118580. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118580>.

- (80) Atchudan, R.; Chandra Kishore, S.; Gangadaran, P.; Jebakumar Immanuel Edison, T. N.; Perumal, S.; Rajendran, R. L.; Alagan, M.; Al-Rashed, S.; Ahn, B.-C.; Lee, Y. R. Tunable Fluorescent Carbon Dots from Biowaste as Fluorescence Ink and Imaging Human Normal and Cancer Cells. *Environ. Res.* **2022**, *204*, 112365. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112365>.
- (81) Zhuang, Q.; Guo, P.; Zheng, S.; Lin, Q.; Lin, Y.; Wang, Y.; Ni, Y. Green Synthesis of Luminescent Graphitic Carbon Nitride Quantum Dots from Human Urine and Its Bioimaging Application. *Talanta* **2018**, *188*, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.060>.
- (82) Hong, W. T.; Yang, H. K. Luminescent Properties of Carbon Dots Originated from Pine Pollen for Anti-Counterfeiting Application. *Opt. Laser Technol.* **2022**, *145*, 107452. <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2021.107452>.
- (83) Zhou, J.; Sheng, Z.; Han, H.; Zou, M.; Li, C. Facile Synthesis of Fluorescent Carbon Dots Using Watermelon Peel as a Carbon Source. *Mater. Lett.* **2012**, *66* (1), 222–224. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2011.08.081>.
- (84) Xue, M.; Zou, M.; Zhao, J.; Zhan, Z.; Zhao, S. Green Preparation of Fluorescent Carbon Dots from Lychee Seeds and Their Application for the Selective Detection of Methylene Blue and Imaging in Living Cells. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (33), 6783–6789. <https://doi.org/10.1039/C5TB01073J>.
- (85) Xue, M.; Zhan, Z.; Zou, M.; Zhang, L.; Zhao, S. Green Synthesis of Stable and Biocompatible Fluorescent Carbon Dots from Peanut Shells for Multicolor Living Cell Imaging. *New J. Chem.* **2016**, *40* (2), 1698–1703. <https://doi.org/10.1039/C5NJ02181B>.
- (86) Praneerad, J.; Neungnoraj, K.; In, I.; Paoprasert, P. Environmentally Friendly Supercapacitor Based on Carbon Dots from Durian Peel as an Electrode. *Key Eng. Mater.* **2019**, *803*, 115–119. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.803.115>.
- (87) Chen, B. B.; Liu, M. L.; Li, C. M.; Huang, C. Z. Fluorescent Carbon Dots Functionalization. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2019**, *270*, 165–190. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.06.008>.
- (88) Kaur, A.; Aulakh, J. S. Chapter 13 - Study of Carbon Quantum Dots as Smart Materials for Environmental Applications. In *Handbook of Nanomaterials for Sensing Applications*; Hussain, C. M., Kailasa, S. K., Eds.; Elsevier, 2021; pp 223–239. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820783-3.00019-1>.
- (89) Sousa, H. B. A.; Martins, C. S. M.; Prior, J. A. V. You Don't Learn That in School: An Updated Practical Guide to Carbon Quantum Dots. *Nanomaterials* **2021**, *11* (3), 611. <https://doi.org/10.3390/nano11030611>.

- (90) Rui, S.; Song, L.; Lan, J.; Wang, D.; Feng, S.; Lu, J.; Wang, S.; Zhao, Q. Recent Advances in Carbon Dots-Based Nanoplatfoms: Physicochemical Properties and Biomedical Applications. *Chem. Eng. J.* **2023**, *476*, 146593. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.146593>.
- (91) Emam, A. N.; Loutfy, S. A.; Mostafa, A. A.; Awad, H.; Mohamed, M. B. Cytotoxicity, Biocompatibility and Cellular Response of Carbon Dots–Plasmonic Based Nano-Hybrids for Bioimaging. *RSC Adv.* **2017**, *7* (38), 23502–23514. <https://doi.org/10.1039/c7ra01423f>.
- (92) Yan, F.; Sun, Z.; Zhang, H.; Sun, X.; Jiang, Y.; Bai, Z. The Fluorescence Mechanism of Carbon Dots, and Methods for Tuning Their Emission Color: A Review. *Microchim. Acta* **2019**, *186* (8). <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3688-y>.
- (93) Mancini, F.; Menichetti, A.; Degli Esposti, L.; Montesi, M.; Panseri, S.; Bassi, G.; Montalti, M.; Lazzarini, L.; Adamiano, A.; Iafisco, M. Fluorescent Carbon Dots from Food Industry By-Products for Cell Imaging. *J. Funct. Biomater.* **2023**, *14* (2), 90. <https://doi.org/10.3390/jfb14020090>.
- (94) Conduto, M. G. Pontos de Carbono a partir da Biomassa de Microalgas cultivadas em Resíduos Alimentares: Produção Sustentável, Bioatividade e Aplicação em Imagiologia. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Lisboa, 2024.
- (95) Chouzende, I.; Costa, A. I.; Barata, P. D.; Martins, S.; Semedo, M. C.; Cardoso, F. M. H.; Lobo, M. L.; Prata, J. V. Carbon Dots from *Porphyridium Cruentum* Microalgae by High-Efficient Hydrothermal Approaches: Biocompatibility and Antioxidant Capabilities. In *ECSOC 2023*; MDPI, 2023; p 4. <https://doi.org/10.3390/ecsoc-27-16074>.
- (96) Barata, P. D.; Costa, A. I.; Martins, S.; Semedo, M. C.; Antunes, B. G.; Prata, J. V. One-Pot Microwave-Assisted Synthesis of Fluorescent Carbon Dots from Tomato Industry Residues with Antioxidant and Antibacterial Activities. *Biomass* **2025**, *5* (2), 35. <https://doi.org/10.3390/biomass5020035>.
- (97) Terracina, A.; Armano, A.; Meloni, M.; Panniello, A.; Minervini, G.; Madonia, A.; Cannas, M.; Striccoli, M.; Malfatti, L.; Messina, F. Photobleaching and Recovery Kinetics of a Palette of Carbon Nanodots Probed by In Situ Optical Spectroscopy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, *14* (31), 36038–36051. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c09496>.
- (98) Dua, S.; Kumar, P.; Pani, B.; Kaur, A.; Khanna, M.; Bhatt, G. Stability of Carbon Quantum Dots: A Critical Review. *RSC Adv.* **2023**, *13* (20), 13845–13861. <https://doi.org/10.1039/d2ra07180k>.

- (99) Dager, A.; Uchida, T.; Maekawa, T.; Tachibana, M. Synthesis and Characterization of Mono-Disperse Carbon Quantum Dots from Fennel Seeds: Photoluminescence Analysis Using Machine Learning. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50397-5>.
- (100) Zong, Q.; Chen, H.; Zhao, Y.; Wang, J.; Wu, J. Bioactive Carbon Dots for Tissue Engineering Applications. *Smart Mater. Med.* **2024**, *5* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.smaim.2023.06.006>.
- (101) Biological Evaluation of Medical Devices - Part 1: Evaluation and Testing within a Risk Management Process, 2018. <https://www.iso.org/standard/68936.html#lifecycle>.
- (102) Nouri, A. 5 - Titanium Foam Scaffolds for Dental Applications. In *Metallic Foam Bone*; Wen, C., Ed.; Woodhead Publishing, 2017; pp 131–160. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101289-5.00005-6>.
- (103) Graham, J.; Peck, J. Chapter 17 - FDA Regulation of Polyaryletheretherketone Implants*. In *PEEK Biomaterials Handbook*; Kurtz, S. M., Ed.; William Andrew Publishing: Oxford, 2012; pp 277–292. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-4463-7.10017-X>.
- (104) Wang, S.; Wang, D.; Wang, G.; Zhang, M.; Sun, Y.; Ding, J. Antibacterial Carbon Dots. *Mater. Today Bio* **2025**, *30*, 101383. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2024.101383>.
- (105) Murray, C. J. L.; Ikuta, K. S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Robles Aguilar, G.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; Johnson, S. C.; Browne, A. J.; Chipeta, M. G.; Fell, F.; Hackett, S.; Haines-Woodhouse, G.; Kashef Hamadani, B. H.; Kumaran, E. A. P.; McManigal, B.; Achalapong, S.; Agarwal, R.; Akech, S.; Albertson, S.; Amuasi, J.; Andrews, J.; Aravkin, A.; Ashley, E.; Babin, F.-X.; Bailey, F.; Baker, S.; Basnyat, B.; Bekker, A.; Bender, R.; Berkley, J. A.; Bethou, A.; Bielicki, J.; Boonkasidecha, S.; Bukosia, J.; Carvalheiro, C.; Castañeda-Orjuela, C.; Chansamouth, V.; Chaurasia, S.; Chiurchiù, S.; Chowdhury, F.; Clotaire Donatien, R.; Cook, A. J.; Cooper, B.; Cressey, T. R.; Criollo-Mora, E.; Cunningham, M.; Darboe, S.; Day, N. P. J.; De Luca, M.; Dokova, K.; Dramowski, A.; Dunachie, S. J.; Duong Bich, T.; Eckmanns, T.; Eibach, D.; Emami, A.; Feasey, N.; Fisher-Pearson, N.; Forrest, K.; Garcia, C.; Garrett, D.; Gastmeier, P.; Giref, A. Z.; Greer, R. C.; Gupta, V.; Haller, S.; Haselbeck, A.; Hay, S. I.; Holm, M.; Hopkins, S.; Hsia, Y.; Iregbu, K. C.; Jacobs, J.; Jarovsky, D.; Javanmardi, F.; Jenney, A. W. J.; Khorana, M.; Khusuwan, S.; Kisson, N.; Kobeissi, E.; Kostyanov, T.; Krapp, F.; Krumkamp, R.; Kumar, A.; Kyu, H. H.; Lim, C.; Lim, K.; Limmathurotsakul, D.; Loftus, M. J.; Lunn, M.; Ma, J.; Manoharan, A.; Marks, F.; May, J.; Mayxay, M.;

- Mturi, N.; Munera-Huertas, T.; Musicha, P.; Musila, L. A.; Mussi-Pinhata, M. M.; Naidu, R. N.; Nakamura, T.; Nanavati, R.; Nangia, S.; Newton, P.; Ngoun, C.; Novotney, A.; Nwakanma, D.; Obiero, C. W.; Ochoa, T. J.; Olivas-Martinez, A.; Olliaro, P.; Ooko, E.; Ortiz-Brizuela, E.; Ounchanum, P.; Pak, G. D.; Paredes, J. L.; Peleg, A. Y.; Perrone, C.; Phe, T.; Phommason, K.; Plakkal, N.; Ponce-de-Leon, A.; Raad, M.; Ramdin, T.; Rattanavong, S.; Riddell, A.; Roberts, T.; Robotham, J. V.; Roca, A.; Rosenthal, V. D.; Rudd, K. E.; Russell, N.; Sader, H. S.; Saengchan, W.; Schnall, J.; Scott, J. A. G.; Seekaew, S.; Sharland, M.; Shivamallappa, M.; Sifuentes-Osornio, J.; Simpson, A. J.; Steenkeste, N.; Stewardson, A. J.; Stoeva, T.; Tasak, N.; Thaiprakong, A.; Thwaites, G.; Tigoi, C.; Turner, C.; Turner, P.; Van Doorn, H. R.; Velaphi, S.; Vongpradith, A.; Vongsouvath, M.; Vu, H.; Walsh, T.; Walson, J. L.; Waner, S.; Wangrangsimakul, T.; Wannapinij, P.; Wozniak, T.; Young Sharma, T. E. M. W.; Yu, K. C.; Zheng, P.; Sartorius, B.; Lopez, A. D.; Stergachis, A.; Moore, C.; Dolecek, C.; Naghavi, M. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *The Lancet* **2022**, *399* (10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
- (106) Esposito, T.; Silva, N. H. C. S.; Almeida, A.; Silvestre, A. J. D.; Piccinelli, A.; Aquino, R. P.; Sansone, F.; Mencherini, T.; Vilela, C.; Freire, C. S. R. Valorisation of Chestnut Spiny Burs and Roasted Hazelnut Skins Extracts as Bioactive Additives for Packaging Films. *Ind. Crops Prod.* **2020**, *151*, 112491. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112491>.
- (107) Silva, V.; Falco, V.; Dias, M. I.; Barros, L.; Silva, A.; Capita, R.; Alonso-Calleja, C.; Amaral, J. S.; Igrejas, G.; C. F. R. Ferreira, I.; Poeta, P. Evaluation of the Phenolic Profile of *Castanea Sativa* Mill. By-Products and Their Antioxidant and Antimicrobial Activity against Multiresistant Bacteria. *Antioxidants* **2020**, *9* (1), 87. <https://doi.org/10.3390/antiox9010087>.
- (108) Zhang, X.; Bai, X.; Deng, X.; Peng, K.; Zheng, Z.; Xiao, J.; Zhang, R.; Huang, Z.; Huang, J.; Chen, M.; Weng, S. Long-Term Antibacterial Activity of Guanidinium Carbon Dots without Detectable Resistance for the Effective Treatment of Pneumonia Caused by Gram-Negative Bacteria. *Carbon* **2023**, *213*, 118229. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2023.118229>.
- (109) Wang, H.; Lu, F.; Ma, C.; Ma, Y.; Zhang, M.; Wang, B.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Huang, H.; Kang, Z. Carbon Dots with Positive Surface Charge from Tartaric Acid and M-Aminophenol for Selective Killing of Gram-Positive Bacteria. *J. Mater. Chem. B* **2021**, *9* (1), 125–130. <https://doi.org/10.1039/D0TB02332A>.
- (110) Wang, P.; You, Q.; Liu, Y.; Miao, H.; Dong, W.-F.; Li, L. Combating Infections from Drug-Resistant Bacteria: Unleashing Synergistic Broad-Spectrum Antibacterial

- Power with High-Entropy MXene/CDs. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2024**, *238*, 113874. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2024.113874>.
- (111) Tian, H.; Zhu, H.; Xue, Y.; Wang, M.; Xing, K.; Li, Z.; Loh, X. J.; Ye, E.; Ding, X.; Li, B. L.; Yin, X.; Leong, D. T. White Light Powered Antimicrobial Nanoagents for Triple Photothermal, Chemodynamic and Photodynamic Based Sterilization. *Nanoscale Horiz.* **2024**, *9* (7), 1190–1199. <https://doi.org/10.1039/D4NH00060A>.
- (112) Sánchez Milán, J. A.; Mulet, M.; Serra, A.; Gallart-Palau, X. Trioxidized Cysteine and Aging: A Molecular Binomial That Extends Far beyond Classical Proteinopathic Paradigms. *Aging* **2024**. <https://doi.org/10.18632/aging.206036>.
- (113) Calvo-Rodriguez, M.; Kharitonova, E. K.; Snyder, A. C.; Hou, S. S.; Sanchez-Mico, M. V.; Das, S.; Fan, Z.; Shirani, H.; Nilsson, K. P. R.; Serrano-Pozo, A.; Bacskai, B. J. Real-Time Imaging of Mitochondrial Redox Reveals Increased Mitochondrial Oxidative Stress Associated with Amyloid β Aggregates in Vivo in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Mol. Neurodegener.* **2024**, *19* (1), 6. <https://doi.org/10.1186/s13024-024-00702-2>.
- (114) Wu, K.; El Zowalaty, A. E.; Sayin, V. I.; Papagiannakopoulos, T. The Pleiotropic Functions of Reactive Oxygen Species in Cancer. *Nat. Cancer* **2024**, *5* (3), 384–399. <https://doi.org/10.1038/s43018-024-00738-9>.
- (115) Trezza, A.; Geminiani, M.; Cutrera, G.; Dreassi, E.; Frusciante, L.; Lamponi, S.; Spiga, O.; Santucci, A. A Drug Discovery Approach to a Reveal Novel Antioxidant Natural Source: The Case of Chestnut Burr Biomass. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25* (5), 2517. <https://doi.org/10.3390/ijms25052517>.
- (116) Wang, D.; Yan, Z.; Ren, L.; Jiang, Y.; Zhou, K.; Li, X.; Cui, F.; Li, T.; Li, J. Carbon Dots as New Antioxidants: Synthesis, Activity, Mechanism and Application in the Food Industry. *Food Chem.* **2025**, *475*, 143377. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.143377>.
- (117) Coroaba, A.; Ignat, M.; Carp, O.-E.; Stan, C. S.; Filipciuc, S. I.; Uritu, C. M.; Simionescu, N.; Marangoci, N.-L.; Pinteala, M.; Ania, C. O. Antioxidant Activity and in Vitro Fluorescence Imaging Application of N-, O- Functionalized Carbon Dots. *Sci. Rep.* **2025**, *15* (1), 25834. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-11676-6>.
- (118) Deng, W.; Zang, C.; Li, Q.; Sun, B.; Mei, X.; Bai, L.; Shang, X.; Deng, Y.; Xiao, Y.; Ghiladi, R. A.; Lorimer, G. H.; Zhang, X.; Wang, J. Hydrothermally Derived Green Carbon Dots from Broccoli Water Extracts: Decreased Toxicity, Enhanced Free-Radical Scavenging, and Anti-Inflammatory Performance. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2023**, *9* (3), 1307–1319. <https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.2c01537>.
- (119) Miller, N. J.; Rice-Evans, C.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A. A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and Its Application to Monitoring the

- Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clin. Sci.* **1993**, *84* (4), 407–412. <https://doi.org/10.1042/cs0840407>.
- (120) 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.* **26** (9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- (121) Gunathilake, K. D. P. P.; Ranaweera, K. K. D. S.; Vasantha Rupasinghe, H. P. In Vitro Anti-Inflammatory Properties of Selected Green Leafy Vegetables. *Biomedicines* **2018**, *6* (4), 107. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6040107>.
- (122) Sharma, A.; Choi, H.-K.; Lee, H.-J. Carbon Dots for the Treatment of Inflammatory Diseases: An Appraisal of In Vitro and In Vivo Studies. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2023**, *2023*, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2023/3076119>.
- (123) Chen, L.; Deng, H.; Cui, H.; Fang, J.; Zuo, Z.; Deng, J.; Li, Y.; Wang, X.; Zhao, L. Inflammatory Responses and Inflammation-Associated Diseases in Organs. *Oncotarget* **2018**, *9* (6), 7204–7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>.
- (124) Ayaz, F.; Alas, M. O.; Genc, R. Differential Immunomodulatory Effect of Carbon Dots Influenced by the Type of Surface Passivation Agent. *Inflammation* **2020**, *43* (2), 777–783. <https://doi.org/10.1007/s10753-019-01165-0>.
- (125) Kong, B.; Yang, T.; Cheng, F.; Qian, Y.; Li, C.; Zhan, L.; Li, Y.; Zou, H.; Huang, C. Carbon Dots as Nanocatalytic Medicine for Anti-Inflammation Therapy. *J. Colloid Interface Sci.* **2022**, *611*, 545–553. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.12.107>.
- (126) Esfandiari, N.; Bagheri, Z.; Ehtesabi, H.; Fatahi, Z.; Tavana, H.; Latifi, H. Effect of Carbonization Degree of Carbon Dots on Cytotoxicity and Photo-Induced Toxicity to Cells. *Heliyon* **2019**, *5* (12), e02940. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02940>.
- (127) Qureshi, Z. A.; Dabash, H.; Ponnamma, D.; Abbas, M. K. G. Carbon Dots as Versatile Nanomaterials in Sensing and Imaging: Efficiency and Beyond. *Heliyon* **2024**, *10* (11), e31634. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e31634>.
- (128) Rock, K. D.; Starnes, H. M.; Belcher, S. M. Reproductive System, Female. In *Encyclopedia of Toxicology (Fourth Edition)*; Wexler, P., Ed.; Academic Press: Oxford, 2024; pp 167–202. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.00420-6>.
- (129) van Meerloo, J.; Kaspers, G. J. L.; Cloos, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*; Cree, I. A., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2011; pp 237–245. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20.
- (130) Chen, Y.-Y.; Jiang, W.-P.; Chen, H.-L.; Huang, H.-C.; Huang, G.-J.; Chiang, H.-M.; Chang, C.-C.; Huang, C.-L.; Juang, T.-Y. Cytotoxicity and Cell Imaging of Six

- Types of Carbon Nanodots Prepared through Carbonization and Hydrothermal Processing of Natural Plant Materials. *RSC Adv.* **2021**, *11* (27), 16661–16674. <https://doi.org/10.1039/D1RA01318A>.
- (131) Horzmann, K. A.; Freeman, J. L. Making Waves: New Developments in Toxicology With the Zebrafish. *Toxicol. Sci.* **2018**, *163* (1), 5–12. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy044>.
- (132) Banti, C.; Hadjikakou, S. Evaluation of Toxicity with Brine Shrimp Assay. *BIO-Protoc.* **2021**, *11* (2). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3895>.
- (133) Lima, W. G.; Santos, L. B.; Nizer, W. S. D. C.; Castilho, R. O.; Brito, J. C. M. Brine Shrimp (*Artemia Salina* Leach) as an Alternative Model for Assessing Their Vivoantioxidant Activity of Rutin. *Braz. J. Health Pharm.* **2022**, *4* (1), 39–44. <https://doi.org/10.29327/226760.4.1-4>.
- (134) Chen, W.; Shen, J.; Wang, Z.; Liu, X.; Xu, Y.; Zhao, H.; Astruc, D. Turning Waste into Wealth: Facile and Green Synthesis of Carbon Nanodots from Pollutants and Applications to bioimaging††Electronic Supplementary Information (ESI) Available. See DOI: 10.1039/D1sc02837e. *Chem. Sci.* **2021**, *12* (35), 11722–11729. <https://doi.org/10.1039/d1sc02837e>.
- (135) Soledad-Flores, O.; Bailón-Ruiz, S. J.; Román-Velázquez, F. Rapid Synthesis of Non-Toxic, Water-Stable Carbon Dots Using Microwave Irradiation. *Micro* **2024**, *4* (4), 659–669. <https://doi.org/10.3390/micro4040040>.
- (136) Thirumalaivasan, N.; Mahapatra, S.; Ramanathan, G.; Kumar, A.; Raja, T.; Muthuramamoorthy, M.; Pandit, B.; Pandiaraj, S.; Prakash, S. Exploring Antimicrobial and Biocompatible Applications of Eco-Friendly Fluorescent Carbon Dots Derived from Fast-Food Packaging Waste Transformation. *Environ. Res.* **2024**, *244*, 117888. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117888>.
- (137) Ahmadian-Fard-Fini, S.; Salavati-Niasari, M.; Ghanbari, D. Hydrothermal Green Synthesis of Magnetic Fe₃O₄-Carbon Dots by Lemon and Grape Fruit Extracts and as a Photoluminescence Sensor for Detecting of E. Coli Bacteria. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, *203*, 481–493. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.06.021>.
- (138) Yue, X.; Zhu, W.; Ma, S.; Yu, S.; Zhang, Y.; Wang, J.; Wang, Y.; Zhang, D.; Wang, J. Highly Sensitive and Selective Determination of Tertiary Butylhydroquinone in Edible Oils by Competitive Reaction Induced “On–Off–On” Fluorescent Switch. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64* (3), 706–713. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05340>.
- (139) Ma, X.; Lin, S.; Dang, Y.; Dai, Y.; Zhang, X.; Xia, F. Carbon Dots as an “on-off-on” Fluorescent Probe for Detection of Cu(II) Ion, Ascorbic Acid, and Acid

- Phosphatase. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411* (25), 6645–6653. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02038-z>.
- (140) Riahi, Z.; Rhim, J.-W.; Bagheri, R.; Pircheraghi, G.; Lotfali, E. Carboxymethyl Cellulose-Based Functional Film Integrated with Chitosan-Based Carbon Quantum Dots for Active Food Packaging Applications. *Prog. Org. Coat.* **2022**, *166*, 106794. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2022.106794>.
- (141) Huang, S.; Yao, J.; Chu, X.; Liu, Y.; Xiao, Q.; Zhang, Y. One-Step Facile Synthesis of Nitrogen-Doped Carbon Dots: A Ratiometric Fluorescent Probe for Evaluation of Acetylcholinesterase Activity and Detection of Organophosphorus Pesticides in Tap Water and Food. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67* (40), 11244–11255. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03624>.
- (142) Qu, R.; Zhang, W.; Liu, N.; Zhang, Q.; Liu, Y.; Li, X.; Wei, Y.; Feng, L. Antioil Ag₃PO₄ Nanoparticle/Polydopamine/Al₂O₃ Sandwich Structure for Complex Wastewater Treatment: Dynamic Catalysis under Natural Light. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2018**, *6* (6), 8019–8028. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b01469>.
- (143) Zhang, L.; Han, Y.; Zhu, J.; Zhai, Y.; Dong, S. Simple and Sensitive Fluorescent and Electrochemical Trinitrotoluene Sensors Based on Aqueous Carbon Dots. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (4), 2033–2036. <https://doi.org/10.1021/ac5043686>.
- (144) Wang, Y.; Zhang, J.; Shuhuang, C.; Zhang, H.; Li, L.; Fu, Z. Surface Passivation with Nitrogen-Doped Carbon Dots for Improved Perovskite Solar Cell Performance. *J. Mater. Sci.* **2018**, *53*. <https://doi.org/10.1007/s10853-018-2190-y>.
- (145) Cao, L.; Sahu, S.; Anilkumar, P.; Bunker, C. E.; Xu, J.; Fernando, K. A. S.; Wang, P.; Guliants, E. A.; Tackett, K. N. I.; Sun, Y.-P. Carbon Nanoparticles as Visible-Light Photocatalysts for Efficient CO₂ Conversion and Beyond. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (13), 4754–4757. <https://doi.org/10.1021/ja200804h>.
- (146) Lu, S.; Cong, R.; Zhu, S.; Zhao, X.; Liu, J.; S.Tse, J.; Meng, S.; Yang, B. pH-Dependent Synthesis of Novel Structure-Controllable Polymer-Carbon NanoDots with High Acidophilic Luminescence and Super Carbon Dots Assembly for White Light-Emitting Diodes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (6), 4062–4068. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b11579>.
- (147) Bartkowski, M.; Zhou, Y.; Nabil Amin Mustafa, M.; Eustace, A. J.; Giordani, S. Carbon Dots: Bioimaging and Anticancer Drug Delivery. *Chem. – Eur. J.* **2024**, *30* (19). <https://doi.org/10.1002/chem.202303982>.
- (148) Qiu, Y.; Li, D.; Li, Y.; Ma, X.; Li, J. Green Carbon Quantum Dots from Sustainable Lignocellulosic Biomass and Its Application in the Detection of Fe³⁺. *Cellulose* **2022**, *29* (1), 367–378. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04314-7>.

- (149) D., P.; Saini, S.; Thakur, A.; Kumar, B.; Tyagi, S.; Nayak, M. K. A “Turn-On” Thiol Functionalized Fluorescent Carbon Quantum Dot Based Chemosensory System for Arsenite Detection. *J. Hazard. Mater.* **2017**, *328*, 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.01.015>.
- (150) Zhang, Q.; Tian, F.; Zhou, Q.; Zhang, C.; Tang, S.; Jiang, L.; Du, S. Targeted Ginkgo Kernel Biomass Precursor Using Eco-Friendly Synthesis of Efficient Carbon Quantum Dots for Detection of Trace Nitrite Ions and Cell Imaging. *Inorg. Chem. Commun.* **2022**, *140*, 109442. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2022.109442>.
- (151) Zhang, X.; Wang, H.; Ma, C.; Niu, N.; Chen, Z.; Liu, S.; Li, J.; Li, S. Seeking Value from Biomass Materials: Preparation of Coffee Bean Shell-Derived Fluorescent Carbon Dots via Molecular Aggregation for Antioxidation and Bioimaging Applications. *Mater. Chem. Front.* **2018**, *2* (7), 1269–1275. <https://doi.org/10.1039/C8QM00030A>.
- (152) Gudimella, K. K.; Appidi, T.; Wu, H.-F.; Battula, V.; Jogdand, A.; Rengan, A. K.; Gedda, G. Sand Bath Assisted Green Synthesis of Carbon Dots from Citrus Fruit Peels for Free Radical Scavenging and Cell Imaging. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2021**, *197*, 111362. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111362>.
- (153) Girigoswami, A.; Gowtham, P.; Harini, K.; Thirumalai, A.; Pallavi, P.; Girigoswami, K. Synthetic Routes to Theranostic Applications of Carbon-Based Quantum Dots. *ADMET DMPK* **2023**. <https://doi.org/10.5599/admet.1747>.
- (154) Zhao, Y.; Feng, T.; Ai, X.; Ong, H. Dual-Responsive Carbon Dots for Tumor Extracellular Microenvironment Triggered Targeting and Enhanced Anticancer Drug Delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (29), 18732–18740. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b06695>.
- (155) Bi, H.; Wu, X.; Xu, M.; Wang, S.; Abbas, K.; Huang, X.; Zhang, R.; Tedesco, A. C. F,N-Doped Carbon Dots as Efficient Type I Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Dalton Trans.* **2022**, *51* (6), 2296–2303. <https://doi.org/10.1039/D1DT03788A>.
- (156) Zhang, W.; Chen, J.; Gu, J.; Bartoli, M.; Domena, J. B.; Zhou, Y.; C.L.B. Ferreira, B.; Kirbas Cilingir, E.; McGee, C. M.; Sampson, R.; Arduino, C.; Tagliaferro, A.; Leblanc, R. M. Nano-Carrier for Gene Delivery and Bioimaging Based on Pentaethylenhexamine Modified Carbon Dots. *J. Colloid Interface Sci.* **2023**, *639*, 180–192. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2023.02.046>.
- (157) Leblanc, R. M.; Seven, E. S.; Seven, Y. B.; Zhou, Y.; Poudel-Sharma, S.; Diaz-Rucco, J. J.; Kirbas Cilingir, E.; Mitchell, G. S.; Van Dyken, J. D. Crossing the Blood–Brain Barrier with Carbon Dots: Uptake Mechanism and *in Vivo* Cargo

- Delivery. *Nanoscale Adv.* **2021**, *3* (13), 3942–3953. <https://doi.org/10.1039/d1na00145k>.
- (158) Parente, D. *Futuro da produção de castanha passa pela mecanização*. Notícias de Aguiar. <https://noticiasdeaguiar.pt/futuro-da-producao-de-castanha-passa-pela-mecanizacao/> (accessed 2025-09-25).
- (159) Boeriu, C. G.; Bravo, D.; Gosselink, R. J. A.; Van Dam, J. E. G. Characterisation of Structure-Dependent Functional Properties of Lignin with Infrared Spectroscopy. *Ind. Crops Prod.* **2004**, *20* (2), 205–218. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2004.04.022>.
- (160) Reis, F. S.; Martins, A.; Barros, L.; Ferreira, I. C. F. R. Antioxidant Properties and Phenolic Profile of the Most Widely Appreciated Cultivated Mushrooms: A Comparative Study between in Vivo and in Vitro Samples. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50* (5), 1201–1207. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.013>.
- (161) Costa-Trigo, I.; Paz, A.; Morán-Aguilar, M. G.; Pérez Guerra, N.; Pinheiro de Souza Oliveira, R.; Domínguez, J. M. Enhancing the Biorefinery of Chestnut Burrs. Part I. Study of the Pretreatment with Choline Chloride Urea Diluted Deep Eutectic Solvent. *Biomass Bioenergy* **2023**, *173*, 106786. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2023.106786>.
- (162) 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. <https://doi.org/10.1088/2040-8986/ac4da9>.
- (163) Wang, J.; Zhang, P.; Huang, C.; Liu, G.; Leung, K. C.-F.; Wáng, Y. X. J. High Performance Photoluminescent Carbon Dots for In Vitro and In Vivo Bioimaging: Effect of Nitrogen Doping Ratios. *Langmuir* **2015**, *31* (29), 8063–8073. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b01875>.
- (164) 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. Int. Ed.* **2013**, *52* (14), 3953–3957. <https://doi.org/10.1002/anie.201300519>.
- (165) Bandi, R.; Gangapuram, B. R.; Dadigala, R.; Eslavath, R.; Singh, S. S.; Guttena, V. Facile and Green Synthesis of Fluorescent Carbon Dots from Onion Waste and Their Potential Applications as Sensor and Multicolour Imaging Agents. *RSC Adv.* **2016**, *6* (34), 28633–28639. <https://doi.org/10.1039/C6RA01669C>.
- (166) Borges, A. I. F.; Barata, P. D.; Costa, A. Produção e Aplicações de Pontos de Carbono Fluorescentes a partir de Ouriços das Castanhas. Projeto do Curso de

- Licenciatura em Engenharia Biomédica, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Lisboa, 2024.
- (167) Bao, H.; Liu, Y.; Li, H.; Qi, W.; Sun, K. Luminescence of Carbon Quantum Dots and Their Application in Biochemistry. *Heliyon* **2023**, *9* (10), e20317. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e20317>.
- (168) Malczak, I.; Gajda, A. Interactions of Naturally Occurring Compounds with Antimicrobials. *J. Pharm. Anal.* **2023**, *13* (12), 1452–1470. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2023.09.014>.
- (169) Imran, A.; Ahmed, F.; Ali, Y. A.; Naseer, M. S.; Sharma, K.; Bisht, Y. S.; Alawadi, A. H.; Shehzadi, U.; Islam, F.; Shah, M. A. A Comprehensive Review on Carbon Dot Synthesis and Food Applications. *J. Agric. Food Res.* **2025**, *21*, 101847. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2025.101847>.
- (170) Sousa, D. A.; Ferreira, L. F. V.; Fedorov, A. A.; Rego, A. M. B. D.; Ferraria, A. M.; Cruz, A. B.; Berberan-Santos, M. N.; Prata, J. V. Luminescent Carbon Dots from Wet Olive Pomace: Structural Insights, Photophysical Properties and Cytotoxicity. *Molecules* **2022**, *27* (19), 6768. <https://doi.org/10.3390/molecules27196768>.
- (171) Hussain, A.; Alajmi, M. F.; Ganguly, S. Sustainable Doped Carbon Dots as Antioxidant and Nanocarrier for Therapeutic Cargos. *J. Fluoresc.* **2024**, *35* (7), 5629–5643. <https://doi.org/10.1007/s10895-024-03940-1>.
- (172) Liang, G.; Shi, H.; Qi, Y.; Li, J.; Jing, A.; Liu, Q.; Feng, W.; Li, G.; Gao, S. Specific Anti-Biofilm Activity of Carbon Quantum Dots by Destroying *P. Gingivalis* Biofilm Related Genes. *Int. J. Nanomedicine* **2020**, *Volume 15*, 5473–5489. <https://doi.org/10.2147/IJN.S253416>.
- (173) Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity, 2009. <https://www.iso.org/standard/36406.html>.
- (174) Havrdova, M.; Urbancic, I.; Tománková, K.; Malina, L.; Štrancar, J.; Bourlinos, A. Self-Targeting of Carbon Dots into the Cell Nucleus: Diverse Mechanisms of Toxicity in NIH/3T3 and L929 Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5608. <https://doi.org/10.3390/ijms22115608>.
- (175) Li, X.; Chen, C. C.; Wu, L.; Zhou, J.; Huang, Y.; Zhu, X. Neglected Negative Effect of Carbon Quantum Dots (CQDs) Entering the Ocean on Marine Organisms Living in Different Water Layers. *Mar. Pollut. Bull.* **2024**, *199*, 115921. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115921>.
- (176) Liu, Y.; Ma, Y.; Chen, M.; Zhou, T.; Ji, R.; Guo, R.; Chen, J. Trophic Transfer and Environmental Safety of Carbon Dots from Microalgae to *Daphnia*. *Sci. Total Environ.* **2022**, *844*, 157201. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157201>.

- (177) A Guide to Recording Fluorescence Quantum Yields. <http://www.jyhoriba.co.uk/> (accessed 2025-06-05).
- (178) 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. <https://doi.org/10.1021/j100820a009>.
- (179) Kasperek, A.; Smyk, B. A New Approach to the Old Problem: Inner Filter Effect Type I and II in Fluorescence. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, *198*, 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.03.027>.
- (180) Toutenburg, H.; Shalabh. *Statistical Analysis of Designed Experiments, Third Edition*; Springer Texts in Statistics; Springer New York: New York, NY, 2009. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1148-3>.
- (181) Hudzicki, J. Kirby Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *American Society for Microbiology*. 2009.
- (182) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.
- (183) Alamgeer; Uttra, A. M.; Hasan, U. H. Anti-Arthritic Activity of Aqueous-Methanolic Extract and Various Fractions of *Berberis Orthobotrys* Bien Ex Aitch. *BMC Complement. Altern. Med.* **2017**, *17* (1), 371. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1879-9>.
- (184) Ghasemi, M.; Liang, S.; Luu, Q. M.; Kempson, I. The MTT Assay: A Method for Error Minimization and Interpretation in Measuring Cytotoxicity and Estimating Cell Viability. In *Cell Viability Assays: Methods and Protocols*; Friedrich, O., Gilbert, D. F., Eds.; Springer US: New York, NY, 2023; pp 15–33. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3052-5_2.
- (185) Lima, W. G.; Santos, L. B.; Nizer, W. S. D. C.; Castilho, R. O.; Brito, J. C. M. Brine Shrimp (*Artemia Salina* Leach) as an Alternative Model for Assessing Their Vivoantioxidant Activity of Rutin. *Braz. J. Health Pharm.* **2022**, *4* (1), 39–44. <https://doi.org/10.29327/226760.4.1-4>.
- (186) Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; McLaughlin, J. L. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Med* **1982**, *45* (5), 31–34. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>.