



ISEL



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

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

Pontos de Carbono a partir da Biomassa de Microalgas cultivadas em Resíduos Alimentares: Produção Sustentável, Bioatividade e Aplicação em Imagiologia

MARIANA GARRIDO CONDUTO

(Licenciada em Engenharia Biomédica)

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadores:

Doutora Patrícia Alexandra Miranda David Barata

Doutora Magda Sofia Soares de Carvalho Cardoso Nobre Semedo

Júri:

Presidente: Doutor Paulo Jorge Leitão Pessoa Guerreiro

Vogais:

Doutor Diogo Alexandre Cartaxo Sousa

Doutora Patrícia Alexandra Miranda David Barata

Setembro de 2024

Pontos de Carbono a partir da Biomassa de Microalgas cultivadas em Resíduos Alimentares: Produção Sustentável, Bioatividade e Aplicação em Imagiologia

MARIANA GARRIDO CONDUTO
(Licenciada em Engenharia Biomédica)

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadores:

Doutora Patrícia Alexandra Miranda David Barata, ISEL

Doutora Magda Sofia Soares de Carvalho Cardoso Nobre Semedo, ISEL

Júri:

Presidente: Doutor Paulo Jorge Leitão Pessoa Guerreiro, ESTeSL

Vogais:

Doutor Diogo Alexandre Cartaxo Sousa, Hovione FarmaCiência

Doutora Patrícia Alexandra Miranda David Barata, ISEL

Setembro de 2024

Agradecimentos

Esta dissertação simboliza a finalização dos meus estudos e é fruto de um ano de trabalho árduo, que concluiu uma pessoa com mais conhecimento, confiança e autonomia.

À Professora Doutora Patrícia Barata e à Professora Doutora Magda Semedo, orientadoras deste trabalho, agradeço todo o seu apoio e dedicação ao longo do último ano, assim como pelos conhecimentos transmitidos, pela ajuda e preocupação incansáveis e, acima de tudo, pela oportunidade de participar no projeto de investigação, que resultou nesta dissertação. A ambas, o meu muito obrigada pelo voto de confiança.

À Professora Doutora Alexandra Costa, agradeço o apoio no desenvolvimento do trabalho experimental, todas as dúvidas esclarecidas e todo o conhecimento transmitido. Agradeço em particular por ter proporcionado, em todos os instantes, um excelente ambiente de trabalho no laboratório de Química Orgânica.

À Professora Doutora Sónia Martins, o meu agradecimento pelos conhecimentos transmitidos e pelas dúvidas esclarecidas relativamente aos ensaios de Atividade Antibacteriana.

Ao meu grande amigo Bruno Antunes, agradeço toda a ajuda e apoio no desenvolvimento do trabalho experimental, interpretação de resultados e escrita desta dissertação. Acima de tudo, agradeço a amizade incondicional ao longo dos últimos anos, a companhia, as boleias e todos os momentos que passámos juntos.

Agradeço também às minhas colegas Inês Chouzende e Rita Marçalo, pela amizade, apoio e esclarecimento de dúvidas, essenciais ao desenvolvimento deste trabalho. Um agradecimento particular à Rita, com quem passei muitas semanas no IHMT.

Ao Doutor Fernando Cardoso, agradeço a disponibilidade e auxílio para a realização dos estudos de citotoxicidade no Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários, UEI de Parasitologia Médica do IHMT/UNL. Agradeço também o interesse no meu trabalho e todos os conhecimentos transmitidos.

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

Ao Professor Doutor Alessandro Fantonni agradeço a disponibilização do seu tempo para ajudar à realização dos ensaios de microscopia de força atómica no Grupo de Investigação Aplicada em Microeletrónica, Optoeletrónica e Sensores do ISEL.

À Allmicroalgae - Natural Products, S.A, agradeço a disponibilização da suspensão aquosa da microalga *C. vulgaris*, usada como biomassa neste trabalho.

Ao Instituto Politécnico de Lisboa, agradeço o financiamento concedido através do projeto IPL/IDI&CA2023/Mic4BioDot_ISEL (Mic4BioDot - Valorização da Biomassa de Microalgas cultivadas em Resíduos Alimentares na Produção Sustentável de Pontos de Carbono com Atividade Biológica).

À Laura Bárbara e o Ben McCabe, agradeço a amizade incondicional com que me presenteiam todos os dias, independentemente do facto de termos passado os últimos cinco anos em países diferentes.

À minha madrinha, Engenheira Sara Pimenta, agradeço por ter sido o meu pilar ao longo de todo o meu tempo no ISEL, por ouvir as minhas queixas, celebrar as minhas vitórias, apoiar-me nos momentos menos bons e por ser, sempre, um exemplo a seguir.

Ao meu afilhado, João Antunes, agradeço por ter tornado o meu percurso académico mais bonito e mais divertido, por me acompanhar em todas as *side-quests* e por me apoiar incondicionalmente. Às minhas afilhadas, Filipa Castilho e Marta Teixeira, agradeço igualmente todo o apoio, amor e amizade que me dão todos os dias. São, os três, a minha dor de cabeça preferida.

À minha família de Lisboa, Ana Isabel Borges e Henrique Batista, agradeço o apoio, amor e companhia. Não teria sido capaz de concluir o meu mestrado se não tivesse percorrido este caminho de braço dado com os dois. Obrigada por tudo.

Aos amigos que a faculdade me deu, Sofia Sousa, Leonor Bispo, Carlos Gomes, Raquel Figueiredo, Rita Silva, Afonso Monteiro, Pedro Martinho, Ricardo Silva, André Santos, Cláudia Marques, Rita Ludovino, João Coelho, Rui Durão, José Costa, Rodrigo Candeias e Olímpia Camisão, agradeço, do fundo do coração, por terem tornado o meu percurso tão especial. Sou uma pessoa mais feliz por vos ter comigo.

Ao Francisco Sabino, agradeço o apoio incansável ao longo dos últimos meses de desenvolvimento deste trabalho e a companhia durante as horas intermináveis de escrita.

Agradeço aos meus pais, Célia e Carlos Conduto, por todo o carinho, apoio e compreensão que sempre me deram. Obrigada por me incentivarem a continuar, por me abrirem as portas para o mundo e por nunca duvidarem das minhas capacidades, nem permitirem que eu o fizesse.

Aos meus irmãos, Inês, João e Sara Conduto, que são as minhas pessoas preferidas no mundo, agradeço todo o amor que me dão. Às minhas irmãs, agradeço a compreensão e por

não fiquem chateadas comigo por não lhes telefonar tanto quanto devia. Ao meu irmão, com quem partilhei casa enquanto fazia o mestrado, agradeço por me fazer companhia e por me fazer o jantar quando chegava a casa tarde das aulas ou do laboratório.

O meu mais profundo agradecimento à minha avó, Adélia Robalo, que é a minha maior apoiante e que celebra todas as minhas vitórias como se fossem suas. Agradeço todas as vezes que rezou ao seu Santo António para que eu passasse num exame.

Ao meu avô, António Garrido, dedico este trabalho, porque apesar de já cá não estar, tudo o que faço e conquisto nesta vida será sempre um bocadinho seu.

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

Lisboa, 8 de janeiro de 2025

Resumo

O presente trabalho teve como principal objetivo promover a valorização da biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* (BM-Cv) cultivada em meio de cultura suplementado com resíduos alimentares (provenientes do comércio retalhista), através da síntese sustentável de pontos de carbono (PsC) bioativos fluorescentes e posterior avaliação das suas potenciais aplicações, nomeadamente em imagiologia.

Os PsC foram sintetizados a partir da BM-Cv por carbonização hidrotérmica através de aquecimento convencional e assistida por radiação micro-ondas, sendo posteriormente submetidos a etapas de isolamento e purificação, através de filtração e extração líquido-líquido.

Os nanomateriais de carbono obtidos foram caracterizados estruturalmente por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ressonância magnética nuclear de próton (RMN ¹H) e análise elementar, enquanto a sua caracterização morfológica preliminar foi realizada por Microscopia de Força Atômica (AFM). As propriedades fotofísicas dos novos PsC foram estudadas através de espectroscopia de absorção no estado fundamental (UV-Vis) e espectroscopia de fluorescência no estado estacionário.

A bioatividade dos PsC foi avaliada no que diz respeito à sua atividade antimicrobiana contra duas espécies bacterianas, *Escherichia coli* e de *Staphylococcus aureus*, bem como quanto à sua atividade antioxidante. A citotoxicidade dos PsC *in vitro* foi estudada em linhas celulares animais normais (NIH-3T3 e VERO) e tumorais (S180) e *in vivo* utilizando o microcrustáceo *Artemia salina* como organismo modelo. Paralelamente, recorreu-se à técnica de microscopia de fluorescência para analisar a interação dos nanomateriais sintetizados com as linhas celulares em estudo e com o microcrustáceo.

A análise das propriedades biológicas permitiu concluir que os PsC exibiram baixa atividade antibacteriana e antioxidante. No entanto, não apresentaram efeitos citotóxicos contra células animais, assim como em organismos vivos. Verificou-se ainda a internalização destas nanopartículas nas linhas celulares animais e em *A. salina*, evidenciando o seu potencial para marcação celular por fluorescência e consequente aplicação em imagiologia.

Palavras-chave: atividade biológica; carbonização hidrotérmica; fluorescência; microalgas; pontos de carbono.

Abstract

The main goal of this work is to promote the valorization of the biomass of the microalga *Chlorella vulgaris* (BM-Cv) cultivated in a culture medium supplemented with food waste (from retail trade), through the sustainable synthesis of fluorescent bioactive carbon dots (CDs) and subsequent evaluation of their potential applications, namely in imaging.

The CDs were synthesized from BM-Cv via hydrothermal carbonization using conventional heating and microwave-assisted irradiation, followed by isolation and purification steps through filtration and liquid-liquid extraction. The obtained CDs were structurally characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), proton nuclear magnetic resonance (NMR ^1H) and elemental analysis, while their preliminary morphological characterization was performed using Atomic Force Microscopy (AFM). The photophysical properties of the CDs were studied using fundamental state absorption spectroscopy ((UV-Vis) and steady-state fluorescence spectroscopy.

The bioactivity of the CDs was evaluated for their antimicrobial activity against two bacterial species, *Escherichia coli* and of *Staphylococcus aureus*, as well as for their antioxidant activity. The *in vitro* cytotoxicity of the CDs was studied using normal (NIH-3T3 and VERO) and tumoral (S180) animal cell lines and *in vivo* using the microcrustacean *Artemia salina* as a model organism. Simultaneously, fluorescence microscopy was employed to analyse the interaction of the nanomaterials with the studied cell lines and the microcrustacean.

The analysis of the biological properties of the CDs revealed low antibacterial and antioxidant activity. However, they did not show cytotoxic effects against animal cells or living organisms. Additionally, the internalization of these nanoparticles in animal cell lines and *A. salina* was observed, highlighting their potential for fluorescence-based cell labelling and imaging applications.

Keywords: biological activity; carbon nanodots; fluorescence; hydrothermal carbonization; microalgae.

Divulgação científica

Do desenvolvimento desta dissertação de mestrado resultaram as seguintes publicações científicas:

Comunicações em conferências (Comunicações em painel):

- Barata, P.D.; Costa, A.I.; Semedo, M.C.; Martins, S.; Conduto, M.G.; Cardoso, H.; Lobo, M.L.; Cardoso, F.M.H.; Prata, J.V. “Aplicação de Pontos de Carbono derivados de Biomassa de Microalgas cultivadas em Resíduos Alimentares como Sondas Fluorescentes em Imagiologia”, XXVIII Encontro Galego-Português de Química, a realizar de 13 a 15 de novembro de 2024, Vigo, Espanha. (*Abstract* aceite)
- Barata, P.D.; Costa, A.I.; Semedo, M.C.; Martins, S.; Conduto, M.G.; Cardoso, H.; Lobo, M.L.; Cardoso, F.M.H.; Prata, J.V., “Microalgae-based Carbon Dots: Synthesis and Biological Applications”, Global Research Conference on Nanotechnology and Nanomaterials (GRCNN2024), 24 a 26 de outubro de 2024, Barcelona, Espanha.
- Semedo, M.C.; Barata, P.D.; Costa, A.I.; Martins, S.; Conduto, M.G.; Cardoso, H.; Cardoso, F.M.H.; Prata, J.V., “*In vitro* Citotoxicity Evaluation of Carbon Dots from *Chlorella vulgaris* Biomass obtained in different Hydrothermal Conditions”, Global Research Conference on Nanotechnology and Nanomaterials (GRCNN2024), 24 a 26 de outubro de 2024, Barcelona, Espanha.
- Conduto, M.G.; Barata, P.D.; Costa, A.I.; Semedo, M.C.; Martins, S.; Cardoso, H.; Prata, J.V., “Synthesis and Applications of Bioactive Fluorescent Carbon Dots Based on Microalgae Biomass Cultivated with Food Waste”, 3rd International Conference on Materials and Nanomaterials (MNs-24), ISEL, 29 a 31 de julho de 2024, Lisboa, Portugal.
- Conduto, M.G.; Barata, P.D.; Costa, A.I.; Semedo, M.C.; Martins, S.; Cardoso, H.; Cardoso, F.M.H.; Prata, J.V.; “Valorização da Biomassa de Microalgas cultivadas em Resíduos Alimentares para a Produção de Pontos de Carbono Fluorescentes”, 7^o Simpósio Produção e Transformação de Alimentos em Ambiente Sustentável, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), 29 de maio de 2024, Oeiras, Portugal.

- Conduto, M.G.; Barata, P.D.; Costa, A.I.; Semedo, M.C.; Martins, S.; Cardoso, H.; Cardoso, F.M.H.; Prata, J.V. “Pontos de Carbono baseados em Biomassa de Microalgas cultivadas em Resíduos Alimentares: Síntese e Aplicações”, 10^o Edição do Fórum de Engenharia Química e Biológica (iFEQB), Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL), 7 a 9 de maio de 2024, Lisboa, Portugal.
- Conduto, M.G.; Barata, P.D.; Costa, A.I.; Semedo, M.C.; Martins, S.; Cardoso, H.; Prata, J.V. “Valorização da Biomassa de Microalgas produzidas em Desperdícios Alimentares na Síntese de Pontos de Carbono Fluorescentes Bioactivos”, XXVII Encontro Luso Galego de Química, 22 a 24 de novembro de 2023, Porto, Portugal.

Comunicações em conferências (Comunicação oral):

- Conduto, M.G.; Barata, P.D.; Costa, A.I.; Semedo, M.C.; Martins, S.; Cardoso, H.; Cardoso, F.M.H.; Prata, J.V. “Pontos de Carbono baseados em Biomassa de Microalgas cultivadas em Resíduos Alimentares: Síntese e Aplicações”, 10^o Edição do Fórum de Engenharia Química e Biológica (iFEQB), Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL), 7 a 9 de maio de 2024, Lisboa, Portugal.

Glossário, Abreviaturas e Símbolos

A

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

B

BHT	Butil-hidroxitolueno
BM-Cv	Biomassa da microalga <i>Chlorella vulgaris</i>
BSA	Albumina do soro bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)

C

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

D

DET	Dietilenotriamina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DP	Desvio padrão

E

ED	Etilenodiamina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
em	Emissão
ET	Equivalentes de Trolox
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (do latim, referência a outros)
exc	Excitação

F

FBS	Soro bovino fetal (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FBR	Fotobiorreator
FTIR	Espetroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (<i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i>)

H

HeLa	Linha celular tumoral do colo do útero de Henrietta Lacks
------	---

L

L929	Linha celular 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>)
MHA	<i>Mueller-Hinton Agar</i>
MHB	<i>Mueller-Hinton Broth</i>
MHS	<i>Mueller-Hinton Soft</i>
MIC	Concentração mínima inibitória (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
MLC	Concentração mínima letal (<i>Minimum Lethal Concentration</i>)
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
m.r.	Mistura reacional

N

n.d.	Não detetado
NIH-3T3	Linha celular de fibroblastos embrionários de murganho
NMs	Nanomateriais
NMsC	Nanomateriais de Carbono
NPsC	Nanopontos de Carbono

P

PBS	Solução salina de tampão fosfatos (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PEG	Polietilenoglicol
PsC	Pontos de Carbono
PQsG	Pontos Quânticos de Grafeno
PsPC	Pontos de Polímero Carbonizado
<i>p</i> -FD	<i>p</i> -Fenilenodiamina

R

Resazurina	7-Hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido, sal de sódio
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Protão (<i>Proton Nuclear Magnetic Resonance</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RQ	Rendimento Quântico de Fluorescência

S

SPV	Sulfofosfovanilina (<i>Sulfo-phospho-vanillin</i>)
S180	Linha celular de sarcoma de murganho

T

T	Temperatura
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico

U

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

V

VERO	Linha celular epitelial renal de macaco verde africano
vs.	<i>versus</i>

Símbolos

λ	Comprimento de onda
Φ_F	Rendimento quântico de fluorescência

Índice de figuras

Figura I.1 - Observação a microscópio ótico de uma cultura de <i>Chlorella vulgaris</i> . ²¹	9
Figura I.2 – Diferentes tipos de PsC. Adaptado de Sun <i>et al.</i> ⁵⁶	15
Figura I.3 - Estratégias de síntese de PsC, <i>top-down</i> e <i>bottom-up</i> . Adaptado de Tesa <i>et al.</i> ⁵⁹ e Pathak <i>et al.</i> ⁶⁰	16
Figura II.1 - Espectro de FTIR da BM-Cv (pastilha de KBr).	36
Figura II.2 - Espectro de FTIR das cinzas da BM-Cv (pastilha de KBr).....	41
Figura II.3 - Espectros de FTIR das frações orgânicas e da fração aquosa (pastilha de KBr).	49
Figura II.4 - Espectros de FTIR dos PsC sintetizados <i>via</i> CHAC e CHMO (pastilha de KBr). 50	
Figura II.5 - Espectros de FTIR dos PsC sintetizados com diferentes rácios mássicos ED/BM-Cv (pastilha de KBr).	51
Figura II.6 - Espectro de RMN ¹ H de dispersões aquosas de PsC_13 (400 MHz, D ₂ O, 25 °C); *solvente residual.	52
Figura II.7 - Espectro de FTIR das cinzas do ensaio PsC_13 em pastilha de KBr.	52
Figura II.8 – Imagens topográficas de AFM das diferentes secções de corte transversal da dispersão aquosa dos PsC_04 (0.1 mg mL ⁻¹), distinguindo a. PsC de ca. 10 nm e b. agregados de ca. 25 nm.	54
Figura II.9 - Imagens topográficas de AFM da secção de corte transversal da dispersão aquosa dos PsC_13 (0.1 mg mL ⁻¹).	55
Figura II.10 – Renderização tridimensional de AFM das dispersões aquosas dos a. PsC_04 e b. PsC_13 (0.1 mg mL ⁻¹).	55
Figura II.11 - Espectros de UV-Vis (linha contínua), emissão (linha pontilhada; $\lambda_{exc} = 360$ nm) e excitação (linha tracejada; monitorizados a 430 e 425 nm), dos PsC_04 (azul) e PsC_13 (amarelo), obtidos a partir de uma dispersão aquosa de 0.1 mg mL ⁻¹	56
Figura II.12 - Espectros de emissão de uma dispersão aquosa 0.1 mg mL ⁻¹ de PsC_13 com excitação a diferentes comprimentos de onda (300 a 400 nm).	57
Figura II.13 - Dispersão aquosa de PsC sob a. luz visível e b. luz UV ($\lambda_{exc} = 366$ nm).	58
Figura II.14 - Espectros de emissão das dispersões aquosa de PsC_13 (0.1 mg mL ⁻¹) adquiridos ao longo de 1 hora de irradiação contínua ($\lambda_{exc} = 360$ nm).	58
Figura II.15 - Variação da fotoluminescência ($\lambda_{exc} = 360$ nm) da dispersão aquosa de PsC (0.1 mg mL ⁻¹).	59
Figura II.16 - Resultados dos ensaios de difusão em disco, após incubação das estirpes bacterianas a. <i>E. coli</i> e b. <i>S. aureus</i> com PsC_01 (100, 500 e 1000 µg/disco), utilizando como controlo positivo gentamicina (G, 10 µg) e controlo negativo água estéril.	60

Figura II.17 - Resultados dos ensaios de difusão em disco, após incubação das estirpes bacterianas a. <i>E. coli</i> e b. <i>S. aureus</i> com PsC_CHMO_19 (100, 500 e 1000 µg/disco), utilizando como controlo positivo gentamicina (G, 10 µg) e controlo negativo água estéril. ..61	61
Figura II.18 - Avaliação da atividade antibacteriana contra a. <i>E. coli</i> e b. <i>S. aureus</i> , após incubação de diferentes concentrações de PsC_05, expressa pelo decréscimo da viabilidade celular (%). ..65	65
Figura II.19 - Avaliação da atividade antibacteriana contra a. <i>E. coli</i> e b. <i>S. aureus</i> , após incubação de diferentes concentrações de PsC_15, expressa pelo decréscimo da viabilidade celular (%). ..66	66
Figura II.20 - Atividade antioxidante em percentagem dos PsC obtidos em ensaios exploratórios e dos controlos positivos, à concentração de 1 mg mL ⁻¹ , determinada pelo método de inibição do radical ABTS.68	68
Figura II.21 - Atividade antioxidante em percentagem dos PsC obtidos e dos controlos positivos, à concentração de 3 mg mL ⁻¹ , determinada pelo método de inibição do radical ABTS; n.d. - não detetado.69	69
Figura II.22 - Capacidade Quelante de iões Fe ²⁺ (%) dos PsC selecionados e do controlo positivo (EDTA) à concentração de 3 mg mL ⁻¹71	71
Figura II.23 - Citotoxicidade celular contra as linhas celulares a. VERO, b. NIH-3T3 e c. S180 dos PsC_13 (ED/BM-Cv = 0.32) avaliada pelo método do MTT; (Citotoxicidade celular não detetada – n.d.).73	73
Figura II.24 - Citotoxicidade celular contra as linhas celulares a. VERO, b. NIH-3T3 e c. S180 dos PsC_03 (300 °C) avaliada pelo método do MTT.75	75
Figura II.25 - Avaliação da citotoxicidade <i>in vivo</i> em <i>A. salina</i> de PsC_13, após 24 h e 48 h.77	77
Figura II.26 - Imagens de microscopia de fluorescência de células VERO após tratamento com uma dispersão aquosa do ensaio PsC_13 à concentração de 2 mg mL ⁻¹ (ampliação 400 x).78	78
Figura II.27 - Imagens de microscopia de fluorescência de células NIH-3T3 após tratamento com uma dispersão aquosa do ensaio PsC_13 à concentração de 2 mg mL ⁻¹ (ampliação 400 x).79	79
Figura II.28 - Imagens de microscopia de fluorescência de células S180 após tratamento com uma dispersão aquosa do ensaio PsC_13 à concentração de 2 mg mL ⁻¹ (ampliação 400 x).80	80
Figura II.29 - Observação a microscópio ótico de um organismo de <i>A. salina</i> (ampliação 100 x), identificando a localização do seu trato intestinal.81	81
Figura II.30 - Imagens de microscopia de fluorescência de <i>A. salina</i> após tratamento com uma dispersão aquosa de PsC_13 à concentração de 2 mg mL ⁻¹ (ampliação 200 x).82	82

Índice de tabelas

Tabela I.1 - Potenciais aplicações de microalgas (adaptado de Balasubramaniam <i>et al.</i>) ⁷	6
Tabela II.1 – Análise elementar da BM-Cv.....	36
Tabela II.2 - Quantificação dos pigmentos fotossintéticos da BM-Cv no extrato de EtOH.	37
Tabela II.3 - Composição em polissacáridos do extrato etanólico de BM-Cv.	39
Tabela II.4 - Composição em compostos fenólicos e flavonóides totais do extrato etanólico de BM-Cv.	40
Tabela II.5 - Características físico-químicas da BM-Cv.....	42
Tabela II.6 - Compostos bioativos presentes na BM-Cv.....	42
Tabela II.7 – Estudo preliminar do efeito da quantidade de aditivo (ED) no rendimento quântico e mássico dos PsC.....	44
Tabela II.8 - Efeito da temperatura no rendimento quântico e mássico dos PsC.....	44
Tabela II.9 - Efeito da natureza do aditivo no rendimento quântico e mássico dos PsC.	45
Tabela II.10 - Efeito do rácio de ED/BM-Cv no rendimento quântico e mássico dos PsC.....	46
Tabela II.11 - Efeito do modo de síntese no rendimento quântico e mássico dos PsC.....	46
Tabela II.12 - Efeito da natureza da fonte de carbono no rendimento quântico e mássico dos PsC.	47
Tabela II.13 - Estudo preliminar do efeito da variação do rácio de ED/BM-Cv no rendimento quântico e mássico dos PsC obtidos por CHMO.	47
Tabela II.14 – Efeito do rácio mássico ED/BM-Cv na análise elementar dos PsC obtidos por CHAC.....	53
Tabela II.15 - Diâmetros de inibição do crescimento de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> , obtidos em ensaios de difusão em disco.	62
Tabela II.16 - Valores MIC e MLC dos PsC sintetizados e aplicados ao estudo da atividade antibacteriana contra <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> , determinados pelo método de microdiluição em meio líquido.	64
Tabela II.17 - Atividade antioxidante em µg ET/mg de PsC (3 mg mL ⁻¹) resultantes dos diferentes ensaios realizados, determinada pelo método de inibição do radical ABTS.	70
Tabela II.18 - Efeito do rácio ED/BM-Cv utilizado na síntese de PsC na viabilidade celular das linhas celulares VERO, NIH-3T3 e S180.	72
Tabela II.19 - Efeito da temperatura de síntese dos PsC na viabilidade celular das linhas VERO, NIH-3T3 e S180.	74

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. MICROALGAS.....	5
I.2.1 Recursos alternativos para a cultura de Microalgas	7
I.2.2 Microalgas verdes e <i>Chlorella vulgaris</i>	9
I.2.3 Extração e isolamento de compostos bioativos.....	10
I.2.4 Métodos de doseamento de compostos bioativos.....	10
I.2.4.1. Quantificação dos pigmentos.....	11
I.2.4.2. Métodos colorimétricos	11
I.2.4.3. Quantificação de lípidos.....	13
I.3. NANOMATERIAIS DE CARBONO.....	14
I.3.1 Métodos de Síntese	16
I.3.1.1. Métodos <i>top-down</i>	16
I.3.1.2. Métodos <i>bottom-up</i>	17
I.3.1.3. Funcionalização Superficial	18
I.3.2 Propriedades Fotofísicas	19
I.3.3 Biocompatibilidade e Bioatividade.....	21
I.3.3.1. Citotoxicidade	21
I.3.3.2. Atividade Antibacteriana	24
I.3.3.3. Atividade Antioxidante.....	25
I.3.4 Aplicações Biomédicas	26

I.3.4.1. Imagiologia	26
I.3.4.2. Nanomedicina e Teranóstica.....	27
I.3.4.3. Biossensores	29
II. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
II.1 PREÂMBULO	33
II.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DA MICROALGA <i>Chlorella vulgaris</i>	35
II.2.1 Caracterização Estrutural.....	36
II.2.2 Quantificação de pigmentos.....	37
II.2.3 Quantificação de proteína total	37
II.2.4 Quantificação de hidratos de carbono totais	38
II.2.5 Quantificação de polissacáridos (sulfatados, ácidos e β -(1,3)-D-glucanos).....	38
II.2.6 Quantificação de compostos fenólicos e flavonóides totais.....	40
II.2.7 Quantificação de lípidos.....	40
II.2.8 Quantificação de cinzas	41
II.2.9 Caracterização global da BM-Cv.....	42
II.3 SÍNTESE DE PONTOS DE CARBONO	43
II.3.1 Síntese de PsC a partir da BM-Cv	43
II.3.1.1 Carbonização Hidrotérmica com Aquecimento Convencional	43
II.3.1.2 Carbonização Hidrotérmica Assistida por Radiação Micro-ondas	47
II.3.2 Purificação dos Pontos de carbono.....	48
II.3.2.1 Extração Líquido-Líquido	48
II.3.3 Caracterização Estrutural.....	50
II.3.4 Caracterização Morfológica	54
II.3.5 Propriedades Fotofísicas	56
II.4 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DOS PONTOS DE CARBONO.....	59
II.4.1 Atividade Antibacteriana	60
II.4.1.1 Técnica de suscetibilidade à difusão em disco.....	60
II.4.1.2 Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Letal.....	63
II.4.2 Atividade Antioxidante e Capacidade Quelante	68

II.4.3	Avaliação da Citotoxicidade <i>in vitro</i>	71
II.4.4	Avaliação da Citotoxicidade <i>in vivo</i>	76
II.4.5	Marcação Celular por Fluorescência.....	77
III.	PARTE EXPERIMENTAL.....	83
III.1.	PREÂMBULO.....	85
III.2.	REAGENTES, MATERIAL BIOLÓGICO, TÉCNICAS GERAIS E EQUIPAMENTO	87
III.3.	CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA.....	90
III.3.1.	Extração de biocompostos.....	90
III.3.2.	Quantificação de pigmentos.....	90
III.3.3.	Quantificação de β -(1,3)-D-glucanos.....	91
III.3.4.	Quantificação de proteína total.....	91
III.3.5.	Quantificação de hidratos de carbono totais.....	92
III.3.6.	Quantificação de polissacáridos sulfatados.....	92
III.3.7.	Quantificação de polissacáridos ácidos.....	92
III.3.8.	Quantificação de compostos fenólicos totais.....	93
III.3.9.	Quantificação de compostos flavonoides totais.....	93
III.3.10.	Quantificação de lípidos.....	94
III.3.11.	Quantificação de sólidos totais.....	94
III.3.12.	Quantificação de cinzas.....	94
III.4.	SÍNTESE DE PONTOS DE CARBONO.....	95
III.4.1.	Síntese de PsC por CHAC.....	95
III.4.2.	Síntese dos PsC por CHMO.....	96
III.4.3.	Purificação dos Pontos de Carbono por Extração Líquido-Líquido.....	96
III.5.	AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DOS PONTOS DE CARBONO.....	97
III.5.1.	Avaliação das Propriedades Antioxidantes.....	97
III.5.1.1.	Método do Radical ABTS.....	97
III.5.1.2.	Capacidade quelante dos iões Fe^{2+}	97
III.5.2.	Avaliação da Atividade Antibacteriana.....	98

III.5.2.1. Técnica de suscetibilidade à difusão em disco.....	98
III.5.2.2. Determinação dos valores de MIC e MLC.....	99
III.5.3. Avaliação da Citotoxicidade <i>in vitro</i>	99
III.5.4. Avaliação da Citotoxicidade <i>in vivo</i>	100
III.5.5. Marcação Celular por Fluorescência.....	100
IV. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	103
V. BIBLIOGRAFIA	105

I. INTRODUÇÃO



I.1. PREÂMBULO

O presente trabalho abrange a síntese sustentável de pontos de carbono (PsC) fluorescentes, obtidos a partir da microalga verde *Chlorella vulgaris*, cultivada em meio de cultura suplementado com resíduos alimentares provenientes do comércio retalhista. As microalgas verdes têm, nos últimos anos, sido alvo de estudo pela comunidade científica, tendo despertado o seu interesse pelo elevado potencial dos produtos e aplicações que apresentam, enquanto biomassa com elevada carga orgânica, contendo compostos benéficos para a saúde humana.

Este Capítulo pretende, numa primeira fase, enquadrar as principais características da microalga utilizada, bem como a sua origem e propriedades bioquímicas, através de uma revisão bibliográfica. Serão, ainda, descritos os métodos empregues para o isolamento de biocompostos com valor acrescentado, a partir destes microrganismos.

Relativamente à síntese de PsC, será apresentada uma revisão da literatura sobre os diferentes tipos de nanoestruturas de carbono e os métodos de síntese associados à sua obtenção. Serão também descritas as suas propriedades fotofísicas e biológicas, juntamente com as suas potenciais áreas de aplicação.

Assim, o presente Capítulo inclui as seguintes Secções:

I.2. Microalgas

I.3. Nanomateriais de Carbono



I.2. MICROALGAS

Enquanto sistema biológico, as microalgas são consideradas extremamente eficazes no que diz respeito à absorção de energia solar e à produção de compostos orgânicos através da fotossíntese, pelo que as aplicações da biomassa destes microrganismos têm vindo a ser estudadas ao longo dos últimos anos.^{1,2}

As microalgas são seres unicelulares, filamentosos ou sifonáceos, existentes em sistemas de água doce e salgada, e são classificados como eucariotas, com um vasto *habitat* natural e uma forte adaptabilidade ambiental, sendo consideradas uns dos seres vivos mais antigos no planeta.^{2,3} Caracterizam-se pela sua riqueza em pigmentos, nomeadamente a clorofila, que lhes confere a capacidade de realizar a fotossíntese de forma extremamente eficiente, tornando-os um dos microrganismos que mais rapidamente se multiplicam. Consequentemente, existem em abundância na natureza, representando uma mais-valia, não só por serem fontes de oxigénio livre na atmosfera, como também pelas diversas aplicações que podem possuir (Tabela I.1).^{4,5}

Considera-se que as microalgas possam ser uma fonte natural para uma dieta saudável e, por isso, são frequentemente utilizadas ao nível da nutrição (humana e animal). Muitas das espécies são ricas em hidratos de carbono, proteínas, lípidos e outros componentes com valor nutricional, tendo sido destacadas pela sua capacidade de auxiliar o sistema imunitário, metabolismo de lípidos e a função intestinal.² Por outro lado, as indústrias farmacêutica, cosmética, alimentar e nutracêutica, bem como a biomedicina, beneficiam também das vantagens das microalgas devido às substâncias bioativas produzidas pelas mesmas e às suas propriedades biológicas, como a fotossíntese, a superfície ativa e a ótima biocompatibilidade.^{3,6} Destacam-se ainda como potenciais aplicações a sua utilização como biocombustíveis e biofertilizantes, assim como a sua utilização no tratamento de águas residuais e na proteómica (Tabela I.1).⁷

Tabela I.1 - Potenciais aplicações de microalgas (adaptado de Balasubramaniam *et al.*)⁷

Farmacêutica

- Anticancerígeno
- Antiinflamatório
- Antiviral
- Antifungal
- Antibacteriano

Nutracêutica

- Suplementos e aditivos alimentares;
- Agente gelificante;
- Bio-corantes.

Cosmética

- Branqueamento da pele;
- Tratamento de doenças da pele;
- Agente antioxidante e hidratante.

Combustível/energia

- Biodiesel;
- Bioetanol;
- Eletricidade/calor;
- Biogás.

Fertilizantes

- Melhoria da fertilidade dos solos;
- Estimulante do crescimento de plantas;
- Bio-pesticida.

Alimentação animal

- Fonte nutricional;
- Melhoria da fertilidade e do sistema imunitário.

Proteômica

Tratamento de águas residuais

A maioria das espécies de microalgas são autotróficas, pelo que os seus requisitos de crescimento estão relacionados com a luminosidade disponível e o teor de carbono inorgânico e minerais dissolvidos no meio de cultura. Contudo, algumas microalgas conseguem crescer sob condições heterotróficas (na ausência da luz, utilizando carbono orgânico através de

respiração aeróbica) e mixotróficas (assimilando o carbono orgânico através de respiração aeróbica). A variedade das condições de crescimento contribui para que a cultura de microalgas seja um processo desafiante e delicado, podendo ser afetado por vários fatores abióticos, como a intensidade da luz, a temperatura, o pH, a taxa de oxigénio e a disponibilidade de nutrientes e de CO₂; bem como por fatores biológicos, como a presença de organismos patogénicos ou predadores. Existem, por isso, diversas estratégias para otimizar as condições de cultura, como sistemas fechados ou abertos, cultura em *batch*, contínua ou semi-contínua, o que implica maiores custos associados a este processo.⁸

Até 2020, aproximadamente 5000 toneladas de microalga seca eram produzidas por ano a nível mundial.⁹ O processo de produção de microalgas engloba três etapas essenciais: a cultura, a colheita e a desidratação. A cultura pode ser, atualmente, realizada em sistema de reservatório aberto, seja em águas naturais, como lagos ou lagoas, ou em reservatórios artificiais. Este método é preferível na perspetiva económica quando comparado à alternativa, que consiste na tecnologia de fotobioreatores (FBRs). Por outro lado, esta permite um sistema de cultura isolado e controlado, eficiente na prevenção da contaminação.⁷

A tecnologia de FBR baseia-se num vaso fechado que permite a produção fototrófica de microalgas, com o objetivo de reduzir os custos da produção de biomassa. Estes equipamentos podem encontrar-se em ambiente interior ou exterior, dependendo da sua capacidade de recolher luz e da sua viabilidade comercial. Habitualmente, o meio de cultura está contido num conjunto de tubos ou pratos transparentes, enquanto a microalga, suspensa num meio aquoso, circula a partir de um reservatório central. Paralelamente, os sistemas de reservatório aberto consistem num tanque de água, ao qual são adicionados os nutrientes e se recorre à luz natural e ao dióxido de carbono da atmosfera para desencadear o processo de produção. O rendimento destes sistemas é baixo, o que, associado a outras desvantagens como a necessidade de grandes terrenos, a facilidade de contaminação e a dificuldade em prolongar o crescimento durante longos períodos, torna esta alternativa menos viável.⁹

I.2.1 Recursos alternativos para a cultura de Microalgas

Dada a dificuldade e os custos associados ao cultivo de microalgas, e tendo em conta o potencial benefício das suas aplicações, procuram-se cada vez mais alternativas económicas e sustentáveis para realizar este processo. A abordagem mais adequada para otimizar a rentabilidade de um sistema de cultura de microalgas reside na utilização de recursos alternativos, ecológicos e de baixo custo, em particular para o meio de cultura, como é o caso dos resíduos alimentares ou das águas residuais do processamento de alimentos.¹⁰

Contudo, é de salientar que esta estratégia apresenta limitações, quer ao nível da diversidade das fontes dos resíduos utilizados, quer das espécies de microalgas que podem efetivamente crescer nestas condições.¹¹

Em particular, os resíduos alimentares domésticos ou provenientes da indústria são considerados como um dos maiores problemas globais, levantando questões a nível ambiental e ético. O desperdício alimentar traduz-se num gasto de tempo, dinheiro e energia que são necessários para a produção de alimentos; por outro lado, manifesta-se também no aumento da emissão de gases com efeito de estufa, implicando o agravamento do aquecimento global.¹²

De acordo com o *Food Waste Index Report 2024* publicado pelo Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente, o desperdício alimentar não só gera aproximadamente 8–10 % das emissões globais de gases de efeito estufa, como também ocupa o equivalente a cerca de 30 % das terras agrícolas do mundo. O mesmo relatório reporta o desperdício de ca. 1.05 biliões de toneladas mundialmente em 2022, sendo estes resíduos provenientes de habitações (60 %), do setor de serviços de alimentação (28 %) e do comércio retalhista (12 %).¹³

Atualmente, a prioridade a nível mundial é mitigar o impacto negativo proporcionado pela acumulação de resíduos alimentares, enquanto se continua a atender à necessidade crescente de produzir alimentos e energia para a população global, que se estima vir a atingir 10 biliões de habitantes até 2050.¹⁴ Assim, existe uma procura urgente de formas de empregar os desperdícios alimentares de forma a reduzir o seu impacto a nível económico e ambiental.¹⁵

Estes resíduos, ricos em hidratos de carbono, proteínas, lípidos, nitrogénio e fósforo, constituem um substrato rico para a cultura de microalgas, cujo meio de cultura ideal deve ser composto não só por elementos inorgânicos, como também por carbono, componente principal de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células, que pode ser igualmente fornecido pelos desperdícios alimentares.¹⁶ Não obstante, a fonte de carbono tipicamente empregue para a produção de biomassa de microalgas autotróficas é o dióxido de carbono e as suas espécies químicas aquosas derivadas, H_2CO_3 , HCO_3^- e CO_3^{2-} . Embora o carbono orgânico também possa ser utilizado para o crescimento de espécies hétero e mixotróficas, é importante explorar qual a melhor via para fornecer este elemento de forma económica.^{16,17}

Desta forma, o cultivo de microalgas num meio de cultura enriquecido com estes desperdícios surge simultaneamente como uma solução para este problema e para o elevado custo associado ao cultivo *standard*.

1.2.2 Microalgas verdes e *Chlorella vulgaris*

As microalgas verdes (*Chlorophyta*), como já referido, são um grupo de microrganismos fotossintéticos que habitam maioritariamente em sistemas aquáticos, sendo consideradas a base da cadeia alimentar destes *habitats*. As algas pertencentes à divisão *Chlorophyta* possuem inúmeras características, sendo algumas delas comuns com as plantas terrestres como, por exemplo, o facto de possuírem cloroplastos revestidos por uma dupla membrana. Estes organelos possuem pigmentos fotossintético, como clorofilas *a* e *b*, bem como pigmentos acessórios nomeadamente carotenos e xantofilas. Destaca-se ainda a composição da parede celular, que consiste numa matriz fibrosa de celulose.^{18,19}

Uma das microalgas verdes mais relevantes na atualidade é a *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*), que, taxonomicamente, pertence ao reino Protista, divisão *Chlorophyta*, sub-divisão *Chlorophytina*, classe *Trebouxiophyceae*, ordem *Chlorellales*, família *Chlorellaceae* e género *Chlorella*.²⁰ É um microrganismo unicelular eucariota, que cresce em água doce e cuja integridade genética se tem mantido constante ao longo dos 2.5 biliões de anos desde o seu aparecimento, durante o período pré-Câmbrico.^{6,8} Possui a capacidade de alterar o seu metabolismo consoante a fonte de carbono e a concentração disponível, pelo que pode exibir um comportamento fotoautotrófico, heterotrófico ou mixotrófico.⁸

Ao longo dos últimos anos, esta microalga tem vindo a ser utilizada em diversas indústrias (alimentação, nutracêutica, cosmética e biofarmacêutica) devido à capacidade de produção e recuperação dos seus metabolitos, nomeadamente proteínas, lípidos, amido, clorofilas, ácidos polinsaturados, vitaminas e minerais, como vitamina B₁₂, ferro, potássio, fósforo e cálcio.^{21,22}

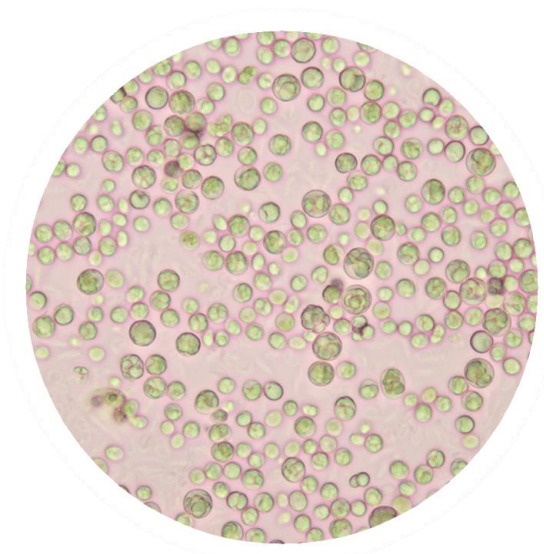


Figura I.1 - Observação a microscópio ótico de uma cultura de *Chlorella vulgaris*.²¹

I.2.3 Extração e isolamento de compostos bioativos

Para além da biomassa, os compostos obtidos a partir da mesma têm potencial para serem transformados em produtos de alto valor acrescentado em diversas indústrias, tornando-se relevante a extração e o doseamento eficientes dos mesmos.²³ Os métodos utilizados convencionalmente envolvem, em grande parte, a extração com solventes orgânicos, tornando-os pouco adequados no que diz respeito à saúde humana e ao meio ambiente, acarretando um elevado gasto de energia e períodos de extração longos. Para além disso, os compostos bioativos podem ser sensíveis ao calor ou à utilização de determinados solventes, pondo em causa a sua integridade estrutural.^{23,24}

Face a estas adversidades, a procura por técnicas de extração mais eficientes, económicas e sustentáveis tem vindo a aumentar. Nas últimas décadas, têm sido exploradas metodologias de extração assistidas por enzimas (EAE), por micro-ondas (MAE) e ultrassons (UAE), bem como a extração por fluídos supercríticos (SPE) e por líquidos pressurizados (PLE), sendo utilizadas com sucesso em aplicações nas indústrias farmacêutica e alimentar, revelando um maior rendimento, aliado a um menor tempo de extração e a um menor custo.^{23,24}

A abordagem da MAE permite obter elevados rendimentos para extratos de compostos biológicos comparativamente aos métodos tradicionais, destacando-se como uma alternativa mais ecológica devido ao uso mínimo de solventes, preferência por solventes não corrosivos, um curto período de extração e uma baixa relação de consumo de energia e temperatura. A irradiação de micro-ondas provoca o aumento da temperatura do solvente pelo movimento de moléculas polares e a rotação de dipolos, promovendo a transição dos compostos bioativos da matriz da amostra para o solvente. Adicionalmente, trata-se de um método versátil relativamente ao solvente utilizado (por exemplo, água, acetona, etanol ou metanol), podendo ser aplicado em diferentes situações.²⁵

I.2.4 Métodos de doseamento de compostos bioativos

Sendo as microalgas ricas numa enorme diversidade de compostos bioativos, como referido anteriormente, a presente Secção engloba uma breve contextualização sobre as técnicas utilizadas para o doseamento dos pigmentos, hidratos de carbono totais, β -(1,3)-D-glucanos, polissacáridos (sulfatados, ácidos e totais), proteínas, compostos fenólicos e compostos flavonoides presentes nesta biomassa.

I.2.4.1. Quantificação dos pigmentos

Ao longo das últimas décadas, as microalgas têm vindo a ser procuradas como uma fonte promissora de clorofilas e carotenoides em diversas indústrias. Estes são pigmentos naturais, destacando-se entre as suas fontes biológicas as microalgas pelo seu rápido crescimento, elevada eficiência fotossintética, produção de metabolitos e baixa emissão de gases de efeito de estufa. São, geralmente, classificados em vários tipos estruturais: tetrapirróis, carotenoides, flavonoides, curcuminoides, betaínas, entre outros.²⁶

Os pigmentos que se encontram em maior quantidade nas microalgas são os tetrapirróis e os carotenoides. Os tetrapirróis são, por sua vez, os pigmentos mais abundantes nos organismos vivos de forma geral, incluindo as clorofilas, o citocromo C, a vitamina B₁₂ e a coenzima F430, que estão associados a um largo gradiente de cores (incluindo vermelho, amarelo, verde, azul e roxo), bem como a ótimas propriedades antioxidantes, anticancerígenas e antimutagénicas, revelando um excelente potencial a nível de aplicações biológicas. Dentro dos tetrapirróis, destacam-se as clorofilas, responsáveis não só pela cor verde das plantas, como também pela fotossíntese.²⁷

Por outro lado, os carotenoides são compostos associados à recolha de luz e à fotoproteção sendo, por isso, sintetizados por todos os organismos fotossintéticos. São constituídos por uma cadeia principal isoprenoide de quarenta átomos de carbono, responsáveis por várias colorações entre o amarelo e o vermelho. Estes pigmentos podem ser divididos em dois subgrupos: os carotenos formados por carbono e hidrogénio, sem oxigénio, como o α -caroteno e o β -caroteno, e as xantofilas, que contém oxigénio, incluindo moléculas como a luteína, zeaxantina e violaxantina. As aplicações dos carotenoides estão direcionadas para a biotecnologia, como antioxidantes, para a indústria alimentar, como corantes, e para as indústrias cosmética e farmacêutica.^{28,29}

O método utilizado com maior frequência para a quantificação do teor de pigmentos numa amostra foi descrito por Lichtenthaler *et al.*²⁹ em 1987, baseado na determinação de coeficientes de absorção específicos a determinados comprimentos de onda associados aos pigmentos. Por sua vez, são aplicados a equações matemáticas características do solvente utilizado na extração dos pigmentos.

I.2.4.2. Métodos colorimétricos

Devido à sua especificidade, elevada sensibilidade e eficiência, os métodos colorimétricos são considerados dos mais eficazes para a deteção de biomoléculas, como é o caso dos

compostos presentes nas microalgas. São de fácil aplicação e têm por base procedimentos simples que permitem uma análise rápida e visualmente clara.³⁰

O método colorimétrico descrito como mais eficaz, fácil e fiável para a determinação do teor de hidratos de carbono é o método do fenol-ácido sulfúrico, desenvolvido por Dubois *et al.*³¹ em 1956 e otimizado por Masuko *et al.*³² em 2004. O seu princípio de funcionamento reside na desidratação dos hidratos de carbono a derivados de furfural aquando da reação com o ácido sulfúrico. Posteriormente, a reação dos derivados de furfural com fenol forma complexos de cor acastanhada que absorvem luz na região do visível ($\lambda_{\text{abs}} = 490 \text{ nm}$), permitindo quantificar o teor de hidratos de carbono presente numa amostra.

Os β -(1,3)-D-glucanos são um dos tipos de polissacáridos que têm, ao longo dos anos, despertado a atenção da comunidade científica pelos seus vários benefícios a nível da saúde, nomeadamente as suas funções hipoglicémicas, imunomoduladoras, antibacterianas e antitumorais. Estes compostos existem em abundância em várias espécies de cogumelos, bactérias e algas³³. Desta forma, a quantificação destes composto com estrutura em tripla hélice é conseguida especificamente utilizando o corante *Congo red*, cuja interação específica com os β -(1,3)-D-glucanos é detetada pelo desvio batocrómico de 488 para 516 nm (> 20 nm) através de espectrofotometria de UV-Vis.^{34,35}

Os polissacáridos sulfatados são compostos comuns em várias espécies de microalgas, podendo desempenhar diversas funções, como formar invólucros de mucilagem que proporcionam uma proteção para estes microrganismos face a alterações ambientais bruscas e adversas, através do aumento do teor em ácidos urónicos, sulfatos e fucose aquando situações de *stress*. Para além disso, os grupos carboxilo e sulfato presentes nestes polissacáridos permitem a desintoxicação provocada pelos metais pesados.¹ O estudo deste tipo de polissacáridos direciona-se, assim, para a sua aplicação na indústria farmacêutica e alimentar, na medicina regenerativa e na agricultura.^{36,37}

Dada a relevância destes compostos a sua quantificação e caracterização é de extrema importância. Hahn *et al.*³⁸ reportaram um método colorimétrico baseado na afinidade entre a carga catiónica de corantes às regiões de ligação aniónicas de hidrocolóides, levando à mudança de cor. Por conseguinte, o corante utilizado foi o azul de toluidina, observando-se um decréscimo da absorvância monitorizada a 632 nm.

Dentro da classe dos polissacáridos, é também possível quantificar os polissacáridos ácidos através do método do carbazol-ácido sulfúrico descrito por Bitter *et al.*³⁹ e, mais tarde, otimizado por Cesaretti *et al.*,⁴⁰ que tem por base a adição de ácido sulfúrico concentrado a uma amostra, seguido da adição de carbazol. Sob o aumento da temperatura, a mistura

reacional adquire uma cor avermelhada resultante das reações de desidratação e de hidrólise que decorrem. Uma vez concluída a reação, a absorvância é medida a 525 nm.⁴¹

O método de Bradford, ou o método de ligação do Azul de Coomassie, desenvolvido por Bradford *et al.*⁴² em 1976, é amplamente conhecido na comunidade científica como um procedimento de fácil execução e sensível à detecção de proteínas, relevante pela abundância destas biomoléculas em todos os sistemas biológicos.⁴³ Este método baseia-se nas duas colorações associadas ao reagente Azul de Coomassie (*Coomassie Brilliant Blue G-250*), que transita de uma tonalidade avermelhada em meio ácido, para azul perante a ligação do corante ao grupo amino das proteínas. O complexo formado apresenta um elevado coeficiente de extinção e permanece disperso em solução aquosa durante ca. uma hora, apresentando uma elevada sensibilidade.⁴⁴

Os compostos fenólicos são considerados metabolitos secundários, produzidos em abundância em vários processos fisiológicos das plantas, assim como das algas, permitindo que estes seres vivos se adaptem a condições de crescimento adversas. A sua concentração depende de fatores externos, como o tipo de habitat, a estação do ano, a disponibilidade de luz e nutrientes e a salinidade.⁴⁵ A quantificação destes compostos é normalmente realizada de acordo com o método de Folin-Ciocalteu, onde é produzido um cromóforo azul (com absorção máxima a 765 nm) quando ocorre uma reação de oxidação-redução entre o reagente de Folin-Ciocalteu e a amostra, levando a que este seja reduzido e assuma nova tonalidade.⁴⁶

Entre os mais de 10 000 tipos de compostos fenólicos naturais, encontram-se também os compostos flavonoides, cuja concentração total numa amostra é, habitualmente, determinada através do método colorimétrico do cloreto de alumínio, desenvolvido originalmente por Christ *et al.*⁴⁷ em 1960. Este método baseia-se na utilização de Al(III) como um agente complexante, formando complexos quelantes de Al(III)-flavonoides, já que o facto de possuírem vários grupos oxo- e hidroxilo concede aos flavonoides uma elevada afinidade a iões metálicos, com absorção máxima a ca. 510 nm.⁴⁸

1.2.4.3. Quantificação de lípidos

À semelhança do referido anteriormente, as microalgas possuem a capacidade de produzir grandes quantidades de lípidos, tornando-as uma promissora fonte de energia sustentável para a produção de biodiesel. Entre os diferentes tipos de lípidos presentes na composição das microalgas, em particular da *C. vulgaris*, constam glicolípidos, hidrocarbonetos, fosfolípidos e ácidos gordos livres, que são sintetizados pelos cloroplastos e integram a

parede celular e as membranas dos organelos, possuindo também uma função estrutural. Devido à sua abundância na composição da biomassa e às suas vantajosas potenciais aplicações, a extração eficiente de lípidos tem vindo a ser alvo de estudo pela comunidade científica.^{6,49}

A extração contínua em Soxhlet, descrita por Silva *et al.*,⁵⁰ é considerada uma técnica convencional simples, que tem por base a realização de ciclos sucessivos de condensação e refluxo do solvente, enquanto a biomassa permanece em contacto com o mesmo, aumentando o rendimento da extração. Embora o sistema de refluxo permita a redução da quantidade de solvente utilizada, esta é ainda significativamente superior ao desejável. Esta abordagem envolve o uso de solventes tóxicos e um longo tempo de extração, o que constitui uma desvantagem para o método.⁵¹

Alternativamente, com o desenvolvimento tecnológico e dos métodos analíticos, o método do SPV (sulfofosfovanilina) descrito por Anschau *et al.*⁵² surge como uma técnica mais inovadora, que requer quantidades muito reduzidas de extrato para a quantificação destes compostos. Esta reação decorre em duas etapas distintas, onde a amostra reage, inicialmente, com ácido sulfúrico concentrado, proporcionando a formação de iões de carbono relativamente estáveis. Posteriormente, é adicionada a vanilina levando ao aparecimento de um cromóforo rosa, com absorvância máxima a ca. 530 nm.

I.3. NANOMATERIAIS DE CARBONO

Os nanomateriais de carbono (NM_sC) são partículas microscópicas, cujo tamanho varia entre 1 e 100 nm e cujas excelentes propriedades óticas, baixa toxicidade e boa biocompatibilidade tem vindo a atrair a atenção da comunidade científica. Estas características têm motivado a sua aplicação em diferentes áreas, nomeadamente a nível medicina, cosmética, farmacêutica, energia e alimentação.^{53,54}

Incluídos na classe dos NM_sC, destacam-se os pontos de carbono (PsC), descobertos em 2004 por acidente por Xu *et al.*⁵⁵ aquando da purificação de nanotubos de carbono de parede única. Os PsC caracterizam-se pelo seu tamanho inferior a 10 nm, a sua morfologia *quasi*-esférica e excelentes propriedades óticas (e.g. intensa fluorescência, geralmente na região do azul e elevada fotoestabilidade), bem como a sua boa solubilidade em meio aquoso, facilidade de funcionalização superficial, inércia química, baixa toxicidade e elevada biocompatibilidade.^{54,56}

Este tipo de nanomateriais pode ser classificado em três categorias: pontos quânticos de grafeno (PQsG), nanopontos de carbono (NPsC) e pontos de polímero carbonizado (PsPC), como é exemplificado na Figura I.2. A maioria dos PsC é normalmente constituída por um núcleo de carbono com hibridações sp^2/sp^3 contendo grupos funcionais na sua superfície, sendo a sua composição estrutural dependente do método de síntese e da natureza da fonte de carbono. O método de síntese pode também ter influência sobre os grupos funcionais à superfície dos nanomateriais o que, por sua vez, é relevante no que diz respeito ao seu campo de aplicação, seja a nível da bioimagem, sensores biológicos, dispositivos optoelectrónicos ou detetores de explosivos, entre outras.^{54,56,57}

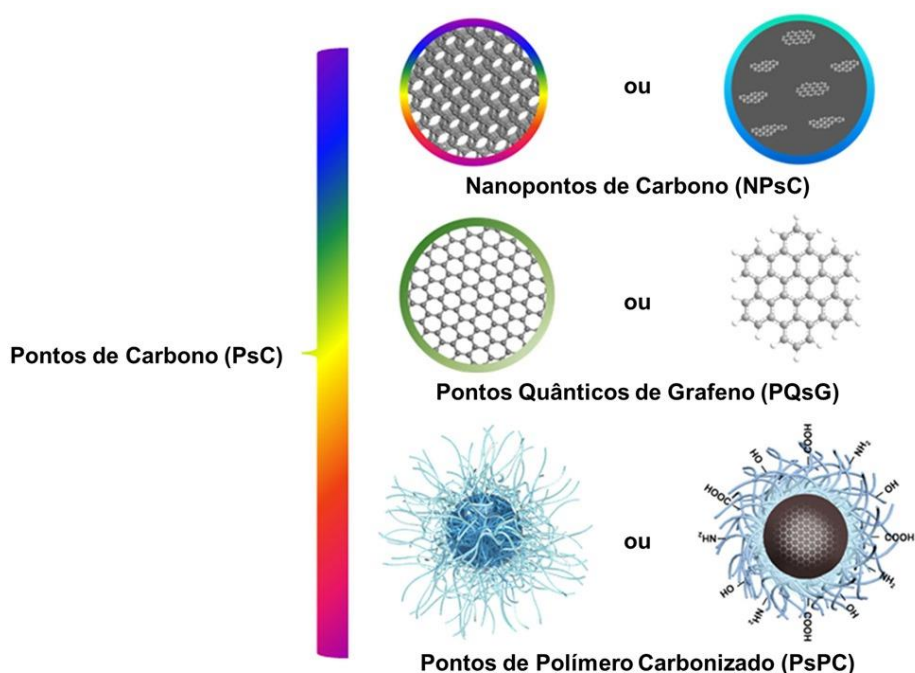


Figura I.2 – Diferentes tipos de PsC. Adaptado de Sun *et al.*⁵⁶

É de salientar que os pontos de carbono se evidenciam entre os restantes nanomateriais pela sua vertente ecológica, não só pela facilidade do processo de síntese e pelo facto de poderem ser sintetizados a partir de precursores orgânicos, mas também por serem uma alternativa aos pontos quânticos baseados em metais tóxicos (como os PQsG, óxidos metálicos e pontos quânticos inorgânicos), que possuem um efeito prejudicial a nível da saúde humana e do meio ambiente.⁵⁶ Destacam-se os PsC obtidos a partir de matérias-primas sustentáveis, como é o caso dos resíduos alimentares, plásticos de uso único ou subprodutos da indústria.⁵⁸

I.3.1 Métodos de Síntese

A estratégia adotada para a síntese de PsC tem uma grande influência nas características dos nanomateriais obtidos, nomeadamente a nível das suas propriedades físicas e químicas. Para além do método de síntese, também a fonte de carbono e o agente de funcionalização da superfície têm um impacto nas propriedades destes compostos.⁵⁹ A síntese de PsC engloba duas estratégias principais, a metodologia “*top-down*” e a “*bottom-up*” (Figura I.3.).

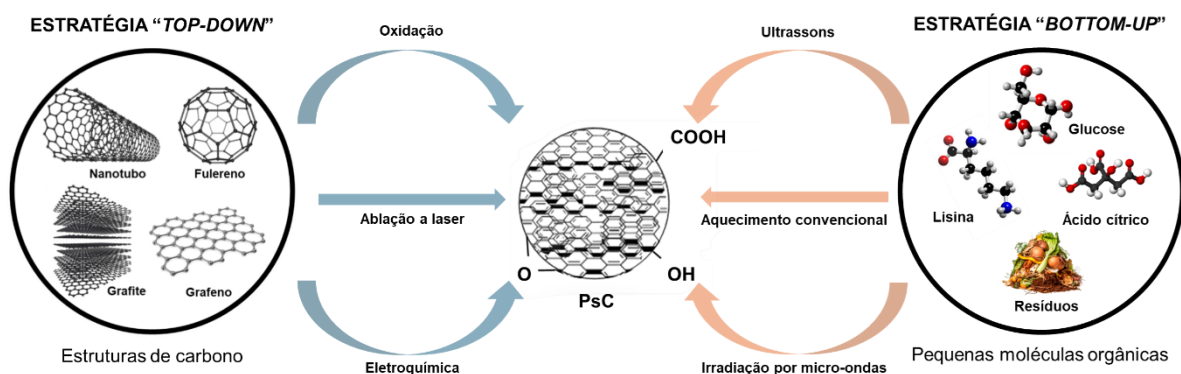


Figura I.3 - Estratégias de síntese de PsC, *top-down* e *bottom-up*. Adaptado de Tesa *et al.*⁶⁰ e Pathak *et al.*⁶¹

I.3.1.1. Métodos *top-down*

A abordagem *top-down* envolve a preparação de PsC a partir de materiais de partida, como a grafite, nanotubos de carbono ou grafeno, sob condições físicas ou químicas específicas. São exemplos destes métodos a ablação a laser, a oxidação química e elétrica, a descarga de arco e a síntese por ultrassons, partindo todos do mesmo princípio, que consiste em quebrar estruturas de carbono de maior tamanho em porções progressivamente menores, até atingir as dimensões nanométricas desejadas. Apesar de adequada para a produção em massa de PsC, uma das desvantagens desta estratégia reside no longo tempo de processamento, bem como na utilização de materiais de partida e equipamentos dispendiosos.^{53,61,62}

No método de descarga de arco, os PsC são sintetizados a partir de fuligem de nanotubos de carbono, como no estudo realizado por Madhurima *et al.*,⁶³ onde foram preparados PsC com propriedades de adsorção a corantes orgânicos. Jumardin *et al.*⁶⁴ estudaram a síntese através de ablação a laser, onde macromoléculas orgânicas mais complexas (neste caso, foi utilizado chá como precursor) são submetidas à radiação laser, libertando partículas de carbono de escala nanométrica a partir da estrutura “mãe”, que foram empregues em imagiologia. Já os

métodos eletroquímicos envolvem o tratamento de nanotubos de carbono ou grafite em soluções específicas para preparar os PsC através de um processo eletrolítico, como é o caso dos nanocristais fluorescentes preparados por Zhou *et al.*⁶⁵ a partir de nanotubos de carbono de múltiplas camadas.

Qualquer um destes métodos é eficaz para produzir estes nanomateriais com boas propriedades fotoluminescentes e tamanhos controlados, adequados para diversas aplicações analíticas e biológicas.^{56,62}

I.3.1.2. Métodos *bottom-up*

O princípio de funcionamento da estratégia *bottom-up* para a síntese de pontos de carbono reside na polimerização de precursores orgânicos, através da sua carbonização ou pirólise. Entre estes precursores orgânicos, são exemplos glucose, sacarose e ácido cítrico, que sofrem carbonização por processos como a deposição química em vapor, tratamento por plasma, irradiação assistida por micro-ondas, tratamento hidrotérmico com aquecimento convencional ou fusão química gradual, que geram pontos de carbono com uma composição heterogénea de átomos de carbono sp^2 e sp^3 .^{53,66}

Este método permite um elevado grau de controlo no processo de síntese, sendo conhecido pela sua capacidade de sintetizar PsC com propriedades e estruturas específicas, oferecendo uma alternativa versátil e precisa para o *design* destes nanomateriais para determinadas aplicações incluindo a biomedicina e a nanotecnologia.^{53,61}

Embora os materiais de carbono sejam, idealmente, os mais adequados para a síntese de pontos de carbono em macroescala, o uso de quantidades substanciais de agentes oxidantes (ácidos fortes) e energia, pode conduzir à obtenção de produtos dispendiosos e implicações a nível ambiental. Desta forma, moléculas baseadas em biomassa são alternativas sustentáveis, uma vez que este recurso possui uma ampla diversidade, vasta disponibilidade, fácil processamento e potencial para síntese em grande escala.⁶⁶

Assim, é cada vez mais frequente a utilização de fontes de carbono alternativas como precursores para a síntese *bottom-up* de PsC. Nos últimos anos, foram reportadas diferentes abordagens para a preparação destes nanomateriais, utilizando como materiais de partida resíduos agroalimentares e agroindustriais, como polpa de bagaço da cana do açúcar, casca de banana, resíduos de chá, cascas de amendoim, borra do café e até águas residuais da indústria do azeite.⁶⁷⁻⁷¹

Athika *et al.*⁷² preparam PQsC a partir de leite desnatado para a sua utilização como sondas fluorescentes seletivas e sensíveis à presença do ião Cr⁶⁺. Paralelamente, e com o objetivo de detetar o mesmo ião, foram sintetizados por Tai *et al.*⁷³ PsC luminescentes a partir de cascas de camarão.

Por outro lado, a biomassa de microalgas tem vindo a ser explorada como uma excelente fonte de carbono para a síntese de PsC. Estes organismos estão associados a diversas vantagens para além da sua disponibilidade no meio ambiente, como fácil manuseamento, possibilidade de síntese a baixas temperaturas com maior eficiência energética, menor toxicidade, menor risco para o ambiente e maior biocompatibilidade.⁷⁴ Chatzimitakos *et al.*⁷⁵ sintetizaram NPsC a partir da microalga *Dunaliella salina* para a preparação de filtros de proteção solar, demonstrando boa absorção de radiação UV e não apresentando toxicidade em células eucariotas. Paralelamente, já foram também realizados estudos para a síntese de PsC recorrendo às espécies *Chlorella sorokiniana*⁷⁶ e *Porphyridium cruentum*.⁷⁷

I.3.1.3. Funcionalização Superficial

A funcionalização da superfície contribui para o aperfeiçoamento das propriedades óticas e da estabilidade destas nanopartículas, influenciando as suas propriedades de absorção e emissão.⁶² O processo de modificação da superfície depende dos precursores utilizados e das condições da reação, levando, conseqüentemente, a diferenças cruciais ao nível das propriedades fotofísicas dos PsC.^{78,79} Os grupos polares carboxilo, hidroxilo ou amino são os grupos superficiais mais comuns neste sentido.

Os pontos de carbono não funcionalizados possuem algumas desvantagens face aos PsC superficialmente modificados, podendo apresentar baixos rendimentos quânticos de fluorescência e reduzida biocompatibilidade, diminuindo o seu potencial para aplicações ao nível da imagiologia. Por outro lado, a ausência de grupos específicos à superfície destas nanopartículas pode interferir na interação com moléculas-alvo, impedindo a sua utilização como biossensores. Assim, é necessário aprimorar não só o processo de síntese, como também a funcionalização da superfície, permitindo a preparação de PsC com propriedades específicas e com potencial para diversas aplicações.⁸⁰

As abordagens de síntese que têm por base reações químicas, como a modificação covalente, são desejáveis por permitirem um melhor controlo do tamanho, passivação da superfície e propriedades físicas das partículas. Por outro lado, a funcionalização não covalente baseia-se nas interações π ou nas forças Van der Waals entre pontos de carbono e reagentes

modificados. Estas não só possuem um menor impacto sobre a estrutura dos PsC, como também viabilizam a melhoria das suas propriedades fotoluminescentes e interfaciais.⁸⁰

Desta forma, um dos métodos mais simples para a funcionalização da superfície é a modificação covalente, permitindo a formação de ligações entre grupos funcionais reacionais (grupos carboxilo, hidroxilo ou amino) e os grupos redutores na superfície dos PsC.⁸¹ As operações de passivação incluem normalmente a formação de uma fina camada isolante, pela ligação de polímeros orgânicos, como PEG, a oxidação da superfície com ácidos fortes e a funcionalização dos PsC oxidados com sais inorgânicos (ZnO ou ZnS) ou heteroátomos (S ou N).⁸² A passivação dos nanopontos de carbono permite, em muitos casos, várias aplicações biológicas, nomeadamente a imagiologia *in vivo*.

I.3.2 Propriedades Fotofísicas

De uma forma geral, os PsC apresentam absorção ótica na região do ultravioleta, com duas bandas distintas a 260-300 nm e 300-360 nm, associadas a uma cauda que se estende para a região do visível. A presença destas bandas no perfil de absorção é atribuída às transições $\pi-\pi^*$ das ligações C=C da rede de carbono, a 260-300 nm, e $n-\pi^*$ das ligações C=O, a 300-360 nm. Considera-se ainda que a zona do espectro que se estende para a região do visível tenha origem nos grupos funcionalizados à superfície dos PsC.^{58,83-85}

A fluorescência destas nanopartículas é, possivelmente, a propriedade fotofísica que mais se destaca, existindo uma clara dependência entre o comprimento de onda de emissão e a intensidade de fluorescência. Para além disso, esta propriedade é ainda dependente da funcionalização superficial, podendo ser sintonizada de acordo com as características e aplicações que se pretendem para os PsC.⁸³ O perfil de emissão destes nanomateriais atinge o seu máximo na gama espectral entre o azul e o verde, embora continue incerto se esta dependência se deve à seleção ótica de nanopartículas de diferentes tamanhos ou à existência de armadilhas de superfície.⁸⁵

A origem das propriedades fotoluminescentes dos PsC tem vindo a ser, ao longo do tempo, associada a diferentes mecanismos. Embora não exista na literatura um consenso em relação a este assunto, considera-se que fatores como o efeito de confinamento quântico e a influência do estado de superfície (dopagem, funcionalização, interação com o solvente e pH), influenciam as propriedades luminescentes destes nanomateriais.^{58,86} A variedade das propriedades fotoluminescentes destas nanopartículas é vasta e revela a complexidade da estrutura eletrónica das mesmas, salientando a possibilidade de desenvolver PsC com

propriedades específicas, desejadas para determinadas aplicações, através de alterações químicas.⁸⁷

Alguns PsC apresentam fotoluminescência dependente da excitação, o que implica que o comprimento de onda de emissão varie com o comprimento de onda de excitação. Este comportamento é frequentemente associado à presença de diferentes pontos de emissão ou estados de superfície variados dentro das nanopartículas.^{86,87}

O princípio subjacente à fluorescência envolve a excitação dos átomos pela irradiação de luz, levando a que os elétrões que orbitam em torno do seu núcleo transitem do estado estacionário para o primeiro ou segundo estado excitado, libertando energia sob a forma de luz ao retornarem ao estado original. Assim, as propriedades fotoluminescentes dos PsC estão intimamente ligadas ao seu comportamento sob irradiação, passando por um processo de separação de cargas aquando da exposição à luz. Sob a luz UV ou visível, os pontos de carbono exibem, tipicamente, uma fotoluminescência azul, embora a cor emitida possa variar consoante os precursores utilizados, a funcionalização superficial e o método de síntese.^{59,87,88}

A fluorescência dos PsC depende ainda do estado molecular, determinado apenas pelas moléculas luminescentes agregadas à superfície ou ao interior das nanopartículas.^{89,90} A sua emissão inclui estados intrínsecos, estados de defeito e estados moleculares, sendo os dois primeiros não sensíveis ao solvente, enquanto as emissões dos estados moleculares possuem uma elevada sensibilidade ao ambiente envolvente, nomeadamente à interação entre solutos e solventes.⁹¹

Por outro lado, foi demonstrado que a fluorescência dos PsC pode estar dependente do seu tamanho. Li *et al.*⁹² estudou a síntese de pontos de carbono de diferentes tamanhos através de um método eletroquímico assistido por metais alcalinos, concluindo que as propriedades fotoluminescentes dos mesmos estavam intimamente relacionadas com as suas diferentes dimensões, pelo que as partículas menores emitiram luz UV, as partículas de tamanho moderado emitiram luz visível e a emissão das partículas de maior tamanho incidiu na zona dos infravermelhos.

A emissividade destas partículas pode ser quantificada pelo rendimento quântico de fluorescência (Φ_F), que consiste no número de fotões emitidos relativamente ao número de fotões absorvidos. Os valores de Φ_F variam, tipicamente, entre ca. 8-22 %.⁹³⁻⁹⁵ Desde a sua descoberta, tem vindo a ser possível obter rendimentos quânticos de fluorescência mais elevados, motivados pela modificação ou passivação da superfície, alteração das condições de síntese e utilização de diferentes precursores.⁸²

Para além de excelentes propriedades de fluorescência, outra característica distintiva dos PsC é a sua ótima fotoestabilidade, maioritariamente devido ao seu centro fotoluminescente de carbono e à sua interação com os grupos químicos à superfície.⁹⁶

I.3.3 Biocompatibilidade e Bioatividade

Quando comparados a outros nanomateriais fluorescentes, como os PQsC, os pontos de carbono destacam-se pela sua biocompatibilidade e ausência de toxicidade, tornando-os mais adequados para aplicações no campo da saúde.^{88,97} A biocompatibilidade refere-se à capacidade de um biomaterial desempenhar a sua função sem provocar efeitos tóxicos ou prejudiciais nos sistemas biológicos, mas produzindo uma resposta adequada do hospedeiro num caso específico.⁹⁸

A biocompatibilidade é um dos requisitos obrigatórios na avaliação e desenvolvimento de materiais para utilização em diferentes áreas, nomeadamente produtos médicos e a sua aplicação em organismos vivos. A avaliação da biocompatibilidade tornou-se obrigatória e foi incluída em paralelo à avaliação das propriedades mecânicas, físicas e químicas destes materiais.⁹⁹ A avaliação biológica dos biomateriais inclui um vasto espetro de testes *in vitro* e *in vivo* relacionados com a citotoxicidade, genotoxicidade, pirogenicidade, sensibilização, hemocompatibilidade, imunotoxicidade, carcinogenicidade, implantação e degradação, tal como especificado em diferentes normas internacionais.^{99,100}

Atualmente, o conceito de biocompatibilidade inclui não só a bio-inércia, mas também a biofuncionalidade e a bioestabilidade. A elevada biocompatibilidade e as propriedades funcionais são altamente desejáveis para os novos biomateriais.⁹⁸ Assim, qualquer material bioativo que se destine a ser utilizado numa aplicação de tecnologia médica deve “dirigir de forma benéfica e adequada as interações entre o dispositivo e o sistema hospedeiro através da modulação da atividade biológica”. Este processo deve ser intencional (ou seja, por conceção e não por acaso), o que implica que as interações com o hospedeiro sejam bem compreendidas.¹⁰¹

I.3.3.1. Citotoxicidade

Como referido anteriormente, a avaliação da citotoxicidade de PsC tornou-se um dos estudos mais importantes a realizar de forma a perceber a aplicabilidade dos mesmos à nanomedicina. Embora o seu potencial a nível destas aplicações possa ser amplo, é necessário considerar os riscos que estas nanopartículas possam implicar aos sistemas biológicos.

Para ser aprovado num teste de citotoxicidade *in vitro*, um produto ou dispositivo não pode provocar a morte das células nem afetar as suas funções celulares. Os efeitos citotóxicos podem comprometer a viabilidade celular quando provocam danos celulares intensos, condicionando a integridade estrutural e/ou metabólica das células, assim como a sua integridade reprodutiva provocando uma série de efeitos destrutivos. Através de técnicas de cultura de células, podem ser detetadas algumas destas ocorrências, como a sua lise, inibição do seu crescimento e outros efeitos que possam ser desencadeados nas mesmas.¹⁰²

Desta forma, a citotoxicidade *in vitro* é frequentemente avaliada recorrendo ao método do sal tetrazólio amarelo, MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), devido à sua rapidez e praticidade. Este método permite a medição da atividade metabólica das células através da determinação do número de células em proliferação após a aplicação dos nanomateriais, baseando-se na clivagem do sal para formar formazona cuja concentração é proporcional ao número de células vivas.¹⁰³

A literatura reporta diferentes estudos que corroboram o carácter não-tóxico dos pontos de carbono, como é o caso de Chouzende *et al.*,⁷⁷ que procuraram avaliar a citotoxicidade de PsC sintetizados a partir da biomassa da microalga *P. cruentum* através de um ensaio de MTT, contra células tumorais de sarcoma de murganho (S180) e células não-tumorais de fibroblastos embrionários (NIH-3T3), onde não verificaram efeitos tóxicos contra células animais estudadas. Para a linha celular S180, verificou-se ainda que a viabilidade celular se manteve entre 80-100 %, começando a decrescer apenas a concentrações acima de $2 \times 10^3 \mu\text{g mL}^{-1}$.⁷⁷ Foram também reportados resultados relativos à síntese de PsC utilizando a polpa de bagaço da cana-de-açúcar como precursor, apresentando uma citotoxicidade extremamente baixa perante células de adenocarcinoma do pulmão humano, com uma viabilidade celular ca. 90 % até concentrações de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e após 48 h de incubação.¹⁰⁴ Adicionalmente, PsC preparados a partir de águas residuais de produção de azeite foram testados contra linhas celulares de fibroblastos de rato (L929) e do colo do útero de Henrietta Lacks (HeLa), demonstrando elevadas taxas de viabilidade celular até concentrações de PsC de $5 \times 10^2 \mu\text{g mL}^{-1}$.⁷⁰

A citotoxicidade *in vivo* requer o estudo das interações entre as nanopartículas e os diferentes componentes celulares das estruturas dos tecidos num determinado órgão e a sua interação com a matriz extracelular.⁶⁶ Assim, é possível testar os PsC num sistema biológico de maior complexidade, bem como avaliar outras propriedades como a via de administração, biodistribuição, biodegradação, disposição a longo prazo e indução de defeitos a nível do desenvolvimento.¹⁰⁴

O peixe-zebra, *Danio rerio*, é um organismo modelo utilizado com frequência nestes ensaios devido à semelhança do seu genoma e do seu metabolismo com o humano. O seu rápido desenvolvimento embrionário *ex-utero* e curto tempo de geração, assim como a elevada fecundidade da espécie e transparência ótica, apresentam-se como vantagens face a outros animais vertebrados.¹⁰⁴ A *Artemia salina* é também uma alternativa bastante utilizada, sendo considerada um dos organismos mais adequados para testes toxicológicos devido à sua rapidez, disponibilidade e baixo custo associado à realização dos ensaios. Os ovos deste microcrustáceo possuem uma elevada taxa de eclosão e são de fácil acesso, por serem facilmente encontrados em locais de venda ao público. Para além disso, o facto destes organismos não possuírem corda dorsal faz com que estejam isentos de autorização por parte de centros éticos, destacando-se com uma alternativa mais viável que o uso de roedores.^{105,106}

Dias *et al.*¹⁰⁴ estudaram a biocompatibilidade de PsC sintetizados a partir de frutas, realizando ensaios *in vivo* com embriões de peixe-zebra, tendo verificado que as nanopartículas apresentavam toxicidade a partir de concentrações superiores a 1.5 mg mL⁻¹, não se observando quaisquer defeitos de desenvolvimento em fases iniciais da embriogénese. Contudo, este estudo concluiu que os PsC poderiam influenciar a coordenação neuro-motora do peixe-zebra em estágios iniciais de vida, uma vez que demonstraram alterações nos seus padrões de natação, movimentos espontâneos e ritmo cardíaco. Para o efeito, foram utilizadas diferentes frutas como precursores e foram obtidos diferentes resultados para cada tipo de PsC, permitindo concluir que a resposta tóxica depende do material de partida e do método de síntese.¹⁰⁴ Outra espécie de peixe frequentemente utilizada como organismo modelo é a *Poecilia reticulata* (vulgarmente designada por guppy). Num estudo realizado por Jiang *et al.*¹⁰⁷ no qual foram incorporados nanopontos de carbono na alimentação destes seres vivos, foi possível observar através de microscopia a aquisição de fluorescência após a ingestão de comida contaminada com PsC.

Em 2021, Cong *et al.*¹⁰⁸ sintetizaram nanopontos de carbono a partir de carne de pato assada, utilizando *Caenorhabditis elegans* (verme nematódeo que vive em ambientes temperados) como organismo modelo. Os PsC foram integrados na alimentação dos nematódeos, verificando-se que o tratamento com concentrações até 15 mg mL⁻¹ não provocaram a sua morte durante 24 h. Foi observada elevada fluorescência de cor azul na zona do intestino dos organismos que ingeriram as nanopartículas, detetando-se apenas uma fraca autofluorescência naqueles que não as ingeriram, sugerindo que a forma de administração dos PsC pode ser *via* alimentação e que estes se acumulam principalmente no intestino.

I.3.3.2. Atividade Antibacteriana

Uma das maiores ameaças à segurança alimentar e à saúde humana são bactérias resistentes a antibióticos, constituindo um problema global crescente nas últimas décadas. Para além de serem conhecidos pela sua baixa toxicidade *in vitro* e *in vivo*, os nanopontos de carbono têm revelado igualmente um forte potencial antimicrobiano. Quando excitados, os PsC produzem espécies reativas de oxigénio (ROS), responsáveis pela inibição do crescimento ou pela morte de microrganismos através da disrupção da parede ou membrana celular bacteriana e, conseqüentemente a sua penetração, levando o organismo a uma condição de *stress* oxidativo, bem como a danos oxidativos em ácidos nucleicos, proteínas e outros compostos intracelulares.^{59,109}

Assim, estas nanopartículas podem adsorver às paredes celulares bacterianas através de difusão ou interações eletrostáticas, sendo que o efeito eletrostático leva ao isolamento biológico de bactérias em crescimento, prevenindo a sua proliferação. Por outro lado, podem também inibir a formação de biofilmes bacterianos, levando à lise celular ou apoptose do organismo. Os PsC possuem, ainda, a capacidade de se ligar ao DNA e RNA de bactérias e fungos através de ligações não-covalentes, promovendo a alteração da estrutura dos ácidos nucleicos e levando à separação da dupla-hélice de DNA.¹¹⁰

Barata *et al.*¹¹¹ avaliaram as propriedades antibacterianas de PsC sintetizados a partir de resíduos da indústria do tomate contra bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), utilizando a técnica de suscetibilidade à difusão em disco, verificando que as partículas exibiram atividade apenas contra *E. coli*.

Por outro lado, Song *et al.*¹¹² sintetizaram PsC a partir do fumo do tabaco, procurando analisar a sua atividade antibacteriana contra as mesmas espécies bacterianas referidas anteriormente, observando que a incubação destas bactérias com uma solução de 1000 µg mL⁻¹ de PsC durante 6h proporcionou o encurtamento das células dos microrganismos, indiciando inibição celular. Observaram ainda a adesão dos PsC à superfície bacteriana por atração eletrostática graças à carga positiva das nanopartículas, medida através do potencial zeta. Assim, dado o tamanho reduzido dos PsC, estes têm a capacidade de se difundir para o interior da bactéria, podendo degradar o seu material genético, inibindo deste modo o seu crescimento.

Zhao *et al.*¹¹³ reportaram a síntese de PsC a partir de quitosano e etilenodiamina, bem como a avaliação da sua atividade antibacteriana, revelando valores de concentração mínima inibitória (MIC) de 10 µg mL⁻¹ para *S. aureus* e 50 µg mL⁻¹ para *E. coli*. Paralelamente, estudaram a estirpe de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA), para com a

qual as nanopartículas apresentaram uma eficiência antibacteriana elevada, com valores de MIC de 10 µg mL⁻¹.

I.3.3.3. Atividade Antioxidante

Perante um desequilíbrio entre moléculas oxidativas e antioxidativas, podem verificar-se situações de *stress*, implicando problemas fisiológicos. Assim, as moléculas antioxidantes podem prevenir ou até mesmo inibir este tipo de situações, pelo que a avaliação da atividade antioxidante de um determinado composto é de extrema importância.¹¹⁴

O método do radical ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) é frequentemente utilizado para quantificar a capacidade antioxidante de compostos, tendo sido inicialmente proposto por Miller *et al.*¹¹⁵ em 1993 e otimizado por Re *et al.*¹¹⁶ O princípio de funcionamento deste método reside na interação entre um antioxidante e um radical ABTS⁺. A molécula de ABTS apresenta-se como incolor no seu estado natural. Quando oxidada, na presença de persulfato de potássio, assume uma coloração azul-esverdeada. Por conseguinte, o radical ABTS tornar-se-á novamente incolor ao interagir com compostos antioxidantes, reduzindo-se à sua forma não-radicalar.^{114,117}

Roy *et al.*¹¹⁸ reportaram a síntese de pontos de carbono a partir de açafraão e funcionalizados com enxofre. A capacidade antioxidante destes PsC aumentou com o incremento da sua concentração, embora tenham observado divergências entre os PsC com e sem funcionalização da superfície com enxofre, apresentando valores de 90 e 80%, respetivamente.

Incluída na avaliação da atividade antioxidante, é possível determinar a capacidade quelante do ião Fe²⁺ de uma amostra. O ferro é um componente essencial ao corpo humano e a muitos outros organismos vivos, podendo, no entanto, ser tóxico quando em excesso, pelo que a sua concentração deve ser regulada. As consequências associadas ao excesso de ferro conhecidas até agora englobam danos associados à produção de radicais livres, implicando efeitos secundários a todo o organismo, como disfunções cardíacas, endocrinológicas e hepáticas. Consequentemente, agentes quelantes de ferro têm vindo a ser incorporados nos cuidados médicos de forma a diminuir o impacto da toxicidade do ferro na saúde dos pacientes, já que estes compostos formam complexos com os iões de Fe²⁺, impedindo a sua ligação a radicais livres de oxigénio.^{119,120}

A determinação da capacidade quelante de uma amostra é realizada recorrendo à ferrozina, composto com o qual o ião Fe²⁺ forma um complexo de cor avermelhada. Perante a presença de agentes quelantes, este complexo é degradado, pelo que a intensidade da cor diminui,

detetando-se através da leitura da absorvância a 560 nm. Este método foi originalmente descrito por Decker *et al.*¹²¹ em 1990.

Num estudo realizado por Li *et al.*¹²² em 2018, foram utilizados como precursores para a síntese de PsC os produtos da reação de Maillard, também conhecida como a reação de escurecimento não enzimático. Verificaram que a capacidade quelante destas nanopartículas aumentou com a sua concentração, reportando resultados significativamente elevados quando comparados com o controlo positivo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), sugerindo que os iões metálicos envolvidos na formação de radicais hidroxilo são quelados pelas nanopartículas.

I.3.4 Aplicações Biomédicas

Dada a vasta versatilidade dos PsC, concedida pelas suas características estruturais e fotofísicas únicas, esta classe de nanomateriais desperta progressivamente mais o interesse científico e tecnológico pelas suas possíveis aplicações.

Embora o foco deste trabalho sejam as aplicações biomédicas, é relevante destacar outras aplicações amplamente utilizadas dos pontos de carbono. Dos vários exemplos, destaca-se a sua utilização em fotocatalise, processo que consiste na conversão de energia de materiais promovida pelo efeito sinérgico existente entre fotocatalisadores e a luz, com o objetivo de acelerar reações, como a degradação de poluentes e a obtenção de hidrogénio a partir da água. Também a deteção de compostos químicos e biológicos é uma funcionalidade comum destes compostos, motivada pelas suas excelentes propriedades óticas, sensibilidade de fluorescência e a capacidade de funcionarem como dadores de eletrões, permitindo a sua aplicação como sensores. Dentro das suas aplicações gerais, consta ainda a optoelectrónica, visto que, devido às suas propriedades fotoluminescentes os PsC podem ser integrados em dispositivos emissores de luz, incluindo LEDs, lasers e células solares.⁵⁴

I.3.4.1. Imagiologia

A aplicação de PsC ao nível da imagiologia tem vindo a ganhar destaque ao longo das últimas décadas, revelando-se uma das aplicações mais promissoras destas nanopartículas devido não só às suas propriedades biológicas, mas também à sua excelente fotoestabilidade, que se verifica melhor e mais duradoura do que outros marcadores celulares utilizados atualmente.⁵⁸

Em 2013, Ko *et al.*¹²³ sintetizaram PsC utilizando a fuligem de pneus como precursor, com o objetivo de os aplicar em imagiologia, mais precisamente numa linha celular de glioma em ratos, onde verificaram que as nanopartículas foram incorporadas com facilidade dentro das células animais sem funcionalização adicional da superfície, observando-se fluorescência dos mesmos sob diferentes comprimentos de onda e filtros de emissão. Mais recentemente, Wang *et al.*¹²⁴ reportaram a aplicação de PsC a peixes-zebra sintetizados a partir de derivados de *Chlorella* spp. Através deste estudo, observaram que as soluções aquosas de PsC entre concentrações de 0.5 a 2 mg mL⁻¹ permitiram obter excelentes resultados de imagem por fluorescência. Utilizando a concentração mais baixa, à qual se verificava uma menor taxa de mortalidade relativamente ao grupo de controlo, os autores concluíram que a intensidade de fluorescência dos ovos de peixe-zebra não aumentou até atingir 96 horas após a fertilização, enquanto os PsC se acumularam dentro do saco vitelino após a eclosão.

No que diz respeito ainda a ensaios *in vivo*, estas nanopartículas podem também ser aplicadas a organismos mais complexos, nomeadamente em murganhos, como descrito por Tao *et al.*¹²⁵ em 2012. Neste estudo, foram administrados PsC obtidos a partir de nanotubos de carbono recorrendo a injeções subcutâneas, tendo sido possível observar sob diferentes comprimentos de onda de excitação a sua incorporação no organismo. Verificou-se que as imagens adquiridas a comprimentos de onda superiores (a partir de 595 nm) foram de melhor qualidade, embora a fluorescência emitida pelas partículas seja inferior. Neste tipo de estudos, são selecionados comprimentos de onda superiores devido a uma melhor penetração dos tecidos pelos fotões, aliada a uma autofluorescência do fundo reduzida. É de salientar que não foram detetados efeitos tóxicos óbvios perante o tratamento dos murganhos com a solução de PsC, revelando um grande potencial para o seu uso em imagiologia como nanosondas óticas.

I.3.4.2. Nanomedicina e Teranóstica

Ao longo dos últimos anos, a nanotecnologia tem sido utilizada como uma ferramenta da nanomedicina, em particular na prevenção, diagnóstico e terapia oncológica. Sabendo que os métodos convencionais de combate ao cancro provocam efeitos secundários severos ao corpo humano, e tendo em conta que muitos dos fármacos utilizados são pouco solúveis em fluidos biológicos e rapidamente eliminados do organismo, os PsC surgem como um sistema de entrega de fármacos, devido à sua ótica biocompatibilidade e biodegradabilidade, promovendo a prevenção da degradação e eliminação do fármaco.¹²⁶

Zheng *et al.*¹²⁷ reportaram a síntese de PsC com diversas funções no âmbito da teranóstica a partir de um corante de cianina hidrofóbico (CyOH) e polietilenoglicol (PEG 8000), cujas características que se destacam são a sua excelente fotoestabilidade e forte absorção e emissão na zona do infravermelho próximo (600-900 nm). Verificaram uma captação preferencial em tumores, bem como uma elevada taxa de conversão fototérmica ($\eta = 38.7\%$), considerando-se estes PsC como agentes teranósticos ideais para imagiologia de fluorescência na zona do infravermelho próximo e terapia fototérmica *in vitro* e *in vivo*.

Por outro lado, os pontos de carbono podem ser sintetizados de forma a adquirem especificidade a determinados recetores relacionados com a expressão de células cancerígenas, podendo ser empregues como mediadores terapêuticos. Li *et al.*¹²⁸ demonstraram que a funcionalização de PsC com ácido hialurónico permitiu a ligação específica à proteína CD44, que é frequentemente sobre-expressa em vários cenários de cancro, como o da pele, do sangue, do pulmão e da mama. Este estudo procurou observar o efeito anti-tumoral dos PsC, verificando-se uma elevada citotoxicidade para células 4T1 após internalização das nanopartículas.^{128,129}

Alternativamente, uma aplicação vantajosa destas nanopartículas na área da nanomedicina baseia-se na sua utilização como sistemas de distribuição de fármacos. Várias abordagens terapêuticas modernas beneficiam da libertação localizada e controlada de medicamentos, pelo que os PsC podem ser utilizados como nanotransportadores destas moléculas. Wang *et al.*¹³⁰ preparam pontos de carbono de estrutura oca a partir de albumina de soro bovino (BSA), com a capacidade de transportar um fármaco anticancerígeno, verificando-se a rápida internalização das nanopartículas em células A549 e, conseqüentemente, a libertação do medicamento no seu citoplasma, mediada pela variação do pH fisiológico.

Numa perspetiva semelhante, foram desenvolvidos PsC fluorescentes que não só funcionam como um sistema de libertação de fármacos, mas também conseguem fazer a distinção entre células tumorais e não tumorais, tendo por base as diferenças de pH entre os tecidos saudáveis e os tumorais. Sendo a quimioterapia intravenosa uma abordagem agressiva e que potencia a ocorrência de graves complicações, estudos demonstraram que a administração de fármacos por injeção direta na massa tumoral pode minimizar a toxicidade sistémica associada aos mesmos. Assim, a investigação desenvolvida por Zeng *et al.*¹³¹ permitiu testar, pela primeira vez, a injeção de PsC combinados com Doxorubicina para o tratamento do cancro do fígado em murganhos, verificando-se uma redução significativa do tamanho da massa tumoral dos animais que receberam o tratamento, face ao crescimento tumoral daqueles que não foram tratados.

Devido ao seu elevado rendimento quântico, os PsC podem ainda ser utilizados no diagnóstico e tratamento de tumores cerebrais, visto terem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, alcançando assim o sistema nervoso central de forma eficaz e permitindo a deteção precoce de patologias cerebrais.¹³²

Contudo, é importante salientar que, embora estejam a decorrer diversos estudos com o objetivo de desenvolver PsC como mediadores terapêuticos através da especificidade com recetores, considera-se que esta seja ainda uma abordagem associada a várias limitações, nomeadamente o facto de alguns destes recetores se encontrarem não só em células tumorais, como também em células normais, podendo ter um efeito negativo na saúde.¹²⁶

I.3.4.3. Biossensores

Como referido anteriormente, uma das aplicações mais comuns destas nanopartículas de carbono é a sua utilização para a deteção de biomoléculas.⁵³ Resultados reportados por Luo *et al.*¹³³ demonstraram a preparação de um sensor “*on-off-on*” para a determinação do conteúdo de ácido ascórbico em frutas, utilizando PsC funcionalizados com nitrogénio e enxofre que permitiram a deteção desta biomolécula numa gama de 10–200 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Paralelamente, Chen *et al.*¹³⁴ prepararam PsC também funcionalizados com enxofre, registando a sua ótima seletividade e sensibilidade para a glucose, baseada na oxidação catalítica desta molécula e na produção de H_2O_2 . Este sensor foi testado numa amostra de soro humano e comparado com um monitor de glucose tradicional, permitindo obter resultados aproximadamente idênticos.

Um estudo desenvolvido por Wibrianto *et al.*¹³⁵ permitiu, já em 2024, aplicar estas nanopartículas a um dos maiores problemas enfrentados a nível global na última década, utilizando-as como biossensores de anticorpos para a deteção da COVID-19. Esta abordagem, à semelhança das reportadas anteriormente, tirou partido da excelente biocompatibilidade e baixa toxicidade destes materiais. O aumento dos níveis de absorvância e de fluorescência sugerem uma elevada sensibilidade dos PsC sintetizados para a deteção de anticorpos IgG o que, aliada ao seu rendimento quântico de fluorescência moderado, salientam o seu potencial como ferramenta prática e não invasiva para o diagnóstico da COVID-19.

Numa outra abordagem, Kaci *et al.*¹³⁶ desenvolveram um dispositivo portátil capaz de detetar rápida e facilmente as bactérias *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica*, responsáveis por doenças transmitidas através do consumo de alimentos ou água. Entre os diferentes

componentes deste dispositivo encontram-se PsC funcionalizados com tionina, que servem como indicadores eletroquímicos, sinalizando a deteção das espécies.

A aplicação de PsC nestes diferentes contextos reflete a sua vasta versatilidade numa só aplicação biomédica, permitindo atuar não só como biossensores para a deteção de compostos biológicos, mas também de anticorpos e bactérias. Por serem facilmente sintetizados e funcionalizados, constituem uma solução acessível para a deteção de biomoléculas.

II. RESULTADOS E DISCUSSÃO



II.1 PREÂMBULO

Os PsC têm despertado enorme curiosidade devido à sua facilidade de obtenção por métodos sustentáveis a partir de resíduos de diversas origens, associada às suas excelentes propriedades óticas, elevada solubilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade, tornando-os aptos para aplicações muito diversificadas em áreas como farmacologia, com particular destaque no controlo microbiano, a imagiologia e a fotocatalise.

Tendo por base o impulsionamento de uma bioeconomia circular, pretendeu-se com o presente trabalho valorizar a biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* (BM-Cv) cultivada em meios de cultura contendo resíduos alimentares constituídos por desperdícios de fruta, vegetais, laticínios, padaria e peixe, e cujas aplicações habituais se encontram mais limitadas e menos exploradas devido à origem da fonte de nutrientes no seu meio de crescimento, utilizando para o efeito esta matéria-prima como fonte de carbono para a obtenção sustentável de PsC fluorescentes bioativos de elevado valor acrescentado.

No presente Capítulo será apresentado numa primeira fase a caracterização físico-química da BM-Cv, através da quantificação dos principais biocompostos presentes na sua constituição, bem como o seu conteúdo em sólidos totais e cinzas, e a sua caracterização estrutural.

Serão posteriormente abordados os resultados relativos à síntese dos PsC por carbonização hidrotérmica com aquecimento convencional e por irradiação micro-ondas a partir de BM-Cv, caracterização estrutural através de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ressonância magnética nuclear de protão (RMN ¹H) e análise elementar, bem como a avaliação das suas propriedades fotofísicas por espectroscopia de absorção no estado fundamental (UV-Vis) e espectroscopia de fluorescência no estado estacionário.

Numa fase final, serão explorados os resultados alcançados através dos estudos da bioatividade dos PsC sintetizados, no que diz respeito às suas propriedades antioxidantes, atividade antibacteriana, citotoxicidade *in vitro* e *in vivo* e capacidade de marcação celular por fluorescência.

Desta forma, o presente Capítulo englobará as seguintes Secções:

II.2. Caracterização da Biomassa da Microalga *Chlorella vulgaris*

II.3 Síntese dos Pontos de Carbono

II.4 Avaliação da Bioatividade dos Pontos de Carbono



II.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DA MICROALGA *Chlorella vulgaris*

A síntese de PsC realizada ao longo do presente trabalho teve como precursor a biomassa da microalga *C. vulgaris* (BM-Cv), cultivada num meio de cultura suplementado com resíduos alimentares provenientes do comércio retalhista, em particular desperdícios de fruta (ca. 22 %), vegetais (ca. 22 %), laticínios (ca. 13 %), padaria (ca. 27 %) e peixe (ca. 16 %).¹³⁷ A cultura foi produzida em bioreatores de bolhas nas instalações industriais da Allmicroalgae - Natural Products, S.A., empresa portuguesa produtora de microalgas, situada em Pataias (Leiria).

Numa fase inicial deste trabalho foi disponibilizada uma quantidade limitada de biomassa que permitiu apenas a realização de ensaios preliminares (*vide* Secção II.3). Posteriormente, foi recolhida nas instalações industriais da Allmicroalgae uma cultura de *C. vulgaris* (ca. 75 L), que foi sujeita a um processo de centrifugação, de forma a separar a biomassa. Por fim, procedeu-se à sua liofilização, obtendo-se uma amostra seca e homogénea (ca. 70 g), de cor verde, característica desta espécie.

A quantificação dos biocompostos presentes na amostra de BM-Cv foi realizada num extrato etanólico obtido por extração assistida por micro-ondas (MAE), onde foram aplicadas as condições de extração otimizadas por Hussen,¹³⁸ à exceção do conteúdo em lípidos, que foi determinado a partir de um extrato obtido através de extração contínua em Soxhlet (utilizando *n*-hexano como solvente), e do teor de cinzas, determinado diretamente a partir da amostra original.

O extrato etanólico foi evaporado até à secura e apresentou um teor de sólidos de 7.87 ± 0.53 mg mL⁻¹.

II.2.1 Caracterização Estrutural

A BM-Cv liofilizada foi analisada por espectroscopia de FTIR, em pastilha de KBr, com o objetivo de identificar os grupos funcionais dos compostos presentes na biomassa utilizada (Figura II.1).

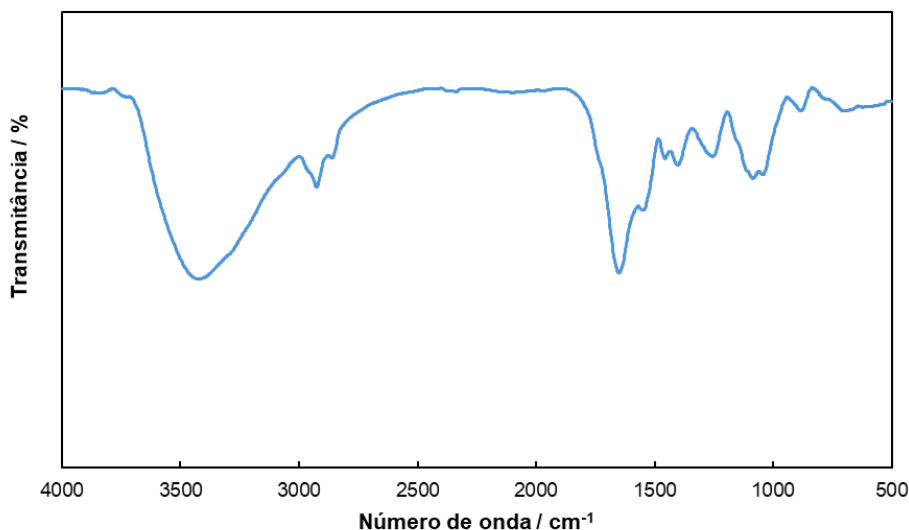


Figura II.1 - Espectro de FTIR da BM-Cv (pastilha de KBr).

A análise do espectro de infravermelho revela uma banda correspondente à extensão O-H (larga), a ca. 3425 cm^{-1} , com um ombro a 3285 cm^{-1} , correspondente à banda N-H. Destacam-se também as bandas de vibração de extensão C-H a 2960 , 2926 e 2860 cm^{-1} , correspondentes à ligação C-H dos grupos alifáticos. As bandas de extensão C=O e C=C têm origem a 1548 e a 1651 cm^{-1} . Relativamente à zona das vibrações de deformação, é possível identificar bandas de deformação a 1402 , 1251 e 1054 cm^{-1} , associadas a ligações C-H, C-O e O-H. Estes resultados são consistentes com os reportados pela literatura.⁷⁶

Os resultados obtidos através da análise elementar de uma amostra de BM-Cv encontram-se apresentados na Tabela II.1, tendo sido corrigidos com o teor de cinzas obtido.

Tabela II.1 – Análise elementar da BM-Cv.

Amostra	Microanálise				Cinzas (%)
	% C	% H	% N	% O (calc.)	
BM-Cv	49.92	6.06	9.02	22.61	12.40

II.2.2 Quantificação de pigmentos

Sendo a *C. vulgaris* um organismo fotossintético, procedeu-se à avaliação do conteúdo em pigmentos responsáveis por este processo na biomassa em estudo. De forma a quantificar os pigmentos produzidos, nomeadamente clorofilas (*a* e *b*) e carotenoides totais, no extrato etanólico da microalga obtido por MAE, recorreu-se ao método proposto por Lichtenthaler *et al.*²⁹, através das equações matemáticas apresentadas na Secção III.3.2. A Tabela II.2 apresenta os resultados obtidos.

Tabela II.2 - Quantificação dos pigmentos fotossintéticos da BM-Cv no extrato de EtOH.

	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Conteúdo $\mu\text{g/g de biomassa}$	Teor (%)
Clorofila a	0.19	24.73	2.47
Clorofila b	0.10	13.04	1.30
Clorofila total	0.30	37.77	3.77
Carotenoides totais	0.14	18.40	1.84

De acordo com a literatura, o pigmento mais abundante na microalga *C. vulgaris* é a clorofila total, que pode atingir *ca.* 1-2% da composição da biomassa seca.⁶ Os resultados obtidos estão em concordância com a literatura, verificando-se a predominância deste pigmento, embora num teor ligeiramente superior. O extrato apresenta, também, uma quantidade superior de clorofila *a* face ao teor em clorofila *b*, encontrando-se esta diferença de acordo com o reportado na literatura.¹³⁹

Relativamente ao teor de carotenoides totais, a literatura sugere que, sob diferentes condições de crescimento, esta microalga possa apresentar *ca.* 7-12 000 μg de carotenoides por g de biomassa, pelo que o valor obtido se enquadra neste intervalo.¹³⁹

II.2.3 Quantificação de proteína total

A determinação do teor de proteínas da amostra de BM-Cv teve por base o método de Bradford *et al.*⁴² A análise do extrato revelou a presença de 9.14 ± 0.70 mg de proteína por g de biomassa. Sendo as proteínas o composto mais abundante na maioria das microalgas, considera-se que a *C. vulgaris* possua *ca.* 43-58 % de conteúdo em proteínas, embora este valor seja variável perante diferentes condições de crescimento.⁶ O resultado obtido

experimentalmente representa menos de 1 % da composição da biomassa, verificando-se ser bastante inferior ao reportado por outros autores.

Atendendo à literatura consultada, foi possível concluir que o conteúdo destas biomoléculas em diferentes espécies de microalgas pode ser influenciado tanto pelas condições de crescimento, como pela fase de crescimento celular em que a cultura é recolhida. Metsoviti *et al.*¹⁴⁰ reportaram teores proteicos relativamente baixos de ca. 7.80 % (de biomassa de *C. vulgaris* seca) perante a diminuição da concentração de nitrogénio no meio de cultura. Por outro lado, ao analisarem a composição da biomassa de *C. vulgaris* nas diferentes fases do seu crescimento celular, Sánchez-Bayo *et al.*¹⁴¹ concluíram que a acumulação de proteínas atingiu o seu máximo antes da fase exponencial de crescimento terminar, pelo que a concentração destas moléculas começou a diminuir posteriormente.

Assim, sendo desconhecida a fase de crescimento em que a biomassa em estudo foi recolhida, uma vez que esta cultura não foi monitorizada ao longo do seu crescimento, presume-se que o seu baixo teor proteico possa estar relacionado com a possibilidade destes microrganismos terem sido recolhidos na fase estacionária ou de morte do seu crescimento.

II.2.4 Quantificação de hidratos de carbono totais

A quantificação de hidratos de carbono totais do extrato etanólico de BM-Cv foi realizada através do método do fenol-ácido sulfúrico, obtendo-se um teor de 3.24 % de hidratos de carbono presentes na amostra, equivalente a 32.35 ± 2.70 mg/g de biomassa. Na literatura, são reportados valores de ca. 26.3 % de peso seco da biomassa em hidratos de carbono¹⁴² perante condições de crescimento adequadas, face a 12-55 % em lotes cultivados sob condições não-favoráveis, particularmente com fornecimento limitado de nitrogénio.⁶ De forma semelhante, num estudo realizado por El-Sayed *et al.*,¹⁴³ onde a microalga *C. vulgaris* foi igualmente cultivada num meio suplementado com resíduos da prensa da cana do açúcar, foi obtido um teor de 13 % de hidratos de carbono. Consequentemente verifica-se que o teor de hidratos de carbono na composição da biomassa em estudo é mais baixo do que o esperado, podendo este resultado ser associado às condições do meio de cultura utilizado.

II.2.5 Quantificação de polissacáridos (sulfatados, ácidos e β -(1,3)-D-glucanos)

O teor de polissacáridos sulfatados e ácidos foi determinado através de dois métodos distintos, o do azul de toluídina adaptado por Hussen¹³⁸ e o do carbazol-ácido sulfúrico⁴⁰,

respetivamente. À semelhança dos restantes doseamentos, os resultados foram expressos em mg/g de biomassa, apresentando-se na Tabela II.3 os valores obtidos para a quantificação dos dois tipos de polissacáridos.

Embora a literatura registe a presença de polissacáridos sulfatados em diversas espécies de microalgas,^{36,37} não foi possível determinar o conteúdo destes biocompostos na amostra em estudo, sugerindo que o solvente utilizado possa não ser o mais apropriado para a sua extração. Já os polissacáridos ácidos foram detetados numa percentagem muito reduzida (0.58 %).

Estudos revelam que a extração de polissacáridos pode ser otimizada pela utilização de água, preferencialmente quente, e que a sua solubilidade tende a diminuir em etanol,^{144,145} explicando, assim, a impossibilidade de detetar polissacáridos sulfatados e o baixo teor de polissacáridos ácidos obtido. Não obstante, é de salientar que os resultados obtidos por Hussen¹³⁸ para o doseamento destes biocompostos em *C. vulgaris* estão em concordância com os valores obtidos.

Tabela II.3 - Composição em polissacáridos do extrato etanólico de BM-Cv.

Polissacáridos	Conteúdo (mg/g de biomassa)
Sulfatados	n.d.
Ácidos	5.80 ± 0.07

n.d. – Não detetado; valores médios ± DP dos replicados.

Por sua vez, a quantificação de β -(1,3)-D-glucanos com estrutura em tripla hélice no extrato de BM-Cv foi realizada pelo método do corante Congo red.³⁵ Na análise do extrato de BM-Cv em etanol foi detetada a presença de β -(1,3)-D-glucanos, consistindo em 0.27 % da composição da biomassa (2.72 ± 1.79 mg/g de biomassa).

Num estudo realizado por Jui *et al.*¹⁴⁶ sobre as condições ótimas de crescimento de *C. vulgaris*, foi possível concluir que o conteúdo destes compostos nesta microalga é residual, estabelecendo-se a ca. 4.32 % de peso seco de β -(1,3)-D-glucanos. Assim, verifica-se que o extrato analisado apresenta um teor de β -(1,3)-D-glucanos mais baixo do que o reportado na literatura, em condições de crescimento diferentes.

II.2.6 Quantificação de compostos fenólicos e flavonóides totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, adaptado do método descrito por Reis *et al.*¹⁴⁷ Para a quantificação de compostos flavonoides totais recorreu-se a uma adaptação do método colorimétrico do cloreto de alumínio descrito por Yeh *et al.*¹⁴⁸ A tabela seguinte apresenta os valores obtidos para estes compostos, expressos em mg/g de biomassa.

Tabela II.4 - Composição em compostos fenólicos e flavonóides totais do extrato etanólico de BM-Cv.

Compostos	Conteúdo (mg/ g de biomassa)
Fenólicos	13.55 ± 0.10
Flavonóides	16.49 ± 2.02

Valores médios ± DP dos replicados.

A literatura reporta uma gama alargada de valores para o teor de compostos fenólicos na microalga *C. vulgaris*, verificando-se uma elevada dependência do o método de extração utilizado.²⁴ Num estudo apresentado por Goiris *et al.*¹⁴⁹ o conteúdo de compostos fenólicos na microalga encontrava-se entre 0.75-1.70 mg/g de biomassa. Por sua vez, El-fayoumy *et al.*¹⁵⁰ obtiveram resultados significativamente superiores, de 25.92 mg/g de biomassa, pelo que o valor determinado experimentalmente para a BM-Cv encontra-se no intervalo de valores estabelecido pelos dois estudos referenciados. Paralelamente, El-fayoumy *et al.*¹⁵⁰ obtiveram um teor em compostos flavonóides de 21.50 mg/g de biomassa, ou seja, um valor superior ao obtido para o extrato de BM-Cv. Estas divergências podem ser justificadas mais uma vez pelas diferentes condições de crescimento da *C.vulgaris* em cada um dos estudos, nomeadamente meio de cultura, temperatura, intensidade de luz, concentração de nitrogénio, entre outras.

II.2.7 Quantificação de lípidos

De forma a quantificar o teor de lípidos na BM-Cv foram empregues duas abordagens, o método de Sulfofosfovanilina (SPV) descrito por Anschau *et al.*,⁵² aplicado ao extrato obtido por MAE, e o método gravimétrico, aplicado ao extrato obtido por extração convencional contínua em Soxhlet, utilizando *n*-hexano como solvente, realizado com base no procedimento descrito por Silva *et al.*⁵⁰ Através do método de SPV, determinou-se a presença

de 3.10 ± 0.86 mg de lípidos por g de biomassa (equivalente a 0.31 %), enquanto por gravimetria foi quantificado um teor de lípidos de 0.18 ± 0.02 %.

De acordo com a literatura, esta microalga pode apresentar um teor de lípidos variável entre 5-40 %, ⁶ pelo que ambas as quantificações foram consideravelmente inferiores ao expectável. Contudo, estudos mostram que a extração de lípidos de microalgas é altamente dependente do solvente utilizado devido à sua polaridade. Li *et al.*⁴⁹ destacam a existência de uma diferença significativa na eficiência da extração convencional contínua em Soxhlet utilizando *n*-hexano e ou uma mistura de hexano e etanol como solventes, indicando uma maior eficácia por parte de solventes de extração contendo uma mistura de um solvente polar e um solvente não polar.

II.2.8 Quantificação de cinzas

A determinação do teor de cinzas na BM-Cv foi realizada recorrendo à biomassa seca, permitindo quantificar o teor de materiais inorgânicos presentes na amostra. Obteve-se um valor de 12.40 ± 0.36 %, equiparável (embora superior) ao obtido por El-Sayed *et al.*,¹⁴³ de 7.2 %. Desta forma, é possível deduzir a presença de um conteúdo reduzido em matéria inorgânica e, conseqüentemente, um elevado teor de carbono na biomassa de *C. vulgaris*.

Na Figura II.2, encontra-se representado o espectro de FTIR típico das cinzas da biomassa utilizada, onde é evidenciada a presença de carbonatos pela banda a 1050 cm^{-1} , correspondente ao teor inorgânico na composição da BM-Cv.

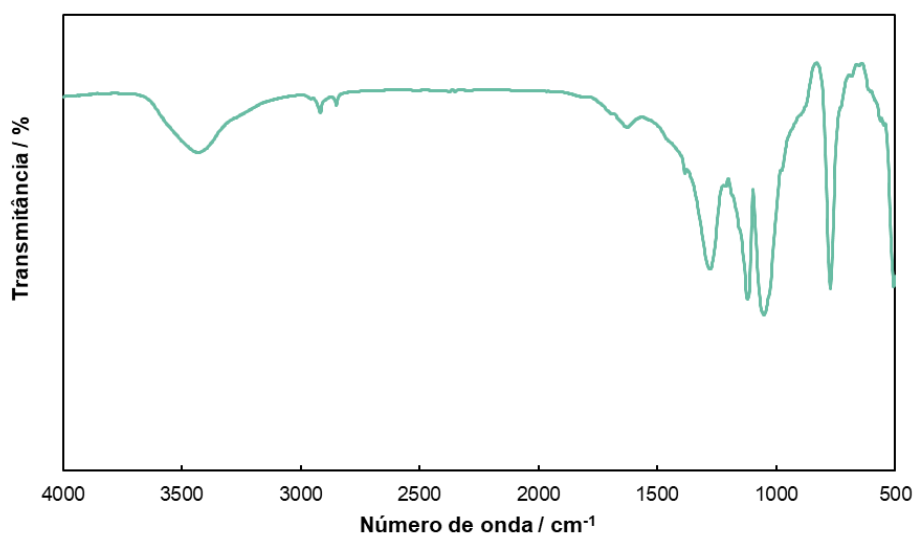


Figura II.2 - Espectro de FTIR das cinzas da BM-Cv (pastilha de KBr).

II.2.9 Caracterização global da BM-Cv

Nas tabelas seguintes, são apresentados os resultados relativos à caracterização físico-química (Tabela II.5) e aos compostos bioativos (Tabela II.6) presentes na biomassa em estudo.

Tabela II.5 - Características físico-químicas da BM-Cv.

Parâmetro	BM-Cv
Sólidos totais (mg mL ⁻¹)	7.87 ± 0.53
Cinzas (%)	12.40 ± 0.36
Microanálise	49.92 % C; 6.06 % H; 9.02 % N; 22.61 % O (calc.)

Valores médios ± DP dos replicados.

Tabela II.6 - Compostos bioativos presentes na BM-Cv.

Parâmetro	Conteúdo (mg/g de biomassa)
Proteínas ¹	9.14 ± 0.70
Compostos fenólicos ¹	13.55 ± 0.10
Compostos flavonóides ¹	16.49 ± 2.02
Lípidos ²	3.10 ± 0.86
Hidratos de carbono totais ¹	32.35 ± 2.70
Polissacáridos sulfatados ¹	n.d.
Polissacáridos ácidos ¹	5.80 ± 0.70
β (1,3)-D-glucanos ¹	2.72 ± 1.79

¹Valores determinados a partir do extrato de etanol; ²Valor determinado a partir do extrato de *n*-hexano; n.d. – Não detetado; valores médios ± DP dos replicados.

É de salientar que, à semelhança do referido anteriormente, o teor de biocompostos presentes na biomassa pode ter sido fortemente influenciado pelas condições de crescimento da microalga. A variação de diversos fatores abióticos, como o pH, a presença de metais e a disponibilidade de nutrientes podem levar ao *stress* destes microrganismos, impactando a sua

síntese e acumulação de metabolitos. Em particular, enquanto o crescimento sob *stress* pode levar à diminuição da produção de diversas moléculas, verifica-se que as microalgas tendem a produzir metabolitos secundários com propriedades antioxidantes, de modo a compensar a desregulação imposta.¹⁵¹

Desta forma, deduz-se que a biomassa em estudo possa ter sido cultivada sob condições menos favoráveis, levando à produção de teores de compostos antioxidantes (fenólicos e flavonóides) superiores ao expectável, ao passo que, de forma geral, os restantes biocompostos doseados apresentam-se significativamente inferiores aos valores reportados pela literatura.

II.3 SÍNTESE DE PONTOS DE CARBONO

II.3.1 Síntese de PsC a partir da BM-Cv

Para a síntese de PsC a partir da BM-Cv foram empregues duas metodologias distintas, a carbonização hidrotérmica através de aquecimento convencional (CHAC) e assistida por radiação micro-ondas (CHMO). Na presente Secção é realizada a comparação entre as vias sintéticas utilizadas, condições reacionais e propriedades fotofísicas exibidas pelas nanopartículas obtidas. Adicionalmente, é discutida a caracterização estrutural e ótica dos PsC, bem como a determinação dos rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F).

II.3.1.1 Carbonização Hidrotérmica com Aquecimento Convencional

Os ensaios de CHAC foram realizados num reator de alta pressão com recurso a um vaso de aço inox, utilizando *ca.* 3 g de BM-Cv e 100 mL de água Millipore®. Nos vários estudos foram utilizados diferentes aditivos como fonte de nitrogénio, nomeadamente etilenodiamina (ED), dietilenotriamina (DET), ureia, melamina e *p*-fenilenodiamina (*p*-FD), assim como diferentes rácios BM-Cv:aditivo e temperaturas de reação.

Como referido na Secção anterior, foram realizados ensaios preliminares com recurso a uma quantidade de biomassa limitada disponibilizada pela Allmicroalgae. Na Tabela II.7 encontra-se o resumo dos resultados obtidos nestes primeiros ensaios, cujas condições reacionais utilizadas foram baseadas em estudos anteriores desenvolvidos pelo grupo de investigação.^{93–95}

Tabela II.7 – Estudo preliminar do efeito da quantidade de aditivo (ED) no rendimento quântico e mássico dos PsC.

Ensaio ^a	ED/BM-Cv	Rendimento PsC (%)	Teor de sólidos (mg/mL)	Φ_F^b
PsC_01	0.16	21.30	8.72	0.19
PsC_02	0.08	16.77	6.71	0.15

^a 3 g de BM-Cv, 100 mL de água Millipore®; 250 °C, 6h; 180 rpm.

^b λ_{exc} = 360 nm.

Desta forma, procurou-se estudar o comportamento dos PsC sintetizados face à variação do rácio mássico de ED/BM-Cv, observando-se através dos resultados que uma maior quantidade de aditivo origina um rendimento quântico de fluorescência superior, assim como um maior rendimento mássico de PsC e um maior teor de sólidos.

Tendo por objetivo avaliar a influência da temperatura de reação nas características dos PsC, nomeadamente no rendimento mássico e nas propriedades fotofísicas, foram realizados ensaios a diferentes temperaturas (Tabela II.8).

Tabela II.8 - Efeito da temperatura no rendimento quântico e mássico dos PsC.

Ensaio ^a	T (°C)	Rendimento PsC (%)	Teor de sólidos (mg/mL)	Φ_F^b
PsC_03	300	18.76	10.53	0.13
PsC_04	250	37.07	17.20	0.20
PsC_05	200	44.27	23.70	0.13
PsC_06	150	22.88	19.90	0.07

^a 3 g de BM-Cv, 100 mL de água Millipore®; rácio mássico ED/BM-Cv = 0.16; 180 rpm; ^b λ_{exc} = 360 nm

Os resultados obtidos indicam uma tendência crescente do valor de rendimento quântico (RQ) com o incremento da temperatura de reação até 250 °C, patamar a partir do qual a luminescência dos PsC decresce. De acordo com a literatura, estes resultados são expectáveis, sendo que se considera que o RQ de fluorescência dos PsC tende a aumentar com a temperatura, embora temperaturas elevadas promovam a degradação das espécies emissivas, levando à diminuição deste parâmetro.^{152,153} Por outro lado, os resultados obtidos parecem não demonstrar uma correlação direta entre a temperatura e o rendimento mássico obtido para os nanomateriais.

Sabendo que a presença de átomos de nitrogénio à superfície dos nanomateriais (NMs) influencia as suas propriedades fotofísicas, foi de seguida realizado um estudo sobre a influência da natureza do aditivo nas características dos PsC. Para o efeito foram utilizadas,

para além da ED, outras amins alifáticas (DET e ureia), assim como amins aromáticas (melamina e *p*-FD). Foi igualmente realizado um ensaio na ausência de aditivo.

Da análise da Tabela II.9 é possível observar que os PsC funcionalizados com ED apresentam um melhor desempenho, exibindo um RQ ligeiramente mais elevado do que o obtido com recurso à DET, bem como rendimento mássico de PsC superior, embora na mesma ordem de grandeza que os dos ensaios com DET e sem aditivo. Já a utilização de ureia como aditivo levou à síntese de PsC com uma luminescência mais baixa, assim como os PsC funcionalizados com as amins aromáticas.

Tabela II.9 - Efeito da natureza do aditivo no rendimento quântico e mássico dos PsC.

Ensaio ^a	Aditivo	Rendimento PsC (%)	Teor de sólidos (mg/mL)	Φ_F^b
PsC_07	-	32.34	10.78	0.15
PsC_04	ED	37.07	17.20	0.20
PsC_08	DET	35.68	15.92	0.18
PsC_09	Ureia	26.59	9.74	0.13
PsC_10	<i>p</i> -FD	21.06	10.47	0.06
PsC_11	ML	21.60	8.36	0.10

^a 3 g de BM-Cv, 100 mL de água Millipore®; rácio mássico Aditivo/BM-Cv = 0.16; 250 °C, 6h; 180 rpm; ^b λ_{exc} = 360 nm.

Um estudo realizado por Mishra *et al.*¹⁵⁴ corrobora estes resultados, salientando que a funcionalização dos PsC com anéis aromáticos não só influencia a sua polaridade e, conseqüentemente, a sua solubilidade em água, como também contribui para a diminuição da sua luminescência, quando comparados com PsC funcionalizados com amins alifáticas.

Desta forma, foi possível concluir que a funcionalização superficial com ED permitiu a obtenção de PsC com melhores características, pelo que se procurou estudar a influência do rácio deste aditivo com a biomassa algal (ED/BM-Cv) para condições reacionais de 250 °C e 6 horas.

Os resultados obtidos para estes ensaios encontram-se apresentados na tabela seguinte e demonstram que o aumento do rácio de ED não possui uma correlação direta com as características dos PsC, observando-se que as nanopartículas funcionalizadas com rácios mássicos ED/BM-Cv de 0.08, 0.16 e 0.32 apresentaram rendimentos quânticos de fluorescência e teores de sólidos semelhantes. Enquanto na ausência de aditivo os PsC exibiram menor valor de RQ, o ensaio realizado com rácio mássico de 0.64 destacou-se pelo aumento ligeiro desta propriedade. O incremento de aditivo promoveu um aumento progressivo dos rendimentos mássicos e teores de sólidos dos PsC.

Tabela II.10 - Efeito do rácio de ED/BM-Cv no rendimento quântico e mássico dos PsC.

Ensaio ^a	ED/BM-Cv	Rendimento PsC (%)	Teor de sólidos (mg/mL)	Φ_F^b
PsC_07	0.00	32.34	10.78	0.15
PsC_12	0.08	34.65	14.97	0.21
PsC_04	0.16	37.07	17.20	0.20
PsC_13	0.32	39.15	17.62	0.21
PsC_14	0.64	41.63	27.31	0.24

^a 3 g de BM-Cv, 100 mL de água Millipore®; 250 °C, 6h; 180 rpm; ^b λ_{exc} = 360 nm.

Na perspetiva de avaliar uma alternativa à síntese *via* CHAC, foi realizado um ensaio exploratório utilizando um reator de aço-inox com vaso de Teflon com recurso a uma mufla como fonte de aquecimento. Devido a limitações operacionais relativas à temperatura suportada pelo recipiente de Teflon, não foi possível realizar um estudo completo da variação deste parâmetro, tendo este ensaio sido comparado com o realizado nas condições reacionais típicas à mesma temperatura (Tabela II.11).

Tabela II.11 - Efeito do modo de síntese no rendimento quântico e mássico dos PsC.

Ensaio ^a	T (°C)	Tempo (h)	Rendimento PsC (%)	Teor de sólidos (mg/mL)	Φ_F^b
PsC_06	150	6	22.88	19.90	0.07
PsC_15 ^c	150	12	36.83	20.50	0.07

^a 3 de BM-Cv, 100 mL de água Millipore®; rácio mássico ED/BM-Cv = 0.16, 180 rpm; ^b λ_{exc} = 360 nm; ^c Ensaio realizado em reator de aço-inox com vaso de Teflon numa mufla.

Perante os resultados obtidos, é possível constatar que a utilização da mufla como fonte de aquecimento não contribuiu positivamente para a melhoria das propriedades luminescentes dos PsC à temperatura estudada, embora tenha contribuído para um ligeiro aumento do rendimento mássico.

Por fim, e com vista à obtenção de PsC de controlo, utilizou-se o ácido cítrico como fonte de carbono, à semelhança do reportado pela literatura.⁵³ O ensaio foi realizado à temperatura de 250 °C, durante 6 h, utilizando um rácio mássico de ED/Ácido cítrico de 0.16. A Tabela II.12 apresenta os resultados obtidos, comparativamente ao ensaio análogo com BM-Cv.

Tabela II.12 - Efeito da natureza da fonte de carbono no rendimento quântico e mássico dos PsC.

Ensaio ^a	Fonte de carbono	Rendimento PsC (%)	Teor de sólidos (mg/mL)	Φ_F^b
PsC_04	BM-Cv	37.07	17.20	0.20
PsC_16	Ácido cítrico	31.85	13.04	0.23

^a 3 g de matéria-prima, 100 mL de água Millipore®; ED/Matéria-prima = 0.16; 250 °C; 6 h, 180 rpm; ^b λ_{exc} = 360 nm

Assim, verificou-se que os ensaios realizados apresentaram rendimentos quânticos e mássicos semelhantes, não existindo influência da variação da fonte de carbono. Resultados reportados por Zhu *et al.*¹⁵⁵ descrevem a síntese de PsC a partir de ácido cítrico e funcionalizados com etilenodiamina, por tratamento hidrotérmico (250 °C, 5 h), exibindo um RQ de ca. 25 %, corroborando os resultados obtidos.

II.3.1.2 Carbonização Hidrotérmica Assistida por Radiação Micro-ondas

Os ensaios de CHMO foram realizados num reator monomodo, utilizando ca. 150 mg de BM-Cv, com 4.50 mL de água Millipore®. No estudo realizado, utilizou-se apenas etilenodiamina como aditivo (quantidade variável), e mantiveram-se constantes a temperatura (150 °C) e o tempo de reação (15 minutos).

À semelhança dos ensaios por CHAC, foram efectuados estudos preliminares *via* CHMO, recorrendo à biomassa inicial com variação do rácio mássico de ED/BM-Cv e utilizando condições reacionais anteriormente empregues pelo grupo de investigação em ensaios com esta fonte de aquecimento.⁹³⁻⁹⁵ Na Tabela II.13 encontram-se os resultados obtidos para os estudos realizados.

Tabela II.13 - Estudo preliminar do efeito da variação do rácio de ED/BM-Cv no rendimento quântico e mássico dos PsC obtidos por CHMO.

Ensaio ^a	ED/BM-Cv	Rendimento PsC (%)	Teor de sólidos (mg/mL)	Φ_F^b
PsC_CHMO_17	0.16	7.47	5.20	0.11
PsC_CHMO_18	0.08	10.79	7.60	0.09

^a 150 g de BM-Cv, 4.50 mL de água Millipore®; 150 °C, 15 min; ^b λ_{exc} = 360 nm.

Os ensaios exploratórios realizados permitiram inferir que a variação da quantidade de ED utilizada não teve influência significativa no RQ dos PsC, sendo que os valores obtidos quer para este parâmetro, quer para o rendimento mássico, são próximos entre si.

O ensaio com maior rácio mássico de aditivo foi duplicado (PsC_CHMO_14), utilizando o segundo lote de biomassa, apresentando um rendimento mássico de 41.65 %, um teor de sólidos de 18.70 mg mL⁻¹ e um rendimento quântico de fluorescência ($\lambda_{exc} = 360$ nm) de 13 %. Devido a limitações de funcionamento do reator micro-ondas, não foi possível explorar de forma aprofundada a síntese *via* CHMO, não tendo sido realizados ensaios adicionais através desta abordagem.

Posteriormente, testou-se a possibilidade de sintetizar PsC com recurso a um micro-ondas doméstico, utilizando um reator de aço-inox com vaso de Teflon. Verificou-se que a potência do micro-ondas doméstico não foi suficiente para induzir a carbonização da matéria orgânica, pelo que a mistura reacional (m.r.) resultante apresentou-se como uma massa espessa, impossibilitando a sua filtração. Neste sentido, o aquecimento *via* micro-ondas doméstico não foi explorado durante o desenvolvimento do presente trabalho.

II.3.2 Purificação dos Pontos de carbono

A presença de impurezas na mistura reacional, nomeadamente moléculas inorgânicas provenientes da BM-Cv e também compostos de polaridade média baixa, interferem nas propriedades luminescentes dos PsC.

Tendo como objetivo o melhoramento da luminescência dos nanomateriais sintetizados, foi realizado a seguir a cada ensaio um processo de purificação com recurso a filtração da m.r. por membrana de acetato de celulose, seguida de extração líquido-líquido com solventes orgânicos adequados.

Alternativamente, outras abordagens como a cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex ou a diálise poderiam ter sido empregues para purificar os PsC. No entanto, por razões de ordem logística, não foi possível a utilização de ambos os métodos.

II.3.2.1 Extração Líquido-Líquido

Após filtração da m.r. por membrana de celulose regenerada com diâmetro de poro de 0.2 μ m, foi realizada uma extração líquido-líquido com recurso a CH₂Cl₂ e a AcOEt. A fase aquosa

resultante das extrações (PsC) foi submetida a um processo de evaporação para remoção do solvente orgânico residual e armazenada a 4 °C sob atmosfera inerte. Posteriormente, as fases orgânicas recolhidas foram evaporadas à secura e os respetivos resíduos quantificados.

Em média, os ensaios de síntese por CHAC apresentaram uma fração de resíduo insolúvel recuperada através de filtração de ca. 8 % e frações de resíduo obtido nas etapas de extração líquido-líquido de ca. 5 %, com CH₂Cl₂, e 1 %, com AcOEt, calculadas em relação à massa inicial de BM-Cv e de aditivo. Assim, os ensaios de síntese *via* CHAC originaram um rendimento de conversão médio de ca. 30.20 ± 8.60 %.

Nos ensaios provenientes da síntese por CHMO registou-se uma fração de resíduo insolúvel recuperada de ca. 14 % e frações de resíduo obtido nas etapas de extração líquido-líquido de ca. 2 % e 0.2 %, com CH₂Cl₂ e AcOEt, respetivamente, pelo que estes ensaios originaram um rendimento de conversão médio de ca. 14.60 ± 17.20 %.

Na Figura II.3 são apresentados os espectros de FTIR típicos das frações orgânicas (CH₂Cl₂ e AcOEt) após evaporação à secura a 105 °C, correspondentes ao ensaio PsC_04 (ED/BM-Cv = 0.16, 250 °C, 6 h, 180 rpm).

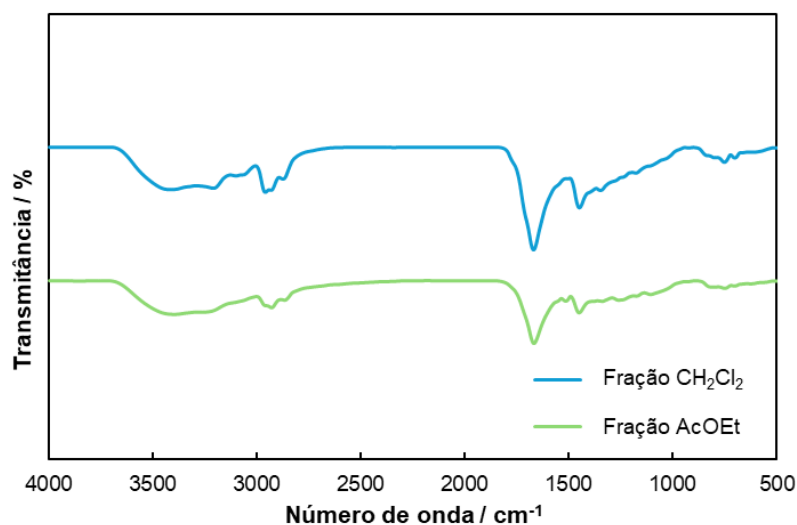


Figura II.3 - Espectros de FTIR das frações orgânicas e da fração aquosa (pastilha de KBr).

Através da figura anterior, é possível verificar que os espectros de FTIR das frações orgânicas apresentam bandas a 2940 e 2875 cm⁻¹, correspondentes à presença de grupos alifáticos, assim como bandas a ca. 1670 cm⁻¹ (C=O, ext) e a ca. 1450 cm⁻¹ (CH₂, def).

II.3.3 Caracterização Estrutural

A caracterização dos PsC foi efetuada através da avaliação dos seus espectros de FTIR e RMN ^1H , bem como da sua análise elementar.

De forma a avaliar a influência do método de síntese na estrutura dos PsC, foram realizados os espectros de FTIR dos PsC obtidos por CHAC (ED/BM-Cv = 0.16, 250 °C, 6 h, 180 rpm) e CHMO (ED/BM-Cv = 0.16, 150 °C, 15 min, 600 rpm) que se apresentam na Figura II.4.

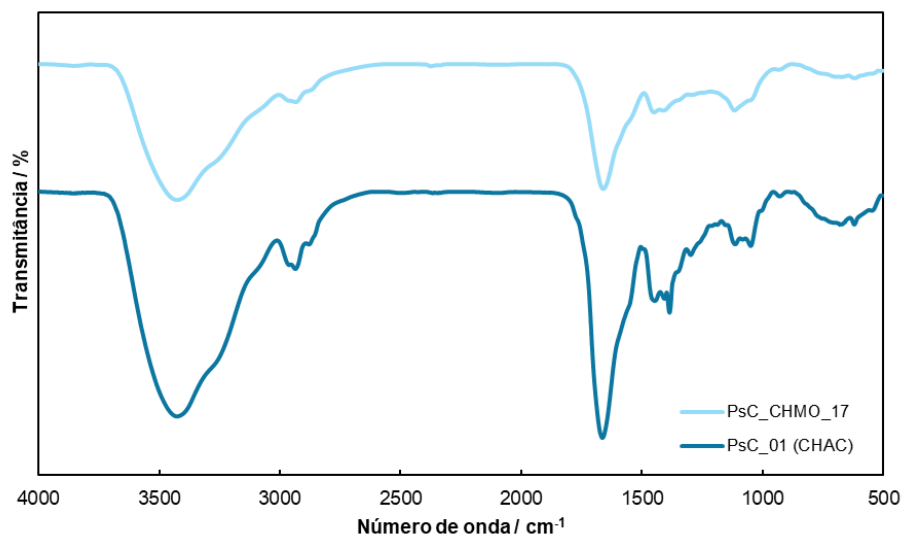


Figura II.4 - Espectros de FTIR dos PsC sintetizados *via* CHAC e CHMO (pastilha de KBr).

Analisando os espectros da Figura II.4, é possível observar a existência da banda correspondente à extensão O-H a ca. 3425 cm⁻¹, assim como da banda de extensão N-H (ombro) a ca. 3250 cm⁻¹. Identificam-se também as bandas que indicam a presença de grupos alifáticos, ainda que pouco proeminentes, a ca. 2965 e 2935 cm⁻¹. A ca. 1665 cm⁻¹ é visível a banda correspondente à extensão C=O (ácidos/carboxilatos e amidas), assim como as bandas a ca. 1660 e 1550 cm⁻¹ (N-H, def e C=C, ext), 1445 cm⁻¹ (CH₂, def), 1404 cm⁻¹ e 1382 cm⁻¹ (CH₃, def).

A Figura II.5 apresenta a comparação dos espectros de FTIR resultantes dos ensaios realizados com variação do rácio de aditivo (ED)/BM-Cv, sendo o parâmetro cujas variações foram mais amplamente estudadas na influência das propriedades biológicas.

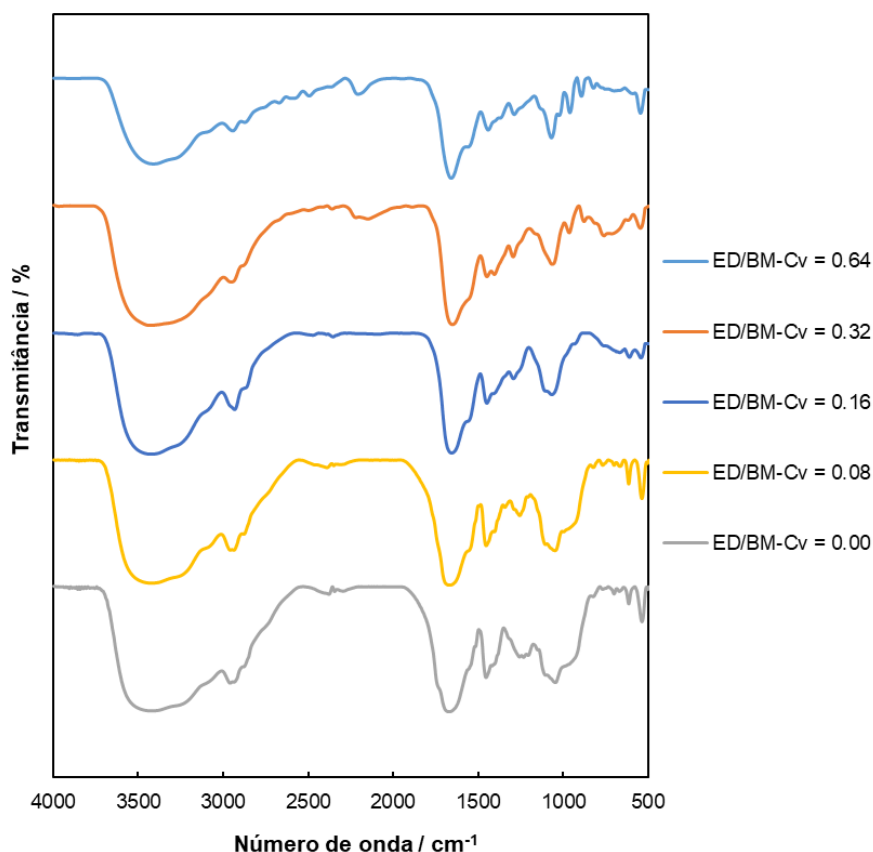


Figura II.5 - Espectros de FTIR dos PsC sintetizados com diferentes rácios mássicos ED/BM-Cv (pastilha de KBr).

Da análise da Figura II.5 é possível observar que o incremento da quantidade de aditivo não possui expressão significativa no perfil dos espectros apresentados, não se observando diferenças significativas entre eles. Verifica-se a presença das bandas típicas deste tipo de nanomateriais, nomeadamente as bandas de extensão O-H a ca. 3430 cm^{-1} , N-H (ombro) a ca. 3220 cm^{-1} e C-H dos grupos alifáticos a ca. 2950 e 2870 cm^{-1} . É possível distinguir as bandas a 1660 cm^{-1} e a 1445 cm^{-1} , correspondente à extensão C=O e evidenciando a presença de ácidos/carboxilatos, assim como as bandas a 1558 cm^{-1} (N-H, def e C=C, ext), 1450 cm^{-1} (CH_2 , def), 1401 cm^{-1} e 1290 cm^{-1} (CH_3 , def).

Na tentativa de verificar a presença de funcionalidades à superfície dos nanomateriais sintetizados, foi realizado o espectro de RMN ^1H dos PsC obtidos por CHAC com ED/BM-Cv = 0.32 a $250\text{ }^\circ\text{C}$ durante 6 h (PsC_13). Foi escolhida a análise deste lote uma vez que os NMs obtidos neste ensaio foram usados nos estudos de citotoxicidade e de marcação celular por fluorescência.

Da análise do espectro é possível verificar a presença maioritária de grupos C-H alifáticos, com ressonâncias entre 0.5 e 2.8 ppm e entre 3.0 e 4.25 ppm o surgimento de sinais indicativos

da presença de ligações CH-O e CH-N. Na zona entre 6.6 e 8.0 ppm são visíveis sinais de fraca intensidade, associados à presença minoritária de prótons aromáticos.

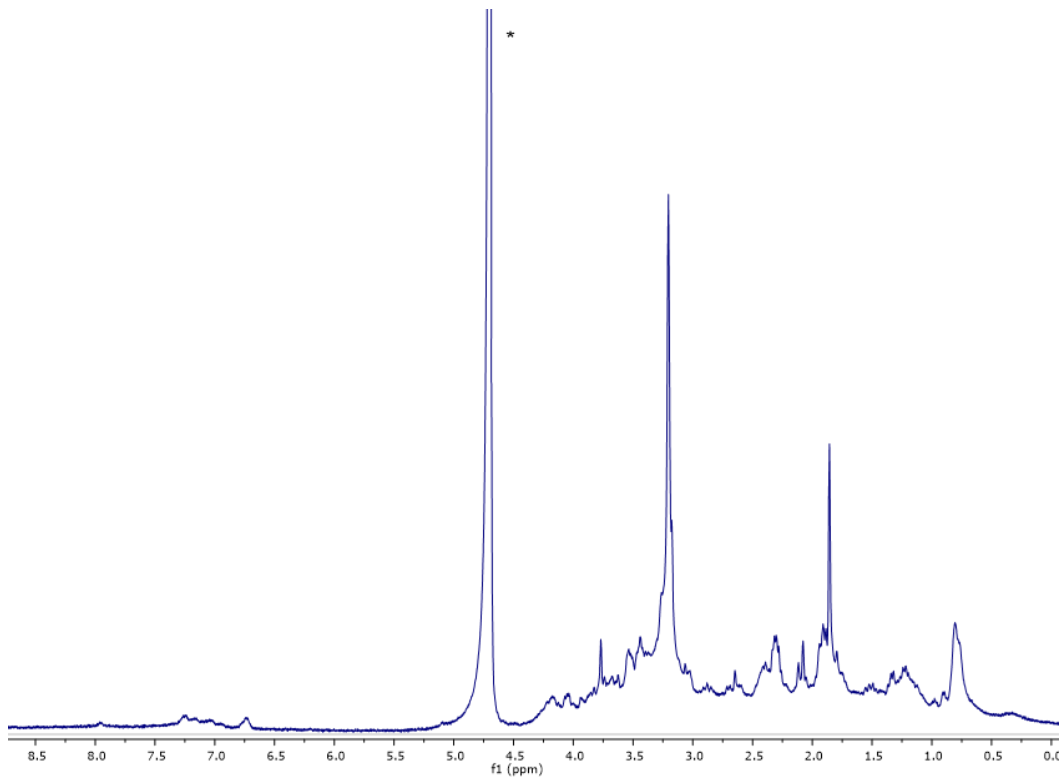


Figura II.6 - Espectro de RMN ^1H de dispersões aquosas de PsC₁₃ (400 MHz, D₂O, 25 °C); *solvente residual.

Adicionalmente, na Figura II.7 está representado o espectro de FTIR típico das cinzas (PsC₁₃; ED/BM-Cv = 0.32, 250 °C, 6 h, 180 rpm). Através da banda intensa a ca. 1102 cm^{-1} é possível verificar a presença de carbonatos, correspondente ao teor inorgânico da amostra. A presença de água é também visível através da banda alargada a ca. 3700-3300 cm^{-1} .



Figura II.7 - Espectro de FTIR das cinzas do ensaio PsC₁₃ em pastilha de KBr.

A Tabela II.14 apresenta os resultados da análise elementar realizada para os PsC obtidos com recurso a diferentes rácios de ED/BM-Cv. Os teores elementares foram corrigidos com o respetivo teor de cinzas. Analisando os resultados, é possível concluir que o aumento da quantidade de aditivo utilizada na síntese dos PsC se refletiu num incremento do conteúdo em nitrogénio, variando este valor entre 10.03 e 18.60 %.

Tabela II.14 – Efeito do rácio mássico ED/BM-Cv na análise elementar dos PsC obtidos por CHAC.

Ensaio ^a	Rácio ED/BM-Cv	Microanálise				Cinzas (%)
		% C	% H	% N	% O (calc.)	
PsC_07	0.00	45.61	6.52	10.03	15.89	21.95
PsC_12	0.08	46.73	7.21	17.17	9.01	19.87
PsC_04	0.16	49.31	7.30	14.61	11.81	16.97
PsC_13	0.32	49.25	6.17	18.60	8.32	17.65

^a 3 g de BM-Cv, 100 mL de água Millipore®; 250 °C, 6h; 180 rpm.

II.3.4 Caracterização Morfológica

A caracterização morfológica preliminar dos PsC foi realizada a partir de uma solução aquosa de 0.1 mg mL^{-1} dos ensaios PsC_04 e PsC_13, através de Microscopia de Força Atômica (AFM). A Figura II.8 apresenta as imagens topográficas adquiridas para os PsC_04 (ED/BM-Cv = 0.16, $250 \text{ }^\circ\text{C}$, 6 h, 180 rpm) em secções de corte transversal distintas.

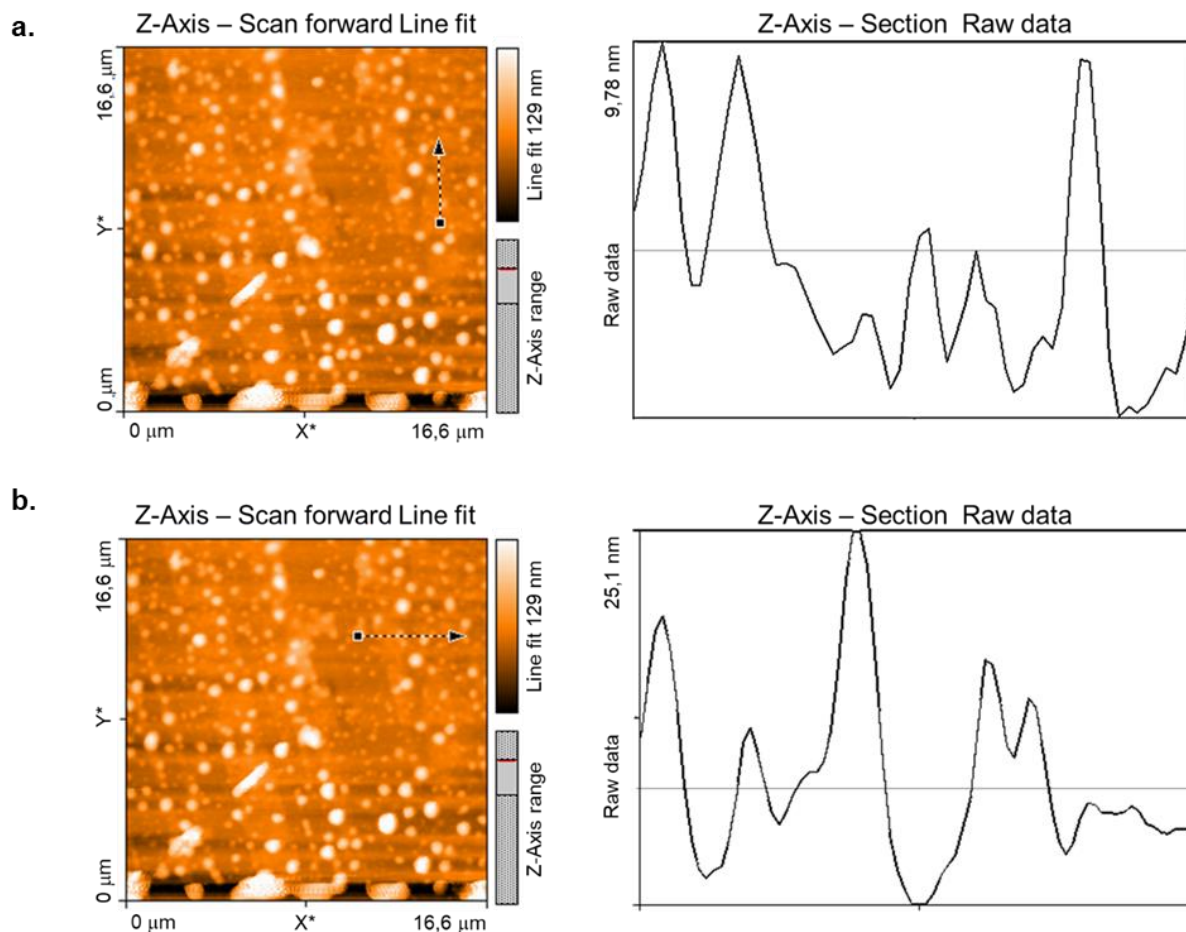


Figura II.8 – Imagens topográficas de AFM das diferentes secções de corte transversal da dispersão aquosa dos PsC_04 (0.1 mg mL^{-1}), distinguindo **a.** PsC de ca. 10 nm e **b.** agregados de ca. 25 nm.

Através da análise da figura anterior, é possível verificar que a dispersão aquosa dos PsC_04 apresenta alguma heterogeneidade em relação ao tamanho dos pontos de carbono, sendo possível observar a presença de PsC com tamanho inferior a 10 nm. Paralelamente, observa-se a tendência para a formação de agregados (ca. 25 nm) por parte destes nanomateriais.

Na Figura II.9, apresenta-se a imagem topográfica adquirida para os PsC_13 (ED/BM-Cv = 0.32, $250 \text{ }^\circ\text{C}$, 6 h, 180 rpm). A análise morfológica destes nanomateriais permitiu inferir o aumento significativo da tendência para a agregação com o aumento do rácio de ED/BM-Cv, sendo possível distinguir um agregado isolado de ca. 30.8 nm.

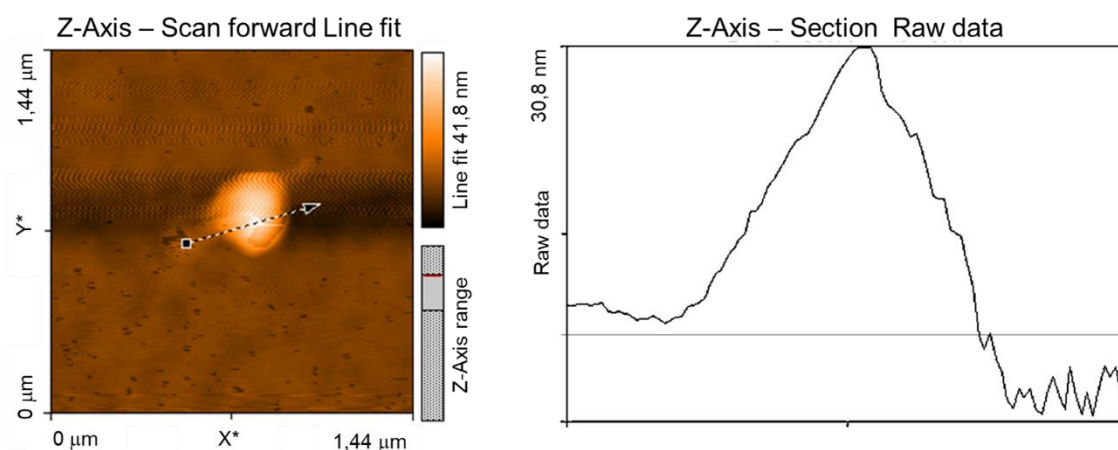


Figura II.9 - Imagens topográficas de AFM da secção de corte transversal da dispersão aquosa dos PsC_13 (0.1 mg mL^{-1}).

Comparando as imagens topográficas dos diferentes ensaios, verificou-se ainda que os PsC_04 possuem uma maior dispersividade face aos PsC_13, amostra na qual os nanomateriais aparentam estar sobrepostos num único agregado.

Adicionalmente, a Figura II.10 apresenta a renderização tridimensional da avaliação morfológica dos PsC em estudo.

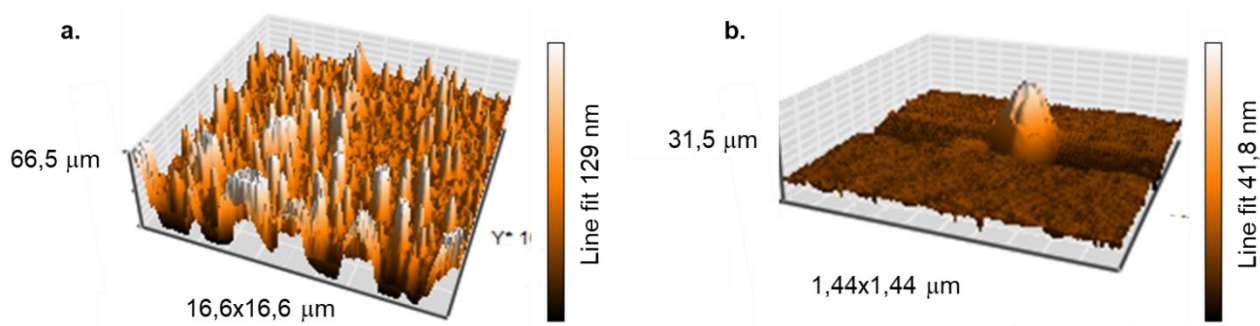


Figura II.10 – Renderização tridimensional de AFM das dispersões aquosas dos **a.** PsC_04 e **b.** PsC_13 (0.1 mg mL^{-1}).

Através do ensaio de AFM realizado, foi possível determinar, preliminarmente, o tamanho médio dos PsC_04, de ca. 10 nm.

II.3.5 Propriedades Fotofísicas

As propriedades fotofísicas destas nanopartículas são consideradas de elevada importância, dada a sua aplicabilidade na área da imagiologia. Estas foram avaliadas recorrendo à espectroscopia de absorção no estado fundamental (UV-Vis) e à espectroscopia de fluorescência no estado estacionário (emissão e excitação) das várias dispersões aquosas de PsC.

A Figura II.11 representa os espectros de UV-Vis, emissão e excitação de PsC sintetizados sob as mesmas condições reacionais (250 °C, 6 h, *via* CHAC), mas com diferentes rácios mássicos de ED/BM-Cv (0.16 e 0.32), resultando dos dois ensaios PsC com rendimentos quânticos de fluorescência semelhantes (ca. 21 %).

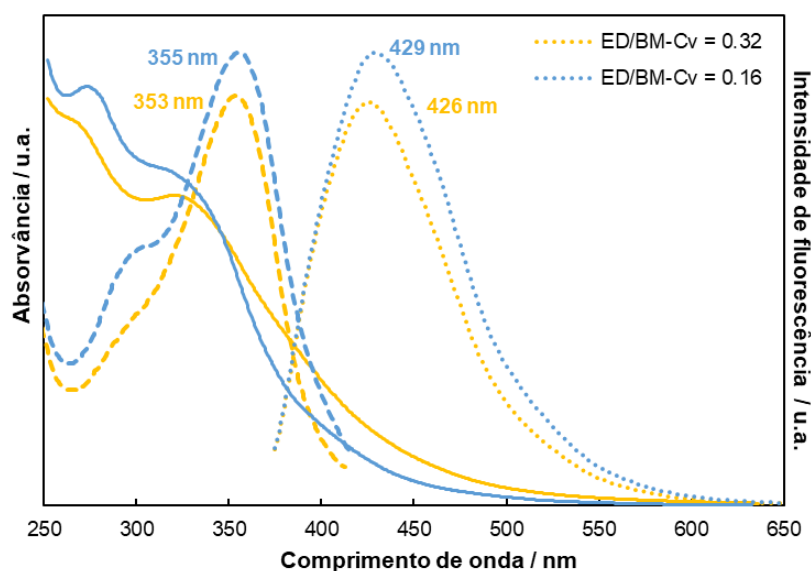


Figura II.11 - Espectros de UV-Vis (linha contínua), emissão (linha pontilhada; $\lambda_{exc} = 360$ nm) e excitação (linha tracejada; monitorizados a 430 e 425 nm), dos PsC_04 (azul) e PsC_13 (amarelo), obtidos a partir de uma dispersão aquosa de 0.1 mg mL⁻¹.

Os espectros de UV-Vis exibem bandas ca. 280 nm e 325 nm. De acordo com a literatura, estas podem ser atribuídas às transições $\pi-\pi^*$ das ligações C=C da rede de carbono e $n-\pi^*$ das ligações C=O, respetivamente.⁸⁴ Verifica-se que as dispersões aquosas dos PsC, quando excitadas a $\lambda_{exc} = 360$ nm, emitem na região do azul, exibindo um máximo de emissão entre 425-429 nm. Comparando os espectros dos PsC sintetizados com diferentes quantidades de aditivo, é possível concluir que quer os espectros de absorção, quer os de emissão e de excitação, apresentam perfis e máximos relativamente semelhantes.

De uma forma geral, os PsC sintetizados *via* CHAC utilizando ED como aditivo e diferentes rácios mássicos permitiram a obtenção de rendimentos quânticos moderados (20-24 %),

superiores aos restantes ensaios. Dos ensaios realizados por CHMO resultaram PsC com RQ mais baixos, entre 9-11 % (vide Secção II.3.1).

Na Figura II.12 apresentam-se diversos espectros de emissão de uma dispersão aquosa PsC (ED/BM-Cv = 0.32, 250 °C, 6 h) com excitação a diferentes comprimentos de onda, demonstrando o fenómeno de fotoluminescência ajustável característico destas nanopartículas.

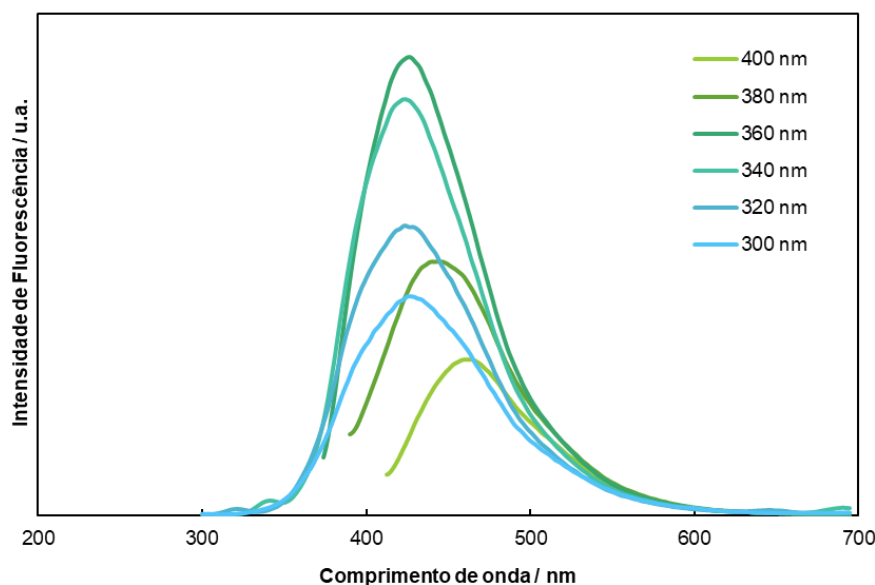


Figura II.12 - Espectros de emissão de uma dispersão aquosa 0.1 mg mL⁻¹ de PsC₁₃ com excitação a diferentes comprimentos de onda (300 a 400 nm).

É possível verificar a forte dependência entre o comprimento de onda de excitação e o comprimento de onda de emissão, sendo evidente um progressivo desvio batocrômico. Adicionalmente, verifica-se que o comprimento de onda de excitação que permite uma maior intensidade de fluorescência é 360 nm, tendo sido este o λ_{exc} selecionado para a determinação do RQ.

A Figura II.13 destaca as propriedades fotoluminescentes dos PsC, demonstrando a sua fluorescência na zona do azul aquando da sua irradiação com luz UV.



Figura II.13 - Dispersão aquosa de PsC sob **a.** luz visível e **b.** luz UV ($\lambda_{exc} = 366$ nm).

Entre as propriedades fotofísicas dos PsC, foi ainda avaliada a sua fotoestabilidade sob condições de irradiação contínua durante 1 h a $\lambda_{exc} = 360$ nm. A Figura II.14 apresenta os espectros de emissão adquiridos ao longo deste período, permitindo verificar a manutenção da intensidade de fluorescência.

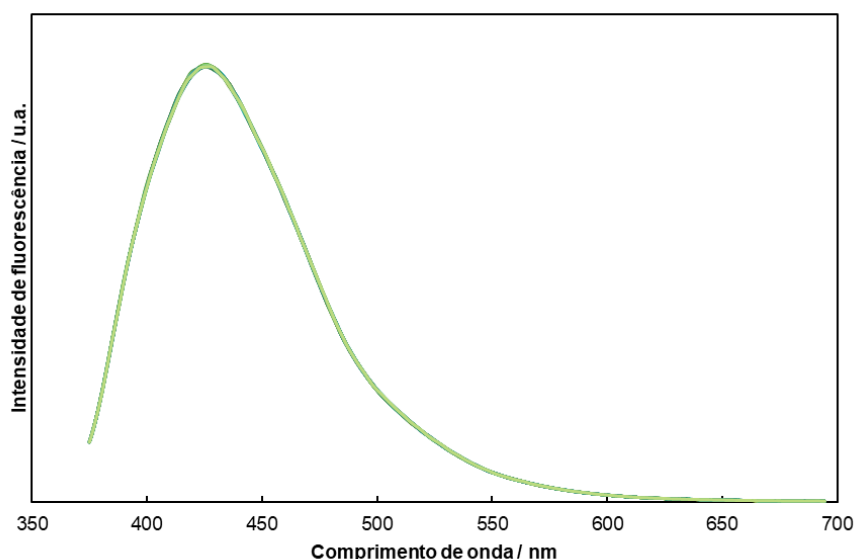


Figura II.14 - Espectros de emissão das dispersões aquosa de PsC_13 (0.1 mg mL^{-1}) adquiridos ao longo de 1 hora de irradiação contínua ($\lambda_{exc} = 360$ nm).

De seguida, procedeu-se à avaliação da influência do pH na luminescência dos pontos de carbono sintetizados. No âmbito do presente trabalho, a sensibilidade dos PsC à variação do pH pode condicionar a sua aplicabilidade em imagiologia, sendo por esta razão o estudo das alterações de pH fisiológico uma variável relevante a ser considerada.

De forma a variar o pH da dispersão aquosa dos PsC entre 1 e 12, foram adicionadas soluções aquosas de HCl e NaOH a diferentes concentrações, mantendo, no entanto, a concentração de PsC inalterada. Partindo de um pH inicial de 7.3, como assinalado na Figura II.15,

constatou-se que a intensidade de fluorescência dos PsC é sensível à alteração do pH do meio. Perante a acidificação do meio (pH entre 1 e 5), a intensidade de fluorescência aumentou face à registada ao pH inicial. Já para valores de pH básicos (acima de 7.5), verificou-se um decréscimo da fotoluminescência.

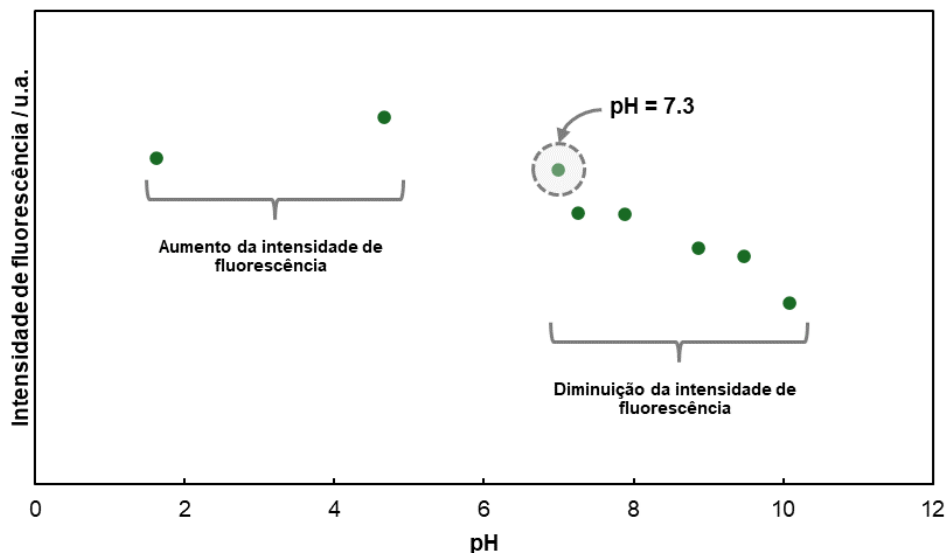


Figura II.15 - Variação da fotoluminescência ($\lambda_{exc} = 360 \text{ nm}$) da dispersão aquosa de PsC (0.1 mg mL^{-1}).

O pH fisiológico humano não é constante, sendo um estado dinâmico e diverso regulado por vários mecanismos biológicos. Em geral, para a maioria dos tecidos é de ca. 7.0-7.4, com algumas exceções, por exemplo, o pH do estômago (1 a 3), o pH do intestino delgado (4 a 7) e o pH da pele (4.5 a 5.5). Assim, verifica-se que a intensidade de fluorescência dos PsC sintetizados exibem uma intensidade de fluorescência elevada na gama de valores do pH fisiológico.¹⁵⁶

II.4 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DOS PONTOS DE CARBONO

O estudo da atividade biológica dos PsC decorreu da avaliação da atividade antibacteriana, das propriedades antioxidantes, da citotoxicidade celular e da marcação por fluorescência *in vitro* e *in vivo*. Estes estudos tiveram como objetivo explorar a versatilidade das aplicações dos pontos de carbono reportada amplamente pela literatura^{54,56}, assim como a sua excelente biocompatibilidade.

II.4.1 Atividade Antibacteriana

A atividade antibacteriana dos PsC sintetizados foi avaliada com recurso a duas estirpes bacterianas, *Escherichia coli* ATCC® 25922 (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 (Gram-positiva), através de dois métodos distintos, a técnica de suscetibilidade à difusão em disco e o método de microdiluição em meio líquido para a determinação dos valores de concentração mínima inibitória (MIC) e de concentração mínima letal (MLC). De seguida são apresentados os resultados obtidos por ambos os métodos.

II.4.1.1 Técnica de suscetibilidade à difusão em disco

A primeira metodologia a ser aplicada foi a técnica de suscetibilidade à difusão em disco.^{157,158} De forma a avaliar a influência da quantidade de PsC na inibição do crescimento microbiano, foram aplicadas diferentes massas (100, 500 e 1000 µg/disco) dos PsC testados (Tabela II.15) e comparados com o controlo positivo do antibiótico gentamicina (10 µg) e o controlo negativo de água estéril.

A Figura II.16 apresenta os diâmetros de inibição obtidos após incubação das espécies bacterianas com PsC_01 (ED/BM-Cv = 0.16, 250 °C, 6 h, CHAC). A atividade antibacteriana foi detetada apenas nos discos onde foi aplicada a massa mais elevada de PsC (1000 µg/disco), apresentando diâmetros de inibição de 1.1 ± 0.0 cm e 1.2 ± 0.0 cm para *E. coli* e *S. aureus*, respetivamente. Os restantes discos impregnados com a solução aquosa de PsC não apresentaram diâmetro de inibição, indicando a ausência de atividade antibacteriana.

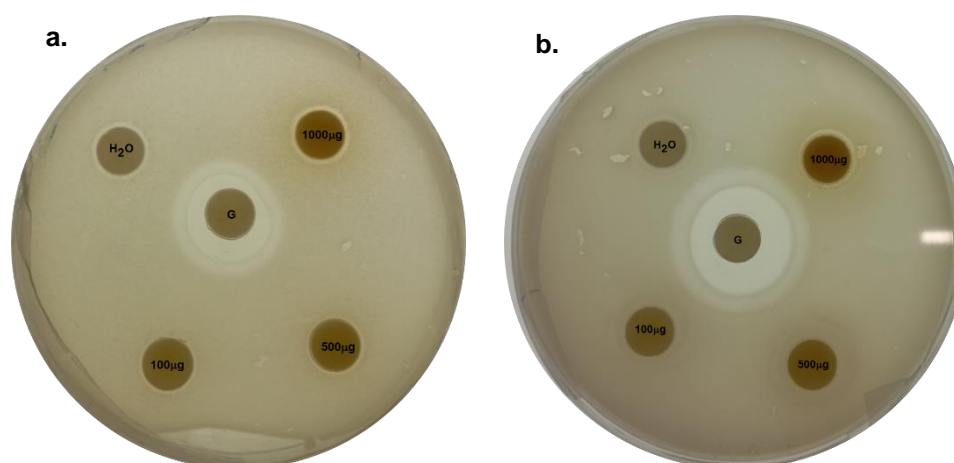


Figura II.16 - Resultados dos ensaios de difusão em disco, após incubação das estirpes bacterianas **a.** *E. coli* e **b.** *S. aureus* com PsC_01 (100, 500 e 1000 µg/disco), utilizando como controlo positivo gentamicina (G, 10 µg) e controlo negativo água estéril.

Por sua vez, a Figura II.17 diz respeito aos ensaios com discos impregnados com a solução aquosa de PsC sintetizado *via* CHMO (ED/BM-Cv = 0.16, 150 °C, 15 min). A cultura de *E. coli* apresentou um elevado diâmetro de inibição em redor do disco onde foi aplicada a maior quantidade de PsC, enquanto na cultura de *S. aureus* não se observou atividade antibacteriana.

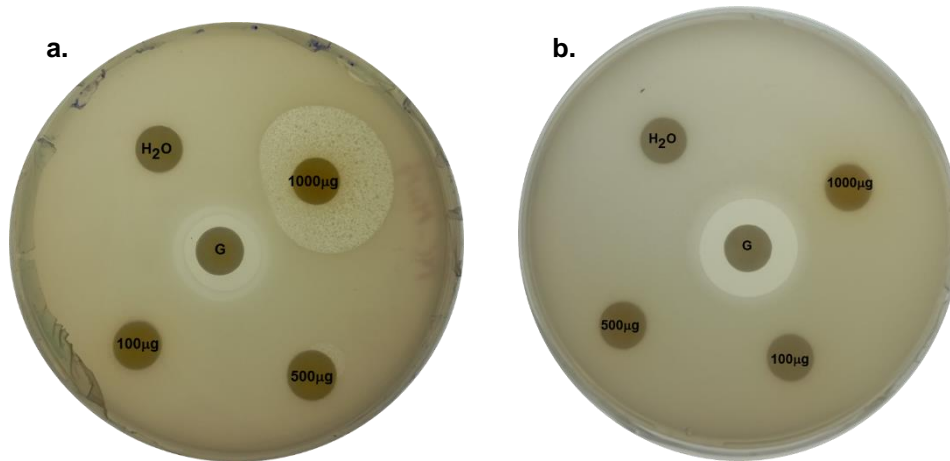


Figura II.17 - Resultados dos ensaios de difusão em disco, após incubação das estirpes bacterianas **a.** *E. coli* e **b.** *S. aureus* com PsC_CHMO_19 (100, 500 e 1000 µg/disco), utilizando como controlo positivo gentamicina (G, 10 µg) e controlo negativo água estéril.

Na Tabela II.15 constam os resultados referentes aos restantes ensaios da técnica de suscetibilidade à difusão em disco. Embora tenha sido possível detetar atividade antibacteriana em alguns dos PsC testados, os diâmetros de inibição exibidos foram, de forma geral, reduzidos.

Os PsC sintetizados *via* CHMO nos ensaios exploratórios com a primeira BM-Cv fornecida pela empresa (PsC_CHMO_17 e 18) permitiram a deteção de um diâmetro de inibição de crescimento microbiano nos discos de menor massa aplicada, ao contrário dos restantes ensaios. Embora não tenham sido efectuados testes com massas de PsC mais elevadas (500 µg e 1000 µg/disco) devido a limitações na quantidade de dispersão aquosa disponível, prevê-se que a tendência seria um aumento dos diâmetros de inibição com o aumento da massa aplicada.

Os restantes PsC testados, nomeadamente os sintetizados *via* CHAC, não apresentaram atividade antibacteriana relevante contra as bactérias testadas. É de salientar que, de forma geral, a espécie *S. aureus* demonstrou resistência aos PsC.

Tabela II.15 - Diâmetros de inibição do crescimento de *E. coli* e *S. aureus*, obtidos em ensaios de difusão em disco.

Ensaio	ED/BM-Cv	Diâmetro de inibição (cm) ^c		
		100 µg /disco	500 µg /disco	1000 µg /disco
<i>E. coli</i>				
PsC_01 ^a	0.16	n.d.	n.d.	1.1 ± 0.0
PsC_02 ^a	0.08	n.d.	1.1 ± 0.0	1.3 ± 0.1
PsC_CHMO_17 ^b	0.16	1.1 ± 0.0	-	-
PsC_CHMO_18 ^b	0.08	1.2 ± 0.0	-	-
PsC_07 ^a	0.00	n.d.	n.d.	n.d.
PsC_12 ^a	0.08	n.d.	n.d.	n.d.
PsC_04 ^a	0.16	n.d.	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1
PsC_13 ^a	0.32	n.d.	n.d.	n.d.
PsC_CHMO_19 ^b	0.16	n.d.	n.d.	2.8 ± 0.4
Ácido Cítrico	0.16	-	-	-
<i>S. aureus</i>				
PsC_01 ^a	0.16	n.d.	n.d.	1.2 ± 0.0
PsC_02 ^a	0.08	n.d.	n.d.	n.d.
PsC_CHMO_17 ^b	0.16	n.d.	-	-
PsC_CHMO_18 ^b	0.08	n.d.	-	-
PsC_07 ^a	0.00	n.d.	n.d.	n.d.
PsC_12 ^a	0.08	n.d.	n.d.	n.d.
PsC_04 ^a	0.16	n.d.	n.d.	n.d.
PsC_13 ^a	0.32	n.d.	n.d.	n.d.
PsC_CHMO_19 ^b	0.16	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido Cítrico	0.16	-	-	-

^aCHAC, 250 °C, 6 h; ^bCHMO, 150 °C, 15 min

^cGentamicina como controlo positivo (10 µg/disco): 1.8 ± 0.1 (*E. coli*) e 2.1 ± 0.1 (*S. aureus*); Atividade antibacteriana não detetada (n.d.); Não determinado (-); valores médios ± DP dos replicados.

Pontos de carbono sintetizados a partir da biomassa da microalga *P. cruentum*⁹⁴ foram testados através do mesmo método de difusão em discos e contra as mesmas espécies bacterianas. Os resultados reportam a ausência de halo de inibição de crescimento em torno dos discos impregnados com diferentes concentrações de PsC, corroborando os resultados obtidos.

Tendo em conta os resultados obtidos através deste método, optou-se por avaliar esta propriedade simultaneamente através do método colorimétrico de microdiluição em meio líquido utilizando resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido, sal de sódio), como agente marcador da viabilidade celular, uma vez que é considerado mais sensível e fiável, comparativamente à técnica da suscetibilidade à difusão em disco.

II.4.1.2 Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Letal

A determinação dos valores da Concentração Mínima Inibitória (MIC) e da Concentração Mínima Letal (MLC) foi realizada pelo método colorimétrico de microdiluição em meio líquido, baseado na redução de resazurina a resorufina.¹⁵⁹ A atividade antibacteriana foi igualmente testada com recurso às estirpes bacterianas *E. coli* ATCC® 25922 e *S. aureus* ATCC® 25923, utilizando água e meio MHB (*Mueller Hinton Broth*) no ensaio em branco.

O valor de MIC é considerado a menor concentração de um agente antimicrobiano à qual este inibe o crescimento de um microrganismo, existindo uma redução $\geq 80.0\%$ do crescimento bacteriano comparativamente ao controlo. Por sua vez, o valor de MLC diz respeito à concentração mínima necessária para inibir o crescimento de $\geq 99.9\%$ de um microrganismo.¹⁶⁰

Através dos resultados obtidos nos estudos de atividade antibacteriana onde foram aplicados os PsC sintetizados como ensaios exploratórios verificou-se não ter sido possível detetar valores de MIC e MLC, indicando que estes não possuem atividade antibacteriana significativa dentro da gama estudada (0.0 - 8.0 mg mL⁻¹).

A mesma abordagem foi utilizada para os restantes PsC sintetizados, aplicando as soluções aquosas dos nanomateriais numa gama de concentrações de 0.0 a 8.0 mg mL⁻¹, não tendo sido detetados quaisquer valores de MIC e/ou MLC neste intervalo. Assim, optou-se por alargar a gama aplicada até à concentração máxima de cada dispersão aquosa.

Para o efeito, apresentam-se de seguida todos os ensaios estudados (Tabela II.16), nos quais os PsC foram obtidos por CHAC com a mesma quantidade de biomassa e água Millipore®, durante 6 h, variando a temperatura de síntese, natureza do aditivo e rácio de ED/BM-Cv. Na Tabela II.16 encontra-se destacado o ensaio PsC_04, considerado o ensaio *standard*, sintetizado a 250 °C, com um rácio de ED/BM-Cv de 0.16.

É de notar que para o estudo da atividade antibacteriana foram testados apenas PsC sintetizados *via* CHAC, uma vez que os ensaios obtidos por CHMO apresentaram um volume final insuficiente para esta aplicação.

Tabela II.16 - Valores MIC e MLC dos PsC sintetizados e aplicados ao estudo da atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus*, determinados pelo método de microdiluição em meio líquido.

Ensaio	Conc. máxima aplicada (mg mL ⁻¹)	Condições reacionais ^a	MIC (mg mL ⁻¹) ^b		MLC (mg mL ⁻¹) ^b		
			<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
PsC_04	17.20	ED/BM-Cv = 0.16; Temperatura variável	250 °C	n.d.	n.d.	n.d.	> 8.0
PsC_03	10.53		300 °C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PsC_05	23.70		200 °C	> 10.0	n.d.	n.d.	> 10.0
PsC_06	19.90		150 °C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PsC_04	17.20	Aditivo/BM-Cv = 0.16; 250 °C Natureza do aditivo variável	ED	n.d.	n.d.	n.d.	> 8.0
PsC_08	15.92		DET	n.d.	n.d.	n.d.	2.0
PsC_09	9.74		Ureia	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PsC_10	10.47		p-FD	n.d.	n.d.	5.2	1.3
PsC_11	8.36		ML	n.d.	n.d.	n.d.	> 8.0
PsC_07	10.78	250 °C; ED/BM-Cv variável	0.00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PsC_12	14.97		0.08	n.d.	n.d.	n.d.	> 10.0
PsC_04	17.20		0.16	n.d.	n.d.	n.d.	> 8.0
PsC_13	17.62		0.32	n.d.	n.d.	n.d.	> 8.0
PsC_14	27.31		0.64	n.d.	n.d.	6.8	3.4

^a CHAC; 3 g de BM-Cv, 100 mL de água Millipore®; 6 h; ^b Atividade antibacteriana não detetada (n.d.)

Através dos resultados obtidos e representados na Tabela II.16, é possível inferir que a variação do rácio ED/BM-Cv não promoveu uma variação significativa da atividade antibacteriana dos PsC, à exceção do rácio de 0.64 (PsC_14), que permitiu a deteção de valores de MLC para ambas as estirpes bacterianas. Por outro lado, a utilização de diferentes aditivos permitiu a deteção de valores de MLC a concentrações mais baixas, como é o caso da p-FD (PsC_10), que levou à inibição total do crescimento de *S. aureus* à concentração de 1.3 mg mL⁻¹.

A Figura II.18 apresenta, graficamente os resultados referentes ao ensaio PsC_05, onde se encontram identificados os valores de MIC e MLC.

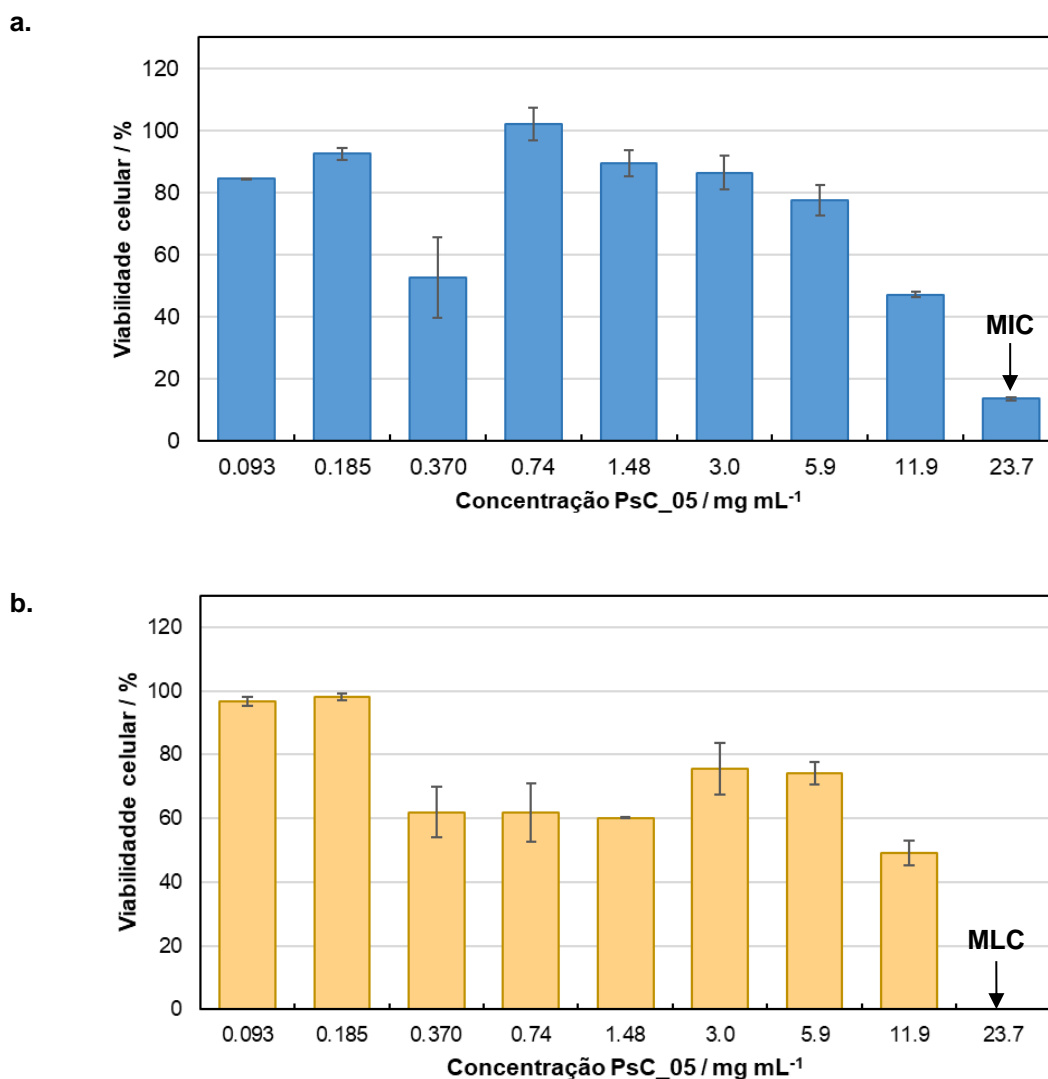


Figura II.18 - Avaliação da atividade antibacteriana contra **a.** *E. coli* e **b.** *S. aureus*, após incubação de diferentes concentrações de PsC_05, expressa pelo decréscimo da viabilidade celular (%).

Apenas os PsC de rácio mássico ED/BM-Cv variável (PsC_04, 07, 12 e 13) foram estudados pelos dois métodos. Nestes casos, os resultados são concordantes, à exceção de PsC_04 (ED/BM-Cv = 0.16), que aparenta inibir parcialmente o crescimento de *E. coli* na avaliação da difusão em disco, resultado não corroborado pelo segundo método.

Para além dos resultados apresentados na tabela anterior, foi também estudada a atividade antibacteriana dos PsC obtidos em mufla (PsC_15), que permitiu a deteção de valores de MIC > 10 mg mL⁻¹ contra *E. coli* e de 5.1 mg mL⁻¹ contra *S. aureus*; para esta espécie foi ainda possível detetar o valor de MLC > 10 mg mL⁻¹. Na Figura II.19 estão representados graficamente estes resultados.

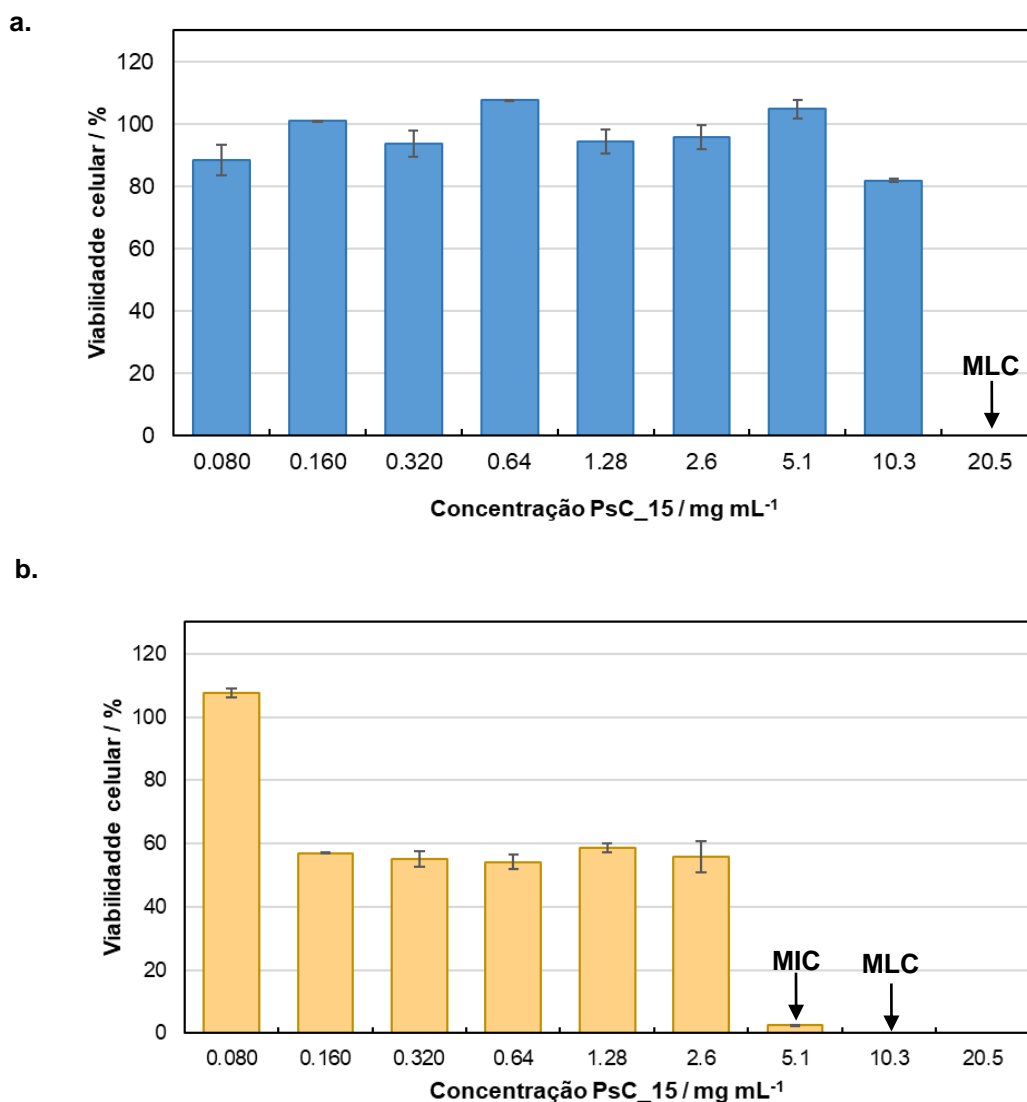


Figura II.19 - Avaliação da atividade antibacteriana contra **a.** *E. coli* e **b.** *S. aureus*, após incubação de diferentes concentrações de PsC_15, expressa pelo decréscimo da viabilidade celular (%).

Atendendo aos resultados obtidos, quer através dos ensaios de difusão em disco, quer através da determinação dos valores de MIC e MLC, é possível inferir que os PsC obtidos a partir de BM-Cv aparentam possuir uma baixa atividade antibacteriana. Não obstante, embora se tenham revelado pouco bactericidas contra *E. coli*, vários ensaios permitiram a deteção de MLC contra *S. aureus*, em particular perante a utilização de diferentes aditivos e à maior concentração de ED.

As melhores propriedades antibacterianas foram registadas para o ensaio PsC_10, sintetizado com $p\text{-FD}/\text{BM-Cv} = 0.16$. De acordo com Ye *et al.*,¹⁶⁰ este fenómeno pode ser explicado pela composição da molécula de *p*-FD, que conta com dois grupos $-\text{NH}_2$ que, por sua vez, existem sob a forma de $-\text{NH}_3^+$ ao pH fisiológico. Desta forma, os PsC funcionalizados

com *p*-FD encontram-se superficialmente cobertos por grupos quaternários de amônia, cujas propriedades antibacterianas têm vindo a ser estudadas pela comunidade científica.

Comparativamente a estudos reportados na literatura, como é o caso dos PsC obtidos por Zhao *et al.*,¹¹³ que indicam valores de MIC de 10 µg mL⁻¹ e 50 µg mL⁻¹ contra *E. coli* e *S. aureus*, respetivamente, os PsC sintetizados a partir de BM-Cv apresentam uma atividade antibacteriana significativamente mais baixa, sendo necessária a aplicação de uma dose extremamente elevada para atingir a MIC e a MLC (> 10 000 µg mL⁻¹).

Contudo, Sun *et al.*¹⁶¹ conseguiram estabelecer uma relação entre o tamanho das nanopartículas e a sua atividade antibacteriana, sendo que tanto a sua internalização pelas células como a sua distribuição nas membranas celulares estão dependentes do seu diâmetro. Através do seu estudo, os autores puderam concluir que PsC de menor tamanho possuem uma melhor atividade antibacteriana, tendo em conta a sua facilidade de se difundir pela membrana celular. Assim, os valores de MIC determinados contra *E. coli*, para as nanopartículas de 2 nm, 4 nm e 5 nm foram de 75, 100 e 100 µg mL⁻¹, respetivamente. Já contra *S. aureus* os PsC provocaram a inibição do crescimento bacteriano às concentrações de 50, 75 e 100 µg mL⁻¹.

Atentando à caracterização morfológica apresentada na Secção II.3.4, é possível concluir que a baixa atividade antibacteriana destes PsC pode dever-se ao seu tamanho, sendo que estes apresentam diâmetros variáveis (ca. 9 nm). Adicionalmente, verificou-se que estes nanomateriais têm tendência a agregar-se, podendo constituir também um obstáculo à sua internalização através da parede celular.

II.4.2 Atividade Antioxidante e Capacidade Quelante

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada através do método do radical ABTS. À semelhança dos restantes estudos realizados, foi efetuada uma análise preliminar recorrendo aos ensaios exploratórios, cujos resultados se encontram na Figura II.20, a par dos resultados dos controlos positivos, Trolox, BHT (butil-hidroxitolueno) e ácido ascórbico, utilizados para fins comparativos. Neste sentido, foram selecionados PsC sintetizados *via* CHAC e CHMO, com diferentes rácios mássicos de ED/BM-Cv (0.16 e 0.08).

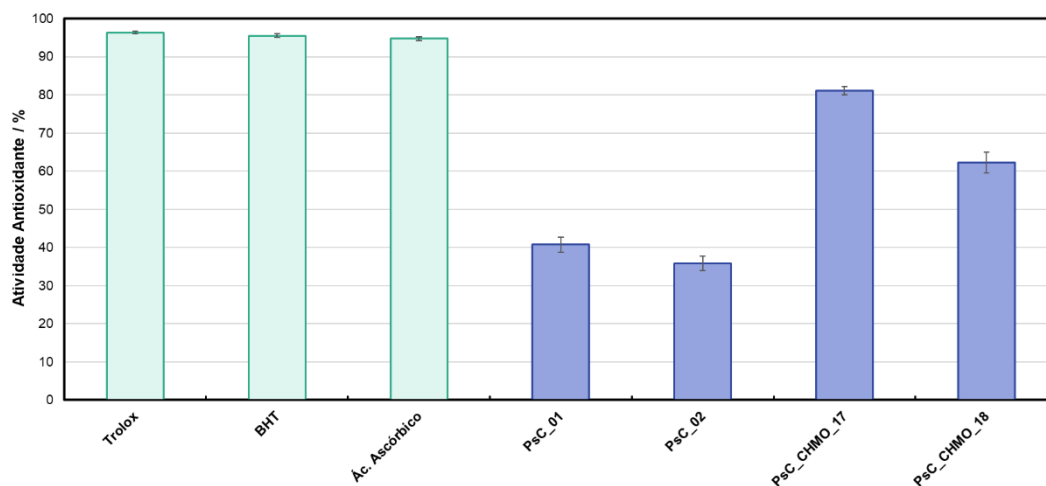


Figura II.20 - Atividade antioxidante em percentagem dos PsC obtidos em ensaios exploratórios e dos controlos positivos, à concentração de 1 mg mL^{-1} , determinada pelo método de inibição do radical ABTS.

Verificou-se que os PsC sintetizados *via* CHAC (PsC_01 e 02) revelaram uma percentagem de atividade antioxidante inferior a 50 %, não demonstrando dependência significativa da quantidade de aditivo utilizada. Por outro lado, os PsC obtidos por CHMO (PsC_CHMO_17 e 18) apresentaram um melhor desempenho, sendo que os PsC sintetizados com um rácio de 0.16 ED/BM-Cv permitiram a atingir ca. 80 % de atividade antioxidante.

A mesma análise foi realizada para os restantes PsC sintetizados, como se pode verificar através da Figura II.21. Comparativamente aos ensaios exploratórios, verificou-se uma diminuição significativa da percentagem de atividade antioxidante. À semelhança do que é possível observar na figura seguinte, os PsC sintetizados com diferentes tipos de aditivo apresentaram atividade antioxidante moderada, quando comparada com os controlos positivos Trolox ($96.72 \pm 0.16 \%$), BHT ($96.50 \pm 0.50 \%$) e ácido ascórbico ($96.39 \pm 1.04 \%$).

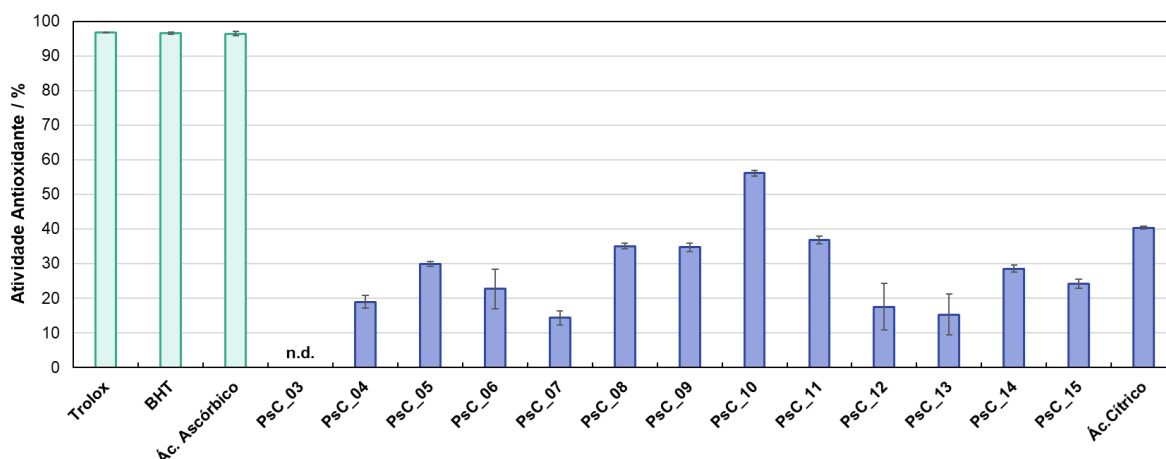


Figura II.21 - Atividade antioxidante em percentagem dos PsC obtidos e dos controlos positivos, à concentração de 3 mg mL^{-1} , determinada pelo método de inibição do radical ABTS; n.d. - não detetado.

Analisando a Tabela II.17 é possível inferir que esta propriedade se destacou particularmente nos PsC funcionalizados com *p*-FD ($56.09 \pm 0.88 \%$; $242.30 \pm 3.87 \mu\text{g ET/mg PsC}$) e revelou-se mais baixa nos PsC sintetizados sem aditivo ($14.33 \pm 2.05 \%$; $58.88 \pm 7.19 \mu\text{g ET/mg PsC}$). Contudo, a capacidade antioxidante determinada foi inferior aos resultados reportados por Roy *et al.*,¹¹⁸ cujos PsC sintetizados a partir de açafrão se aproximaram do valor obtido pelo controlo positivo (ca. 80-90 %). Da mesma forma, o ensaio realizado com PsC a partir ácido cítrico demonstrou uma capacidade antioxidante inferior (ca. 40 %) sendo, no entanto, superior aos ensaios com os restantes PsC, à exceção do ensaio PsC_10 (*p*-FD).

Foi também possível concluir que os PsC funcionalizados com ED apresentaram baixa atividade antioxidante, não se verificando uma relação de proporcionalidade entre esta propriedade e o rácio de aditivo utilizado, assim como não se verificou uma dependência da temperatura de síntese. Contudo, é de salientar a existência de um comportamento semelhante dos PsC perante a avaliação da atividade antibacteriana e antioxidante, sendo que o ensaio de *p*-FD se destacou em ambos os estudos pelas suas propriedades biológicas.

Tabela II.17 - Atividade antioxidante em $\mu\text{g ET/mg}$ de PsC (3 mg mL^{-1}) resultantes dos diferentes ensaios realizados, determinada pelo método de inibição do radical ABTS.

Ensaio	Condições reacionais ^a	Atividade Antioxidante ($\mu\text{g ET/mg PsC}$)	
PsC_04	ED/BM-Cv = 0.16; Temperatura variável	250 °C	70.09 ± 7.70
PsC_03		300 °C	n.d.
PsC_05		200 °C	126.97 ± 3.35
PsC_06		150 °C	95.69 ± 7.86
PsC_15 ^b	Mufia	150 °C	96.36 ± 3.51
PsC_04	Aditivo/BM-Cv = 0.16; 250 °C; Natureza do aditivo variável	ED	70.09 ± 7.70
PsC_08		DET	149.61 ± 3.51
PsC_09		Ureia	143.70 ± 3.68
PsC_10		<i>p</i> -FD	242.30 ± 3.87
PsC_11		ML	160.94 ± 1.51
PsC_07	250 °C; ED/BM-Cv variável	0.00	58.88 ± 7.19
PsC_12		0.08	72.93 ± 9.20
PsC_04		0.16	70.09 ± 7.70
PsC_13		0.32	63.06 ± 25.77
PsC_14		0.64	121.28 ± 3.37
Ácido cítrico	Ensaio modelo		40.29 ± 0.41

^a Condições reacionais: CHAC; 3 g de BM-Cv, 100 mL de água Millipore®; 6 h;

^b Condições reacionais: CHAC; Mufia; 12 h; 150 °C; n.d. – Não detetado; valores médios ± DP dos replicados.

Para a avaliação da atividade antioxidante, foi ainda estudada a capacidade quelante de íons Fe^{2+} dos PsC selecionados e utilizado como controlo positivo o EDTA, para fins comparativos.

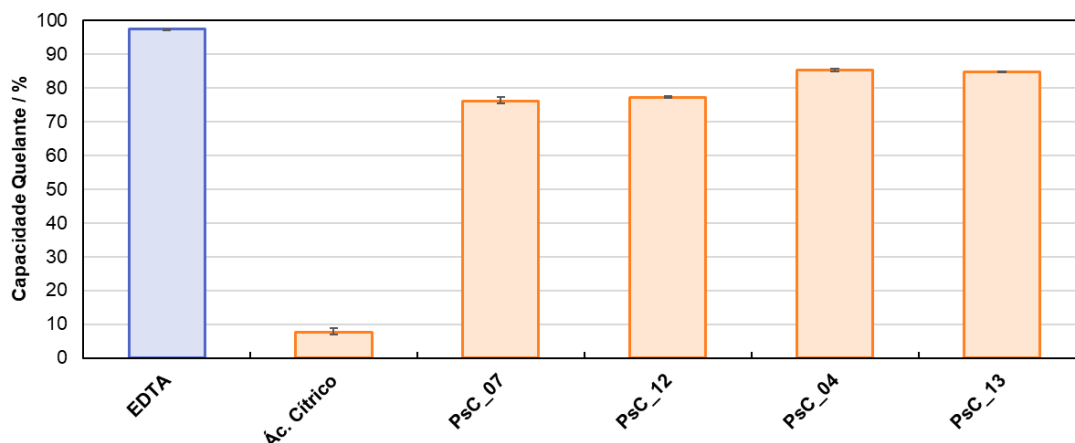


Figura II.22 - Capacidade Quelante de íons Fe^{2+} (%) dos PsC selecionados e do controlo positivo (EDTA) à concentração de 3 mg mL^{-1} .

Para o efeito, foram escolhidos os PsC sintetizados com diferentes rácios mássicos de ED/BM-Cv, bem como o ensaio modelo realizado com ácido cítrico. Através dos resultados obtidos, foi possível concluir que os PsC obtidos a partir da biomassa da microalga revelaram uma excelente capacidade quelante, relativamente próxima do controlo positivo. Os PsC funcionalizados com maiores quantidades de ED (ED/BM-Cv = 0.16 e 0.32), destacaram-se pela sua capacidade quelante de íons Fe^{2+} ca. 85 % (85.22 ± 0.32 % e 84.71 ± 0.05 %, respetivamente), enquanto os ensaios com menor quantidade de aditivo deram origem a valores ca. 76-77 %. Assim, é possível concluir que pode existir uma relação entre a quantidade de aditivo utilizada e a propriedade em estudo. De forma contrastante, o ensaio com ácido cítrico apresentou um valor muito baixo (7.54 ± 0.73 %) para a capacidade quelante de íons Fe^{2+} .

II.4.3 Avaliação da Citotoxicidade *in vitro*

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos PsC foi realizada através do método colorimétrico do MTT, tendo sido quantificada a viabilidade celular de três linhas celulares após incubação com PsC selecionados com base nas variações de rácio mássico ED/BM-Cv (0.00, 0.08, 0.16 e 0.32), e na variação de temperatura de síntese (150 °C, 200 °C, 250 °C e 300 °C).

Esta avaliação foi efetuada através da análise da viabilidade celular de duas linhas celulares animais normais, VERO ATCC® CCL-81 (células epiteliais renais de macaco verde africano)

e NIH-3T3 ATCC® CRL-1658 (fibroblastos embrionários), e uma linha celular animal tumoral S180 ATCC® TIB-66 (células de sarcoma de murganho).

De acordo com a norma ISO 10993-5, quanto mais baixa for a percentagem de viabilidade celular, maior o potencial citotóxico do composto em análise, considerando-se que este possui um efeito citotóxico perante uma diminuição para menos de 70 %.¹⁶² A Tabela II.18 e a Tabela II.19 apresentam os resultados relativos ao efeito do rácio de ED e da temperatura na viabilidade das três linhas celulares, respetivamente.

Relativamente aos PsC sintetizados com diferentes quantidades de ED, é possível concluir que os nanomateriais correspondentes aos rácios mássicos de 0.00 e 0.08 apresentaram um efeito citotóxico para as três linhas celulares testadas. No caso das células VERO e NIH-3T3, revelaram toxicidade apenas às concentrações mais elevadas (8000 e 4000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respetivamente), verificando-se um decréscimo da viabilidade celular para ca. 40-60 %. Por sua vez, as células S180 demonstraram toxicidade na presença dos PsC, a uma concentração de 8000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o rácio mássico de 0.00 e a uma concentração de 62.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o rácio mássico de 0.08, exibindo o último um elevado efeito citotóxico.

Tabela II.18 - Efeito do rácio ED/BM-Cv utilizado na síntese de PsC na viabilidade celular das linhas celulares VERO, NIH-3T3 e S180.

Ensaio	ED/BM-Cv ^a	Citotoxicidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^b		
		VERO	NIH-3T3	S180
PsC_07	0.00	8000 (58 %)	4000 (44 %)	8000 (62 %)
PsC_12	0.08	8000 (63 %)	4000 (63 %)	62.5 (67 %)
PsC_04	0.16	n.d.	n.d.	4000 (39 %)
PsC_13	0.32	n.d.	n.d.	8000 (56 %)

^a Condições reacionais: 3 g de BM-Cv, 100 mL de água Millipore®; 250 °C; 6 h.

^b Citotoxicidade não detetada (n.d.)

Por outro lado, os PsC sintetizados com rácios mássicos de 0.16 e 0.32 ED/BM-Cv demonstraram não ser citotóxicos para as células VERO e NIH-3T3 e uma citotoxicidade moderada contra com as células S180. É de salientar que os PsC de rácio mássico de 0.16 exibiram maior efeito citotóxico contra as células S180 relativamente aos PsC de rácio mássico de 0.32, tendo ocorrido um decréscimo da viabilidade celular para 39 % à concentração de 4000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ vs. 56 % à concentração mais elevada (8000 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Na Figura II.23 estão representados os gráficos correspondentes à avaliação da citotoxicidade *in vitro* do ensaio PsC_13 (ED/BM-Cv = 0.32), que foi posteriormente aplicado aos estudos *in vivo* (Secção II.4.4).

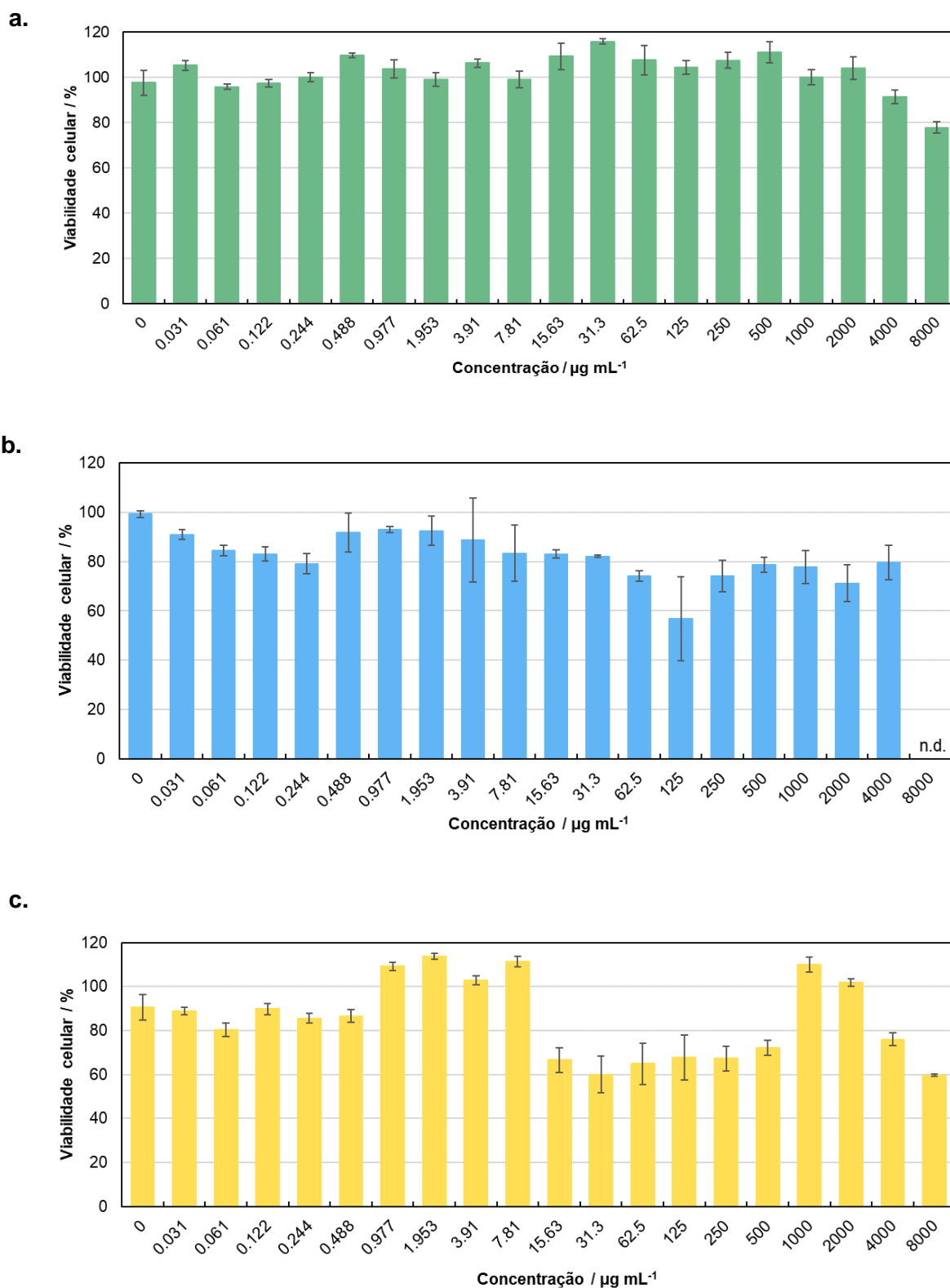


Figura II.23 - Citotoxicidade celular contra as linhas celulares **a.** VERO, **b.** NIH-3T3 e **c.** S180 dos PsC_13 (ED/BM-Cv = 0.32) avaliada pelo método do MTT; (Citotoxicidade celular não detetada – n.d.).

Paralelamente ao estudo da influência da quantidade de aditivo na citotoxicidade dos PsC, procurou-se estudar o efeito da temperatura de síntese (Tabela II.19), já que diversos estudos indicam que esta pode ser um fator determinante não só da morfologia e das propriedades óticas dos nanomateriais sintetizados, mas também das suas propriedades biológicas.^{153,163}

Tabela II.19 - Efeito da temperatura de síntese dos PsC na viabilidade celular das linhas VERO, NIH-3T3 e S180.

Ensaio	Temperatura ^a	Citotoxicidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^b		
		VERO	NIH-3T3	S180
PsC_06	150 °C	n.d.	n.d.	n.d.
PsC_05	200 °C	n.d.	3.91 (65 %)	n.d.
PsC_04	250 °C	n.d.	n.d.	4000 (39 %)
PsC_03	300 °C	n.d.	n.d.	4000 (61 %)

^aCondições reacionais: 3 g de BM-Cv, 100 mL de água Millipore®; ED/BM-Cv = 0.16; 6 h;

^bCitotoxicidade não detetada (n.d.)

O efeito citotóxico dos PsC obtidos a diferentes temperaturas de síntese foi significativamente menos proeminente, podendo ser considerados não-citotóxicos contra a linha celular VERO. Para a linha celular NIH-3T3 apenas os PsC sintetizados a 200 °C demonstraram citotoxicidade, levando ao decréscimo inesperado da viabilidade celular para 65 % à concentração de 3.91 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Por outro lado, para as células tumorais S180 na presença dos PsC obtidos a temperaturas de síntese mais elevadas, observa-se uma diminuição da viabilidade celular com o aumento da temperatura, à concentração de 4000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estes resultados contrastam com os resultados do estudo de Esfandiari *et al.*,¹⁶⁴ cuja citotoxicidade dos PsC sintetizados não aparentou ser dependente da temperatura de síntese.

Na Figura II.24 são apresentados os resultados da avaliação do efeito citotóxico PsC_03 (300 °C).

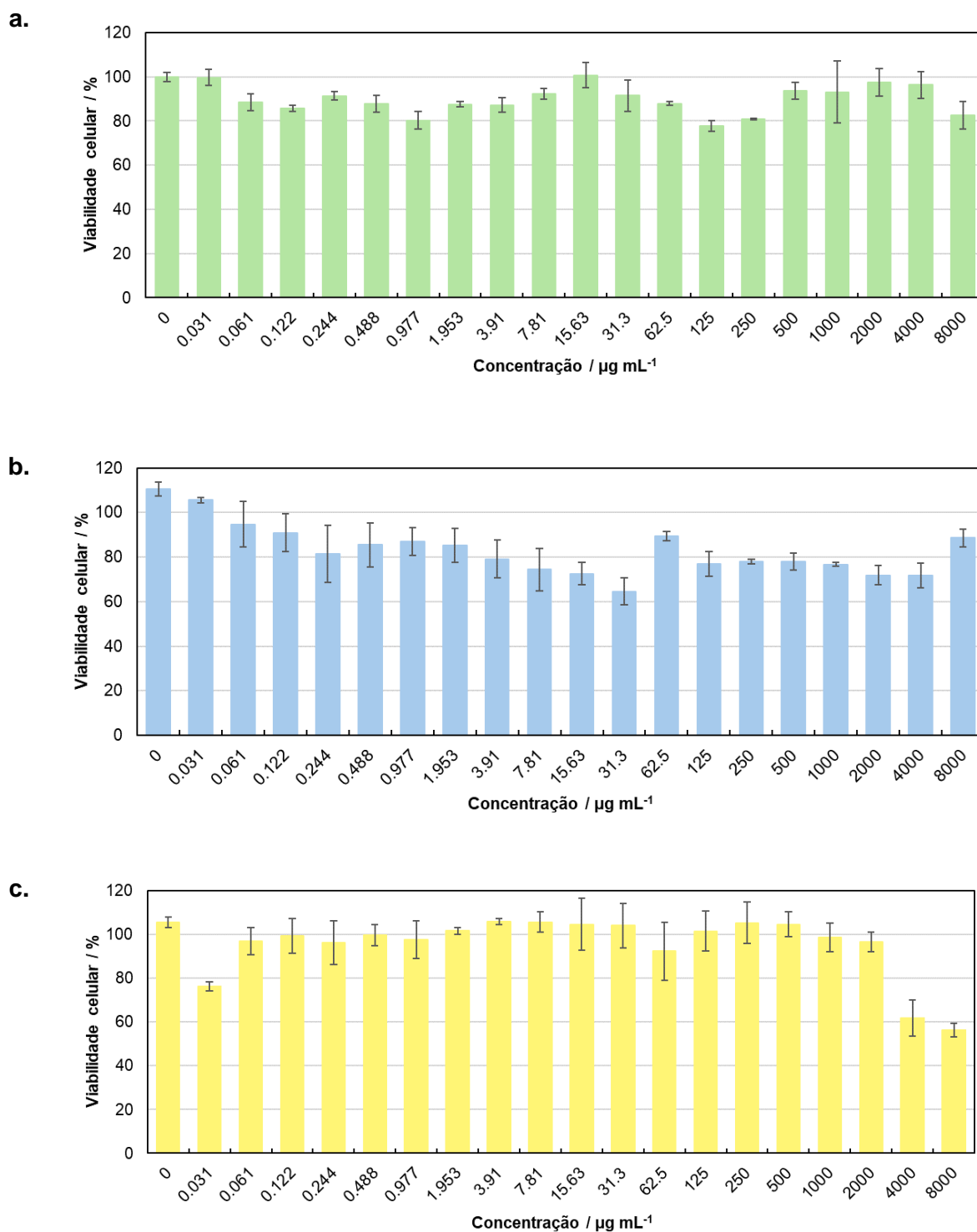


Figura II.24 - Citotoxicidade celular contra as linhas celulares **a.** VERO, **b.** NIH-3T3 e **c.** S180 dos PsC_03 (300 °C) avaliada pelo método do MTT.

Wang *et al.*¹⁶⁵ verificaram a biocompatibilidade de PsC com células NIH-3T3 até 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto Bao *et al.*¹⁶⁶ reportaram a sua baixa citotoxicidade contra células VERO, corroborando os resultados obtidos e salientando a aplicabilidade destes nanomateriais na

área da biomédica, sendo que as concentrações de PsC a partir das quais se verificou um efeito citotóxico na maioria dos ensaios excedem os valores máximos tipicamente aplicados.

PsC sintetizados a partir da biomassa da microalga *P. cruentum*⁹⁴ e de desperdícios da indústria do processamento do tomate⁹⁵ foram avaliados quanto à sua citotoxicidade contra as mesmas linhas celulares. Os dois lotes de PsC revelaram um comportamento semelhante aos PsC sintetizados a partir da BM-Cv, apresentando de forma geral boa biocompatibilidade, com um decréscimo a concentrações inferiores a 2000 µg mL⁻¹.

Face aos resultados obtidos, o ensaio PsC_12 (ED/BM-Cv = 0.08) destaca-se pela sua elevada citotoxicidade contra a linha celular tumoral S180, verificando-se uma viabilidade celular de 67% a uma concentração de apenas 62.5 µg mL⁻¹, sugerindo um potencial anticancerígeno destes PsC.

II.4.4 Avaliação da Citotoxicidade *in vivo*

Na sequência do estudo da citotoxicidade *in vitro* dos PsC, realizou-se um ensaio preliminar de citotoxicidade *in vivo*, recorrendo ao organismo modelo *Artemia salina*. Após a incubação destes organismos com diferentes concentrações PsC (0-5000 µg mL⁻¹) foi quantificada a taxa de mortalidade dos mesmos decorridos os períodos de 24 e 48 horas.

A seleção do PsC para este estudo teve por base os ensaios de citotoxicidade *in vitro* anteriormente apresentados, assim como as propriedades luminescentes das nanopartículas, tendo-se optado pelo ensaio sintetizado com o rácio mássico de ED/BM-Cv de 0.32 (250 °C, 6 h), que apresentou baixa toxicidade para as linhas celulares estudadas e um rendimento quântico de fluorescência de 21 %.

Analisando os resultados apresentados na Figura II.25, é possível depreender que a incubação com a solução de PsC após 24 h não contribuiu para uma variação significativa da taxa de mortalidade de *A. salina*, mantendo-se abaixo de 10 %. Contudo, passadas 48 h, o número de organismos mortos aumentou com o aumento da concentração de PsC, pelo que, à concentração de 1250 µg mL⁻¹, aproximadamente 50 % dos organismos tinham morrido e, à concentração de 5000 µg mL⁻¹, a taxa de mortalidade atingiu o seu valor máximo (79.20 ± 7.52 %).

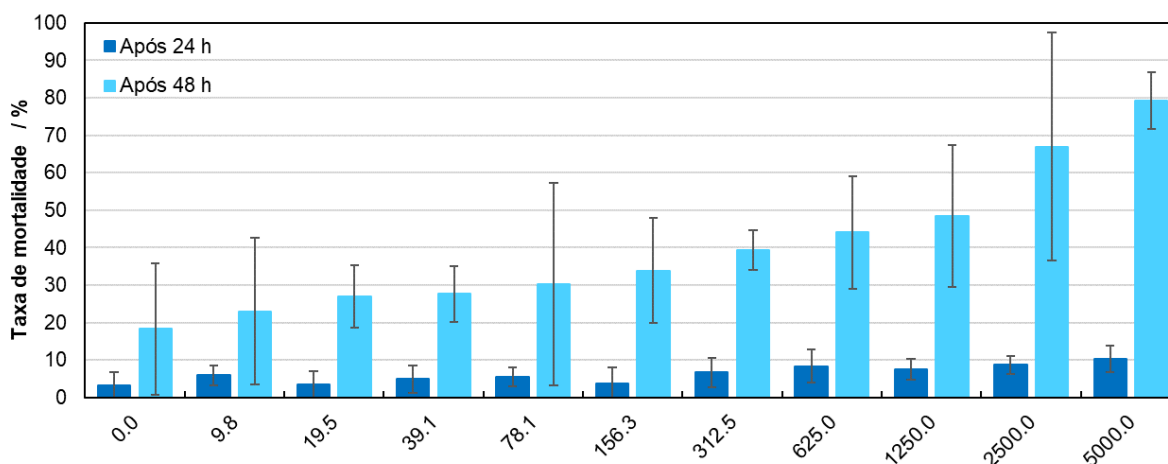


Figura II.25 - Avaliação da citotoxicidade *in vivo* em *A. salina* de PsC_13, após 24 h e 48 h.

Estudos prévios recorrendo ao mesmo organismo modelo apresentaram resultados semelhantes. Murugesan *et al.*¹⁶⁷ procuraram estudar o efeito citotóxico de pontos quânticos de grafeno nestes seres vivos, verificando-se o aumento da taxa de mortalidade com o tempo de exposição. Contudo, observaram um efeito citotóxico a partir de concentrações mais baixas de pontos quânticos (40 µg mL⁻¹), assim como uma maior taxa de mortalidade após 24 h, contrastando com os resultados obtidos neste trabalho.

Por outro lado, Atchudan *et al.*⁷¹ exploraram a toxicidade de pontos quânticos de *in vivo* utilizando *C. elegans* como organismo modelo, onde verificaram a inexistência de perdas significantes na viabilidade dos nematódeos após tratamento com as partículas sintetizadas (até 200 µg mL⁻¹). Paralelamente, Cong *et al.*¹⁰⁸ procederam ao tratamento de uma população destes nematódeos com uma solução aquosa de PsC, obtidos a partir de peito de pato assado, à concentração de 15 mg mL⁻¹ e verificaram que esta não provocou a morte dos organismos após 24 h de incubação.

Assim, os resultados reportados pela literatura corroboram os resultados obtidos, sendo possível concluir-se que os PsC sintetizados não são citotóxicos para os organismos vivos testados, podendo ser inócua a sua utilização.

II.4.5 Marcação Celular por Fluorescência

O estudo de marcação celular por fluorescência teve como objetivo averiguar o potencial de aplicação dos PsC sintetizados como sondas fluorescentes em imagiologia. A avaliação da fluorescência destes nanomateriais foi realizada com excitação nas regiões do azul (330-385 nm) e do verde (460-490 nm), comparativamente a ensaios de controlo na ausência de PsC.

As imagens de marcação celular por fluorescência foram adquiridas através de um microscópio de fluorescência invertido, após 24h de incubação das linhas celulares VERO, NIH-3T3 e S180 e dos organismos vivos *A. salina* com PsC_13 (ED/BM-Cv = 0.32), selecionados para o efeito devido à sua biocompatibilidade e propriedades luminescentes, nomeadamente RQ.

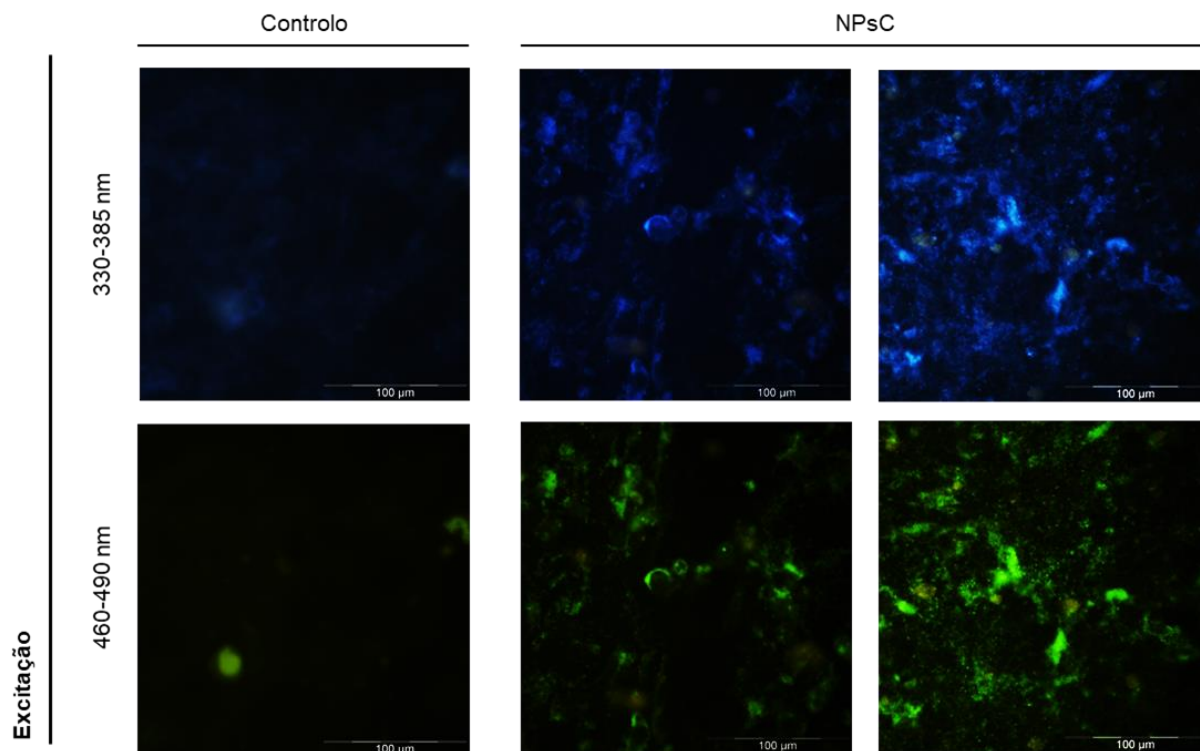


Figura II.26 - Imagens de microscopia de fluorescência de células VERO após tratamento com uma dispersão aquosa do ensaio PsC_13 à concentração de 2 mg mL^{-1} (ampliação 400 x).

A Figura II.26 apresenta os resultados obtidos após a incubação de células VERO com os PsC em estudo, onde é possível verificar a internalização dos PsC pelas células, aparentando existir uma acumulação no citoplasma e na membrana nuclear, sendo particularmente distinguível um “anel” em torno de algumas células. Em alguns casos, foi também possível a visualização de depósitos fluorescentes no interior do núcleo, revelando alguma permeabilidade da membrana nuclear para com os PsC.

No caso da linha celular NIH-3T3 (Figura II.27), é igualmente visível a acumulação dos PsC na zona da membrana nuclear, assim como no citoplasma. No entanto, verificou-se uma menor fluorescência, de modo geral, relativamente às restantes linhas celulares, indicando a possibilidade de existir menor internalização dos PsC por parte destas células.

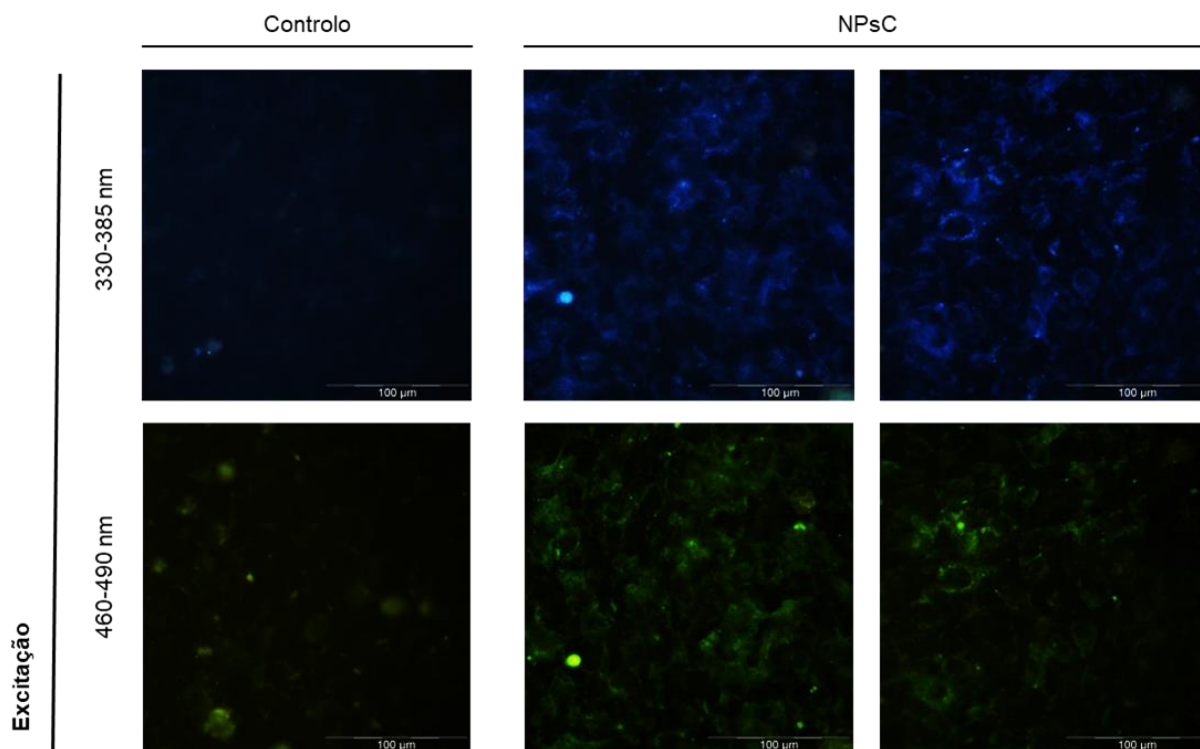


Figura II.27 - Imagens de microscopia de fluorescência de células NIH-3T3 após tratamento com uma dispersão aquosa do ensaio PsC_13 à concentração de 2 mg mL⁻¹ (ampliação 400 x).

Em contrapartida, a linha tumoral S180 (Figura II.28) exibiu uma excelente internalização dos PsC, sendo possível distinguir de forma clara a estrutura celular devido à fluorescência incorporada no citoplasma e na membrana celular. São também visíveis vários depósitos de PsC na zona do núcleo, revelando uma boa permeabilidade da membrana nuclear.

Embora o ensaio PsC_13 possua, à semelhança dos restantes, um rendimento quântico de fluorescência moderado (21 %), foi possível demonstrar o seu potencial como marcador celular. Comparando as três linhas celulares avaliadas, verificou-se existir um comportamento semelhante das linhas não tumorais face à alocação dos PsC no seu interior, destacando-se a zona perinuclear e citoplasmática. Aliada à sua fluorescência, a baixa toxicidade destas nanopartículas contra células saudáveis sugere que tenham a capacidade de atuar como marcadores de fluorescência no âmbito da imagiologia.

Paralelamente, o estudo realizado indica uma melhor internalização por parte das células tumorais, o que pode ser vantajoso, não só para a sua marcação celular, como também para a aplicação destas nanopartículas a sistemas de distribuição de fármacos, perspetivando-se o seu potencial como ferramentas de teranóstica.

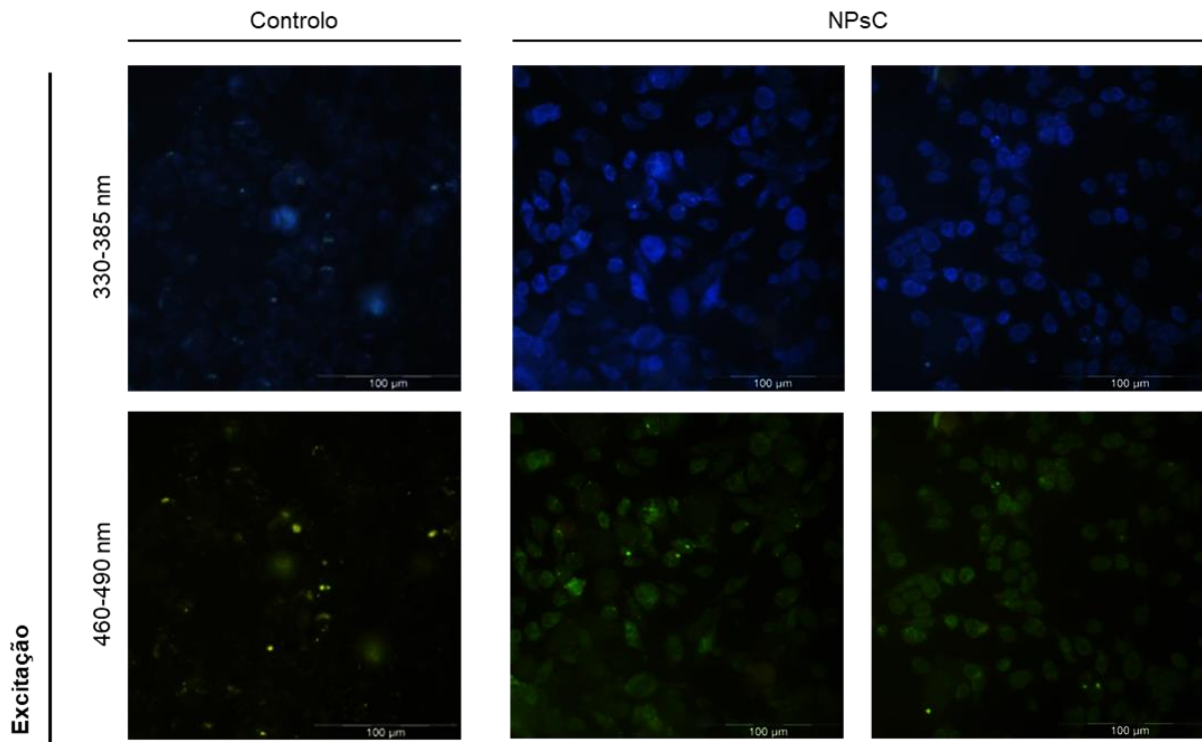


Figura II.28 - Imagens de microscopia de fluorescência de células S180 após tratamento com uma dispersão aquosa do ensaio PsC_13 à concentração de 2 mg mL⁻¹ (ampliação 400 x).

É de salientar que os resultados obtidos através de microscopia de fluorescência encontram-se em concordância com outros estudos, nomeadamente com Liu *et al.*,¹⁶⁸ que reportaram a baixa toxicidade de PsC para células VERO, assim como a fluorescência intracelular das mesmas após incubação com as nanopartículas. Alternativamente, Havrdová *et al.*¹⁶⁹ verificaram a incorporação de PsC em células NIH-3T3, verificando a sua maior incidência na zona do núcleo.

Por fim, através dos ensaios de citotoxicidade *in vivo* realizados, foram ainda adquiridas imagens de microscopia de fluorescência de *A. salina* incubada durante 24h com a dispersão aquosa de PsC_13. Devido ao tamanho destes organismos aquando da aquisição das imagens e às limitações do microscópio utilizado (sendo a menor ampliação de 200 x), não foi possível obter uma imagem que enquadrasse a sua estrutura completa.

De forma a possibilitar a identificação do local de alocação dos PsC no interior destes seres vivos, a Figura II.29 apresenta uma imagem ilustrativa de um organismo de *A. salina*, ao microscópio ótico (ampliação 100 x).

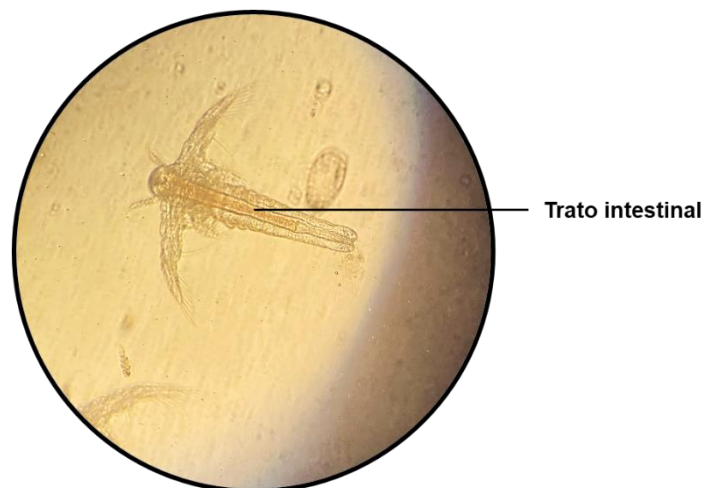


Figura II.29 - Observação a microscópio ótico de um organismo de *A. salina* (ampliação 100 x), identificando a localização do seu trato intestinal.

Os resultados obtidos revelam a existência de uma autofluorescência inerente a estes organismos, evidenciada pelas imagens do controlo (Figura II.30). Não obstante, é claramente visível a presença de depósitos de PsC no interior do seu trato intestinal, sugerindo que a solução aquosa de PsC foi ingerida pelos organismos, realçando o potencial destas nanopartículas como sondas fluorescentes.

De acordo com o estudo de Atchudan *et al.*,⁷¹ onde organismos da mesma espécie foram alimentados com PQsG, foi possível verificar a presença dos mesmos no trato intestinal, exibindo uma forte fluorescência sob o comprimento de onda de excitação de 460 nm, validando os resultados obtidos no presente trabalho. Também Cong *et al.*¹⁰⁸ exploraram a aquisição de imagens de microscopia de fluorescência, recorrendo à espécie *C. elegans* como organismo modelo, que demonstrou um comportamento semelhante perante a ingestão de PsC, sendo visível a sua acumulação ao longo do intestino dos nematódeos.

É de realçar que os organismos vivos foram tratados com uma dispersão aquosa à concentração de 2 mg mL^{-1} , tendo sido possível distinguir com êxito os PsC internalizados (Figura II.30). Atendendo aos resultados anteriores é possível concluir que estas nanopartículas têm potencial para utilização como marcadores internos em imagiologia, apresentando uma baixa toxicidade após 24 h de incubação. No entanto, de forma a garantir a segurança a longo prazo após a sua internalização, os PsC seriam, idealmente, utilizados a concentrações mais baixas, minimizando os seus efeitos tóxicos.

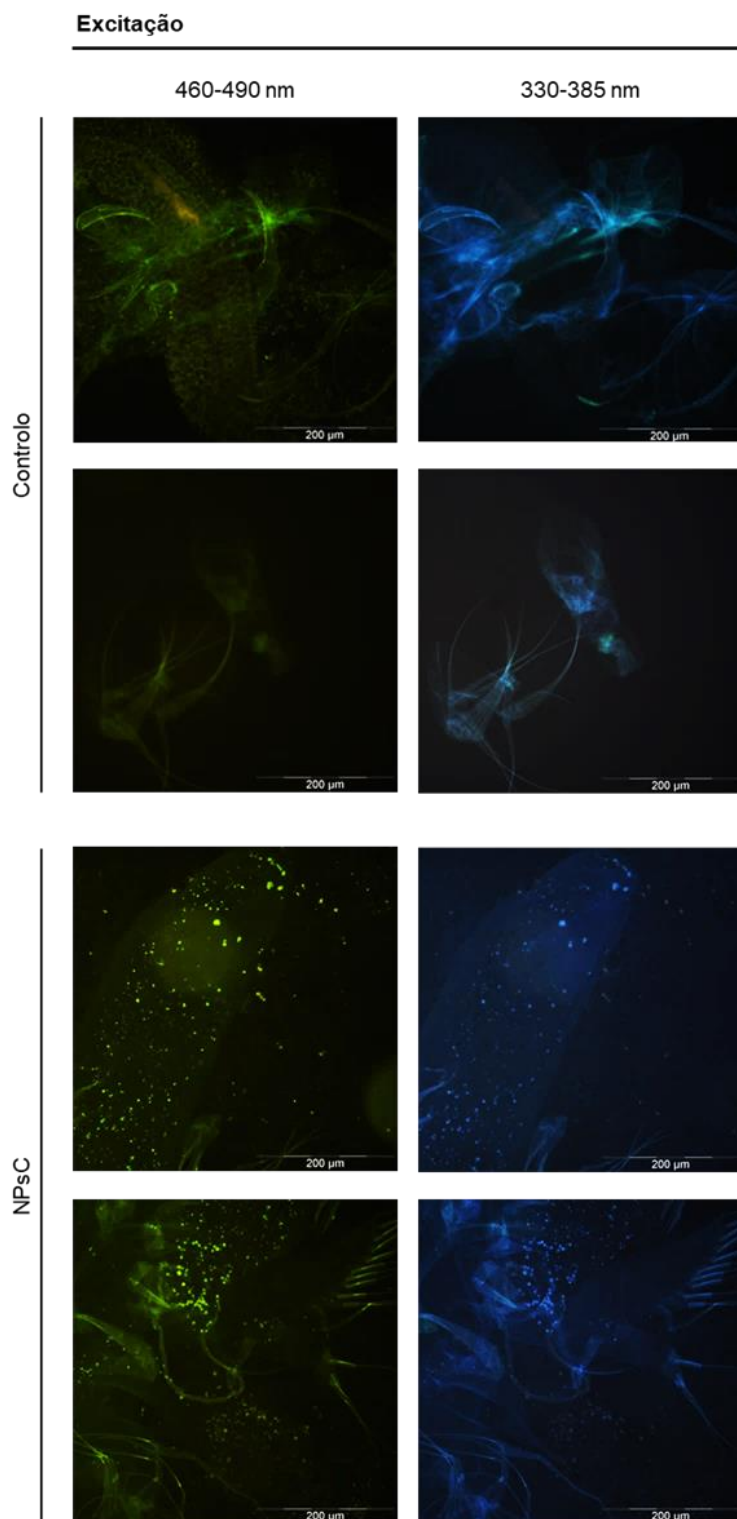


Figura II.30 - Imagens de microscopia de fluorescência de *A. salina* após tratamento com uma dispersão aquosa de PsC_13 à concentração de 2 mg mL⁻¹ (ampliação 200 x).

III. PARTE EXPERIMENTAL



III.1. PREÂMBULO

Na Parte Experimental serão apresentados os reagentes e materiais biológicos utilizados, as técnicas gerais e o equipamento necessários à execução deste trabalho experimental. Serão ainda descritos os métodos utilizados para a caracterização da BM-Cv, bem como para a síntese e caracterização estrutural dos pontos de carbono. Por último, apresentar-se-ão as técnicas associadas à avaliação da bioatividade dos mesmos.

Desta forma, o presente Capítulo englobará as seguintes Secções:

- III.2. Reagentes, Material Biológico, Técnicas Gerais e Equipamento
- III.3. Caracterização da BM-Cv
- III.4. Síntese dos PsC
- III.5. Avaliação da Bioatividade dos PsC



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

Os reagentes e solventes utilizados no decorrer deste trabalho possuem pureza analítica, tendo sido utilizados na forma em que foram recebidos.

A BM-Cv foi produzida nas instalações industriais da Allmicroalgae, em Pataias, em outubro de 2023, em bioreatores de bolhas em modo descontínuo e em meio de cultura suplementado com resíduos alimentares provenientes do comércio retalhista composto por desperdícios de fruta (ca. 22 %), vegetais (ca. 22 %), laticínios (ca. 13 %), padaria (ca. 27 %) e peixe (ca. 16 %).¹³⁷ O volume total da cultura recolhida foi de cerca de 75 L, tendo sido centrifugada (HERMLE, Z 383 K) a 3000 rpm, a 4 °C, em ciclos de 25 min, de forma a recolher a biomassa, sendo de seguida, conservada a -20 °C em tubos Falcon. O sobrenadante (meio de crescimento), de cor alaranjada, foi descartado. Posteriormente a biomassa recolhida foi liofilizada durante cerca de 24 horas (UNIEQUIP, UNICRYO MC-2L-60°) e armazenada em atmosfera inerte e ao abrigo da luz.

Na caracterização da BM-Cv, designadamente no doseamento de biomoléculas presentes na biomassa em estudo, através de métodos espectroscópicos foram utilizados dois leitores de microplacas (Bio-Rad 680, FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec), consoante o comprimento de onda selecionado.

A síntese dos pontos de carbono (PsC) por carbonização hidrotérmica através de aquecimento convencional (CHAC) foi realizada num reator de alta-pressão (PARR, modelo 4560), com capacidade máxima de 300 mL, equipado com vaso em aço inox e com sensores/controladores de pressão, temperatura e agitação (PARR, modelo 4843). Adicionalmente foi realizado um ensaio exploratório onde foi utilizado como fonte de aquecimento convencional uma mufla (Nabertherm, Controller B 170). Por sua vez, a síntese por carbonização hidrotérmica assistida por radiação micro-ondas (CHMO) foi realizada num reator monomodo (CEM, Discover SP), em tubos pirex, com capacidade de 10 mL. A síntese experimental de PsC com recurso a micro-ondas doméstico (Teka, MW-219), foi realizada utilizando um reator de aço-inox com vaso de Teflon. Em todos os ensaios, para ambas as vertentes de síntese, foi utilizada água ultrapura como solvente (Milli-Q, Millipore®, Burlington, MA, USA).

Após a síntese por CHAC, a mistura reacional foi filtrada por membrana de celulose regenerada (Whatman®, RC58), com poros de tamanho de 0.2 µm. Dado o volume resultante mais reduzido nos ensaios de síntese por CHMO, a mistura foi filtrada com filtros de seringa

com tamanho de poro 0.20 μm (Whatman[®], Spartan). Para a determinação do pH ao longo da etapa de síntese, utilizou-se um aparelho de pH VWR (modelo UHM 6100L).

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram traçados num espectrofotómetro Brüker Vertex 70 com uma resolução de 2 cm^{-1} , numa gama de 4000 a 500 nm^{-1} , tendo as amostras sido suportadas em pastilha de brometo de potássio (KBr). Sempre que se revelou necessário, foram traçados espectros quantitativos utilizando uma relação de 5 mg de amostra para 100 mg de KBr.

Os espectros de ultravioleta-visível (UV-Vis) foram obtidos num espectrofotómetro de UV-Vis, Jasco V-750. Por sua vez, os espectros de fluorescência no estado estacionário foram registados num espectralfluorímetro PerkinElmer LS45, utilizando a geometria a 90°, a 25 °C. Em ambos os casos, a cada análise, serão indicadas as condições de realização de cada ensaio (concentrações aplicadas, reagentes).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de protão (RMN ¹H, 400 MHz) foram realizados no espectrómetro Brüker AVANCE II+, utilizando D₂O como solvente

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

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

Os rendimentos quânticos de fluorescência foram determinados em água ultrapura (Millipore[®]), utilizando sulfato de quinino (> 98 %, Fluka) em H₂SO₄ 0.1 M como padrão ($\Phi_F = 0.54^{170}$ em condições de equilíbrio com o ar e geometria a 90°), através do método do declive¹⁷¹. De forma a prevenir o efeito de filtro interno, as densidades das amostras e do padrão foram mantidas abaixo de 0.05 ao comprimento de onda de excitação.

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada numa câmara de segurança biológica SafeFAST Classic 209, onde foram manipuladas as espécies *Escherichia coli* ATCC[®] 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 25923. As culturas de pré-inóculo dos microrganismos foram crescidas numa incubadora com agitação orbital Gallenkamp 10X 400, a 37 °C e 120 rpm. Por sua vez, as culturas inoculadas em placa de Petri foram incubadas numa estufa Memmert BP 600, a 37 °C. Para todos os ensaios, foi utilizada a gentamicina (Sigma-Aldrich), dissolvida em água desionizada, como controlo positivo e água desionizada estéril como controlo negativo.

Para os ensaios de MIC e MLC foi utilizada resazurina (> 85 %, Tokyo Chemical Industry) como agente indicador da viabilidade celular, dissolvida em PBS (solução salina de tampão fosfatos, *Phosphate-Buffered Saline*), previamente filtrado. As soluções de gentamicina, de PBS, de resazurina e de PsC foram filtradas através de filtros de seringa (Whatman®, Spartan), de diâmetro de poro de 0.2 µm.

Todo o material utilizado na avaliação da atividade antibacteriana foi esterilizado em autoclave (AJCosta, UNICLAVE 99).

A determinação dos valores MIC e MLC foi realizada através da leitura da intensidade de fluorescência num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec). A atividade antioxidante foi avaliada através de leituras de absorvância num leitor de microplacas Bio-Rad 680.

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), recorrendo a células epiteliais renais de macaco verde africano (VERO ATCC® CCL-81), fibroblastos embrionários (NIH-3T3 ATCC® CRL-1658) e células de sarcoma de murganho (S180 ATCC® TIB-66). Para este efeito foi utilizado um microscópio invertido OLYMPUS CK2 e recorrendo ao método de exclusão do corante azul de tripano (GIBCO®, Thermo Fisher Scientific) numa câmara de contagem *Neubauer Improved* (Superior Marienfeld), foi possível determinar as concentrações celulares a aplicar nas placas de cultura de 96 poços (Orange Scientific). Por sua vez, estas foram incubadas a 37 °C sob atmosfera humidificada de 5 % de CO₂, em estufa (Heaeus, HERA cell 240). Para o desenvolvimento de todos os ensaios foi utilizada uma câmara de fluxo laminar horizontal (TL 2448).

Para a determinação da viabilidade celular, utilizou-se MTT (> 98 %, PanReac) e o leitor de microplacas TECAN Infinite M200 PRO, de forma a ler a absorvância. Alternativamente, nos ensaios de citotoxicidade *in vivo*, os organismos vivos testados, *Artemia salina* (Artemio Pur, JBL) foram contados através de um microscópio ótico invertido OLYMPUS CK2. Já 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 fotografias nas regiões do azul e verde, respetivamente.

III.3. CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

III.3.1. Extração de biocompostos

A extração assistida por radiação micro-ondas foi a técnica selecionada para a extração de biomoléculas a partir da biomassa de *C. vulgaris*. Este método foi realizado num reator micro-ondas monomodo (CEM, Discover SP), tendo sido aplicadas as condições de extração otimizadas por Hussen.¹³⁸ Assim, a extração foi realizada à temperatura de 150 °C, durante 15 minutos, utilizando como solvente o etanol absoluto. A razão biomassa:solvente foi de 1:10, tendo sido utilizados 4.50 mL de EtOH e 0.45 g de biomassa para cada extração; no total, foram realizadas 3 réplicas, obtendo-se um volume final de, aproximadamente, 12 mL. O extrato foi recuperado através de centrifugação a 12 000 rpm durante 20 minutos numa centrífuga de bancada (HERMLE, Z 200 A) e armazenado em microtubos a - 20 °C. O extrato foi utilizado para a quantificação de pigmentos fotossintéticos, polissacáridos, proteínas, compostos fenólicos totais, flavonoides e lípido produzidos pela microalga nas condições de crescimento anteriormente descritas.

Adicionalmente, a extração convencional contínua em Soxhlet foi utilizada para a extração de lípidos, adaptando o procedimento descrito por Silva *et al.*,⁵⁰ utilizando *n*-hexano como solvente, a uma temperatura de cerca de 100 °C, durante 3 horas, e com uma razão constante de biomassa:solvente de 1:6. O extrato resultante foi seco com MgSO₄ e filtrado por gravidade. Por fim, foi evaporado a 105 °C (WTC Binder) e o produto resultante foi quantificado.

III.3.2. Quantificação de pigmentos

A quantificação dos pigmentos fotossintéticos da BM-Cv foi baseada no método de espectroscopia UV-Vis simples, descrito por Lichtenthaler,²⁹ que permite a determinação das concentrações dos conteúdos em clorofila e carotenoides totais em extratos em etanol absoluto, através das seguintes equações:

$$C_a = 13.36 \text{ Abs}_{663 \text{ nm}} - 5.19 \text{ Abs}_{646 \text{ nm}} \quad \text{Equação III.1}$$

$$C_b = 27.43 \text{ Abs}_{646 \text{ nm}} - 8.12 \text{ Abs}_{663 \text{ nm}} \quad \text{Equação III.2}$$

$$C_{a+b} = 5.42 \text{ Abs}_{663 \text{ nm}} - 22.24 \text{ Abs}_{646 \text{ nm}} \quad \text{Equação III.3}$$

$$C_{x+c} = \frac{1000 \text{ Abs}_{470 \text{ nm}} - 2.13 C_a - 97.64 C_b}{209} \quad \text{Equação III.4}$$

Sendo que C_a e C_b dizem respeito à concentração em clorofila *a* e *b*, respectivamente, enquanto C_{a+b} representa a concentração total de clorofila. C_{x+c} representa o valor da concentração total de carotenoides.

Desta forma, foram traçados espectros de absorvância UV-Vis (VWR, UV-3100PC) para os extratos, entre os comprimentos de onda de 320 e 800 nm, em cuvetes de vidro de 1 mL. Posteriormente, foram identificados os valores da absorvância a 470, 646 e 663 nm, utilizando os mesmos para determinar a concentração da clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides totais presentes no extrato de BM-Cv através das equações anteriormente apresentadas. Os valores obtidos foram expressos em µg/g de biomassa.

III.3.3. Quantificação de β -(1,3)-D-glucanos

Para o doseamento no extrato de BM-Cv de β -(1,3)-D-glucanos com estrutura em tripla hélice, foi utilizado o método do corante Congo red, otimizado por Semedo *et al.*³⁵ Os ensaios foram realizados em triplicado, utilizando uma microplaca de 96 poços (NUNC), onde foram pipetados 140 µL de extrato (diluído a 1:2 em água desionizada) e 140 µL de corante Congo red a 0.0017 % (m/v) em PBS. Para os ensaios em branco foram efetuadas três variações, com água desionizada e o corante Congo Red, com água destilada e PBS e com a amostra e PBS. O padrão utilizado foi o β -(1,3)-D-glucano de cevada (Sigma-Aldrich) numa gama de 0-30 µg mL⁻¹ dissolvido numa solução aquosa de NaOH 1M, posteriormente neutralizada.

A absorvância foi lida num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec), a 510 nm e a quantificação foi expressa em mg/g de biomassa.

III.3.4. Quantificação de proteína total

A proteína total do extrato de BM-Cv foi quantificada através do método de ligação do Azul de Coomassie também designado por método de Bradford,⁴² adicionando 100 µL do reagente de Bradford (Bio-Rad, *Quick Start Bradford 1x Dye Reagent*) a 100 µL do extrato (diluído a 1:50 em água desionizada). Para o branco, foi utilizada água desionizada. Como padrão, utilizou-se albumina de soro bovino (BSA; Acros Organics), numa gama de 0-20 µg mL⁻¹.

O doseamento foi realizado em triplicado, numa microplaca de 96 poços (NUNC), tendo sido lida a absorvância num leitor de microplacas (Bio-Rad 680), a 655 nm. A quantificação de proteína total foi expressa em mg/g de biomassa.

III.3.5. Quantificação de hidratos de carbono totais

A quantificação dos hidratos de carbono totais foi realizada de acordo com o método colorimétrico do fenol-ácido sulfúrico descrito por Masuko *et al.*³² À semelhança dos restantes doseamentos, o ensaio foi realizado em triplicado numa microplaca de 96 poços (NUNC). A 50 µL de extrato (diluído a 1:50 em água desionizada), adicionaram-se 150 µL de ácido sulfúrico concentrado, seguidos de 50 µL de fenol 5 % (m/v).

De seguida, a microplaca foi incubada a 90 °C, em banho termostaticado, durante 5 minutos. Após ser arrefecida até à temperatura ambiente, a absorvância foi lida num leitor de microplacas (Bio-Rad 680) a 490 nm. Como solução padrão, utilizou-se a D-glucose (Scharlau), numa gama de 0-2 µg mL⁻¹; como branco, utilizou-se água desionizada. A quantificação foi expressa em mg/g de biomassa.

III.3.6. Quantificação de polissacáridos sulfatados

Recorrendo ao método do azul de toluidina descrito por Hahn *et al.*³⁸ e adaptado por Hussen¹³⁸, determinou-se o conteúdo de polissacáridos sulfatados no extrato obtido. Foi preparada uma solução de azul de toluidina [(7-amino-8-metil-fenotiazin-3-ilideno)-dimetil amónia, Fluka] 0.05 mg mL⁻¹, e adicionaram-se 250 µL desta solução a 50 µL de extrato, numa microplaca de 96 poços (NUNC), em triplicado. Como padrão utilizou-se sulfato de dextrano com massa molar média de 200 000 Da (Sigma-Aldrich) numa gama de concentração de 0-160 µg mL⁻¹, sendo utilizada água desionizada para o ensaio em branco.

A mistura reacional repousou durante 5 minutos no escuro e, posteriormente, a absorvância foi lida a 655 nm num leitor de microplacas (Bio-Rad 680). A quantificação foi expressa em mg/g de biomassa.

III.3.7. Quantificação de polissacáridos ácidos

Para a quantificação de polissacáridos ácidos foi utilizado o método do carbazol-ácido sulfúrico, seguindo o método descrito por Cesaretti *et al.*⁴⁰ com adaptações. A mistura reacional foi preparada previamente em tubos de vidro roscados, para onde foram adicionados 40 µL de extrato (diluído a 1:10 em água desionizada), 400 µL de água desionizada, 2 mL de tetraborato de sódio 0.95 g L⁻¹ H₂SO₄ e 40 µL de carbazol a 0.2 % (m/v) em etanol absoluto. Da mesma forma, foram preparadas as misturas reacionais para o ensaio

em branco e o padrão, utilizando água desionizada e ácido D-galactúrico, numa gama de 0-25 mg mL⁻¹, respetivamente.

Posteriormente, os tubos roscados foram agitados num agitador vortex (Ika - Vortex 2) e incubados a 90 °C num banho termostaticado durante 12 minutos. Após o arrefecimento até à temperatura ambiente, adicionaram-se 300 µL da mistura reacional para a microplaca (NUNC) leu-se a absorvância a 528 nm num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA– BMG Labtec). Os doseamentos foram realizados em triplicado e os resultados foram expressos em mg/g de biomassa.

III.3.8. Quantificação de compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, adaptado do método descrito por Reis *et al.*¹⁴⁷ Utilizou-se o reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich F9252) diluído 1:10 (v/v) em água desionizada, do qual foram pipetados 150 µL para uma microplaca de 96 poços (NUNC), em triplicado. Adicionalmente, foram pipetados 30 µL de extrato (diluído de 1:10 em água desionizada) e 120 µL de solução de NaCO₃ 75 g L⁻¹. A mistura reacional foi incubada a 40 °C, durante 20 minutos, num banho termostaticado. Após arrefecer até à temperatura ambiente, foi lida a absorvância a 655 nm num leitor de microplacas (BioRad 680).

Como branco foi utilizada água desionizada, recorrendo-se ao ácido gálico como padrão, numa gama de 0-250 µg mL⁻¹. Os resultados foram expressos em mg/g de biomassa.

III.3.9. Quantificação de compostos flavonoides totais

Para a quantificação de compostos flavonoides totais, recorreu-se a uma adaptação do método colorimétrico de cloreto de alumínio descrito por Yeh *et al.*¹⁴⁸ Pipetou-se 25 µL de extrato (diluído de 1:10 em água desionizada), seguido de 7.5 µL de NaNO₃ 5 % (m/v) e 100 µL de água desionizada. Posteriormente, deixou-se a mistura reacional repousar, à temperatura ambiente, durante 5 minutos, adicionando-se de seguida 7.5 µL de uma solução de AlCl₃ 10 % (m/v). Após 5 minutos, adicionaram-se 100 µL de uma solução de NaOH 4 % (m/v).

Os doseamentos foram realizados em triplicado, utilizando-se como branco água desionizada e, como solução padrão, catequina em etanol 50 % (v/v), numa gama de 0-1 µg mL⁻¹. Os resultados foram apresentados em mg/g de biomassa.

III.3.10. Quantificação de lípidos

A quantificação de lípidos presentes na BM-Cv foi efetuada através de dois métodos distintos, o método colorimétrico de sulfofosfovanilina (SPV) e através de gravimetria após extração contínua em Soxhlet usando *n*-hexano como solvente.

O extrato etanólico obtido por MAE foi quantificado através do método SPV adaptado do descrito por Anschau *et al.*⁵² Em tubos de vidro roscado, colocaram-se 20 µL extrato (diluído a 1:50 em água desionizada) e incubaram-se a 90 °C durante 10 minutos, num banho termostaticado. Após a mistura reacional arrefecer até à temperatura ambiente, adicionaram-se 180 µL de ácido sulfúrico concentrado, incubando-se novamente, de seguida, a 100 °C durante 10 minutos. Novamente à temperatura ambiente, juntaram-se 500 µL do reagente PV (0.0012% (m/v) de vanilina (Thermo Fisher Scientific) numa solução de ácido *o*-fosfórico a 70.83 % (v/v)). Por fim, a mistura reacional foi incubada a 37 °C durante 30 minutos.

Novamente à temperatura ambiente, pipetaram-se 150 µL da mistura reacional para uma microplaca de 96 poços, sendo a absorvância lida a 528 nm num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec). O etanol absoluto foi utilizado como branco e o óleo de canola como padrão, preparado em etanol absoluto, numa gama de 0-2.5 mg mL⁻¹. Os doseamentos foram realizados em triplicado e a quantificação final foi apresentada em mg/g de biomassa

No método alternativo utilizado os lípidos foram extraídos através de extração convencional contínua em Soxhlet, descrito na Secção III.3.1.

III.3.11. Quantificação de sólidos totais

Através da evaporação de uma amostra de 1 mL de extrato obtido por MAE até à secura, foi possível quantificar os sólidos totais na BM-Cv, tendo o procedimento sido realizado em triplicado. O resíduo resultante foi seco a 105 °C durante ca.12-24 horas e, posteriormente, pesado.

III.3.12. Quantificação de cinzas

De forma a quantificar o teor de cinzas presente na BM-Cv e nos PsC obtidos, foram secos 3 cadinhos de porcelana em estufa (WTC Binder), a 105 °C, durante 12 horas. Posteriormente, os cadinhos foram colocados na mufla (Nabertherm, Controller B 170) a 575 °C, durante 12-24 horas. Após serem arrefecidos até à temperatura ambiente num exsiccador, foram tarados,

sendo depois adicionada a cada, uma massa conhecida de amostra (seja BM-Cv ou PsC). Os cadinhos foram, novamente, colocados na estufa a 105 °C, durante 12-24 horas, seguindo-se a sua ignição à chama.

Por fim, foram colocados na mufla a 575 °C, durante 12-24 horas e posteriormente arrefecidos num exsiccador até peso constante, permitindo a quantificação do resíduo. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

III.4. SÍNTESE DE PONTOS DE CARBONO

III.4.1. Síntese de PsC por CHAC

A primeira abordagem utilizada para a síntese dos PsC baseou-se na carbonização hidrotérmica por aquecimento convencional, realizada em reator de alta pressão. Utilizou-se 3 g de BM-Cv em 100 mL de água Millipore®, medindo-se o pH inicial da mistura. Adicionou-se o aditivo, com rácio mássico de aditivo:biomassa variável, e registou-se novamente o pH. Os aditivos selecionados para a síntese foram: ED (> 99.5 %, Fluka), DET (99 %, Aldrich), melamina (99 %, Acros Organics), ureia recristalizada e *p*-FD (> 97 %, Fluka).

Após selagem do reator de aço inox, foram programadas as condições de ensaio e iniciada a reação. As condições reacionais variaram entre ensaios, encontrando-se descritas na Secção II.3. Decorrido o tempo da reação selecionado e arrefecimento, registou-se o pH da mistura reacional final.

Considerando como ensaio modelo a utilização 3 g de BM-Cv em 100 mL de água Millipore® e um rácio de aditivo/BM-Cv de 0.16, foram adicionadas quantidades diferenciadas dos vários aditivos testados, nomeadamente 533 µL de ED, 503 µL de DET ou 480 mg no caso dos reagentes sólidos (melamina, ureia e *p*-FD).

Como ensaio modelo, utilizou-se 3 g de ácido cítrico (> 99.5%, Sigma-Aldrich) em 100 mL de água Millipore®, adicionando-se 533 µL de aditivo, que corresponde a um rácio mássico de ED:ácido cítrico de 0.16; as leituras de pH foram realizadas como descrito anteriormente. Estando o reator devidamente selado, foram programadas as condições operatórias de 250 °C, durante 6 horas, a uma velocidade de agitação de 180 rpm.

Alternativamente, foi realizado um ensaio em reator de aço-inox com vaso de Teflon de 50 mL, na mufla, a 150 °C. Foram pesadas 1.2 g de BM-Cv, adicionando-se 40 mL a água Millipore®, medindo-se o pH inicial da mistura antes e após a adição de aditivo (213 µL, correspondente a um rácio mássico de ED:BM-Cv de 0.16), bem como no final da reação.

III.4.2. Síntese dos PsC por CHMO

Na síntese dos PsC por CHMO recorreu-se à estratégia de carbonização hidrotérmica assistida por radiação micro-ondas, num reator monomodo. Num tubo de pirex, pesaram-se 150 mg de BM-Cv e adicionaram-se 4.5 mL de água Millipore[®], registando-se o pH inicial da mistura reacional. Após a adição da etilenodiamina (quantidade variável) mediu-se novamente o pH. Decorrido o tempo da reação e arrefecimento, registou-se o pH da mistura reacional final.

Colocou-se o tubo selado com septo de teflon no reator de micro-ondas e selecionaram-se as condições do ensaio, cujas variações se encontram descritas na Secção II.3.

III.4.3. Purificação dos Pontos de Carbono por Extração Líquido-Líquido

A mistura reacional resultante da síntese foi, posteriormente, submetida a uma etapa de isolamento por filtração com membrana de celulose regenerada, no caso da síntese por CHAC e por filtro de seringa, no caso da síntese por CHMO, ambos com diâmetro de poro de 0.2 µm. O resíduo obtido foi quantificado após ser seco em estufa (WTC Binder), a 105 °C, durante 24 horas.

Os filtrados recuperados do processo anterior foram purificados através de extração líquido-líquido em duas etapas sucessivas, com CH₂Cl₂ e AcOEt. Para o filtrado da síntese por CHAC foram utilizadas duas porções sucessivas de 50 mL de cada solvente, enquanto para o filtrado da síntese por CHMO foram utilizadas duas porções sucessivas de 10 mL. Posteriormente, foi efetuada a remoção de solvente orgânico residual através de evaporação, sendo registado o volume final da dispersão aquosa resultante e a mesma conservada em atmosfera inerte, a 4 °C. Foram ainda quantificadas as fases orgânicas recolhidas na etapa de purificação após evaporação e secagem a 105 °C.

III.5. AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DOS PONTOS DE CARBONO

III.5.1. Avaliação das Propriedades Antioxidantes

III.5.1.1. Método do Radical ABTS

A capacidade antioxidante dos PsC foi avaliada através do método do radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico); 98 %, Sigma-Aldrich), descrito por Re *et al.*,¹¹⁶ com adaptações. À semelhança dos restantes métodos colorimétricos utilizados para a caracterização da biomassa, foi utilizada uma microplaca de 96 poços (NUNC), para onde foram pipetados 290 µL de uma solução stock de radical ABTS ajustada à unidade de absorvância a 655 nm e previamente preparada a uma concentração de 7 mM, em 2.5 mM de K₂S₂O₈ em água desionizada, e conservada ao abrigo da luz durante ca. 18 h. Foram adicionados 10 µL de solução aquosa de PsC (de concentração variável) ou água desionizada (ensaio em branco). Como controlos positivos, foram utilizados o ácido ascórbico (> 99.7%, Riedel-de Haën), BHT (Scharlau) e Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico, 97 %, Acros Organics).

A mistura reacional repousou durante 5 minutos, antes de ser lida a absorvância a 655 nm. A atividade antioxidante foi determinada através da equação III.5 e expressa em %.

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \frac{(\text{Abs}_{655 \text{ nm}})_0 - (\text{Abs}_{655 \text{ nm}})_{\text{amostra}}}{(\text{Abs}_{655 \text{ nm}})_0} \quad \text{Equação III.5}$$

Onde $(\text{Abs}_{655 \text{ nm}})_0$ corresponde à absorvância a 655 nm do ensaio em branco e $(\text{Abs}_{655 \text{ nm}})_{\text{amostra}}$ à absorvância a 655 nm da amostra ou do controlo positivo.

Foi efetuada em simultâneo a quantificação da atividade antioxidante com recurso a uma curva de calibração utilizando padrões de Trolox, numa gama de concentrações de 0-0.20 mg mL⁻¹, tendo os resultados sido apresentados em µg de equivalentes de Trolox (ET) por mg de PsC (µg TE mg⁻¹). Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

III.5.1.2. Capacidade quelante dos iões Fe²⁺

Paralelamente, a atividade antioxidante dos PsC foi também avaliada através da determinação da capacidade quelante dos iões Fe²⁺, seguindo o método descrito por Adjimani e Asare¹²⁰ e Canabady-Rochelle *et al.*¹⁷²

Para a realização deste método, adicionaram-se 50 µL de amostra (PsC) a uma microplaca de 96 poços (NUNC), em triplicado. De seguida, pipetaram-se 185 µL de metanol absoluto,

50 µL de solução de cloreto de ferro (II) 2 mM e 20 µL de solução de ferrozina (Sigma Aldrich) 5 mM. Após um período de repouso de 10 minutos, a absorvância da mistura reacional foi lida num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec), a 550 nm. Para o branco, foi utilizada água desionizada e, como controlo positivo, utilizou-se EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético, Merk) 2 mg mL⁻¹. Os resultados foram apresentados em percentagem de capacidade quelante (%) e determinados através da equação III.6, onde $(Abs_{550\text{ nm}})_0$ corresponde à absorvância a 550 nm do branco e $(Abs_{550\text{ nm}})_{amostra}$ à absorvância da amostra ou do controlo positivo a 550 nm:

$$\text{Capacidade Quelante (\%)} = \frac{(Abs_{550\text{ nm}})_0 - (Abs_{550\text{ nm}})_{amostra}}{(Abs_{550\text{ nm}})_0} \quad \text{Equação III.6}$$

III.5.2. Avaliação da Atividade Antibacteriana

III.5.2.1. Técnica de suscetibilidade à difusão em disco

Uma das técnicas utilizadas para avaliar a atividade antibacteriana dos PsC foi realizada através de uma adaptação do método de Kirby-Bauer,^{157,158} baseando-se na técnica de suscetibilidade à difusão em disco de 9 mm.

As espécies bacterianas testadas, *Escherichia coli* ATCC® 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, foram inoculadas obedecendo às normas M100 do CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*).¹⁵⁹ O referido documento descreve os procedimentos de preparação do pré-inóculo em meio MHB (*Mueller-Hinton Broth*; Oxoid), ajustando a turbidez ao padrão 0.5 de McFarland (1.5x10⁸ CFU/mL; Liofilchem) após incubação *overnight*, a 37 °C e 180 rpm.

Posteriormente, a inoculação das suspensões celulares foi efetuada em meio MHS (*Mueller-Hinton Soft*), preparado a partir de MHB suplementado com 0.5 % (m/v) de Agar Técnico (Oxoid), com deposição em placa de Petri sobre MHA (*Mueller-Hinton Agar*, Scharlau).

Os discos de 9 mm de diâmetro foram impregnados com 50 µL dos PsC (massa variável), com gentamicina como controlo positivo (10 µg/disco) e com água desionizada estéril como controlo negativo, tendo estes sido colocados sobre o meio MHS antes da sua solidificação. Os resultados foram observados e registados ao fim de um período de incubação de ca. 18 horas, a 37 °C.

III.5.2.2. Determinação dos valores de MIC e MLC

A segunda técnica utilizada para avaliar a atividade bacteriana contra *E. coli* e *S. aureus*, baseou-se na determinação dos valores de MIC e MLC, através do método colorimétrico de microdiluição em meio líquido, descrito pelo CLSI.¹⁷³ Foram seguidas as etapas descritas anteriormente para a preparação das culturas bacterianas.

Para uma microplaca de 96 poços estéril (VWR), foram pipetados 100 µL de suspensão celular, previamente ajustada a 5×10^5 CFU/mL e 100 µL de PsC (massa variável) ou água desionizada estéril (como controlo negativo) em triplicado. Após incubação a 37 °C durante 18 horas, foram adicionados a cada poço 20 µL de solução de 0.01 % (m/v) de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido, sal de sódio) em PBS, pH 7.2.

A interpretação visual dos resultados e leitura da intensidade de fluorescência ($\lambda_{exc} = 550$ nm, $\lambda_{em} = 650$ nm, FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec) foi realizada após uma nova incubação a 37 °C durante 1-2 horas.

III.5.3. Avaliação da Citotoxicidade *in vitro*

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos PsC foi realizada através do método colorimétrico do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) com adaptações, onde é detetada a redução deste reagente a formazona por parte das células vivas.^{103,174} Foi quantificado o efeito citotóxico avaliando a viabilidade de três linhas celulares animais após incubação com os PsC, designadamente células epiteliais renais de macaco verde africano (VERO ATCC® CCL-81), fibroblastos embrionários (NIH-3T3 ATCC® CRL-1658) e células de sarcoma de murganho (S180 ATCC® TIB-66).

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços estéreis (Orange Scientific), onde foram inicialmente adicionados 100 µL de suspensão celular (1×10^5 células/poço) em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; GIBCO®, Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10 % (v/v) FBS (soro fetal bovino, *Fetal Bovine Serum*; GIBCO®, Thermo Fisher Scientific), com incubação durante 48 horas a 37 °C sob atmosfera humidificada de 5 % de CO₂. Posteriormente, adicionaram-se 100 µL/poço de PsC (massa variável, por diluição seriada), e incubou-se de novo sob as mesmas condições durante ca. 18 horas, utilizando-se como controlo negativo água Millipore® estéril.

Posteriormente descartou-se o sobrenadante e lavaram-se os poços com PBS, adicionando-se 100 µL/poço de uma solução de MTT a 5 mg mL⁻¹ em PBS. Após um novo período de incubação de ca. 3 horas, a 37 °C sob atmosfera humidificada de 5 % CO₂, removeu-se

novamente o sobrenadante 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 e leu-se a absorvância a 570 nm, com referência a 650 nm, num leitor de microplacas (TECAN Infinite M200 PRO).

III.5.4. Avaliação da Citotoxicidade *in vivo*

De forma a avaliar a citotoxicidade *in vivo*, foi desenvolvido um ensaio de letalidade com o microcrustáceo *Artemia salina*. Para o efeito, foram selecionados ovos da marca *Artemio Pur*, produzida pela JBL. Previamente preparou-se uma solução de água do mar artificial recorrendo a 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 dissolvidos em 1 L de água Millipore®. A esta solução, adicionou-se Na₂CO₃ sólido para ajustar o pH a 9.0. Os ovos de *A. salina* foram colocados num recipiente próprio contendo esta solução, onde ficaram a incubar durante 24-48 horas, à temperatura ambiente (28-30 °C), sob iluminação contínua e forte arejamento.

O ensaio de citotoxicidade foi realizado tendo por base a metodologia descrita na literatura.^{106,175,176} Numa microplaca de 96 poços estéril (Orange Scientific), depositaram-se 2 gotas de solução salina contendo os organismos vivos (estimando-se a presença de 10-15 organismos por gota) por poço. A solução de PsC utilizada foi diluída em série em solução de água do mar artificial imediatamente antes da sua aplicação, num volume de 100 µL por poço. A microplaca foi tapada, permitindo a incubação da mistura à temperatura ambiente durante 24-48 horas. O número de organismos mortos foi contado ao microscópio ótico invertido (OLYMPUS CK2), registando-se este valor por poço. De seguida, aplicaram-se 20 µL de solução de 5 % (v/v) clorofórmio em cada poço, levando à morte de todos os organismos, possibilitando a contagem do número total de organismos por poço. Os resultados obtidos foram expressos em % de morte dos organismos, através da seguinte equação:

$$\% \text{ Morte} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de organismos mortos}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de organismos}} \times 100 \quad \text{Equação III.7}$$

III.5.5. Marcação Celular por Fluorescência

A aquisição das fotografias por microscopia de fluorescência (OLYMPUS, BX51) foi realizada após incubação das linhas celulares (VERO, S180, NIH-3T3) com a dispersão aquosa de PsC à concentração de 2 mg mL⁻¹. Numa microplaca de 24 poços estéril (Orange Scientific) depositaram-se lamelas redondas previamente esterilizadas no fundo dos poços,

adicionando-se de seguida 500 μL de uma solução 0.15 % (m/v) de gelatina em PBS. Após um período de incubação de ca. 10 minutos, removeu-se o volume em excesso e lavaram-se todos os poços com DMEM suplementado com 10 % (v/v) FBS. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de células em suspensão, de forma a cobrir o fundo do poço, seguindo-se nova incubação de ca. 24 horas, a 37 °C, sob atmosfera humidificada de 5 % CO_2 .

Após este período, descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 900 μL de DMEM fresco suplementado com 10 % (v/v) FBS e 100 μL /poço de PsC (20 mg mL^{-1}), obtendo-se a concentração final de 2 mg mL^{-1} . Seguiu-se um novo período de incubação de ca. 18 horas sob as mesmas condições descritas anteriormente. De forma a proceder à aquisição das imagens de microscopia de fluorescência, procedeu-se à lavagem de todos os poços com DMEM fresco e depositou-se a lamela invertida sobre uma lâmina hidratada com 1-2 gotas do sobrenadante.

Por sua vez, a aquisição das fotografias por microscopia de fluorescência dos organismos modelo foi realizada após incubação dos mesmos com a dispersão aquosa de PsC à concentração de 2 mg mL^{-1} , numa microplaca 96 poços estéril (Orange Scientific), à semelhança do procedimento descrito para a preparação dos ensaios de citotoxicidade *in vivo*. Decorrido o tempo de incubação (ca. 24 h), depositou-se 1 gota de solução salina contendo os microcrustáceos e a dispersão aquosa de PsC sobre uma lâmina, sobre a qual foi posteriormente colocada uma lamela. Antes de se proceder à aquisição das fotografias, a lâmina preparada repousou durante ca. 15 minutos no escuro.



IV. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

O presente trabalho aborda a síntese de pontos de carbono (PsC) fluorescentes e bioativos a partir da biomassa da microalga *C. vulgaris* crescida em meio de cultura suplementado com resíduos alimentares provenientes do comércio retalhista.

Da etapa de síntese resultaram PsC luminescentes com rendimentos mássicos moderados através de vias sustentáveis de síntese hidrotérmica recorrendo a aquecimento convencional e irradiação micro-ondas, promovendo simultaneamente a valorização dos resíduos alimentares e da biomassa da microalga produzida em condições não convencionais e cujas aplicações se encontram mais limitadas e menos exploradas, devido à origem da fonte de nutrientes.

Foram obtidos PsC com características diferenciadas, através da utilização de diferentes aditivos, rácios mássicos de aditivo/BM-Cv e temperaturas de reação. Entre os vários nanomateriais, destacaram-se os PsC funcionalizados com etilenodiamina (ED), que exibiram rendimentos quânticos de fluorescência promissores (ca. $\Phi_F = 21\%$).

Foi ainda avaliada a atividade biológica destas nanopartículas, quer ao nível da sua atividade antibacteriana quer ao nível da sua capacidade antioxidante. Os efeitos citotóxicos dos PsC foram analisados através de testes *in vitro* e *in vivo*, tendo também sido explorada a sua internalização celular através da aquisição de imagens de microscopia de fluorescência.

Embora estes PsC não tenham tido um desempenho destacável em termos das suas atividades antibacteriana e antioxidante, foi possível verificar que os nanomateriais não apresentam citotoxicidade para as linhas celulares animais testadas, bem como para o microcrustáceo *A. salina*, salientando-se a sua potencial aplicação na marcação e visualização de células na área da imagiologia.

Não obstante, refira-se que os PsC funcionalizados com *p*-fenilenodiamina revelaram, ao contrário dos restantes ensaios, uma boa atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus*, destacando-se o seu potencial como agentes antimicrobianos.

Perspetivando-se a aplicação destes nanomateriais na área da imagiologia, as suas propriedades óticas e morfológicas deverão ser sintonizadas de forma a garantir o menor tamanho e melhor fluorescência possíveis, com o intuito de facilitar a incorporação dos PsC no interior de células, tecidos ou órgãos e possibilitando a marcação dos mesmos. Será, igualmente, pertinente procurar purificar os nanomateriais sintetizados através de técnicas alternativas, nomeadamente cromatografia de exclusão molecular e/ou diálise, com vista à

obtenção de melhores rendimentos quânticos de fluorescência e, possivelmente, melhores propriedades biológicas.

Por outro lado, atendendo ao facto de os PsC obtidos terem somente sido testados em células animais não humanas, é de extrema importância perceber qual a sua biocompatibilidade para com um modelo celular humano, de células normais e tumorais. No mesmo contexto, o estudo mais profundo no âmbito dos ensaios *in vivo* será relevante, utilizando modelos animais mais complexos, como os murganhos.

Por último, é de salientar a importância da implementação desta classe de nanomateriais à Engenharia Biomédica, não só pela sua fácil obtenção e pelo baixo custo associados, mas principalmente pela versatilidade das suas condições de síntese, permitindo a sintonização das suas características de acordo com a aplicação em vista.

V. BIBLIOGRAFIA

- (1) Shalaby, E. Algae as Promising Organisms for Environment and Health. *Plant Signaling & Behavior* **2011**, 6 (9), 1338–1350. <https://doi.org/10.4161/psb.6.9.16779>.
- (2) Sathasivam, R.; Radhakrishnan, R.; Hashem, A.; Abd_Allah, E. F. Microalgae Metabolites: A Rich Source for Food and Medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences* **2019**, 26 (4), 709–722. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.003>.
- (3) Huang, H.; Lang, Y.; Wang, S.; Zhou, M. Microalgae-Based Drug Delivery Systems in Biomedical Applications. *Engineered Regeneration* **2024**. <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2024.01.002>.
- (4) Zhong, D.; Du, Z.; Zhou, M. Algae: A Natural Active Material for Biomedical Applications. *VIEW* **2021**, 2 (4). <https://doi.org/10.1002/VIW.20200189>.
- (5) *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products*; Alam, Md. A., Xu, J.-L., Wang, Z., Eds.; Springer Singapore: Singapore, 2020. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-0169-2>.
- (6) Safi, C.; Zebib, B.; Merah, O.; Pontalier, P. Y.; Vaca-Garcia, C. Morphology, Composition, Production, Processing and Applications of *Chlorella Vulgaris*: A Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2014**, 35, 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>.
- (7) Balasubramaniam, V.; Gunasegavan, R. D. N.; Mustar, S.; Lee, J. C.; Noh, M. F. M. Isolation of Industrial Important Bioactive Compounds from Microalgae. *Molecules* **2021**, 26 (4). <https://doi.org/10.3390/molecules26040943>.
- (8) Pacheco, D.; Rocha, A. C. S.; Garcia, A.; Bóia, A.; Pereira, L.; Verdelhos, T. Municipal Wastewater: A Sustainable Source for the Green Microalgae *Chlorella Vulgaris* Biomass Production. *Applied Sciences (Switzerland)* **2021**, 11 (5), 1–16. <https://doi.org/10.3390/app11052207>.
- (9) Yousuf, A. Fundamentals of Microalgae Cultivation. In *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*; Yousuf, A., Ed.; Academic Press, 2020; pp 1–9. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00001-1>.
- (10) Carvalho, J. C. de; Borghetti, I. A.; Cartas, L. C.; Woiciechowski, A. L.; Soccol, V. T.; Soccol, C. R. Biorefinery Integration of Microalgae Production into Cassava Processing Industry: Potential and Perspectives. *Bioresource Technology* **2018**, 247, 1165–1172. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.213>.
- (11) Medeiros, V. P. B. de; Pimentel, T. C.; Varandas, R. C. R.; Santos, S. A. dos; Pedrosa, G. T. de S.; Sassi, C. F. da C.; Conceição, M. M. da; Magnani, M. Exploiting the Use of Agro-Industrial Residues from Fruit and Vegetables as Alternative Microalgae Culture

-
- Medium. *Food Research International* **2020**, 137.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109722>.
- (12) Trivedi, S.; Bhoyar, V.; Belgamwar, V.; Wadher, K.; Raut, N. A.; Dhoble, S. J. Practices of Food Waste Management and Its Impact on Environment. In *360-Degree Waste Management, Volume 1*; Elsevier, 2023; pp 89–111. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90760-6.00001-1>.
- (13) United Nations Environment Programme. *Food Waste Index Report 2024. Think Eat Save: Tracking Progress to Halve Global Food Waste*; 2024. <https://wedocs.unep.org/20.500.11822/45230>.
- (14) Ferdeş, M.; Zăbavă, B. Ștefania; Paraschiv, G.; Ionescu, M.; Dincă, M. N.; Moiceanu, G. Food Waste Management for Biogas Production in the Context of Sustainable Development. *Energies* **2022**, 15 (17). <https://doi.org/10.3390/en15176268>.
- (15) Lau, K. Y.; Pleissner, D.; Lin, C. S. K. Recycling of Food Waste as Nutrients in *Chlorella Vulgaris* Cultivation. *Bioresource Technology* **2014**, 170, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.096>.
- (16) Chowdury, K. H.; Nahar, N.; Deb, U. K. The Growth Factors Involved in Microalgae Cultivation for Biofuel Production: A Review. *Computational Water, Energy, and Environmental Engineering* **2020**, 09 (04), 185–215. <https://doi.org/10.4236/cweee.2020.94012>.
- (17) Carvalho, J. C. de; Sydney, E. B.; Tessari, L. F. A.; Soccol, C. R. Culture Media for Mass Production of Microalgae. In *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Biofuels from Algae, Second Edition*; Elsevier, 2018; pp 33–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64192-2.00002-0>.
- (18) Leliaert, F. Green Algae: Chlorophyta and Streptophyta. In *Encyclopedia of Microbiology*; Elsevier, 2019; pp 457–468. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20890-X>.
- (19) Leliaert, F.; Smith, D. R.; Moreau, H.; Herron, M. D.; Verbruggen, H.; Delwiche, C. F.; De Clerck, O. Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences* **2012**, 31 (1), 1–46. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.615705>.
- (20) *Taxonomic classification of Chlorella vulgaris - World Register of Marine Species*. <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=532029>.
- (21) Jian, J.; Torres-Montero, P.; Bai, M.; Lu, Y.; Simonsen, H. T. Genome Analysis of *Chlorella Vulgaris* (CCAP 211/12) Mutants Provided Insight into the Molecular Basis of Chlorophyll Deficiency. *Algal Research* **2024**, 78, 103426. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103426>.

-
- (22) *As nossas Espécies de Microalgas - Allmicroalgae. As nossas Espécies de Microalgas – Allmicroalgae.* [Online]. Available: <https://www.allmicroalgae.com/pt-pt/microalgas/>. [Accessed: 05-Apr-2021].
- (23) Khanra, S.; Mondal, M.; Halder, G.; Tiwari, O. N.; Gayen, K.; Bhowmick, T. K. Downstream Processing of Microalgae for Pigments, Protein and Carbohydrate in Industrial Application: A Review. *Food and Bioproducts Processing* **2018**, *110*, 60–84. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.02.002>.
- (24) Kadam, S. U.; Tiwari, B. K.; O'Donnell, C. P. Application of Novel Extraction Technologies for Bioactives from Marine Algae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61* (20), 4667–4675. <https://doi.org/10.1021/jf400819p>.
- (25) Sosa-Hernández, J. E.; Escobedo-Avellaneda, Z.; Iqbal, H. M. N.; Welti-Chanes, J. State-of-the-Art Extraction Methodologies for Bioactive Compounds from Algal Biome to Meet Bio-Economy Challenges and Opportunities. *Molecules* **2018**, *23* (11). <https://doi.org/10.3390/molecules23112953>.
- (26) Lee, W. K.; Ryu, Y. K.; Kim, T.; Park, A.; Lee, Y. J.; Sunwoo, I. Y.; Koh, E. J.; Oh, C.; Choi, W. Y.; Kang, D. H. Enhanced Photosynthetic Pigment Production Using a Scaled-Up Continuously Circulated Bioreactor. *Marine Drugs* **2023**, *21* (11). <https://doi.org/10.3390/md21110576>.
- (27) Lyu, X.; Lyu, Y.; Yu, H.; Chen, W. N.; Ye, L.; Yang, R. Biotechnological Advances for Improving Natural Pigment Production: A State-of-the-Art Review. *Bioresources and Bioprocessing* **2022**, *9* (1). <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00497-4>.
- (28) Schüller, L. M.; Gangadhar, K. N.; Duarte, P.; Placines, C.; Molina-Márquez, A. M.; León-Bañares, R.; Sousa, V. S.; Varela, J.; Barreira, L. Improvement of Carotenoid Extraction from a Recently Isolated, Robust Microalga, *Tetraselmis* Sp. CTP4 (Chlorophyta). *Bioprocess and Biosystems Engineering* **2020**, *43* (5), 785–796. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02273-9>.
- (29) Lichtenthaler, H. K. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. In *Plant Cell Membranes*; Academic Press, 1987; Vol. 148, pp 350–382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1).
- (30) Yang, F. Q.; Ge, L. Colorimetric Sensors: Methods and Applications. *Sensors* **2023**, *23* (24). <https://doi.org/10.3390/s23249887>.
- (31) Dubois, M.; Gilles, K.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. A Colorimetric Method for the Determination of Sugars. *Nature* **1951**, *168* (4265), 167. <https://doi.org/10.1038/168167a0>.
- (32) 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. *Analytical Biochemistry* **2005**, *339* (1), 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001>.

-
- (33) Yuan, T.; Zhao, S.; Yang, J.; Niu, M.; Xu, Y. Structural Characteristics of β -Glucans from Various Sources and Their Influences on the Short- and Long-Term Starch Retrogradation in Wheat Flour. *International Journal of Biological Macromolecules* **2024**, *264*, 130561. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130561>.
- (34) Ogawa, K.; Tsijrugi, J.; Watanabe, T.-K. The Dependence of the Conformation of a (1-+3)-D-D-Glucan on Chain-Lenght in Alkaline Solution. *Carbohydrate Research* **1973**, *29*, 397–403.
- (35) Semedo, M. C.; Karmali, A.; Fonseca, L. A High Throughput Colorimetric Assay of β -1,3-d-Glucans by Congo Red Dye. *Journal of Microbiological Methods* **2015**, *109*, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.12.020>.
- (36) Fimbres-Olivarria, D.; Marquez-Escalante, J.; Martínez-Robinson, K. G.; Miranda-Arizmendi, V.; Anda-Flores, Y. D.; Rascon-Chu, A.; Brown-Bojorquez, F.; Carvajal-Millan, E. Physicochemical and Microstructural Characteristics of Sulfated Polysaccharide from Marine Microalga. *Analytica* **2023**, *4* (4), 527–537. <https://doi.org/10.3390/analytica4040036>.
- (37) Miranda-Arizmendi, V.; Fimbres-Olivarria, D.; Miranda-Baeza, A.; Martínez-Robinson, K.; Rascón-Chu, A.; Anda-Flores, Y. D.; Lizardi-Mendoza, J.; Mendez-Encinas, M. A.; Brown-Bojorquez, F.; Canett-Romero, R.; Carvajal-Millan, E. Sulfated Polysaccharides from *Chaetoceros Muelleri*: Macromolecular Characteristics and Bioactive Properties. *Biology* **2022**, *11* (10). <https://doi.org/10.3390/biology11101476>.
- (38) Hahn, T.; Schulz, M.; Stadtmüller, R.; Zayed, A.; Muffler, K.; Lang, S.; Ulber, R. Cationic Dye for the Specific Determination of Sulfated Polysaccharides. *Analytical Letters* **2016**, *49* (12), 1948–1962. <https://doi.org/10.1080/00032719.2015.1126839>.
- (39) Bitter, T.; Muir, H. M. A Modified Uronic Acid Carbazole Reaction. *Analytical Biochemistry* **1962**, *4* (4), 330–334. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(62\)90095-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(62)90095-7).
- (40) Cesaretti, M.; Luppi, E.; Maccari, F.; Volpi, N. A 96-Well Assay for Uronic Acid Carbazole Reaction. *Carbohydrate Polymers* **2003**, *54* (1), 59–61. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00144-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00144-9).
- (41) Li, J.; Kisara, K.; Danielsson, S.; Lindström, M. E.; Gellerstedt, G. An Improved Methodology for the Quantification of Uronic Acid Units in Xylans and Other Polysaccharides. *Carbohydrate Research* **2007**, *342* (11), 1442–1449. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.03.031>.
- (42) Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 1976, *72*, 248–254.

-
- (43) Nouroozi, V.; Nouroozi, R. V.; Noroozi, M. V.; Ahmadizadeh, M. Determination of Protein Concentration Using Bradford Microplate Protein Quantification Assay. *International Electronic Journal of Medicine* **2015**, *4* (1).
- (44) Kielkopf, C. L.; Bauer, W.; Urbatsch, I. L. Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harbor Protocols* **2020**, *2020* (4), 136–138. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot102269>.
- (45) Cichoński, J.; Chrzanowski, G. Microalgae as a Source of Valuable Phenolic Compounds and Carotenoids. *Molecules* **2022**, *27* (24). <https://doi.org/10.3390/molecules27248852>.
- (46) Dominguez-López, I.; Pérez, M.; Lamuela-Raventós, R. M. Total (Poly)Phenol Analysis by the Folin-Ciocalteu Assay as an Anti-Inflammatory Biomarker in Biological Samples. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1–7. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2220031>.
- (47) Christ, B.; Muller, K. H.; Nattermann, A. Determination of the Amount of Flavonol Derivatives in Drugs. *Arch Pharm* **1957**, *293* (65), 1033–1042.
- (48) Shraim, A. M.; Ahmed, T. A.; Rahman, M. M.; Hijji, Y. M. Determination of Total Flavonoid Content by Aluminum Chloride Assay: A Critical Evaluation. *LWT* **2021**, *150*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111932>.
- (49) Li, Y.; Naghdi, F. G.; Garg, S.; Adame-Vega, T. C.; Thurecht, K. J.; Ghafor, W. A.; Tannock, S.; Schenk, P. M. A Comparative Study: The Impact of Different Lipid Extraction Methods on Current Microalgal Lipid Research. *Microbial Cell Factories* **2014**, *13* (1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-14>.
- (50) Silva, A. de S. e; Magalhães, W. T. de; Moreira, L. M.; Rocha, M. V. P.; Bastos, A. K. P. Microwave-Assisted Extraction of Polysaccharides from *Arthrospira* (*Spirulina*) *Platensis* Using the Concept of Green Chemistry. *Algal Research* **2018**, *35*, 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.08.015>.
- (51) Zhou, J.; Wang, M.; Saraiva, J. A.; Martins, A. P.; Pinto, C. A.; Prieto, M. A.; Simal-Gandara, J.; Cao, H.; Xiao, J.; Barba, F. J. Extraction of Lipids from Microalgae Using Classical and Innovative Approaches. *Food Chemistry* **2022**, *384*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132236>.
- (52) Anschau, A.; Xavier, M. C. A.; Hernalsteens, S.; Franco, T. T. Effect of Feeding Strategies on Lipid Production by *Lipomyces Starkeyi*. *Bioresource Technology* **2014**, *157*, 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.104>.
- (53) Banger, A.; Gautam, S.; Jadoun, S.; Jangid, N. K.; Srivastava, A.; Pulidindi, I. N.; Dwivedi, J.; Srivastava, M. Synthetic Methods and Applications of Carbon Nanodots. *Catalysts* **2023**, *13* (5). <https://doi.org/10.3390/catal13050858>.

-
- (54) Cui, L.; Ren, X.; Sun, M.; Liu, H.; Xia, L. Carbon Dots: Synthesis, Properties and Applications. *Nanomaterials* **2021**, *11* (12). <https://doi.org/10.3390/nano11123419>.
- (55) 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. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (40), 12736–12737. <https://doi.org/10.1021/ja040082h>.
- (56) Gayen, B.; Palchoudhury, S.; Chowdhury, J. Carbon Dots: A Mystic Star in the World of Nanoscience. *Journal of Nanomaterials* **2019**, *2019*. <https://doi.org/10.1155/2019/3451307>.
- (57) Sun, H.; Yang, G.; Yang, B. Synthesis, Structure Control and Applications of Carbon Dots. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao/Chemical Journal of Chinese Universities* **2021**, *42* (2), 349–365. <https://doi.org/10.7503/cjcu20200659>.
- (58) Lima, L. C. de O.; Machado, W. S.; Schiavon, M. A. Carbon Dots: Chemical Synthesis, Properties and Applications – a Review. *Revista Virtual de Quimica* **2023**, *15* (6), 1163–1178. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20230010>.
- (59) Alas, M. O.; Alkas, F. B.; Sukuroglu, A. A.; Alturk, R. G.; Battal, D. Fluorescent Carbon Dots Are the New Quantum Dots: An Overview of Their Potential in Emerging Technologies and Nanosafety. *Journal of Materials Science* **2020**, *55* (31), 15074–15105. <https://doi.org/10.1007/s10853-020-05054-y>.
- (60) Tesa, M. Photoluminescence Spectroscopy of Carbon Dots, 2024. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.12585.81763>.
- (61) Pathak, R.; Punetha, V. D.; Bhatt, S.; Punetha, M. Multifunctional Role of Carbon Dot-Based Polymer Nanocomposites in Biomedical Applications: A Review. *Journal of Materials Science* **2023**, *58* (15), 6419–6443. <https://doi.org/10.1007/s10853-023-08408-4>.
- (62) Roy, P.; Chen, P. C.; Periasamy, A. P.; Chen, Y. N.; Chang, H. T. Photoluminescent Carbon Nanodots: Synthesis, Physicochemical Properties and Analytical Applications. *Materials Today* **2015**, *18* (8), 447–458. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2015.04.005>.
- (63) Madhurima, V. P.; Kumari, K.; Jain, P. K. Synthesis and Study of Carbon Nanomaterials through Arc Discharge Technique for Efficient Adsorption of Organic Dyes. *Diamond and Related Materials* **2024**, *141*, 110538. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2023.110538>.
- (64) Jumardin, J.; Maddu, A.; Santoso, K.; Isnaeni, I. Synthesis of Fluorescent Carbon Dots (CDs) Using Laser Ablation Method for Bioimaging Application. *Jurnal Ilmu Fisika | Universitas Andalas* **2023**, *15* (2), 91–105. <https://doi.org/10.25077/jif.15.2.91-105.2023>.
- (65) Zhou, J.; Booker, C.; Li, R.; Zhou, X.; Sham, T. K.; Sun, X.; Ding, Z. An Electrochemical Avenue to Blue Luminescent Nanocrystals from Multiwalled Carbon Nanotubes

-
- (MWCNTs). *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129 (4), 744–745. <https://doi.org/10.1021/ja0669070>.
- (66) Wang, B.; Song, H.; Qu, X.; Chang, J.; Yang, B.; Lu, S. Carbon Dots as a New Class of Nanomedicines: Opportunities and Challenges. *Coordination Chemistry Reviews*, 2021, 442. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214010>.
- (67) S, T.; D, R. S. Green Synthesis of Highly Fluorescent Carbon Quantum Dots from Sugarcane Bagasse Pulp. *Applied Surface Science* **2016**, 390, 435–443. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.08.106>.
- (68) Zhu, J.; Zhu, F.; Yue, X.; Chen, P.; Sun, Y.; Zhang, L.; Mu, D.; Ke, F. Waste Utilization of Synthetic Carbon Quantum Dots Based on Tea and Peanut Shell. *Journal of Nanomaterials* **2019**, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7965756>.
- (69) Moraes, B.; Costa, A. I.; Barata, P. D.; Prata, J. V. Carbon Dots Synthesis from Coffee Grounds, and Sensing of Nitroanilines; MDPI AG, 2022; p 101. <https://doi.org/10.3390/ecsoc-25-11777>.
- (70) Sousa, D. A.; Ferreira, L. F. V.; Fedorov, A. A.; Rego, A. M. B. do; Ferrara, 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). <https://doi.org/10.3390/molecules27196768>.
- (71) Atchudan, R.; Edison, T. N. J. I.; Shanmugam, M.; Perumal, S.; Somanathan, T.; Lee, Y. R. Sustainable Synthesis of Carbon Quantum Dots from Banana Peel Waste Using Hydrothermal Process for in Vivo Bioimaging. *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures* **2021**, 126. <https://doi.org/10.1016/j.physe.2020.114417>.
- (72) Athika, M.; Prasath, A.; Duraisamy, E.; Devi, V. S.; Sharma, A. S.; Elumalai, P. Carbon-Quantum Dots Derived from Denatured Milk for Efficient Chromium-Ion Sensing and Supercapacitor Applications. *Materials Letters* **2019**, 241, 156–159. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.01.064>.
- (73) Tai, D.; Liu, C.; Liu, J. Facile Synthesis of Fluorescent Carbon Dots from Shrimp Shells and Using the Carbon Dots to Detect Chromium(VI). *Spectroscopy Letters* **2019**, 52 (3–4), 194–199. <https://doi.org/10.1080/00387010.2019.1607879>.
- (74) LewisOscar, F.; Vismaya, S.; Arunkumar, M.; Thajuddin, N.; Dhanasekaran, D.; Chari Nithya. Algal Nanoparticles: Synthesis and Biotechnological Potentials. In *Algae*; Thajuddin, N., Dhanasekaran, D., Eds.; IntechOpen, 2016; p Ch. 7. <https://doi.org/10.5772/62909>.
- (75) Chatzimitakos, T. G.; Kasouni, A.; Troganis, A.; Leonardos, I.; Tzovenis, I.; Ntzouvaras, A.; Stalikas, C. Carbon Nanodots Synthesized from Dunaliella Salina as Sun Protection Filters. *C* **2020**, 6 (4), 69. <https://doi.org/10.3390/c6040069>.

-
- (76) Pena, A. C. C.; Raymundo, L. M.; Trierweiler, L. F.; Gutterres, M. Green Carbon Dots Synthesized from *Chlorella Sorokiniana* Microalgae Biochar for Chrome Detection. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **2023**, *117*, 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2022.09.047>.
- (77) Chouzende, I.; Costa, A. I.; Barata, P. D.; Martins, S.; Semedo, M. C.; Cardoso, F. M. H.; Lobo, M. L.; Prata, J. V. Green Synthesis of Luminescent Carbon Nanomaterials from *Porphyridium Cruentum* Microalgae; MDPI AG, 2023; p 3. <https://doi.org/10.3390/msf2023023003>.
- (78) Sudolská, M.; Dubecký, M.; Sarkar, S.; Reckmeier, C. J.; Zboril, R.; Rogach, A. L.; Otyepka, M. Nature of Absorption Bands in Oxygen Functionalized Graphitic Carbon Dots. *J. Phys. Chem. C, Just Accepted Manuscript • Publication Date* **2015**, *15*. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b04080>.
- (79) Zuo, P.; Lu, X.; Sun, Z.; Guo, Y.; He, H. A Review on Syntheses, Properties, Characterization and Bioanalytical Applications of Fluorescent Carbon Dots. *Microchimica Acta* **2016**, *183* (2), 519–542. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1705-3>.
- (80) Yan, F.; Jiang, Y.; Sun, X.; Bai, Z.; Zhang, Y.; Zhou, X. Surface Modification and Chemical Functionalization of Carbon Dots: A Review. *Microchimica Acta* **2018**, *185* (9). <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2953-9>.
- (81) Ding, C.; Zhu, A.; Tian, Y. Functional Surface Engineering of C-Dots for Fluorescent Biosensing and in Vivo Bioimaging. *Accounts of Chemical Research* **2014**, *47* (1), 20–30. <https://doi.org/10.1021/ar400023s>.
- (82) Lim, S. Y.; Shen, W.; Gao, Z. Carbon Quantum Dots and Their Applications. *Chemical Society Reviews* **2015**, *44* (1), 362–381. <https://doi.org/10.1039/c4cs00269e>.
- (83) Wang, Y.; Hu, A. Carbon Quantum Dots: Synthesis, Properties and Applications. *Journal of Materials Chemistry C* **2014**, *2* (34), 6921–6939. <https://doi.org/10.1039/c4tc00988f>.
- (84) Qi, B. P.; Zhang, G. J.; Zhang, Z. L.; Pang, D. W. Photoluminescent Properties of Carbon Nanodots. In *Carbon Nanostructures*; Springer International Publishing, 2016; Vol. 0, pp 239–256. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28782-9_7.
- (85) Hola, K.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Giannelis, E. P.; Zboril, R.; Rogach, A. L. Carbon Dots - Emerging Light Emitters for Bioimaging, Cancer Therapy and Optoelectronics. *Nano Today* **2014**, *9* (5), 590–603. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.09.004>.
- (86) Das, S.; Mondal, S.; Ghosh, D. Carbon Quantum Dots in Bioimaging and Biomedicines. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **2023**, *11*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1333752>.

-
- (87) Choi, Y.; Choi, Y.; Kwon, O. H.; Kim, B. S. Carbon Dots: Bottom-Up Syntheses, Properties, and Light-Harvesting Applications. *Chemistry - An Asian Journal* **2018**, *13* (6), 586–598. <https://doi.org/10.1002/asia.201701736>.
- (88) 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>.
- (89) Song, Y.; Zhu, S.; Xiang, S.; Zhao, X.; Zhang, J.; Zhang, H.; Fu, Y.; Yang, B. Investigation into the Fluorescence Quenching Behaviors and Applications of Carbon Dots. *Nanoscale* **2014**, *6* (9), 4676–4682. <https://doi.org/10.1039/c4nr00029c>.
- (90) Zhu, S.; Song, Y.; Zhao, X.; Shao, J.; Zhang, J.; Yang, B. The Photoluminescence Mechanism in Carbon Dots (Graphene Quantum Dots, Carbon Nanodots, and Polymer Dots): Current State and Future Perspective. *Nano Research* **2015**, *8* (2), 355–381. <https://doi.org/10.1007/s12274-014-0644-3>.
- (91) Wang, H.; Zhang, T.; Zhu, J.; Zhai, Y.; Wang, H.; Bai, X.; Dong, B.; Song, H. A Novel Mechanism for Red Emission Carbon Dots: Hydrogen Bond Dominated Molecular States Emission. *Nanoscale* **2017**, *9* (35), 13042–13051. <https://doi.org/10.1039/c7nr03570e>.
- (92) 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. *Angewandte Chemie - International Edition* **2010**, *49* (26), 4430–4434. <https://doi.org/10.1002/anie.200906154>.
- (93) Moraes, B. Valorização de Borrás de Café Na Obtenção de Nanopontos de Carbono Luminescentes: Síntese Sustentável, Caracterização e Aplicações, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Lisboa, 2022.
- (94) Chouzende, M. I. V. Nanopontos de Carbono Fluorescentes a Partir de Biomassa de Microalgas: Síntese, Caracterização e Atividade Biológica, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Lisboa, 2023.
- (95) Antunes, B. G. Síntese Sustentável de Nanomateriais de Carbono Fluorescentes e Bioativos a Partir de Desperdícios Da Indústria Do Tomate, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Lisboa, 2023.
- (96) 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. *Microchimica Acta* **2019**, *186* (8). <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3688-y>.
- (97) He, C.; Xu, P.; Zhang, X.; Long, W. The Synthetic Strategies, Photoluminescence Mechanisms and Promising Applications of Carbon Dots: Current State and Future Perspective. *Carbon* **2022**, *186*, 91–127. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2021.10.002>.
- (98) Huzum, B.; Puha, B.; Necoara, R.; Gheorghevici, S.; Puha, G.; Filip, A.; Sirbu, P.; Alexa, O. Biocompatibility Assessment of Biomaterials Used in Orthopedic Devices: An

-
- Overview (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine* **2021**, *22* (5). <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10750>.
- (99) Karakullukcu, A.; Taban, E.; Ojo, O. Biocompatibility of Biomaterials and Test Methods: A Review. *Materials Testing* **2023**, *65*, 545–559. <https://doi.org/10.1515/mt-2022-0195>.
- (100) Yeow, B. S.; Soh, Y. B.; Chua, H.-M.; Ong, J. H. E.; Teo, J. C.; Un, W. Y.; Lim, C. M.; Ren, H. Cable-Driven Flexible Endoscope Utilizing Diamond-Shaped Perforations: FlexDiamond. In *Flexible Robotics in Medicine*; Ren, H., Ed.; Academic Press, 2020; pp 39–75. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817595-8.00003-1>.
- (101) Williams, D. F. Biocompatibility Pathways and Mechanisms for Bioactive Materials: The Bioactivity Zone. *Bioactive Materials* **2022**, *10*, 306–322. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.08.014>.
- (102) Kedar, U.; Phutane, P.; Shidhaye, S.; Kadam, V. Advances in Polymeric Micelles for Drug Delivery and Tumor Targeting. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2010**, *6* (6), 714–729. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.05.005>.
- (103) Sylvester, P. W. Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability. In *Methods in Molecular Biology*; Humana Press Inc., 2011; Vol. 716, pp 157–168. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-012-6_9.
- (104) Dias, C.; Vasimalai, N.; Sárria, M. P.; Pinheiro, I.; Vilas-Boas, V.; Peixoto, J.; Espiña, B. Biocompatibility and Bioimaging Potential of Fruit-Based Carbon Dots. *Nanomaterials* **2019**, *9* (2). <https://doi.org/10.3390/nano9020199>.
- (105) Lima, W. G.; Santos, L. B.; Nizer, W. S. da C.; Castilho, R. O.; Brito, J. C. M. Brine Shrimp (*Artemia Salina* Leach) as an Alternative Model for Assessing Their Vivoantioxidant Activity of Rutin. *Brazilian Journal of Health and Pharmacy* **2022**, *4* (1), 39–44. <https://doi.org/10.29327/226760.4.1-4>.
- (106) Rajabi, S.; Ramazani, A.; Hamidi, M.; Naji, T. *Artemia Salina* as a Model Organism in Toxicity Assessment of Nanoparticles. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences* **2015**, *23* (1). <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0105-x>.
- (107) Jiang, C.; Wu, H.; Song, X.; Ma, X.; Wang, J.; Tan, M. Presence of Photoluminescent Carbon Dots in Nescafe® Original Instant Coffee: Applications to Bioimaging. *Talanta* **2014**, *127*, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.046>.
- (108) Cong, S.; Liu, K.; Qiao, F.; Song, Y.; Tan, M. Biocompatible Fluorescent Carbon Dots Derived from Roast Duck for in Vitro Cellular and in Vivo *C. Elegans* Bio-Imaging. *Methods* **2019**, *168*, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.07.007>.
- (109) Dong, X.; Liang, W.; Meziani, M. J.; Sun, Y. P.; Yang, L. Carbon Dots as Potent Antimicrobial Agents. *Theranostics* **2020**, *10* (2), 671–686. <https://doi.org/10.7150/thno.39863>.

-
- (110) Li, P.; Sun, L.; Xue, S.; Qu, D.; An, L.; Wang, X.; Sun, Z. Recent Advances of Carbon Dots as New Antimicrobial Agents. *SmartMat* **2022**, *3* (2), 226–248. <https://doi.org/10.1002/smm2.1131>.
- (111) Pereira, F.; Lourenço, A.; Aires-de-Sousa, J.; Ferreira, L. M.; Marques, M. M. B.; Sousa, E.; Branco, P. S. 14th Edition of the Nacional Organic Chemistry Meeting and 7th Edition of the Nacional Therapeutic Chemistry Meeting; MDPI AG, 2022; p 1. <https://doi.org/10.3390/chemproc2022011001>.
- (112) Song, Y.; Lu, F.; Li, H.; Wang, H.; Zhang, M.; Liu, Y.; Kang, Z. Degradable Carbon Dots from Cigarette Smoking with Broad-Spectrum Antimicrobial Activities against Drug-Resistant Bacteria. *ACS Applied Bio Materials* **2018**, *1* (6), 1871–1879. <https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00421>.
- (113) Zhao, D.; Zhang, R.; Liu, X.; Li, X.; Xu, M.; Huang, X.; Xiao, X. Screening of Chitosan Derivatives-Carbon Dots Based on Antibacterial Activity and Application in Anti-Staphylococcus Aureus Biofilm. *International Journal of Nanomedicine* **2022**, *17*, 937–952. <https://doi.org/10.2147/IJN.S350739>.
- (114) Erel, O. A Novel Automated Direct Measurement Method for Total Antioxidant Capacity Using a New Generation, More Stable ABTS Radical Cation. *Clinical Biochemistry* **2004**, *37* (4), 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015>.
- (115) Miller, N. J.; Rice-Evans, C.; Davies, M.; Gopinathan, V.; Milner, A. A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and Its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clinical Science* **1993**, *84* (4), 407–412.
- (116) Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology and Medicine* **1999**, *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).
- (117) Ilyasov, I. R.; Beloborodov, V. L.; Selivanova, I. A.; Terekhov, R. P. ABTS/PP Decolorization Assay of Antioxidant Capacity Reaction Pathways. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21* (3). <https://doi.org/10.3390/ijms21031131>.
- (118) Roy, S.; Ezati, P.; Rhim, J. W.; Molaei, R. Preparation of Turmeric-Derived Sulfur-Functionalized Carbon Dots: Antibacterial and Antioxidant Activity. *Journal of Materials Science* **2022**, *57* (4), 2941–2952. <https://doi.org/10.1007/s10853-021-06804-2>.
- (119) Entezari, S.; Haghi, S. M.; Norouzkhani, N.; Sahebazar, B.; Vosoughian, F.; Akbarzadeh, D.; Islampanah, M.; Naghsh, N.; Abbasalizadeh, M.; Deravi, N. Iron Chelators in Treatment of Iron Overload. *Journal of Toxicology* **2022**, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/4911205>.

-
- (120) Adjimani, J. P.; Asare, P. Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of Iron Chelators. *Toxicology Reports* **2015**, *2*, 721–728. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.04.005>.
- (121) Decker, E. A.; Welch, B. Role of Ferritin as a Lipid Oxidation Catalyst in Muscle Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1990**, *38* (3), 674–677. <https://doi.org/10.1021/jf00093a019>.
- (122) Li, D.; Na, X.; Wang, H.; Xie, Y.; Cong, S.; Song, Y.; Xu, X.; Zhu, B. W.; Tan, M. Fluorescent Carbon Dots Derived from Maillard Reaction Products: Their Properties, Biodistribution, Cytotoxicity, and Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2018**, *66* (6), 1569–1575. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05643>.
- (123) Ko, H. Y.; Chang, Y. W.; Paramasivam, G.; Jeong, M. S.; Cho, S.; Kim, S. In Vivo Imaging of Tumour Bearing Near-Infrared Fluorescence-Emitting Carbon Nanodots Derived from Tire Soot. *Chemical Communications* **2013**, *49* (87), 10290–10292. <https://doi.org/10.1039/c3cc45215h>.
- (124) Wang, Y.; Gu, Z.; Dong, J.; Zhu, J.; Liu, C.; Li, G.; Lu, M.; Han, J.; Cao, S.; Chen, L.; Wang, W. Green Synthesis of Chlorella-Derived Carbon Dots and Their Fluorescence Imaging in Zebrafish. *RSC Advances* **2024**, *14* (2), 1459–1463. <https://doi.org/10.1039/d3ra07623g>.
- (125) Tao, H.; Yang, K.; Ma, Z.; Wan, J.; Zhang, Y.; Kang, Z.; Liu, Z. In Vivo NIR Fluorescence Imaging, Biodistribution, and Toxicology of Photoluminescent Carbon Dots Produced from Carbon Nanotubes and Graphite. *Small* **2012**, *8* (2), 281–290. <https://doi.org/10.1002/smll.201101706>.
- (126) Bayda, S.; Amadio, E.; Cailotto, S.; Frión-Herrera, Y.; Perosa, A.; Rizzolio, F. Carbon Dots for Cancer Nanomedicine: A Bright Future. *Nanoscale Advances* **2021**, *3* (18), 5183–5221. <https://doi.org/10.1039/d1na00036e>.
- (127) Zheng, M.; Li, Y.; Liu, S.; Wang, W.; Xie, Z.; Jing, X. One-Pot to Synthesize Multifunctional Carbon Dots for Near Infrared Fluorescence Imaging and Photothermal Cancer Therapy. *ACS Applied Materials and Interfaces* **2016**, *8* (36), 23533–23541. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b07453>.
- (128) Li, J.; Li, M.; Tian, L.; Qiu, Y.; Yu, Q.; Wang, X.; Guo, R.; He, Q. Facile Strategy by Hyaluronic Acid Functional Carbon Dot-Doxorubicin Nanoparticles for CD44 Targeted Drug Delivery and Enhanced Breast Cancer Therapy. *International Journal of Pharmaceutics* **2020**, *578*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119122>.
- (129) Mooney, K. L.; Choy, W.; Sidhu, S.; Pelargos, P.; Bui, T. T.; Voth, B.; Barnette, N.; Yang, I. The Role of CD44 in Glioblastoma Multiforme. *Journal of Clinical Neuroscience* **2016**, *34*, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2016.05.012>.

-
- (130) Wang, Q.; Huang, X.; Long, Y.; Wang, X.; Zhang, H.; Zhu, R.; Liang, L.; Teng, P.; Zheng, H. Hollow Luminescent Carbon Dots for Drug Delivery. *Carbon* **2013**, *59*, 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2013.03.009>.
- (131) Zeng, Q.; Shao, D.; He, X.; Ren, Z.; Ji, W.; Shan, C.; Qu, S.; Li, J.; Chen, L.; Li, Q. Carbon Dots as a Trackable Drug Delivery Carrier for Localized Cancer Therapy: In Vivo. *Journal of Materials Chemistry B* **2016**, *4* (30), 5119–5126. <https://doi.org/10.1039/c6tb01259k>.
- (132) Ashrafizadeh, M.; Mohammadinejad, R.; Kailasa, S. K.; Ahmadi, Z.; Afshar, E. G.; Pardakhty, A. Carbon Dots as Versatile Nanoarchitectures for the Treatment of Neurological Disorders and Their Theranostic Applications: A Review. *Advances in Colloid and Interface Science* **2020**, *278*. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102123>.
- (133) Luo, X.; Zhang, W.; Han, Y.; Chen, X.; Zhu, L.; Tang, W.; Wang, J.; Yue, T.; Li, Z. N,S Co-Doped Carbon Dots Based Fluorescent “on-off-on” Sensor for Determination of Ascorbic Acid in Common Fruits. *Food Chemistry* **2018**, *258*, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.032>.
- (134) Chen, J.; Yan, J.; Dou, B.; Feng, Q.; Miao, X.; Wang, P. Aggregatable Thiol-Functionalized Carbon Dots-Based Fluorescence Strategy for Highly Sensitive Detection of Glucose Based on Target-Initiated Catalytic Oxidation. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2021**, *330*. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.129325>.
- (135) Wibrianto, A.; Saputra, Y. J.; Sugito, S. F. A.; Khairunisa, S. Q.; Rachman, B. E.; Nasronudin, N.; Megasari, N. L. A.; Chang, J.; Fahmi, M. Z. Potential Usage of Boron Modified Carbon Nanodots as a Marker Candidate for Coronavirus Disease (COVID-19) Antibody Detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2024**, *248*, 116242. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2024.116242>.
- (136) Kaci, K.; Enebral-Romero, E.; Martínez-Periñán, E.; Garrido, M.; Pérez, E. M.; López-Diego, D.; Luna, M.; González-de-Rivera, G.; García-Mendiola, T.; Lorenzo, E. Multiplex Portable Biosensor for Bacteria Detection. *Biosensors* **2023**, *13* (11). <https://doi.org/10.3390/bios13110958>.
- (137) Pereira, P. E. dos S. Evaluate the use of retail food waste for the production of *Chlorella vulgaris*. Relatório de Estágio, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 2023.
- (138) Hussen, S. N. da F. Produção, Extração e Caracterização Parcial de Compostos Bioativos de *Chlorella Vulgaris* e de *Tetraselmis Chuii*, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Lisboa, 2021.
- (139) Ferreira, A. S.; Pereira, L.; Canfora, F.; Silva, T. H.; Coimbra, M. A.; Nunes, C. Stabilization of Natural Pigments in Ethanolic Solutions for Food Applications: The Case

-
- Study of *Chlorella Vulgaris*. *Molecules* **2023**, *28* (1).
<https://doi.org/10.3390/molecules28010408>.
- (140) Metsoviti, M. N.; Katsoulas, N.; Karapanagiotidis, I. T.; Papapolymerou, G. Effect of Nitrogen Concentration, Two-Stage and Prolonged Cultivation on Growth Rate, Lipid and Protein Content of *Chlorella Vulgaris*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2019**, *94* (5), 1466–1473. <https://doi.org/10.1002/jctb.5899>.
- (141) Sánchez-Bayo, A.; Morales, V.; Rodríguez, R.; Vicente, G.; Bautista, L. F. Cultivation of Microalgae and Cyanobacteria: Effect of Operating Conditions on Growth and Biomass Composition. *Molecules* **2020**, *25* (12). <https://doi.org/10.3390/molecules25122834>.
- (142) Schulze, C.; Wetzel, M.; Reinhardt, J.; Schmidt, M.; Felten, L.; Mundt, S. Screening of Microalgae for Primary Metabolites Including β -Glucans and the Influence of Nitrate Starvation and Irradiance on β -Glucan Production. *Journal of Applied Phycology* **2016**, *28* (5), 2719–2725. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0812-9>.
- (143) El-Sayed, A. E. K. B.; Reda, M. M.; Almutairi, A. W.; Mavromatis, C. Biomass Production and Biochemical Composition of *Chlorella Vulgaris* Grown in Net-House Photobioreactor (NHPBR) Using Sugarcane Press Mud Waste. *Journal of Taibah University for Science* **2023**, *17* (1). <https://doi.org/10.1080/16583655.2023.2194843>.
- (144) Liu, F.; Chen, H.; Qin, L.; Al-Haimi, A. A. N. M.; Xu, J.; Zhou, W.; Zhu, S.; Wang, Z. Effect and Characterization of Polysaccharides Extracted from *Chlorella Sp.* by Hot-Water and Alkali Extraction Methods. *Algal Research* **2023**, *70*. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.102970>.
- (145) Yan, X. Short-Chain Polysaccharide Analysis in Ethanol-Water Solutions. *Journal of AOAC International* **2017**, *100* (4), 1134–1136. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0426>.
- (146) Jui, T. J.; Tasnim, A.; Islam, S. M. R.; Manjur, O. H. B.; Hossain, M. S.; Tasnim, N.; Karmakar, D.; Hasan, M. R.; Karim, M. R. Optimal Growth Conditions to Enhance *Chlorella Vulgaris* Biomass Production in Indoor Phyto Tank and Quality Assessment of Feed and Culture Stock. *Heliyon* **2024**, *10* (11). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e31900>.
- (147) 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 and Chemical Toxicology* **2012**, *50* (5), 1201–1207. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.013>.
- (148) Yeh, J. Y.; Hsieh, L. H.; Wu, K. T.; Tsai, C. F. Antioxidant Properties and Antioxidant Compounds of Various Extracts from the Edible Basidiomycete *Grifola Frondosa* (Maitake). *Molecules* **2011**, *16* (4), 3197–3211. <https://doi.org/10.3390/molecules16043197>.
- (149) Goiris, K.; Muylaert, K.; Fraeye, I.; Foubert, I.; Brabanter, J. D.; Cooman, L. D. Antioxidant Potential of Microalgae in Relation to Their Phenolic and Carotenoid Content.

Journal of Applied Phycology **2012**, 24 (6), 1477–1486. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9804-6>.

- (150) El-fayoumy, E. A.; Shanab, S. M. M.; Shalaby, E. A. Metabolomics and Biological Activities of *Chlorella Vulgaris* Grown under Modified Growth Medium (BG11) Composition. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences* **2020**, 19 (1), 91–123. <https://doi.org/10.12982/CMUJNS.2020.0007>.
- (151) Gauthier, M. R.; Senhorinho, G. N. A.; Scott, J. A. Microalgae under Environmental Stress as a Source of Antioxidants. *Algal Research* **2020**, 52, 102104. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102104>.
- (152) Song, Y.; Zhu, S.; Zhang, S.; Fu, Y.; Wang, L.; Zhao, X.; Yang, B. Investigation from Chemical Structure to Photoluminescent Mechanism: A Type of Carbon Dots from the Pyrolysis of Citric Acid and an Amine. *Journal of Materials Chemistry C* **2015**, 3 (23), 5976–5984. <https://doi.org/10.1039/c5tc00813a>.
- (153) Quaid, T.; Ghalandari, V.; Reza, T. Effect of Synthesis Process, Synthesis Temperature, and Reaction Time on Chemical, Morphological, and Quantum Properties of Carbon Dots Derived from Loblolly Pine. *Biomass (Switzerland)* **2022**, 2 (4), 250–263. <https://doi.org/10.3390/biomass2040017>.
- (154) 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. *Journal of Optics (United Kingdom)* **2022**, 24 (4). <https://doi.org/10.1088/2040-8986/ac4da9>.
- (155) 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. *Angewandte Chemie* **2013**, 125 (14), 4045–4049. <https://doi.org/10.1002/ange.201300519>.
- (156) Gaohua, L.; Miao, X.; Dou, L. Crosstalk of Physiological pH and Chemical pKa under the Umbrella of Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Drug Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* **2021**, 17 (9), 1103–1124. <https://doi.org/10.1080/17425255.2021.1951223>.
- (157) Hockett, K. L.; Baltrus, D. A. Use of the Soft-Agar Overlay Technique to Screen for Bacterially Produced Inhibitory Compounds. *Journal of Visualized Experiments* **2017**, 2017 (119). <https://doi.org/10.3791/55064>.
- (158) Hudzicki, J. *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*; 2009. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:125831583>.
- (159) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2021, 41, 316.
- (160) Ye, Z.; Li, G.; Lei, J.; Liu, M.; Jin, Y.; Li, B. One-Step and One-Precursor Hydrothermal Synthesis of Carbon Dots with Superior Antibacterial Activity. *ACS Applied Bio Materials* **2020**, 3 (10), 7095–7102. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00923>.

-
- (161) Sun, B.; Wu, F.; Zhang, Q.; Chu, X.; Wang, Z.; Huang, X.; Li, J.; Yao, C.; Zhou, N.; Shen, J. Insight into the Effect of Particle Size Distribution Differences on the Antibacterial Activity of Carbon Dots. *Journal of Colloid and Interface Science* **2021**, *584*, 505–519. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.10.015>.
- (162) ISO 10993-5:2009. Biological Evaluation of Medical Devices- Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity, 2009.
- (163) Wu, Q.; Li, W.; Wu, P.; Li, J.; Liu, S.; Jin, C.; Zhan, X. Effect of Reaction Temperature on Properties of Carbon Nanodots and Their Visible-Light Photocatalytic Degradation of Tetracycline. *RSC Advances* **2015**, *5* (92), 75711–75721. <https://doi.org/10.1039/c5ra16080d>.
- (164) 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). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02940>.
- (165) Wang, L.; Li, B.; Xu, F.; Li, Y.; Xu, Z.; Wei, D.; Feng, Y.; Wang, Y.; Jia, D.; Zhou, Y. Visual in Vivo Degradation of Injectable Hydrogel by Real-Time and Non-Invasive Tracking Using Carbon Nanodots as Fluorescent Indicator. *Biomaterials* **2017**, *145*, 192–206. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.08.039>.
- (166) Bao, L.; Liu, C.; Zhang, Z. L.; Pang, D. W. Photoluminescence-Tunable Carbon Nanodots: Surface-State Energy-Gap Tuning. *Advanced Materials* **2015**, *27* (10), 1663–1667. <https://doi.org/10.1002/adma.201405070>.
- (167) Murugesan, B.; Sonamuthu, J.; Pandiyan, N.; Pandi, B.; Samayanan, S.; Mahalingam, S. Photoluminescent Reduced Graphene Oxide Quantum Dots from Latex of *Calotropis Gigantea* for Metal Sensing, Radical Scavenging, Cytotoxicity, and Bioimaging in *Artemia Salina*: A Greener Route. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2018**, *178*, 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.11.031>.
- (168) Liu, Z.; Li, R.; Li, Y.; Zhou, J.; Gong, Y.; Shi, H.; Guo, Y.; Li, H.; Wang, Z.; Zhang, F. Fluorescent N-Functionalized Carbon Nanodots from Carboxymethylcellulose for Sensing of High-Valence Metal Ions and Cell Imaging. *RSC Advances* **2021**, *11* (55), 34898–34907. <https://doi.org/10.1039/d1ra04972k>.
- (169) Havrdová, M.; Urbančíč, I.; Tománková, K. B.; Malina, L.; Štrancar, J.; Bourlinos, A. B. Self-targeting of Carbon Dots into the Cell Nucleus: Diverse Mechanisms of Toxicity in NIH/3T3 and L929 Cells. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22* (11). <https://doi.org/10.3390/ijms22115608>.
- (170) Melhuish, W. H. Quantum Efficiencies of Fluorescence of Organic Substances: Effect of Solvent and Concentration of the Fluorescent Solute. *The Journal of Physical Chemistry* **1961**, *65* (2), 229–235. <https://doi.org/10.1021/j100820a009>.

-
- (171) Limited, H. U. A Guide to Recording Fluorescence Quantum Yields, 2018. https://static.horiba.com/fileadmin/Horiba/Application/Materials/Material_Research/Quantum_Dots/quantumyieldstrad.pdf.
- (172) Canabady-Rochelle, L. L. S.; Harscoat-Schiavo, C.; Kessler, V.; Aymes, A.; Fournier, F.; Girardet, J. M. Determination of Reducing Power and Metal Chelating Ability of Antioxidant Peptides: Revisited Methods. *Food Chemistry* **2015**, *183*, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.147>.
- (173) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 2018, *38*, 92.
- (174) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* **1983**, *65* (1), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- (175) Meyer, B. N.; Ferrigni, N. A.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; Mclaughlin, J. L. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **1982**, *45*, 31–34.
- (176) Manjili, H. K.; Jafari, H.; Ramazani, A.; Davoudi, N. Anti-Leishmanial and Toxicity Activities of Some Selected Iranian Medicinal Plants. *Parasitology Research* **2012**, *111* (5), 2115–2121. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3059-7>.