



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE FÍSICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA**

**MANUELA OLIVEIRA DE CASTRO**

**MICRO E NANOPARTÍCULAS DE CARBONO OBTIDAS POR  
CARBONIZAÇÃO HIDROTÉRMICA: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E  
INTERAÇÃO COM PROTEÍNA**

**FORTALEZA**

**2017**

MANUELA OLIVEIRA DE CASTRO

MICRO E NANOPARTÍCULAS DE CARBONO OBTIDAS POR CARBONIZAÇÃO  
HIDROTÉRMICA: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E INTERAÇÃO COM  
PROTEÍNA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Física. Área de concentração: Física da Matéria Condensada.

Orientador: Prof. Dr. Odair Pastor Ferreira.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- D32m de Castro, Manuela Oliveira de.  
Micro e nanopartículas de carbono obtidas por carbonização hidrotérmica : preparação, caracterização e interação com proteína / Manuela Oliveira de de Castro. – 2017.  
136 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Física , Fortaleza, 2017.  
Orientação: Prof. Dr. Odair Pastor Ferreira.
1. carbonização hidrotérmica. 2. carvão hidrotérmico. 3. nanopartículas de carbono. 4. imobilização de biomoléculas. 5. lectinas. I. Título.

CDD 530

---

MANUELA OLIVEIRA DE CASTRO

MICRO E NANOPARTÍCULAS DE CARBONO OBTIDAS POR CARBONIZAÇÃO  
HIDROTÉRMICA: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E INTERAÇÃO COM  
PROTEÍNA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Física. Área de concentração: Física da Matéria Condensada.

Aprovada em: 30/01/2017.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Odair Pastor Ferreira (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Amauri Jardim de Paula  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Antônio Gomes de Souza Filho  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Bartolomeu Cruz Viana Neto  
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

---

Prof. Dr. João Batista Cajazeiras  
Instituto Superior de Teologia Aplicada (INTA)

Aos meus pais, Célio e Josilene, e aos meus irmãos, Mirela, Victor e Jordano, por estarem sempre ao meu lado, apoiando-me e incentivando-me em todos os momentos de minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por todas as minhas conquistas.

Aos meus pais, Célio e Josilene, por todo amor, atenção, compreensão e orientação que sempre me proporcionaram.

Aos meus irmãos, Mirela, Victor e Jordano, pelo amor, amizade, companhia e momentos de descontração.

Ao meu orientador, Dr. Odair Pastor Ferreira, pelo auxílio, conhecimento, paciência, compreensão, amizade e orientação que me proporcionou desde o início desta jornada e por sempre primar por um ambiente de trabalho saudável.

Ao professor Dr. Antonio Gomes de Souza Filho, por todo auxílio, atenção, conhecimento, orientação e consideração a mim proporcionados desde a graduação.

Ao professor Dr. Josué Mendes Filho, pelo auxílio, orientação e ensinamentos.

A todos que fazem o Laboratório de Materiais Funcionais Avançados – LaMFA pelo auxílio, discussões, amizade e momentos de descontração, em especial à Leila Conegero, Laís, Fernanda, Holanda, Thaiz e Cláudio pelo auxílio com os experimentos e medidas.

Aos professores Dra. Kyria Santiago e Dr. Benildo Cavada por me receberem no Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas - Biomol Lab, no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, e pelo fornecimento da lectina ConBr e de outros subsídios necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

À Mayara Santiago, por todo auxílio, discussões, paciência e disponibilidade para a realização de experimentos e discussões decisivas para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais integrantes do Biomol Lab, em especial, Vanir Reis e Vinícius Osterne, pelo auxílio, discussões e acolhimento.

A todos os professores, dos períodos de graduação, mestrado e doutorado, que com dedicação, inteligência e brilhantismo souberam me conduzir no caminho do aperfeiçoamento acadêmico e à consequente conquista desta vitória.

A todos os meus colegas de curso, em especial, ao Carlos, pelas medidas de Microscopia de Força Atômica, à Nádia, pela paciência em me treinar e tirar inúmeras dúvidas sobre o Nanolog; à Janete, Katiane, Gustavo, Valdenir, Rafael Alencar, Rocieler, entre outros, pela companhia, descontração, discussões, e disposição para auxiliar sempre que necessário.

Aos antigos integrantes da sala 8, Raffael, Wanessa e Manoel, que me receberam muito bem, e aos mais recentes, Bruno, Gelson e Keilla, por todos me auxiliarem sempre que precisei e me proporcionarem bons momentos de descontração.

Ao Alvernes Cruz, pelas medidas de Espectroscopia de Fotoluminescência.

À Dra. Luciana Magalhães, pelas medidas de Microscopia de Força Atômica.

À Dra. Larissa Otubo, do Laboratório de Microscopia e Microanálise do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN, pelas imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Aos professores Dra. Márcia Bisinotti e Dr. Altair B. Moreira e a Dra. Camila Melo, do Laboratório de Estudos em Ciências Ambientais – LECA, no Departamento de Química e Ciências Ambientais da Universidade Estadual de São Paulo – São José do Rio Preto, pelas medidas de análise elementar CHNS.

Ao Dr. Emílio de Castro Miguel, da Central Analítica da Universidade Federal do Ceará, pelas medidas de Microscopia de Varredura Laser Confocal, pelo auxílio com os testes de toxicidade em artêmias e pelas discussões.

Aos integrantes da secretaria e coordenação da pós-graduação do Departamento de Física, em especial, à Creuza, Rejane Ramos e Ana Cleide Ferreira, pela paciência, compreensão, profissionalismo e assistência a mim dispensados.

Enfim, a todos àqueles que contribuíram direta ou indiretamente para o meu desenvolvimento e sucesso acadêmico.

À Central Analítica da Universidade Federal do Ceará, pela disponibilização de infraestrutura para a realização das imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia de Varredura Laser Confocal.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE, pela disponibilização de infraestrutura para a realização de algumas das imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura e de Transmissão utilizadas nesta Tese.

Ao Laboratório de Bioinorgânica, no Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará, pela disponibilização de infraestrutura para medidas de Espectroscopia de Fotoluminescência.

Ao Laboratório de Espectroscopia Vibracional e Molecular – LEVM, no Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará, pela disponibilização de infraestrutura para medidas de Espectroscopia no Infravermelho e Espectroscopia de Absorção na região do Ultravioleta/Visível.

Ao Laboratório de Microscopia Avançada – LMA, no Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará, pela disponibilização de infraestrutura para medidas de Microscopia de Força Atômica.

À CAPES pelo apoio financeiro.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento,  
mais evidente fica a nossa ignorância”

(John F. Kennedy)

## RESUMO

Materiais carbonáceos são atrativos devido à versatilidade e abundância do elemento carbono, características que possibilitam o desenvolvimento de novas estruturas, por diversas metodologias de preparação, dotadas de propriedades físico-químicas variadas e que, deste modo, oferecem possibilidades de aplicação em diversos ramos da ciência e da tecnologia. Dentre estas técnicas de preparação, a carbonização hidrotérmica tem se destacado por possibilitar a obtenção de micro e nanoestruturas carbonáceas de forma sustentável e rápida, através do uso de biomassa, resíduos de biomassa e carboidratos como precursores, sem o uso de reagentes tóxicos. Tal fato torna os materiais carbonáceos produzidos por esta metodologia alternativas potenciais para aplicações biológicas como, por exemplo, para o desenvolvimento de biodispositivos e suporte para biocatalisadores. Nesta Tese, micro e nanopartículas de carbono foram preparadas por carbonização hidrotérmica de glicose, caracterizadas físico-quimicamente e submetidas à interação com a lectina ConBr, por meio de metodologias covalente e não covalente, a fim de verificar a possibilidade de utilização destes materiais como suporte para a biomolécula. A lectina ConBr é uma proteína vegetal que possui a capacidade de aglutinar eritrócitos. Após as preparações, as micropartículas foram submetidas à lavagem com água e secagem em estufa, enquanto as nanopartículas foram purificadas por diálise. As análises realizadas indicaram que as micropartículas são constituídas por esferas individualizadas e coalescidas, dotadas de potencial zeta negativo, diâmetro hidrodinâmico médio de, aproximadamente, 1  $\mu\text{m}$ , compostas por carbono, hidrogênio e oxigênio. As nanopartículas, obtidas utilizando diferentes parâmetros reacionais, apresentam-se em aglomerados nanométricos com diferentes diâmetros hidrodinâmicos e potencial zeta negativo. Dependendo dos referidos parâmetros, as nanopartículas apresentam fotoluminescência na região do visível e suspensões aquosas sem precipitação ou turbidez por, pelo menos, dois meses. Aquelas com diâmetro hidrodinâmico médio em torno de 30 nm mostraram-se estáveis sob variação de pH entre 4,35 e 9,44 e nas soluções salinas tampão fosfato (PBS) e NaCl 0,9%. Ambos os materiais foram submetidos à interação com a lectina ConBr por reação de amidação com auxílio de carbodiimida e por adsorção. Os resultados obtidos, tanto para os conjugados com micropartículas quanto para aqueles com nanopartículas, indicaram que foi possível imobilizar a lectina nas partículas de modo que esta mantivesse sua atividade biológica de aglutinação de eritrócitos.

Palavras-chave: carvão hidrotérmico, carbonização hidrotérmica, lectina ConBr, amidação, adsorção, hemaglutinação, C-dots, nanopartículas de carbono, fotoluminescência.

## ABSTRACT

Carbonaceous materials are attractive due to the versatility and abundance of the carbon element, characteristics that enable the development of new structures, by different preparation methods, with a manifold of physicochemical properties. In this way, this type of material could offer possibilities of application in different branches science and technology. Among the preparation techniques, hydrothermal carbonization has been outstanding on the attainment of carbonaceous micro and nanostructures in a sustainable and fast way, through the use of biomass, biomass residues and carbohydrates as precursors, without toxic reagents. This makes carbonaceous materials produced by this methodology potential alternative for biological applications such as development of biodevices and support for biocatalysts. In this thesis, carbon micro and nanoparticles were prepared by hydrothermal carbonization of glucose, physically and chemically characterized and their use as support for ConBr lectin was evaluated using covalent and non-covalent methodologies. ConBr lectin is a plant protein that has the ability to agglutinate erythrocytes. After the preparations, the microparticles were washed with deionized water and dried in an oven, while the nanoparticles were purified by dialysis. The analyses performed indicated that the microparticles were formed by individualized and coalesced spheres with negative zeta potential, average hydrodynamic diameter of approximately 1  $\mu\text{m}$  and were composed of carbon, hydrogen and oxygen. The nanoparticles, obtained using different reaction parameters, appeared as nanometric agglomerates with different hydrodynamic diameters and negative zeta potential. Depending on these parameters, the nanoparticles had photoluminescence in the visible region and aqueous suspensions without precipitation or turbidity for at least two months. Those with a mean hydrodynamic diameter around 30 nm were stable under pH variation between 4,35 and 9,44 and in saline solutions phosphate buffer (PBS) and NaCl 0,9%. Both materials were subjected to interaction with ConBr lectin by amidation reaction with the aid of carbodiimide and by adsorption. The results obtained for both the microparticle and nanoparticle conjugates indicated that it was possible to immobilize the lectin in the particles so that it maintained its biological activity of erythrocyte's agglutination.

Keywords: hydrochar, hydrothermal carbonization, ConBr lectin, amidation, adsorption, hemagglutination, C-dots, carbon nanoparticles, photoluminescence.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Imagem ilustrando que carboidratos e diferentes tipos de biomassa podem ser utilizados como precursores de carbono para a obtenção de materiais carbonáceos nanoestruturados e materiais híbridos por carbonização hidrotérmica..... 29
- Figura 2 – Representação esquemática da estrutura cíclica de alguns monossacarídeos, dissacarídeos e trissacarídeo..... 32
- Figura 3 – Esquema representativo do mecanismo de formação do material carbonáceo obtido através da carbonização hidrotérmica de sacarose..... 36
- Figura 4 – (a) Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) de microesfera de carbono obtida pela carbonização hidrotérmica de amido. (b) Representação esquemática da estrutura casca-carço (*core-shell*) de microesferas obtidas pela carbonização de sacarídeos..... 37
- Figura 5 – Modelos propostos para a estrutura do carbono hidrotérmico..... 38
- Figura 6 – Imagens SEM de (i) micropartículas de carbono obtidas por HTC de (a) sacarose, (b) glicose, (c) glicose e ácido acrílico, (d) amido e íons ferro; (ii) compósito carbono/SiO<sub>2</sub> obtido por HTC de amilose na presença tetraetilortosilicato nas razões mássicas (a) 1/1 e (b) 1/2,5..... 39
- Figura 7 – (i) Esquema da preparação de NPCs a partir da carbonização hidrotérmica de celulose e ciclodextrina. (ii) Imagens TEM e os respectivos histogramas de distribuição de tamanho das NPCs fluorescentes preparadas de (a) celulose e (b) ciclodextrina. (iii) Espectros FTIR das NPCs obtidas por HTC de celulose (Cel-NPCs) e ciclodextrina (Cic-NPCs). (iv) Espectros de Absorção na região do Ultravioleta/Visível (UV/Vis) e de emissão de fluorescência de NPCs provenientes de (a) celulose e (b) ciclodextrina em água. (v) Imagens de células de melanoma de ratos incubadas com NPCs provenientes de celulose durante 5 h, utilizando filtros de excitação nos comprimentos de onda (a) 330-380 nm, (b) 450-490 nm e (c) 510-560 nm..... 42
- Figura 8 – Estratégias de imobilização de enzimas em nanotubos de carbono de paredes simples (SWCNTs). (a) ligação covalente via acoplamento amida

	com grupos ácidos carboxílicos de nanotubos oxidados; (b, e) imobilização via interações sobre nanotubos funcionalizados com diferentes moléculas ligantes; (c) adsorção de enzimas em nanotubos via interações eletrostáticas e hidrofóbicas; (d) aprisionamento de enzimas em matriz polimérica formada em torno dos nanotubos.....	46
Figura 9	– Esquema da reação de amidação por carbodiimida (EDC). As substâncias (1) e (2) podem ser peptídeos, proteínas ou qualquer espécie química que tenha grupos carboxilato e aminas primárias. Quando são peptídeos ou proteínas, essas moléculas são dezenas a milhares de vezes maiores que o agente de acoplamento e a conjugação ocorre como no diagrama.....	49
Figura 10	– (a) Vagens e sementes de <i>Canavalia Brasiliensis</i> ou feijão bravo do Ceará. (b) Estrutura tridimensional do tetrâmero da lectina ConBr. As cores azul e vermelha destacam os aminoácidos lisina e arginina, respectivamente, na estrutura da lectina.....	51
Figura 11	– Preparação de micro e nanopartículas de carbono por carbonização hidrotérmica de glicose. (a) Reator de aço inox (autoclave) e copo de Teflon e (b) Forno mufla utilizado para as preparações; (c) Aspecto da amostra obtida por carbonização hidrotérmica de 4,0000 g de glicose à 180 °C, durante 24 h, logo após a abertura do reator. É possível verificar que a amostra é constituída por materiais em fases (d) coloidal (nanopartículas de carbono) e (e) sólida (micropartículas de carbono).....	55
Figura 12	– Separação das fases da amostra obtida por carbonização hidrotérmica de 4,0000 g de glicose à 180 °C, por 24 h. (a) Sistema de filtração à vácuo no momento da filtração. (b) Micropartículas de carbono (c) Nanopartículas de carbono coloidais.....	56
Figura 13	– Lavagem das micropartículas de carbono obtidas por carbonização hidrotérmica de 4,0000 g de glicose à 180 °C, por 24 h, utilizando água ultra-pura no mesmo sistema em que a amostra “como sintetizada” fora filtrada. (a) Início da lavagem: filtrado de cor amarela e com pH ácido, indicativos da presença de resíduos de carbonização. (b) Fim da lavagem: filtrado incolor e com pH entre 6,00 e 7,00.....	56
Figura 14	– Purificação das nanopartículas de carbono por diálise. (a) Aparato utilizado para realizar os procedimentos de diálise. Após adicionar a amostra	

	na membrana, esta foi inserida em béquer com água ultrapura e o procedimento ocorreu sob agitação branda, com auxílio de agitador magnético. (b) Imagem mais detalhada da amostra dentro da membrana fechada nas duas extremidades por prendedores de Nylon®.....	57
Figura 15	– Cadinhos de platina utilizados para o procedimento de determinação de teor de sólidos solúveis.....	58
Figura 16	– Imagens SEM (a, b, c) e TEM (d, e) para as micropartículas de carbono geradas pela carbonização hidrotérmica de 4,0000 de glicose por 24 h a 180 °C.....	72
Figura 17	– Estimativas dos diâmetros das MPCs (a) por DLS e (b) por imagem SEM. Carbonização hidrotérmica realizada com 4,0000 g de glicose a 180 °C por 24 h.....	73
Figura 18	– Imagens SEM dos sistemas (a, b) MPCs-ConBr e (c, d) MPCs+ ConBr.....	79
Figura 19	– (a) Espectros FTIR da (ai) lectina ConBr; (aii) MPCs; (aiii) tampão MES, (aiv) MPCs-ConBr e (av) MPCs+ConBr. (b) A região contornada pelo tracejado vermelho em (a) é destacada e aumentada para melhor visualização das bandas na região de 1800-1480 cm <sup>-1</sup> .....	81
Figura 20	– Deconvolução das bandas na região entre 1780-1480 cm <sup>-1</sup> dos espectros FTIR das amostras (a) MPCs; (b) ConBr; (c) MPCs-ConBr e (d) MPCs+ ConBr.....	81
Figura 21	– Imagens obtidas por Microscopia de Varredura Laser Confocal. (a) Tampão MES 0,10 mol/L pH 5,47; (b) MPCs + Tampão MES 0,10 mol/L pH 5,47; (c) ConBr-FITC + Tampão MES 0,10 mol/L pH 5,47; (d) MPCs+ ConBr-FITC + Tampão MES 0,10 mol/L pH 5,47.....	87
Figura 22	– Imagens de Microscopia Óptica obtidas nos ensaios de atividade hemaglutinante e inibição. (a) Tampão TRIS + eritrócitos de coelho tratados com tripsina; (b) Tampão MES 0,050 mol/L + eritrócitos de coelho tratados com tripsina (c) Tampão TRIS + MPCs + eritrócitos de coelho tratados com tripsina; (d, e) Tampão TRIS + ConBr + eritrócitos de coelho tratados com tripsina; (f) Controle das MPCs e da lectina ConBr misturados; (g, h) Tampão TRIS + amostra MPCs-ConBr + eritrócitos de coelho tratados com tripsina; (i) Tampão TRIS + amostra MPCs-ConBr + MaM + eritrócitos de coelho tratados com tripsina; (j, k) Tampão TRIS +	

	amostra MPCs + ConBr + eritrócitos de coelho tratados com tripsina; (l) Tampão TRIS + amostra MPCs + ConBr + MaM + eritrócitos de coelho tratados com tripsina.....	88
Figura 23	– Suspensões coloidais (Amostras) obtidas através da carbonização hidrotérmica, utilizando diferentes tempos de reação e massas de glicose. (a) Amostra I; (b) Amostra II; (c) Amostra III; (d) Amostra IV; (e) Amostra V e (f) Amostra VI.....	90
Figura 24	– (a) Espectros UV/Vis das Amostras I, II, III, V e VI diluídas em água ultrapura. (b) Espectros UV/Vis de ácido levulínico (LA) e HMF em solução com diferentes concentrações.....	92
Figura 25	– Cadinhos de platina com a Amostra PII (à esquerda) e Amostra II (à direita), logo após o término do procedimento de determinação do teor de sólidos solúveis.....	93
Figura 26	– Histogramas de porcentagem em número de partículas por distribuição de diâmetro hidrodinâmico obtidos para as Amostras (a) I, (b) II, (c) III, (d) IV, (e) V e (f) VI por análise de DLS. Detalhes em (e) e (f): histograma com eixo referente ao diâmetro hidrodinâmico com maior incremento para melhor visualização.....	94
Figura 27	– (a) Espectros UV/Vis obtidos para as alíquotas do líquido externo à membrana em cada troca de água realizada durante o processo de purificação por diálise da Amostra I e para a amostra ao fim do processo (Amostra purificada). Os espectros obtidos para as alíquotas 4 e 5 são mostrados em escala aumentada para melhor visualização. As fotografias mostram alíquotas da Amostra I (esquerda) e da Amostra PI (direita). (b) Espectros UV/VIS obtidos para as Amostras PI, PII, PIII, PV e PVI. Os espectros obtidos para as Amostras PV e PVI são mostrados em escala aumentada para melhor visualização.....	97
Figura 28	– Imagens TEM das Amostras (a) V, (b, c) PV, (d-f) PI, (g-i) PII, (j-l) PIII e histogramas obtidos por análises de DLS das Amostras (m) PI, (n) PII, (o) PIII, (p) PIV, (q) PV e (r) PVI.....	98
Figura 29	– Imagens AFM da Amostra PI. (a, b) Imagens topográficas. (c, d) Imagens de contraste de fase.....	100

Figura 30 –	Imagens AFM da Amostra PV. (a, b, e) Imagens feitas por análise de topografia. (c, f) Imagens feitas por análise de contraste de fase. (d) Histograma obtido a partir da análise estatística das NPCs mostradas na imagem (a).....	101
Figura 31 –	Espectros de emissão de fotoluminescência obtidos para (a) Amostra I, (b) Amostra PI, (c) Amostra V, (d) Amostra PV, (e) Amostra VI e (f) Amostra PVI. Detalhe em (a) imagem da Amostra I sob luz ambiente. Detalhe em (b) Amostra PI sob luz ambiente, à esquerda e sob luz negra (365 nm), à direita.....	103
Figura 32 –	Espectros de emissão de fotoluminescência obtidos para a Amostra PV quando em pH 5,11 (seu pH após a purificação) e em pH 7,03 (ajustado com solução de NaOH 0,010 mol/L).....	105
Figura 33 –	Fotografias mostrando a evolução das Amostras (I a VI) em função do tempo de acondicionamento em condição ambiente do Laboratório.....	106
Figura 34 –	(a) Gráfico do diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta em função do pH da Amostra PV. O aumento de pH foi promovido com a adição de solução de NaOH 0,25 mol/L. (b) Histogramas referentes às distribuições de diâmetros hidrodinâmicos das NPCs na Amostra PV nos pHs inicial (4,35) e final (9,44) da titulação.....	107
Figura 35 –	Fotografias de alíquotas das soluções NaCl (1,8%) e tampão fosfato salino (PBS), da Amostra PV e das dispersões desta amostra nestes meios salinos (Amostra PV + NaCl 0,9% e Amostra PV + PBS) em função do tempo de acondicionamento nas condições ambiente do Laboratório.....	109
Figura 36 –	Histograma comparativo referente às faixas de distribuições de diâmetro hidrodinâmico por número de partículas para a Amostra PV, após 48 h sob as temperaturas 50 °C, 4 °C, e temperatura ambiente (23 °C). As fotografias mostram a Amostra PV (a, b) sob temperatura ambiente, (c) após 48 h a 4 °C e (d) após 48 h a 50 °C.....	112
Figura 37 –	Imagens de Microscopia Óptica de náuplios de <i>Artemia salina</i> em (a) controle negativo, (b) ensaio de toxicidade com a maior concentração da Amostra II, (c) ensaio de toxicidade com a menor concentração da Amostra II, (d) ensaio de toxicidade com a maior concentração da Amostra PII e (e) ensaio de toxicidade com a menor concentração da Amostra PII.	

	Imagens SEM de guelras de náuplios de <i>Artemia salina</i> em (f) controle negativo, (g) ensaio de toxicidade com a maior concentração da Amostra II, (h) ensaio de toxicidade com a menor concentração da Amostra II, (i) ensaio de toxicidade com a maior concentração da Amostra PII, (j) ensaio de toxicidade com a menor concentração da Amostra PII. Imagens SEM de abdomens de náuplios de <i>Artemia salina</i> em (k) controle negativo, (l) ensaio de toxicidade com a maior concentração da Amostra II, (m) ensaio de toxicidade com a menor concentração da Amostra II, (n) ensaio de toxicidade com a maior concentração da Amostra PII e (o) ensaio de toxicidade com a menor concentração da Amostra PII.....	114
Figura 38	– Representação esquemática das principais etapas do procedimento realizado para promover a interação covalente entre as NPCs e a lectina ConBr.....	115
Figura 39	– Resultados obtidos por análise de AFM da lectina ConBr. (a, b) Imagens de topografia, (c) Perfil de altura do espécime mostrado em (b), (d, e) Imagens de fase.....	116
Figura 40	– Imagens AFM dos conjugados NPCs-ConBr(I) e NPCs-ConBr(II). (a, b) Imagens de topografia do conjugado NPCs-ConBr(I); (c) Perfil de altura da imagem topográfica (b); (d) Imagem de topografia do conjugado NPCs-ConBr(II); (e, f) Imagens de contraste de fase do conjugado NPCs-ConBr(II).....	117
Figura 41	– Imagens AFM do conjugado NPCs+ConBr. (a) Imagem de topografia, (b) Imagem de fase.....	118
Figura 42	– Imagens de Microscopia Óptica obtidas utilizando microscópio estereoscópio para avaliação da atividade hemaglutinante da lectina ConBr quando conjugada às NPCs purificadas. As imagens mostram os poços das microplacas onde foram realizados os ensaios com os controles (tampão TRIS + eritrócitos) e com as menores diluições da solução de lectina ConBr e das dispersões das amostras de NPCs não purificadas (Amostra V), NPCs purificadas (Amostra PV) e dos conjugados NPCs-ConBr e NPCs+ConBr (tampão TRIS + amostra + eritrócitos).....	119
Figura 43	– Imagens de Microscopia Óptica obtidas utilizando microscópio estereoscópio para avaliação da inibição da atividade hemaglutinante da lectina	

ConBr na amostra NPCs-ConBr (I) pela ação do açúcar MaM e nas amostras com NPCs não purificadas (Amostra V), NPCs purificadas (Amostra PV) e na amostra NPCs-ConBr (II) por aquecimento a 100 °C. As imagens mostram os poços das microplacas onde foram realizados os ensaios..... 122

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Digrama de fase da água, onde se destaca a região apresentando as condições de temperatura e pressão da água que favorecem a síntese de materiais carbonáceos sólidos por carbonização hidrotérmica..... 30
- Gráfico 2 – Espectros FTIR de micropartículas de carbono obtidas utilizando 4,0000 gramas de glicose para carbonização hidrotérmica à 180 °C, em diferentes tempos reacionais (a) 12 h; (b) 24 h e (c) 48 h..... 71
- Gráfico 3 – Espectros FTIR (a) da glicose e (b) das MPCs, com algumas atribuições tentativa em destaque. Carbonização hidrotérmica realizada com 4,0000 g de glicose a 180 °C por 24 h..... 76
- Gráfico 4 – Deconvolução das bandas na região 1800-1500 cm<sup>-1</sup> do espectro FTIR das MPCs. Carbonização hidrotérmica realizada com 4,0000 g de glicose a 180 °C por 24 h..... 77
- Gráfico 5 – Difratoograma de raios-X obtido para as MPCs provenientes de glicose. Reação de carbonização hidrotérmica realizada com 4,0000 g de glicose a 180 °C por 24 h..... 78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Exemplos de atividades biológicas determinadas para a lectina ConBr...	52
Tabela 2	– Relação de experimentos de carbonização hidrotérmica de glicose e as respectivas variações de parâmetros reacionais.....	55
Tabela 3	– Resultados obtidos através de análises por DLS (diâmetro hidrodinâmico médio e Pdl) e por ELS (potencial zeta) das MPCs provenientes da carbonização hidrotérmica de 4,0000 g de glicose a 180 °C por 24 h..	74
Tabela 4	– Teores de carbono (C), hidrogênio (H) e oxigênio (O) das MPCs e da glicose. Carbonização hidrotérmica realizada com 4,0000 g de glicose a 180 °C por 24 h.....	74
Tabela 5	– Discriminação e atribuições tentativas das bandas obtidas na deconvolução da região 1800-1500 cm <sup>-1</sup> do espectro FTIR das MPCs.....	77
Tabela 6	– Análise química elementar CHNS das partículas de carbono, da lectina ConBr, do tampão MES e dos sistemas MPCs-ConBr e MPCs+ConBr....	80
Tabela 7	– Atribuições tentativa para as componentes calculadas nas deconvoluções mostradas na Figura 20c e na Figura 20d.....	82
Tabela 8	– Diâmetro hidrodinâmico médio obtido por DLS, potencial zeta obtido por ELS e concentração das nanopartículas, obtidas por diferentes reações de carbonização hidrotérmica de glicose antes e depois da purificação por diálise.....	91
Tabela 9	– Faixas de distribuição de diâmetros hidrodinâmicos por número de partículas (D25, D50 e D90) obtidas para as Amostras I, II, III, IV, V e VI....	95
Tabela 10	– Faixas de distribuição de diâmetros hidrodinâmicos por número de partículas (D10, D60 e D90) para as Amostras PI, PII, PIII, PIV, PV e PVI...	99
Tabela 11	– Faixas de distribuição de diâmetros hidrodinâmicos por número de partículas (D25, D50, D95) para a Amostra PV nos pHs analisados durante a titulação.....	108
Tabela 12	– Diâmetros hidrodinâmicos médios e Pdl's obtidos por DLS para a Amostra PV pura e quando dispersa em soluções salinas de NaCl 0,9% e tampão fosfato salino (PBS) em função do tempo de acondicionamento nas condições ambiente do Laboratório.....	109

Tabela 13	– Faixas de distribuição de diâmetros hidrodinâmicos por número de partículas (D20, D60 e D90) para a Amostra PV quando em soluções salinas de NaCl 0,9% e tampão fosfato salino (PBS) em função do tempo de acondicionamento nas condições ambiente do Laboratório.....	110
Tabela 14	– Dados obtidos através de análises por DLS, ELS e pH da Amostra PV antes e após os ensaios de estabilidade acelerada.....	112
Tabela 15	– Faixas de distribuição de diâmetros hidrodinâmicos por número de partículas (D15, D65 e D95) para a Amostra PV antes e após os ensaios de estabilidade acelerada.....	112

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ConBr	<i>Canavalia Brasiliensis</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
HTC	Carbonização Hidrotérmica
C-dots	Pontos Quânticos de Carbono
HMF	Hidroximetilfurfural
MPCs	Micropartículas de Carbono
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
XPS	Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X
NMR	Espectrometria de Ressonância Nuclear Magnética
HCA	Hidroxicarbonato Apatita
NPCs	Nanopartículas de Carbono
UV/Vis	Espectroscopia de Absorção na região do Ultravioleta/Visível
$\lambda_{ex}$	Comprimento de Onda de Excitação
SWCNTs	Nanotubos de Carbono de Paredes Simples
EDAC/EDC	N-etil-N-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
DCC	N,N-diciclohexil-carbodiimida
NHS	N-hidroxisuccinimida
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
MWCO	<i>Molecular Weight Cutt-Off</i>
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
MaM	Metil- $\alpha$ -D-Manopiranosídeo
DRCs	Domínios de Reconhecimento de Carboidratos
TRIS	Tris-HCl 0,050 mol/L (pH 7,6), contendo NaCl 0,15 mol/L
ATR	Refletância Total Atenuada
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura
XRD	Difratometria de Raios-X
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
AFM	Microscopia de Força Atômica
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
ELS	Espalhamento de Luz Eletroforético

PL	Espectroscopia de Fotoluminescência
PdI	Índice de Polidispersividade
DH	Diâmetro Hidrodinâmico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>1.1</b>	<b>Carbonização hidrotérmica.....</b>	<b>27</b>
<b>1.2</b>	<b>Carbonização hidrotérmica de carboidratos.....</b>	<b>31</b>
<i>1.2.1</i>	<i>Carboidratos.....</i>	<i>31</i>
<i>1.2.2</i>	<i>Carboidratos como precursores para a carbonização hidrotérmica.....</i>	<i>33</i>
<i>1.2.3</i>	<i>Mecanismo de formação dos materiais carbonáceos obtidos por carbonização hidrotérmica de hexoses.....</i>	<i>34</i>
<b>1.3</b>	<b>Materiais carbonáceos obtidos por carbonização hidrotérmica de carboidratos: propriedades e aplicações.....</b>	<b>37</b>
<i>1.3.1</i>	<i>Micropartículas de carbono (carbono hidrotérmico).....</i>	<i>37</i>
<i>1.3.2</i>	<i>Nanopartículas de carbono.....</i>	<i>41</i>
<b>1.4</b>	<b>Imobilização de biomoléculas em materiais.....</b>	<b>45</b>
<i>1.4.1</i>	<i>Metodologias de imobilização covalente e não-covalente entre biomoléculas e materiais.....</i>	<i>48</i>
<b>1.5</b>	<b>Lectinas: A ConBr.....</b>	<b>50</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>53</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>53</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>53</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>54</b>
<b>3.1</b>	<b>Reagentes e materiais.....</b>	<b>54</b>
<b>3.2</b>	<b>Preparação das micro e nanopartículas de carbono.....</b>	<b>54</b>
<i>3.2.1</i>	<i>Preparação das micro e nanopartículas de carbono através da carbonização hidrotérmica de glicose.....</i>	<i>54</i>
<i>3.2.2</i>	<i>Micropartículas de carbono: lavagem e secagem.....</i>	<i>56</i>
<i>3.2.3</i>	<i>Nanopartículas de carbono: purificação por diálise.....</i>	<i>57</i>
<i>3.2.4</i>	<i>Determinação dos teores de sólidos dispersos nas suspensões coloidais de nanopartículas de carbono.....</i>	<i>58</i>
<i>3.2.5</i>	<i>Ensaio de estabilidade das suspensões coloidais de nanopartículas de carbono.....</i>	<i>59</i>
<b>3.3</b>	<b>Interações com a lectina ConBr.....</b>	<b>60</b>
<i>3.3.1</i>	<i>Extração e purificação da lectina ConBr.....</i>	<i>60</i>

3.3.2	<i>Preparação de lectina ConBr com isotiocianato de fluoresceína (FITC).....</i>	60
3.3.3	<i>Preparação dos reagentes e amostras para a imobilização da lectina ConBr.</i>	61
3.3.4	<i>Imobilização da lectina ConBr em micropartículas de carbono.....</i>	61
3.3.4.1	<i>Metodologia de interação covalente: amidação ativada por carbodiimida.....</i>	61
3.3.4.2	<i>Metodologia de interação não covalente: adsorção.....</i>	62
3.3.5	<i>Imobilização da lectina ConBr em nanopartículas de carbono.....</i>	63
3.3.5.1	<i>Metodologia de interação covalente: amidação ativada por carbodiimida.....</i>	63
3.3.5.2	<i>Metodologia de interação não covalente: adsorção.....</i>	63
3.4	<b>Ensaio para a avaliação da atividade hemaglutinante da lectina ConBr após as interações covalente e não covalente.....</b>	64
3.5	<b>Bioensaio com náuplios de <i>Artemia salina</i> para avaliação preliminar da toxicidade das nanopartículas de carbono.....</b>	65
3.6	<b>Caracterizações físico-químicas das micro e nanopartículas.....</b>	66
3.6.1	<i>Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....</i>	66
3.6.2	<i>Análise Elementar CHNS.....</i>	66
3.6.3	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM).....</i>	67
3.6.4	<i>Difratometria de raios-X (XRD).....</i>	67
3.6.5	<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....</i>	67
3.6.6	<i>Microscopia de Força Atômica (AFM).....</i>	68
3.6.7	<i>Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Espalhamento de Luz Eletroforético (ELS).....</i>	68
3.6.8	<i>Espectroscopia de Absorção na região do Ultravioleta/Visível (UV/Vis).....</i>	69
3.6.9	<i>Espectroscopia de Fotoluminescência (PL).....</i>	69
3.6.10	<i>Microscopia Óptica.....</i>	69
3.6.11	<i>Microscopia de Varredura Laser Confocal.....</i>	70
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	71
4.1	<b>Micropartículas de carbono.....</b>	71
4.1.1	<i>Propriedades físico-químicas.....</i>	71
4.2	<b>Sistemas micropartículas de carbono – lectina ConBr.....</b>	79
4.2.1	<i>Propriedades físico-químicas.....</i>	79
4.2.2	<i>Avaliação da atividade hemaglutinante da lectina.....</i>	87
4.3	<b>Nanopartículas de carbono.....</b>	89
4.3.1	<i>Propriedades físico-químicas.....</i>	89

4.3.1.1	<i>Efeitos da variação do tempo de reação.....</i>	91
4.3.1.2	<i>Efeitos da variação da massa de glicose.....</i>	95
4.3.1.3	<i>Efeitos da purificação por diálise.....</i>	96
<b>4.3.2</b>	<b><i>Fotoluminescência.....</i></b>	<b>102</b>
4.3.2.1	<i>Efeitos do processo de purificação na fotoluminescência das nanopartículas de carbono.....</i>	103
4.3.2.2	<i>Efeitos da variação do pH na fotoluminescência das nanopartículas de carbono.....</i>	104
<b>4.4</b>	<b>Estabilidade das nanopartículas de carbono.....</b>	<b>105</b>
4.4.1	<i>Efeitos da variação do pH.....</i>	107
4.4.2	<i>Nanopartículas de carbono em meio salino – soro fisiológico (NaCl 0,9%) e tampão fosfato salino (PBS).....</i>	108
4.4.3	<i>Efeitos da variação de temperatura.....</i>	111
<b>4.5</b>	<b>Toxicidade.....</b>	<b>113</b>
<b>4.6</b>	<b>Sistemas nanopartículas de carbono – ConBr.....</b>	<b>115</b>
4.6.1	<i>Propriedades físico-químicas.....</i>	115
4.6.2	<i>Avaliação da atividade da lectina.....</i>	118
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>124</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>127</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico sustentável é imprescindível para garantir a preservação do meio ambiente e, por conseguinte, a conservação dos recursos naturais e a qualidade de vida das pessoas, tanto para a geração atual quanto para as futuras. Desta forma, a busca por tecnologias “limpas”, que consumam o mínimo de energia, produzam a menor quantidade e tipos possíveis de resíduos e façam uso de recursos renováveis, torna-se primordial para contribuir com a redução dos impactos ambientais, uma vez que buscar soluções para os prejuízos finais causados por tecnologias já existentes constituem ações apenas paliativas.

A elaboração e a produção de novos materiais constituem um setor de destaque na ciência e tecnologia, uma vez que alicerçam pesquisa e desenvolvimento de produtos destinados a atender às demandas da sociedade nas mais diversas áreas do conhecimento. Desde a construção de um nanosensor até estruturas mais resistentes para um “arranha-céu”, por exemplo, vários fatores devem ser considerados. Dentre eles o custo-benefício da produção, o rendimento e a possibilidade da obtenção em larga escala dos materiais necessários, além da complexidade dos procedimentos realizados para gerar o produto final. Para alguns destes aspectos, apostar na sustentabilidade representa mais que preservação ambiental, tendo em vista que o uso de recursos naturais abundantes e renováveis, ou mesmo de resíduos, para a produção de materiais poderia representar redução ou solução de problemas de custo e rendimento e, dependendo do método de processamento, de dificuldades de escalonamento.

Materiais de carbono, sobretudo nanocarbonos (nanotubos, grafeno e pontos quânticos), são atrativos para ampla gama de aplicações devido à sua versatilidade e propriedades físico-químicas únicas (BAGHERI; JULKAPLI, 2016; HAN *et al.*, 2016; TITIRICI *et al.*, 2012). Além disso, o carbono é um elemento abundante na natureza, o que possibilita a elaboração de diferentes rotas para a síntese de materiais carbonáceos, utilizando diferentes matérias-primas. Dentre as rotas de síntese existentes, a carbonização hidrotérmica destaca-se por possibilitar a obtenção de materiais funcionais de carbono de forma ambientalmente adequada. Esta técnica possibilita a síntese de micro e nanomateriais de carbono a partir de biomassa, resíduos de biomassa e carboidratos, sem a necessidade do uso de reagentes tóxicos ou caros, ou de preparações elaboradas e dispendiosas dos precursores, com baixo consumo de energia e elevado potencial de escalonamento (HU *et al.*, 2010; TITIRICI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2012). Outra grande vantagem da metodologia é que os materiais gerados são intrinsecamente funcionais, isto é, apresentam grupos funcionais em sua superfície, não exigindo

tratamentos químicos ou físicos adicionais para torná-los reativos (HU *et al.*, 2010; TITIRICI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2012).

No caso do uso de carboidratos como precursores na carbonização hidrotérmica, dois tipos de materiais podem ser gerados, micro e nanopartículas esféricas de carbono. As micropartículas esféricas, denominadas na literatura como carbono hidrotérmico ou *hydrochar*, são obtidas na forma de pó, de cor marrom ou preta e sua porosidade e funcionalidade os tornam alvo de investigações para variadas aplicações, destacando-se nas áreas de remediação ambiental (purificação de água, captura de gás carbônico (CO<sub>2</sub>), armazenamento de energia, etc.) e catálise (HU *et al.*, 2010; TITIRICI *et al.*, 2012). Por outro lado, as nanopartículas de carbono, são obtidas dispersas no meio reacional, isto é, em fase coloidal. De modo geral, é descrito na literatura que tais nanopartículas apresentam fotoluminescência combinada à biocompatibilidade e baixa toxicidade, propriedades que as tornam promissoras para bioaplicações e alvo de estudos como o desenvolvimento de biossensores e marcadores fotoluminescentes para imageamento e diagnóstico, por exemplo (DING; ZHU; TIAN, 2014; LIM; SHEN; GAO, 2015; WANG; QIU, 2016; ZHAO *et al.*, 2015).

Muitas aplicações em biomedicina e biotecnologia tem a imobilização de biomoléculas (proteínas, fármacos, ácidos nucleicos, etc.) em suportes (filmes, partículas, polímeros, etc.) como etapa fundamental do processo, especialmente a elaboração de biossensores e biocatalisadores. Tal procedimento pode ser empregado na tentativa de aliar propriedades individuais atrativas do suporte e da biomolécula, ou aprimorar propriedades de cada um dos materiais, de modo a superar alguma limitação em manipulação ou propriedade físico-química. Para isto, dentre os métodos mais comuns de imobilização, os materiais podem ser submetidos à interação covalente (direta ou por *cross-linking*), não-covalente (ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas) ou encapsulamento (PRIETO-SIMÓN; CAMPÀS; MARTY, 2008; SHELDON; VAN PELT, 2013).

Entretanto, um grande desafio no que tange à imobilização de biomoléculas é garantir a preservação das propriedades individuais dos componentes, uma vez que, a exemplo do que ocorre com proteínas (NELSON; COX, 2002), parâmetros reacionais como velocidade de agitação, pH, temperatura e tipos de reagentes podem ocasionar alterações estruturais e/ou estereoquímicas, tanto na biomolécula quanto no substrato/suporte utilizado. Desta forma, além de fatores como custo, tempo e complexidade de reação, reprodutibilidade e rendimento da amostra final, a metodologia de imobilização escolhida deve possibilitar a manutenção das propriedades dos componentes do conjugado.

Assim, nesta Tese, micro e nanopartículas de carbono foram sintetizadas a partir da

carbonização hidrotérmica da glicose. Ambos os materiais carbonáceos foram caracterizados morfológica e estruturalmente e submetidos à interação com a lectina ConBr por meio de metodologias que promovem ligações covalente e não-covalente, visando avaliar a possibilidade de uso das partículas como suporte para biomoléculas, de modo que estas mantenham sua atividade biológica. No caso da ConBr, a atividade investigada foi a de hemaglutinação, a qual foi avaliada nas amostras conjugadas resultantes dos procedimentos de interação com as micro e nanopartículas de carbono.

Na obtenção das nanopartículas de carbono foram realizados estudos para avaliação dos efeitos de parâmetros reacionais e da metodologia de purificação, sobre a quantidade de material recuperada e propriedades físico-químicas, tais como: tamanho de partícula e fotoluminescência. Além disso, foram realizados ensaios para a avaliação da estabilidade de nanopartículas de carbono coloidais, em função do tempo e da temperatura de acondicionamento (estabilidade acelerada) e em função da variação de pH.

De modo a estimar o comportamento das nanopartículas de carbono em meios biológicos, vislumbrando sua utilização em aplicações biomédicas *in vitro* e *in vivo*, as nanopartículas de carbono também foram submetidas a testes de estabilidade quando dispersas em tampão fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline* – PBS) e soro fisiológico (solução aquosa de NaCl 0,9% (m:v)). Tais soluções salinas são bastante utilizadas em ensaios biológicos, uma vez que são isotônicas, isto é, possuem osmolaridade e concentração iônica coincidentes com as do corpo humano, além de serem não tóxicas para as células humanas (MULDER *et al.*, 2002; SIGMA-ALDRICH, 2016a, 2016b; ZHOU *et al.*, 2015). Por fim, bioensaios utilizando *Artemia salina* como modelo experimental foram realizados para a avaliação preliminar da toxicidade de nanopartículas de carbono produzidas nesta Tese.

É importante destacar que o trabalho desenvolvido apresenta como contribuições à literatura: i) estudo do carbono hidrotérmico (micropartículas de carbono) como suporte para biomolécula, uma vez que o material é pouco explorado em estudos em biotecnologia; ii) estudo pioneiro de imobilização da lectina ConBr em materiais carbonáceos; iii) estudo sistemático de aspectos físico-químicos e toxicidade em artêmias de nanopartículas de carbono coloidais obtidas por carbonização hidrotérmica de glicose.

## 1.1 Carbonização hidrotérmica

Denomina-se carbonização hidrotérmica o processo em que precursores contendo carbono, dispersos ou solubilizados em meio aquoso, são convertidos em materiais carbonáceo

após serem submetidos a determinadas condições de temperatura e, normalmente, pressão autogerada em reatores fechados. A metodologia de tratamento hidrotérmico é bastante explorada para a síntese e modificação de materiais de diferentes naturezas químicas, destacando-se, principalmente, por sua versatilidade e por ser ambientalmente adequada.

A palavra hidrotérmico tem origem geológica e foi utilizada pela primeira vez pelo geólogo britânico Roderick Murchison para descrever a ação da água, a elevadas temperatura e pressão, na formação de minerais e rochas (BYRAPPA; ADSCHIRI, 2007; SHANDILYA; RAI; SINGH, 2016). Com o desenvolvimento de estudos à cerca destas formações geológicas em laboratório, as quais procuravam simular as condições naturais, o termo hidrotérmico também passou a designar todo experimento realizado em condições semelhantes (BYRAPPA; ADSCHIRI, 2007; RABENAU, 1985; SHANDILYA; RAI; SINGH, 2016). Reunindo as definições de Byrappa e Yoshimura (BYRAPPA; ADSCHIRI, 2007) e Rabenau (1985), o termo hidrotérmico denomina toda reação química homogênea ou heterogênea, que se processa em meio aquoso ou não, a temperaturas maiores que 100 °C e pressões maiores que 1 atm, em sistema fechado. Na literatura podem ser encontradas variações deste termo, dependendo do solvente utilizado na reação, como solvotérmico (solvente não-aquoso), alcotérmico (álcool), glicotérmico (glicol), amonotérmico (amônia), etc. (BYRAPPA; ADSCHIRI, 2007).

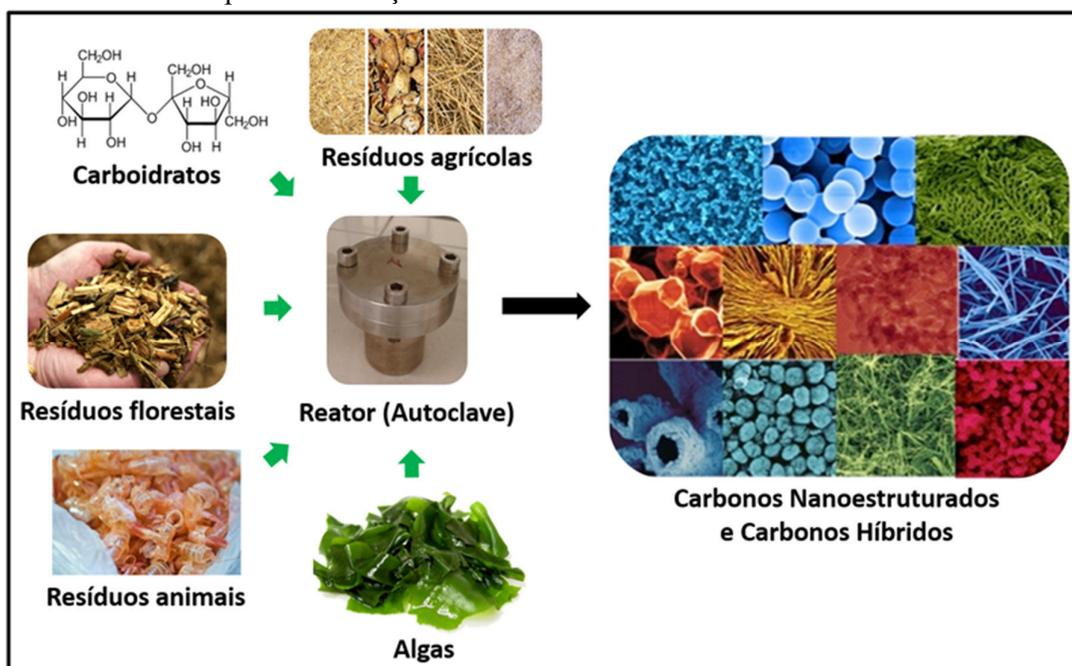
A síntese de materiais por técnicas hidrotérmicas data do século XIX, tendo os experimentos de Bunsen e Schafhäütl como pontos de partida. O primeiro produziu agulhas cristalinas milimétricas de carbonatos de bário e estrôncio em temperaturas maiores que 200 °C e pressões maiores que 98 atm (RABENAU, 1985; SHANDILYA; RAI; SINGH, 2016). O segundo observou a formação de pequenos cristais de quartzo pela precipitação de ácido silícico em um digestor à vapor (digestor de Papin), precursor da autoclave (RABENAU, 1985; SHANDILYA; RAI; SINGH, 2016).

O uso da técnica hidrotérmica para a obtenção de materiais carbonáceos teve início com os estudos de Friedrich Bergius, em 1913, sobre a decomposição da celulose, por aquecimento. Durante as pesquisas, ele descobriu que o precursor deveria estar inteiramente em contato com água e ser aquecido a temperaturas médias (cerca de 200 °C), em recipiente à alta pressão, para que a celulose não sofresse decomposição em gases e fosse possível a sua conversão em material cuja composição era similar àquela do carvão (LI; WANG; SHAHBAZI, 2015; TITIRICI, 2012; YU *et al.*, 2012).

Em 2001, o tratamento hidrotérmico passou a se destacar como metodologia para a preparação de esferas de carbono. Tal uso teve início com o trabalho de Wang *et al.* (2001), que empregaram a metodologia para a obtenção de esferas de carbono a partir de sacarose. Com o

desenvolvimento das pesquisas na área de preparação de materiais carbonáceos, o processo recebeu o nome de carbonização hidrotérmica (HTC) e estudos utilizando diferentes precursores, temperaturas, tempos de reação e adição de substâncias, como metais e polímeros, destinados a catalisar a reação, ou então, para obter materiais híbridos ou compósitos, podem ser encontrados na literatura (HU *et al.*, 2010; TITIRICI *et al.*, 2012). A combinação destes diferentes parâmetros reacionais resulta na obtenção de materiais com diferentes propriedades físico-químicas, o que, aliado à possibilidade de uso de precursores provenientes de fontes renováveis (biomassa, resíduos de biomassa e carboidratos) torna a HTC uma técnica em destaque para a obtenção de materiais que permitem vislumbrar aplicações em diversas áreas tecnológicas e de forma sustentável (FIGURA 1).

Figura 1 - Imagem ilustrando que carboidratos e diferentes tipos de biomassa podem ser utilizados como precursores de carbono para a obtenção de materiais carbonáceos nanoestruturados e materiais híbridos por carbonização hidrotérmica.



Fonte: adaptada de Titirici Group (2016).

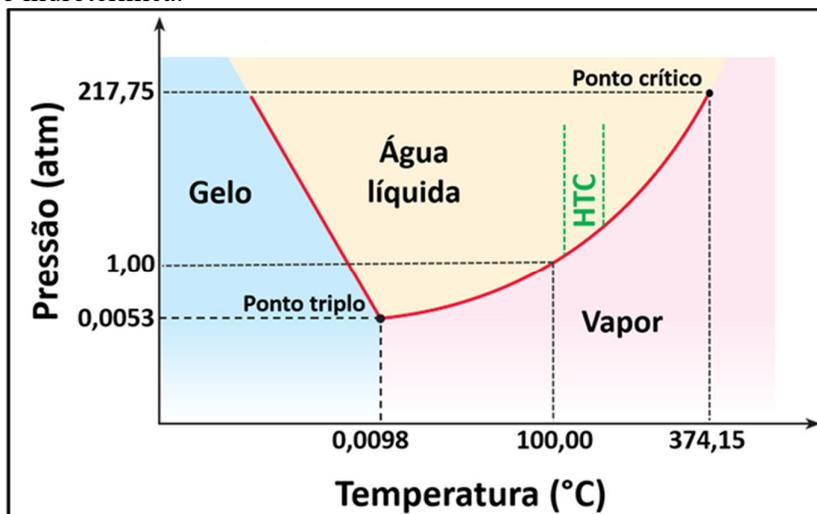
Considerado um processo rápido e simples, a HTC possui, ainda, a grande vantagem de não exigir uma preparação sofisticada para os precursores utilizados, tão pouco a secagem dos materiais, uma vez que ocorre na presença de água. Além disso, a amostra final é facilmente separada do restante do produto gerado, reduzindo ainda mais o tempo de processo, o consumo de energia e, conseqüentemente, os custos com procedimentos dispendiosos (TITIRICI *et al.*, 2007). A possibilidade de obtenção de nanoestruturas utilizando temperaturas

relativamente baixas ( $< 200\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), o que consiste em mais economia de energia, além de não necessitar o uso de precursores tóxicos são outras vantagens da carbonização hidrotérmica.

A HTC é um processo termoquímico exotérmico que ocorre em ambiente fechado e sob pressão autogerada. A mistura do material precursor de carbono e água é disposta em reator (autoclave), que é vedado e submetido a temperaturas, em geral, entre  $130$  e  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$  (TITIRICI *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2012). A pressão é gerada pela saturação da pressão de vapor de água, o que depende da temperatura escolhida para a reação, geralmente, variando entre 2 a 6 MPa (19,74 a 59,22 atm) (KAMBO; DUTTA, 2015).

No Gráfico 1, o intervalo de valores de temperatura e pressão que devem ser utilizadas para favorecer a obtenção de materiais carbonáceos sólidos a partir de HTC é indicado no diagrama de fase da água. Verifica-se que, para isso, o processo HTC deve ser realizado em condições subcríticas, isto é, em que a água se mantém no estado líquido sob temperaturas entre  $100$  e  $374\text{ }^{\circ}\text{C}$  e pressões maiores que a pressão atmosférica.

Gráfico 1- Diagrama de fase da água, onde se destaca a região apresentando as condições de temperatura e pressão da água que favorecem a síntese de materiais carbonáceos sólidos por carbonização hidrotérmica.



Fonte: adaptado de Kambo e Dutta (2015) e Feltre (2004).

Em condições subcríticas, a água apresenta propriedades diferentes daquelas conhecidas para a água a temperatura ambiente. Por exemplo, a alta pressão e a alta temperatura afetam a ionização, viscosidade, comportamento dielétrico e densidade da água. Concomitantemente ao aumento da pressão e temperatura ocorre o aumento do grau de ionização da água. Esta se dissocia em íons hidrônio ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) e hidróxido ( $\text{OH}^-$ ), o que favorece reações catalisadas por ácidos e bases, como a hidrólise do precursor, as quais são aceleradas. Além disso, a água

passa a atuar como solvente não polar, aumentando o grau de solubilização de compostos orgânicos hidrofóbicos. A viscosidade decresce com o aumento da temperatura, o que aumenta a mobilidade das moléculas e íons e ocasiona o decréscimo da constante dielétrica da água. Já a densidade da água, encontra-se no intervalo entre aquelas observadas nas condições ambiente e supercrítica. Assim, as propriedades da água em condições subcríticas tornam-na um meio reacional apropriado para o desenvolvimento do processo de (KAMBO; DUTTA, 2015; RABENAU, 1985; TOOR; ROSENDAHL; RUDOLF, 2011).

Dependendo dos parâmetros reacionais, a HTC pode gerar diferentes materiais carbonáceos sólidos: um denominado carbono hidrotérmico ou *hydrochar* (pela literatura internacional) com tamanhos de partículas e agregados micrométricos, e outro disperso no meio reacional, com tamanhos de partículas de poucos nanômetros denominado ponto quântico de carbono, C-dots (pela literatura internacional) ou nanopartícula de carbono (HU *et al.*, 2010; TITIRICI *et al.*, 2012, 2015).

O mecanismo de formação destes materiais ainda está sob investigação (FALCO *et al.*, 2011; HU *et al.*, 2010; LI; WANG; SHAHBAZI, 2015; TITIRICI; ANTONIETTI; BACCILE, 2008), uma vez que as reações químicas que se processam durante a carbonização são bastante complexas e tornam-se ainda mais, dependendo da heterogeneidade da estrutura do precursor. Entretanto, sabe-se que os materiais gerados são dotados de grupos funcionais superficiais, o que constitui outra vantagem da técnica de HTC. Nenhum processo adicional de preparação é exigido para garantir a reatividade destes materiais em aplicações, como ocorre com os nanotubos de carbono e o grafeno, por exemplo.

Tendo em vista a necessidade de um melhor entendimento das propriedades e do mecanismo de formação dos materiais carbonáceos gerados através de HTC, os açúcares têm sido bastante explorados como fontes de carbono para estudos neste sentido, principalmente, por serem as unidades mais simples da constituição estrutural da biomassa. Ainda, o uso destas substâncias como modelo de precursor pode ser justificado por serem substâncias abundantes na natureza, serem obtidos por processos sustentáveis e alguns apresentarem alta solubilidade em água.

## **1.2 Carbonização hidrotérmica de carboidratos**

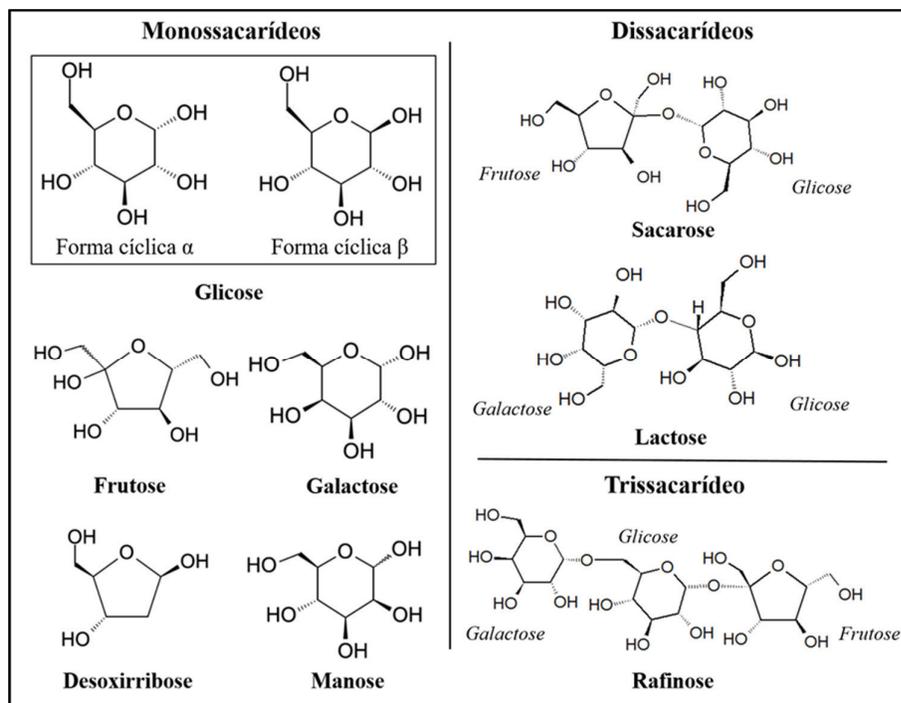
### ***1.2.1 Carboidratos***

Carboidratos são biomoléculas formadas, principalmente, por carbono, hidrogênio

e oxigênio, também chamados de hidratos de carbono ou açúcares. Sendo as mais abundantes no planeta, estas biomoléculas atuam de diversas formas em organismos vivos, como armazenadores de energia química, compondo ácidos nucleicos, paredes celulares de bactérias e vegetais, tecido conjuntivo de animais, carapaças de crustáceos e participando de interações célula-célula, como reconhecimento e coesão (BETTLELHEIM *et al.*, 2013; NELSON; COX, 2002).

Em sua maioria, os carboidratos são representados pela fórmula molecular  $(CH_2O)_n$  (FIGURA 2), onde  $n$  pode assumir valores de 3 a 7. Entretanto, existem carboidratos compostos, ainda, por nitrogênio, enxofre e fósforo. A classificação destas biomoléculas é feita de acordo com o tamanho da molécula que forma sua estrutura (FIGURA 2). Os mais simples são denominados monossacarídeos. Dois ou mais monossacarídeos reunidos por ligações glicosídicas dão origem aos oligossacarídeos. A estrutura formada pela ligação entre duas unidades de monossacarídeos também pode ser denominada de dissacarídeo, enquanto aquela formada por três unidades é um trissacarídeo (FIGURA 2). Estruturas resultantes da ligação de mais de 20 monossacarídeos são chamadas polissacarídeos (NELSON; COX, 2002).

Figura 2 - Representação esquemática da estrutura cíclica de alguns monossacarídeos, dissacarídeos e trissacarídeo.



Fonte: elaborada pela autora.

Os monossacarídeos são nomeados de duas formas: pelo número de átomos de carbono em sua estrutura, sendo denominados trioses, tetroses, pentoses, hexoses e heptoses, para

aqueles que contêm 3, 4, 5, 6 e 7 carbonos, respectivamente, e pela presença do grupo funcional aldeído ou cetona na estrutura, em aldoses ou cetoses (BETTLELHEIM *et al.*, 2013; NELSON; COX, 2002).

A glicose, utilizada nesta Tese como fonte de carbono para a obtenção de micro e nanopartículas de carbono por HTC, é o carboidrato mais simples e abundante na natureza. É um monossacarídeo classificado, também, como aldose, por possuir seis átomos de carbono em sua cadeia principal e aliar os grupos funcionais álcool e aldeído quando em cadeia aberta. Sua fórmula molecular é  $C_6H_{12}O_6$  (massa molar: 180,1559 g/mol) e sua estrutura química pode se apresentar nas formas aberta e cíclica (glicopiranoses), sendo esta última mostrada na Figura 2. Em soluções aquosas, as formas cíclicas são predominantes (NELSON; COX, 2002).

### ***1.2.2 Carboidratos como precursores para a carbonização hidrotérmica***

O trabalho de Wang *et al.* (2001) destacou a carbonização hidrotérmica de carboidratos como método de obtenção de materiais carbonáceos funcionais, em geral, com morfologia esférica. Os autores utilizaram a sacarose, que foi carbonizada a 190 °C durante diferentes tempos de reação (1, 2 e 5 h) e distintas concentrações do carboidrato (0,15; 1,5 e 3,0 mol/L). O sólido resultante foi submetido a tratamento térmico a 1000 °C. Os processos levaram a um sólido, contendo microesferas densas, com superfície regular, cujo diâmetro variou entre 0,25 e 5 µm, dependendo das condições utilizadas para as HTCs.

Em 2004, Sun e Li relataram a obtenção de esferas de carbono coloidais monodispersas por carbonização hidrotérmica de glicose a 160 e 180 °C. Os autores observaram que o diâmetro das esferas depende primordialmente do tempo de reação. Tempos reacionais de 2, 4, 6, 8 e 10 h, sob temperatura e concentração do carboidrato constantes, conduziram à obtenção de esferas com diâmetros que variaram de 0,2 a 1,5 µm.

A carbonização hidrotérmica de pentoses e hexoses foi investigada e comparada por Titirici, Antonietti e Baccile (2008). Utilizando parâmetros reacionais iguais e os carboidratos glicose, xilose, maltose e amilopectina no processo HTC, os autores reportaram que hexoses primeiramente decompõem-se em hidroximetilfurfural (HMF), enquanto pentoses decompõem em furfural. Tal fato conduz à formação de materiais carbonáceos com estruturas relativamente diferentes.

As influências dos parâmetros de preparação e do tipo de carboidrato utilizado como precursor sobre características físico-químicas das micropartículas geradas também foram observadas por Sevilla e Fuertes (2009a) em trabalho em que comparam tais aspectos dos

produtos gerados pela carbonização hidrotérmica de glicose, sacarose e amido. Os autores utilizaram diferentes concentrações dos carboidratos para a síntese por HTC em diferentes temperaturas e tempos de reação e obtiveram como produtos materiais carbonáceos formados por microesferas com diâmetros entre 0,4 e 6  $\mu\text{m}$ . Foi observado que os diâmetros aumentavam quanto maior a concentração do carboidrato, a temperatura e o tempo de reação. Além disso, observaram que, sob condições de síntese semelhantes, o diâmetro médio das microesferas depende do carboidrato utilizado, de modo que glicose < amido < sacarose. Segundo os autores, isto se deve ao número de espécies em decomposição no processo HTC, que é maior para o amido, polissacarídeo que se decompõe em glicose, e para a sacarose, dissacarídeo que se decompõe em glicose e frutose.

### ***1.2.3 Mecanismo de formação dos materiais carbonáceos obtidos por carbonização hidrotérmica de hexoses***

O mecanismo de formação dos materiais obtidos por HTC de carboidratos é bastante abordado na literatura. Vários pesquisadores têm desenvolvido trabalhos em que utilizam diferentes tipos de carboidratos como precursores em HTC e, além da caracterização do material carbonáceo obtido, apresentam estudo em que sugerem possíveis mecanismos de formação destes materiais. Como exemplos de trabalhos que abordam mais amplamente o assunto, pode-se citar aqueles de Sevilla e Fuertes, que propõem o mecanismo de formação de carbono hidrotérmico a partir da celulose (SEVILLA; FUERTES, 2009b) e de sacarídeos tais como glicose, sacarose e amido (SEVILLA; FUERTES, 2009a), além do trabalho de Titirici, Antonietti e Baccile (2008) - citado na seção anterior - e de Qi *et al.* (2016), que aborda o assunto quando a sacarose é o carboidrato precursor.

Apesar das discussões na literatura a respeito do mecanismo detalhado de formação do carbono hidrotérmico, algumas etapas já estão bem estabelecidas. Todos os trabalhos supracitados sugerem que o processo inicia com a hidrólise da estrutura do precursor, seguida por isomerização, desidratação e, a partir daí, inúmeras reações em cascata que conduzem à polimerização, condensação e aromatização das cadeias carbônicas através de abertura de anéis, substituições e/ou cicloadições (YU *et al.*, 2012) que formam a estrutura do material carbonáceo final.

A Figura 3, mostra um esquema representativo do mecanismo de reação, proposto por Qi *et al.* (2016), quando a fonte de carbono é a sacarose. Este carboidrato é um dissacarídeo,

cuja unidade estrutural é formada pela união de uma molécula de glicose e uma de frutose (FIGURA 2).

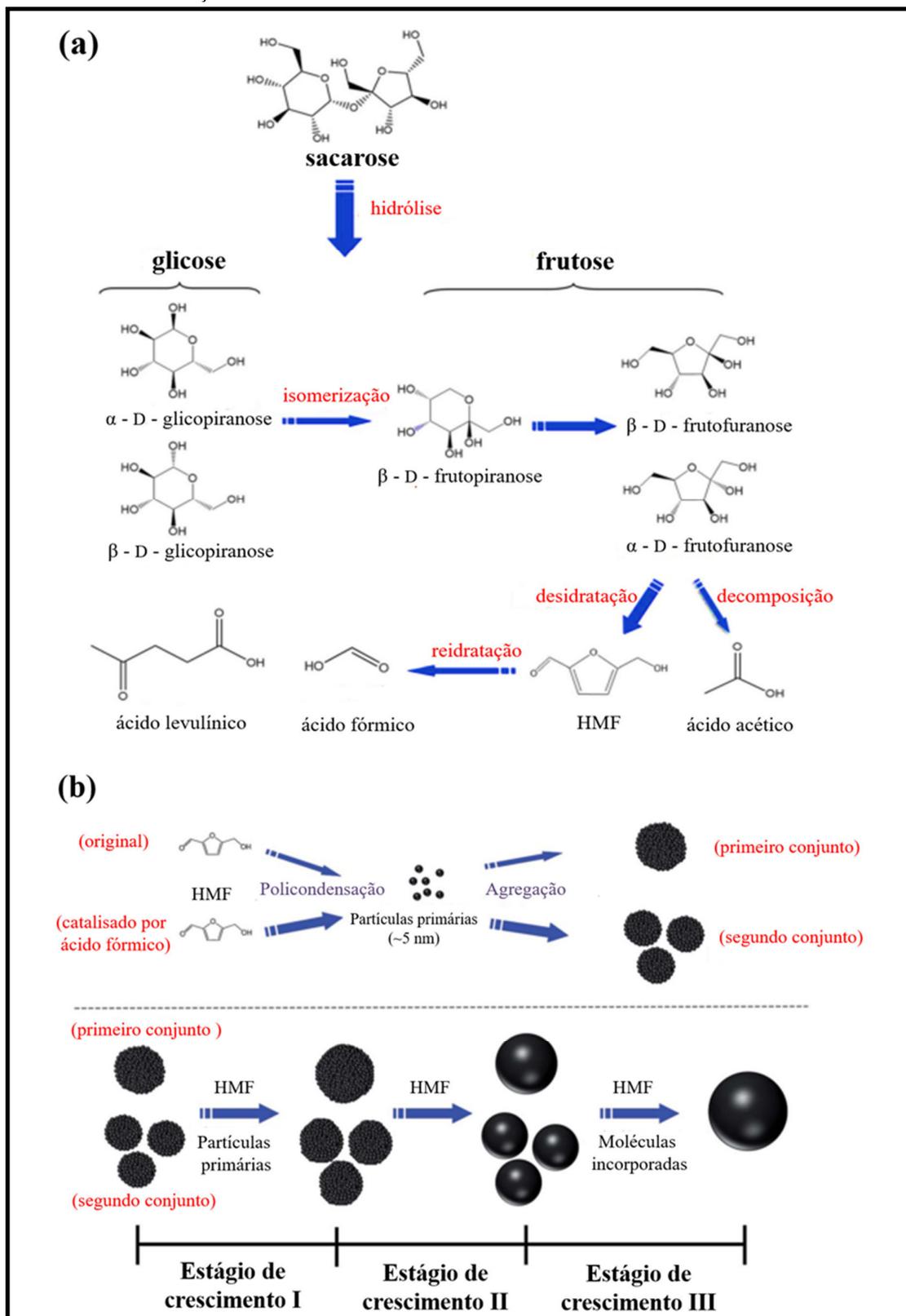
Na primeira etapa da carbonização hidrotérmica a sacarose sofre hidrólise. Em seguida, a glicose (glicopirranose) sofre isomerização, produzindo frutose (frutopirranose). Tanto para a glicose quanto para a frutose o principal produto da desidratação é a molécula de HMF. No mecanismo sugerido por Qi *et al.* (2016), o HMF resulta da desidratação intramolecular da frutofuranose, existente no meio reacional pela tautomerização da frutopirranose (FIGURA 3). Assim, como a isomerização da glicopirranose em frutopirranose ocorre paralelamente à tautomerização da frutopirranose em frutofuranose, há liberação contínua da molécula de HMF no meio reacional.

A partir daí, iniciam-se os processos de polimerização e condensação, que ocorrem com a desidratação da molécula de HMF e resultam em cadeias furânicas tridimensionais. Neste estágio, os primeiros núcleos para a formação do material carbonáceo são formados. Quanto maior o tempo de reação, maior a desidratação destas cadeias, que aumentam em tamanho e em volume, perdendo grupos oxigenados e, conseqüentemente, causando a formação de núcleos aromáticos hidrofóbicos.

Estes núcleos são o ponto de partida para a formação de partículas primárias, que tendem a agregar, de modo a reduzir a energia livre de superfície, por meio de reações entre os grupos funcionais superficiais (FIGURA 3b). As partículas e agregados formados coexistem com HMF e com ácidos orgânicos gerados pela reidratação do HMF e pela decomposição da frutofuranose (ácidos levulínico, fórmico, acético, etc.). A presença destes ácidos no meio reacional catalisa a desidratação da frutose, o que mantém o fluxo de HMF no meio e conduz a formação de novas partículas primárias. Desta forma, ao fim do primeiro estágio da formação de material carbonáceo por HTC de sacarídeo, tem-se um primeiro conjunto de agregados maiores e um segundo conjunto de agregados menores, provenientes das partículas primárias geradas em diferentes tempos de reação.

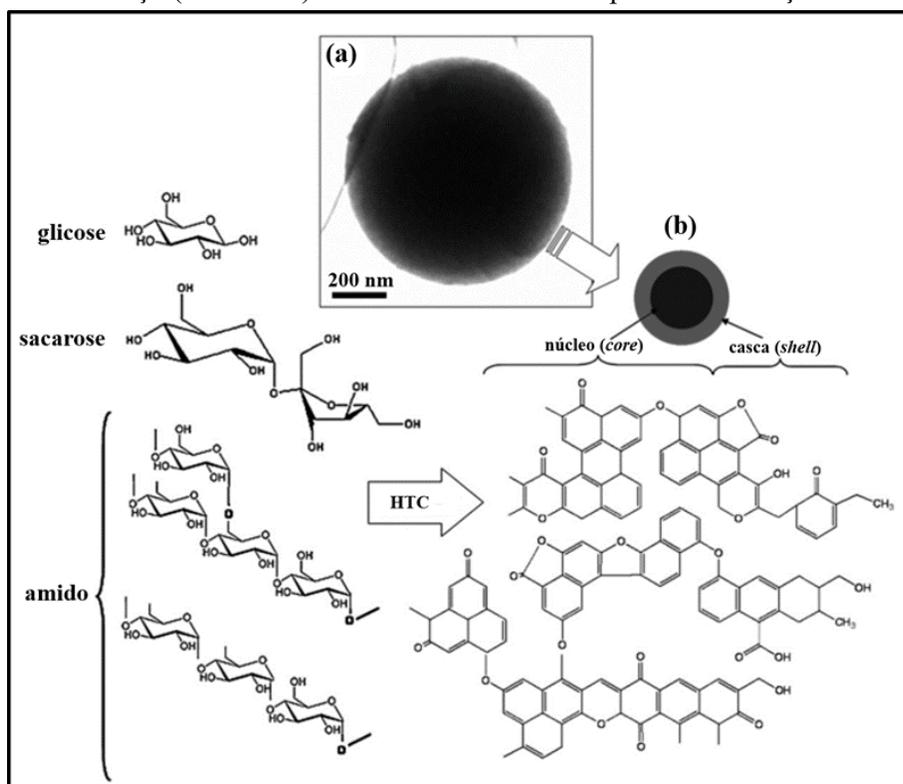
O segundo estágio de crescimento dos agregados, ocorre após a saturação da formação de partículas primárias, de modo que o aumento do diâmetro dos agregados acontece apenas devido à reação destes com as moléculas de HMF. No terceiro e último estágio, concomitantemente às reações com o HMF, ocorrem reações da superfície porosa destes agregados com os ácidos orgânicos presentes no meio reacional, o que conduz à formação do carbono hidrotérmico como uma estrutura *core-shell* (FIGURA 4), dotada de núcleo hidrofóbico e uma camada hidrofílica, formada pelos grupos funcionais oxigenados reativos (HU *et al.*, 2010; SEVILLA; FUERTES, 2009a, 2009b).

Figura 3 - Esquema representativo do mecanismo de formação do material carbonáceo obtido através da carbonização hidrotérmica de sacarose.



Fonte: adaptada de Qi *et al.* (2016).

Figura 4 – (a) Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) de microesfera de carbono obtida pela carbonização hidrotérmica de amido. (b) Representação esquemática da estrutura casca-carço (*core-shell*) de microesferas obtidas pela carbonização de sacarídeos.



Fonte: adaptada de Sevilla e Fuertes (2009a).

### 1.3 Materiais carbonáceos obtidos por carbonização hidrotérmica de carboidratos: propriedades e aplicações

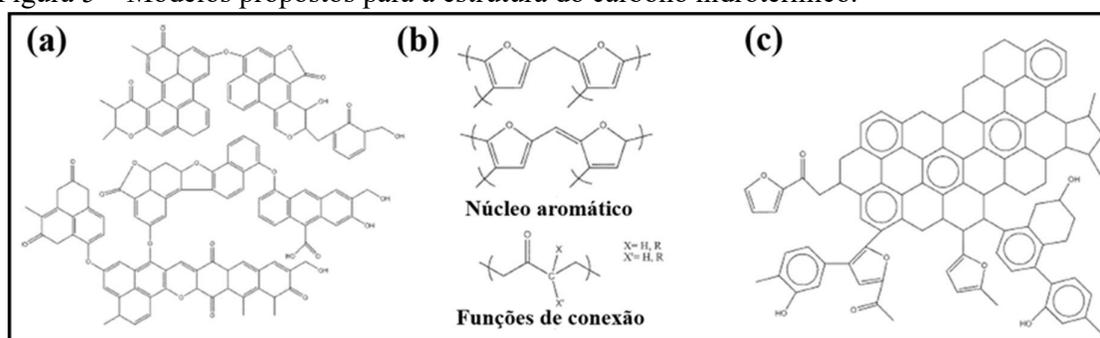
#### 1.3.1 Micropartículas de carbono (carbono hidrotérmico)

O carbono hidrotérmico, doravante denominado micropartículas de carbono (MPCs), gerado pela carbonização hidrotérmica de carboidratos possui, geralmente, partículas esféricas de tamanho micrométrico cuja estrutura é do tipo *core-shell*, dotada de um núcleo hidrofóbico e uma camada superficial hidrofílica (conforme já destacado na Figura 4).

Investigações por meio de diferentes técnicas de caracterização sugeriram três diferentes modelos de organização estrutural das micropartículas (FALCO *et al.*, 2011). Na Figura 5, o esquema (a), sugerido por Sevilla e Fuertes (2009a) e baseado em análises de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X (XPS) e Espectroscopia Raman, mostra que o núcleo das MPCs é

formado por unidades de anéis benzênicos condensados entre si, e tais unidades são conectadas por átomos de oxigênio ou cadeias cíclicas contendo oxigênio como heteroátomos. Por outro lado, a proposta descrita em (b), resulta de caracterizações por Espectrometria de Ressonância Nuclear Magnética (NMR) de carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ ) e sugere que a estrutura é composta por anéis furânicos e arenos (BACCILE *et al.*, 2009). O terceiro modelo, mostrado no esquema (c), sugerido por Chuntanapum e Matsumura (2009), indica que o material carbonáceo é composto por anéis aromáticos e furânicos, sendo os primeiros mais abundantes na estrutura. Tal avaliação foi realizada por FTIR e Espectroscopia Raman.

Figura 5 – Modelos propostos para a estrutura do carbono hidrotérmico.



Fonte: adaptada de Falco *et al.* (2011).

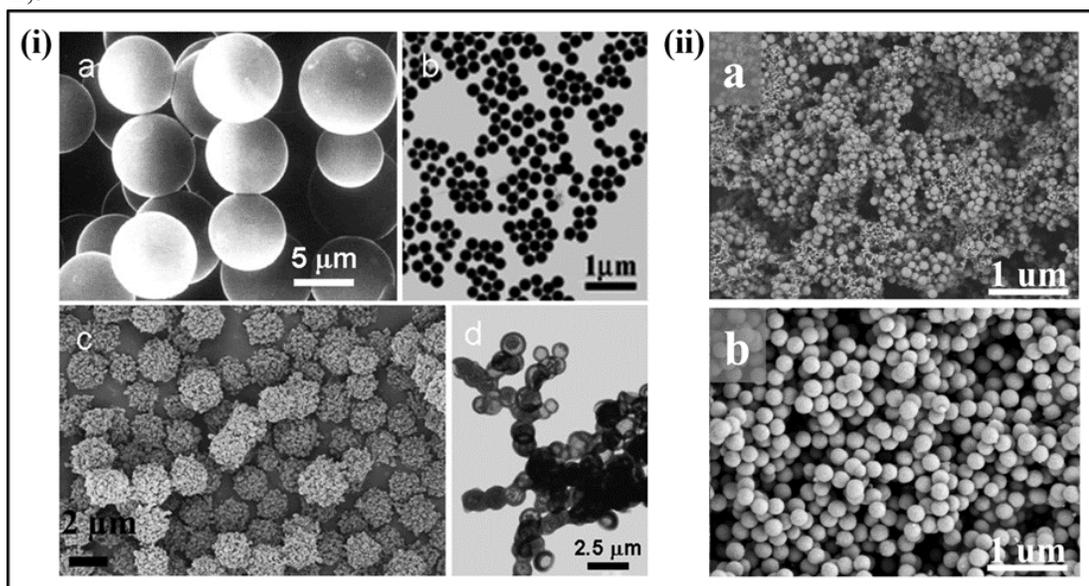
Micropartículas provenientes de carboidratos, geralmente, possuem baixo ordenamento estrutural, similar ao carbono amorfo, e com baixa porosidade, o que pode ser melhorado submetendo as MPCs a tratamentos térmicos. Yu *et al.* (2012) concluíram que a porosidade desenvolve com o aumento da temperatura do tratamento térmico, após estudo utilizando temperaturas entre 350 e 950 °C para tratar termicamente carbonos hidrotérmicos provenientes de glicose, amido, sacarose e xilose.

Em relação à composição química elementar, as micropartículas de carbono apresentam, em geral, 60 a 70% de carbono e de 20 a 30% de oxigênio em sua estrutura. Análises de FTIR, XPS e potencial zeta revelam que a superfície deste material é altamente funcional, devido à existência de grupos funcionais oxigenados, como ácidos carboxílicos, ésteres, cetonas e aldeídos, que possibilitam a modificação da superfície das micropartículas com outras espécies químicas para aplicações em diferentes áreas (JAGADEESAN; ESWARAMOORTHY, 2010; SEVILLA; FUERTES, 2009a; YU *et al.*, 2012).

Uma ampla gama de funcionalidades também pode ser fornecida a estas micropartículas durante o processo de preparação, em que a adição de espécies químicas, como cátions

metálicos, polímeros e *templates* ao meio reacional possibilitam a obtenção de micropartículas e materiais híbridos com propriedades físico-químicas diferenciadas. Na Figura 6, imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) mostram exemplos de micropartículas carbonáceas obtidas por carbonização hidrotérmica de carboidratos, com e sem a adição de outras espécies químicas ao meio reacional. Na Figura 6i, observam-se em (a e b) micropartículas densas e com diferentes diâmetros provenientes de sacarose (WANG *et al.*, 2001) e glicose (SUN; LI, 2004), respectivamente, em (c) micropartículas com maior porosidade resultante de HTC de glicose e ácido acrílico (DEMIR-CAKAN *et al.*, 2009) e, em (d), esferas ocas obtidas pela HTC de amido e íons ferro (CUI; ANTONIETTI; YU, 2006). Na Figura 6ii, as imagens mostram o compósito de carbono e dióxido de silício (SiO<sub>2</sub>) gerado pela carbonização hidrotérmica de amilose na presença de tetraetilortosilicato em diferentes razões mássicas (LI *et al.*, 2016a).

Figura 6 – Imagens SEM de (i) micropartículas de carbono obtidas por HTC de (a) sacarose, (b) glicose, (c) glicose e ácido acrílico, (d) amido e íons ferro; (ii) compósito carbono/SiO<sub>2</sub> obtido por HTC de amilose na presença tetraetilortosilicato nas razões mássicas (a) 1/1 e (b) 1/2,5.



Fonte: (i) Hu *et al.* (2010); (ii) adaptada de Li *et al.* (2016a).

Para aplicações em adsorção de gases e armazenamento de energia, a porosidade do material carbonáceo é primordial e, desta forma, as MPCs são submetidas a tratamento térmico e/ou ativação química, como reportado por Sevilla, Fuertes e Mokaya (2011) no preparo de micropartículas de carbono para armazenamento de hidrogênio (H<sub>2</sub>) e por Li *et al.* (2016b) para adsorção de CO<sub>2</sub>, metano (CH<sub>4</sub>) e H<sub>2</sub>. No primeiro trabalho, micropartículas obtidas por HTC de glicose, amido e celulose foram ativadas quimicamente com hidróxido de potássio

(KOH) e termicamente em temperaturas entre 600 e 800 °C. O processo de ativação das micropartículas conduziu à obtenção de um material carbonáceo ativado com aumentada área superficial e volume de poros, cuja captação de H<sub>2</sub> foi superior ao normalmente verificado para carbonos ativados obtidos por outras metodologias. No segundo trabalho, MPCs porosas foram obtidas por HTC de amido e ativadas por tratamento térmico a 1000 °C sob fluxo de CO<sub>2</sub> durante 150 min. Estas MPCs apresentaram grande área superficial e volume de poros, maiores que os geralmente exibidos por carbonos fisicamente ativados. Testes de adsorção de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>, a 20 atm, mostraram que a captação destes gases pelas MPCs ativadas foi maior que os já registrados para carbonos ativados, sendo a performance de adsorção deste último gás a maior já registrada. Além disso, os autores verificaram que a redução da pressão conduz a dessorção dos gases.

Já para aplicações em tratamento de água e catálise é comum a modificação da superfície das partículas ou o encapsulamento de diferentes espécies químicas para interação com o material de interesse. Lai *et al.* (2016) modificaram a superfície de MPCs obtidas por HTC de glicose com (bis-3,4-dihidroxibenzil) p-fenilenodiamina para a remoção de urânio de solução aquosa por adsorção. Yan, Street e Yu (2015) prepararam MPCs com nanopartículas de ferro encapsuladas, através do HTC de solução de cloreto de ferro II (FeCl<sub>2</sub>) com açúcares derivados de madeira, para uso como catalisadores na conversão térmica do gás de síntese em hidrocarbonetos líquidos.

Microesferas de carbono são pouco exploradas para aplicações biológicas. Entretanto, a existência dos grupos funcionais de superfície permite vislumbrar aplicações das MPCs como suportes para biomoléculas, como enzimas, para biocatálise, e fármacos, para ensaios biológicos *in vitro*.

Outro tipo de possível aplicação biológica foi apresentado por Jagadeesan *et al.* (2008). Os autores utilizaram MPCs provenientes de glicose e n-octano e pluronic P123 na composição de um vidro bioativo (sílica sol contendo cálcio e fósforo) hierarquicamente poroso. Vitrocerâmicas bioativas são materiais muito utilizados para engenharia de tecidos devido estabelecerem ligações químicas com ossos por meio da formação de hidroxicarbonato apatita (HCA) biocompatível em sua superfície, quando em contato com fluidos corporais. Entretanto, a eficiência destes materiais depende da taxa de formação da HCA, pois, se for muito lenta, nenhuma ligação é formada. Neste sentido, o uso das MPCs teve o objetivo de aumentar a porosidade do vidro e promover o aumento da taxa de crescimento do HCA. Testes *in vitro* com fluidos corporais simulados mostraram que a adição das MPCs possibilitou o desenvolvimento dos núcleos de HCA, aumentando a bioatividade do material. Além disso, testes preliminares

de biocompatibilidade em células de fibroblastos humanos mostraram que a vitrocerâmica bioativa com as MPCs não é tóxica para estas células.

### ***1.3.2 Nanopartículas de carbono***

Nesta Tese consideram-se nanopartículas de carbono (NPCs) obtidas por carbonização hidrotérmica de carboidratos os materiais carbonáceos que compreendem desde as partículas primárias geradas durante o processo de formação das MPCs, os quais, segundo Qi *et al.* (2016), apresentam, aproximadamente, 5 nm de diâmetro, até aquelas com cerca de 100 nm de diâmetro.

Nanopartículas de carbono, principalmente, aquelas com diâmetros inferiores a 10 nm, denominadas C-dots, têm sido alvo de intensas pesquisas que visam sua aplicação nas áreas de biotecnologia e biomedicina devido às suas propriedades singulares de fotoluminescência, boa biocompatibilidade, baixa toxicidade, dispersividade em água, facilidade de obtenção e modificação, além de estabilidade química. Dentre as aplicações mais vislumbradas deste material estão imageamento, biosensoreamento, diagnóstico, carregamento de fármacos, biomarcação e como componentes de dispositivos optoeletrônicos (DING; ZHU; TIAN, 2014; LI *et al.*, 2012a; RUEDAS-RAMA *et al.*, 2012; YAN *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2015).

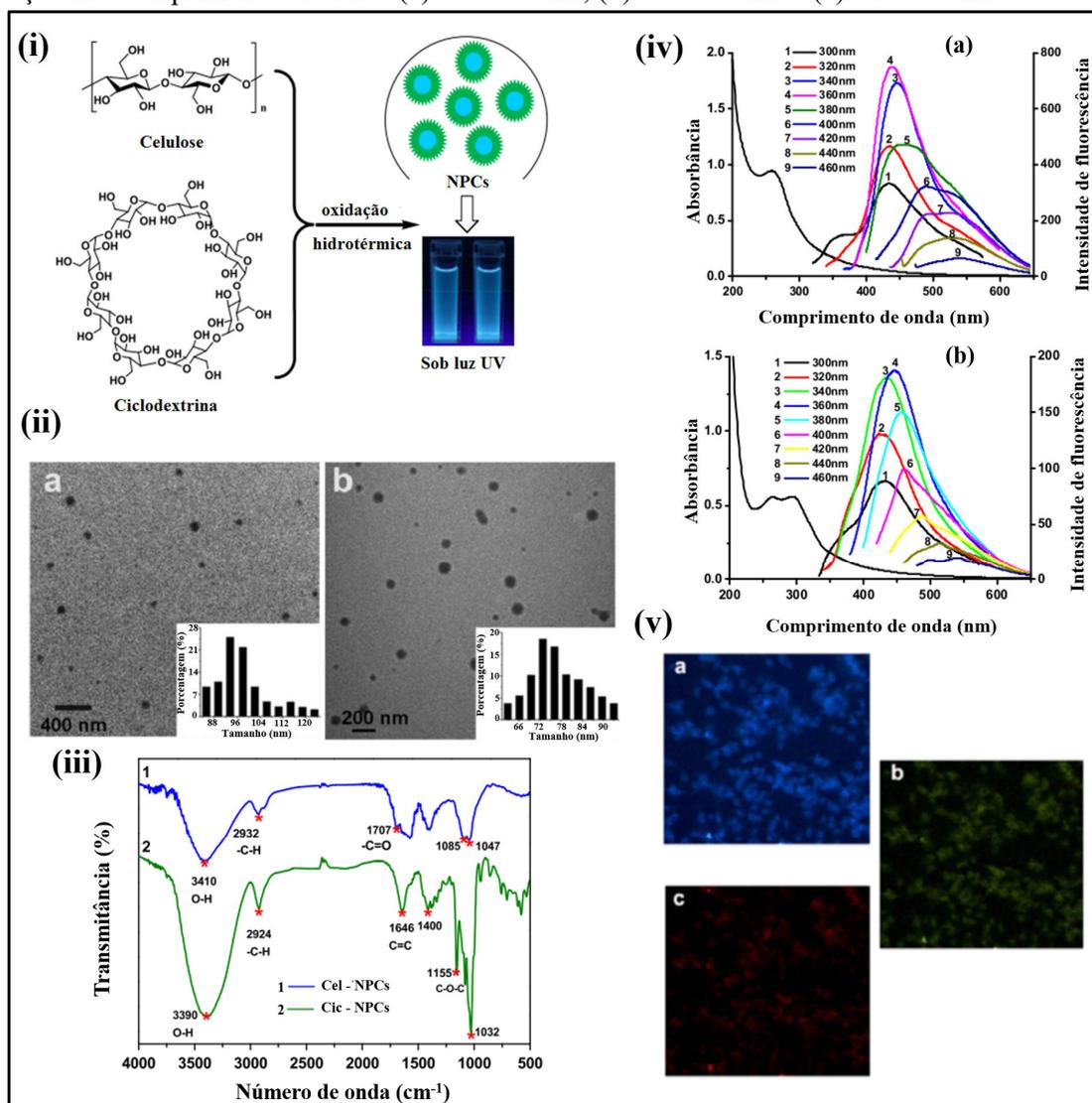
As propriedades supracitadas tornam as NPCs possíveis alternativas aos tradicionais fluoróforos orgânicos (corantes, proteínas, complexos metálicos), pontos quânticos de semicondutores e nanopartículas de silício, ouro e prata, por exemplo. Os primeiros possuem baixa resistência à fotodegradação e baixa intensidade de sinal (RUEDAS-RAMA *et al.*, 2012). Os pontos quânticos de semicondutores apresentam fotoluminescência com características importantes, como alto rendimento quântico, alta estabilidade e espectros de emissão ajustáveis com o tamanho das partículas, entretanto, necessitam de precursores tóxicos para sua preparação e podem conduzir à lixiviação dos metais pesados (DING; ZHU; TIAN, 2014; HSU *et al.*, 2012; YAN *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2011). Já as nanopartículas de silício apresentam como limitação a tendência à degradação oxidativa em sistemas biológicos (HSU *et al.*, 2012), enquanto as nanopartículas de ouro e prata necessitam de precursores caros para a síntese e apresentam baixa fotoestabilidade em sistemas biológicos (HSU *et al.*, 2012, 2013).

Assim como as MPCs obtidas por carbonização hidrotérmica de carboidratos, as propriedades físico-químicas das NPCs também dependem dos parâmetros de reação e dos precursores utilizados. Características como tamanho de partícula, dispersividade em meio aquoso,

composição, rendimento quântico de emissão e a existência de grupos funcionais na estrutura estão fortemente relacionados aos parâmetros do processo de preparação.

Yan *et al.* (2013) reportaram a síntese de nanopartículas de carbono a partir de HTC de celulose e de ciclodextrina (FIGURA 7i) em hidróxido de sódio e água para imageamento de células de melanoma de ratos.

Figura 7 – (i) Esquema da preparação de NPCs a partir da carbonização hidrotérmica de celulose e ciclodextrina. (ii) Imagens TEM e os respectivos histogramas de distribuição de tamanho das NPCs fluorescentes preparadas de (a) celulose e (b) ciclodextrina. (iii) Espectros FTIR das NPCs obtidas por HTC de celulose (Cel-NPCs) e ciclodextrina (Cic-NPCs). (iv) Espectros de Absorção na região do Ultravioleta/Visível (UV/Vis) e de emissão de fluorescência de NPCs provenientes de (a) celulose e (b) ciclodextrina em água. (v) Imagens de células de melanoma de ratos incubadas com NPCs provenientes de celulose durante 5 h, utilizando filtros de excitação nos comprimentos de onda (a) 330-380 nm, (b) 450-490 nm e (c) 510-560 nm.



Fonte: adaptada de Yan *et al.* (2013).

As NPCs obtidas apresentaram morfologia esférica e boa dispersividade em água (FIGURA 7ii). Aquelas obtidas a partir de celulose apresentaram diâmetros entre 85 e 123 nm, enquanto aquelas provenientes de ciclodextrina, entre 62 e 92 nm. Análises de FTIR mostraram que a estrutura das NPCs contém grupos hidroxila e carboxila, o que foi corroborado pelo valor negativo obtido para o potencial zeta (FIGURA 7iii).

Os comprimentos de onda dos máximos de emissão destas NPCs apresentaram comportamento de variação em função do comprimento de onda de excitação, de modo que quanto maior o comprimento de onda de excitação, maior o comprimento de onda do máximo de emissão (FIGURA 7iv). A maior intensidade de emissão foi observada para excitação a 360 nm para ambos os conjuntos de NPCs, entretanto, com máximos de emissão diferentes (439 nm para NPCs provenientes de celulose e 405 nm para aquelas provenientes de ciclodextrina), como consequência da diferença de precursor (FIGURA 7iv).

As NPCs provenientes de celulose foram submetidas a ensaios *in vitro* para imageamento de células de melanoma de ratos (B16-F10), sob excitação com comprimentos de onda nos intervalos 330 a 380 nm, 450 a 490 nm e 510 a 560 nm, e apresentaram fluorescência nas cores azul, verde e vermelha, respectivamente (FIGURA 7v).

No trabalho de Yang *et al.* (2011), NPCs obtidas pela carbonização de glicose na presença de fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), em duas razões molares glicose/ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  distintas, apresentaram morfologia quasi-esférica, boa dispersão e distribuições de tamanhos e emissão de fluorescência dependentes da concentração do sal. Para a razão molar 1/36, as NPCs apresentaram diâmetro médio de 1,83 nm, enquanto para a razão molar 1/26, o diâmetro médio das NPCs ficou em torno de 3,83 nm.

As NPCs com maiores tamanhos apresentaram estrutura cristalina e emissão de fotoluminescência na cor verde e as primeiras, estrutura amorfa e emissão na cor azul. Para ambos os conjuntos de NPCs, a emissão de fotoluminescência apresentou, muito sensivelmente, o comportamento do deslocamento dos máximos em função do comprimento de onda de excitação, sendo os maiores deslocamentos ( $\sim 20$  nm) observados para a amostra dotada de NPCs com os maiores tamanhos.

Segundo os autores, a presença de átomos de oxigênio em combinação com moléculas aromáticas conjugadas é responsável pela emissão de fluorescência das NPCs, de modo que, diferentes graus de oxidação conduzem a comportamentos de emissão distintos. Desta forma, como o grau de oxidação é maior em NPCs com diâmetros maiores, há maior deslocamento dos máximos de emissão para maiores comprimentos de onda e quanto mais ampla a distribuição de tamanhos das NPCs na amostra mais perceptível o deslocamento batocrômico.

As NPCs que apresentaram emissão de fluorescência na cor verde foram testadas como marcadores biológicos, utilizando células de câncer de fígado humano (HepG2). As imagens obtidas revelaram que as NPCs foram internalizadas sem atingir o núcleo das células, sendo a fluorescência verde observada apenas na região do citoplasma das células. Além disso, após 72 h de ensaio, os autores concluíram que não houve citotoxicidade considerável, o que sugere a viabilidade das NPCs.

Yang, Li e Wang (2011) utilizaram glucosamina-HCl como precursor para a preparação de NPCs por HTC. As NPCs apresentaram morfologia quasi-esférica, boa dispersividade em água e diâmetros entre 15 e 70 nm e estrutura dotada de domínios cristalinos e amorfos. Como a glucosamina apresenta um grupo amina em sua composição química, análises por Espectroscopia Raman, FTIR e XPS indicaram a presença de aminas aromáticas e ligações C-N na estrutura das NPCs, além dos grupos hidroxila e carboxila esperados.

Fluorescência na cor verde foi observada para as NPCs sob luz ultravioleta (365 nm), cujo máximo de emissão não desloca significativamente com a variação do comprimento de onda de excitação. Segundo os autores, tal comportamento é resultado da passivação da superfície das NPCs, ou seja, da modificação da superfície do material pelos grupos nitrogenados da glucosamina, que criam sítios de defeitos adicionais àqueles formados pelos grupos oxigenados. Tais sítios consistem em diferentes armadilhas para a energia de excitação e, em conjunto, causam a redução do deslocamento batocrômico.

Como observado nos trabalhos supracitados, os parâmetros de reação impactam diretamente no comportamento e no rendimento quântico da fotoluminescência das NPCs e diferentes mecanismos são sugeridos na tentativa de entender, melhorar e ajustar a emissão para aplicações específicas.

Embora bastante celebrada, a fotoluminescência das NPCs ainda não tem origem esclarecida (CHEN *et al.*, 2013; DING *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2012a; LIM; SHEN; GAO, 2015; VAZ *et al.*, 2015; YAN *et al.*, 2013; YANG; LI; WANG, 2011). A hipótese mais difundida e aceita é a existência de armadilhas emissivas na superfície das NPCs, inseridas pela passivação destes materiais carbonáceos. Outro possível mecanismo bastante discutido é a emissão por domínios  $\pi$  conjugados.

A superfície da NPC, quando dotada de grupos funcionais oxigenados ou de outras espécies químicas é dita passivada ou funcionalizada, uma vez que tais grupos dão funcionalidade ao material carbonáceo. A existência destes grupos na superfície das NPCs gera defeitos que funcionariam como armadilhas de energia ou centros de captura de éxcitons, que criam estados de superfície responsáveis pela fotoluminescência por recombinação radiativa (DING

*et al.*, 2016). A existência destes grupos funcionais na superfície das NPCs insere níveis de energia entre o mais alto orbital molecular ocupado (HOMO) e o mais baixo orbital molecular desocupado (LUMO) dos estados C=C do núcleo das NPCs, de modo que, quanto mais grupos funcionais, menor o gap de energia entre estes orbitais (DING *et al.*, 2016; SAHU *et al.*, 2012; VAZ *et al.*, 2015). Este mecanismo explica o comportamento de dependência do comprimento de onda de emissão com o comprimento de onda de excitação, geralmente observado para a emissão das NPCs. Quanto maior a quantidade e a variedade de grupos funcionais na superfície maior é o deslocamento batocrômico da emissão, uma vez que diferentes espécies químicas inserem diferentes defeitos na superfície. Da mesma forma, uma grande quantidade de grupo funcionais semelhantes poderia conduzir a uma emissão independente da excitação (CHEN *et al.*, 2013; DING *et al.*, 2016; SHEN *et al.*, 2013; VAZ *et al.*, 2015).

O segundo mecanismo diz respeito a transições  $\pi$ - $\pi^*$  em domínios hibridizados  $sp^2$  isolados, ou clusters. Segundo Li *et al.* (2012b), a existência destes pequenos clusters dentro de uma matriz  $sp^3$  de carbono e oxigênio cria estados de energia fortemente localizados, que geram gaps de energia responsáveis por emissões na cor azul. Estes gaps dependem do tamanho, da forma, dos defeitos, da composição e da quantidade de domínios  $sp^2$ , o que conduz a emissões também dependentes do comprimento de onda de excitação (EDA *et al.*, 2010; SANTIAGO *et al.*, 2016).

#### 1.4 Imobilização de biomoléculas em materiais

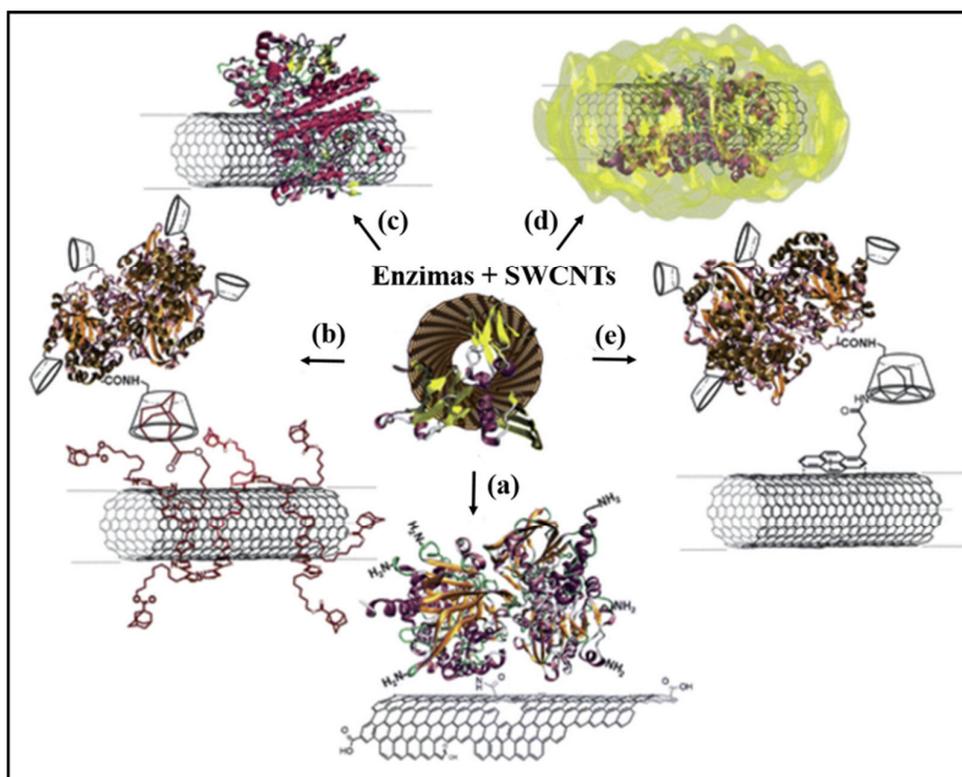
A imobilização de biomoléculas (ex: proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, fármacos) em materiais e partículas é um procedimento fundamental para o desenvolvimento de pesquisas em biotecnologia e biomedicina, em especial para a construção de biodispositivos e biocatalisadores. Além disso, o ancoramento de biomoléculas em materiais é uma alternativa para aperfeiçoar propriedades, tanto do suporte quanto da biomolécula suportada. Considerando as enzimas, por exemplo, sua imobilização constitui um modo de superar problemas como estabilidade, manipulação e, até mesmo, descarte (BENEŠOVÁ; KRÁLOVÁ, 2012; SHELDON; VAN PELT, 2013). Por outro lado, para substratos, como, por exemplo, os nanotubos de carbono, a modificação da superfície com a biomolécula pode melhorar sua dispersão em água e promover a redução de sua citotoxicidade (CALVARESI; ZERBETTO, 2013; VARDHARAJULA *et al.*, 2012).

Contudo, a preservação das propriedades fundamentais do substrato e da biomolécula após a imobilização constitui um desafio, uma vez que, pelas metodologias existentes não

há como garantir que modificações estruturais e estereoquímicas da biomolécula, bem como a aglomeração do substrato, se for particulado, não ocorram durante o processo de conjugação.

As diferentes metodologias de imobilização envolvem ligações covalentes (ex: amidação, interações através de moléculas ligantes intermediárias), não-covalentes (ex: adsorção por forças de van de Waals, interações eletrostáticas e hidrofóbicas) e/ou encapsulamento (FIGURA 8).

Figura 8 – Estratégias de imobilização de enzimas em nanotubos de carbono de paredes simples (SWCNTs). (a) ligação covalente via acoplamento amida com grupos ácidos carboxílicos de nanotubos oxidados; (b, e) imobilização via interações sobre nanotubos funcionalizados com diferentes moléculas ligantes; (c) adsorção de enzimas em nanotubos via interações eletrostáticas e hidrofóbicas; (d) aprisionamento de enzimas em matriz polimérica formada em torno dos nanotubos.



Fonte: adaptada de Oliveira *et al.* (2015).

A imobilização por ligação covalente apresenta a vantagem de gerar sistemas mais estáveis, limitando ou evitando a lixiviação de seus componentes, por exemplo (BENEŠOVÁ; KRÁLOVÁ, 2012; ELNASHAR, 2010). Em geral, as metodologias baseadas neste tipo de interação requerem a modificação da superfície do material, de modo a gerar espécies químicas que permitam a formação das ligações químicas desejadas. Contudo, as condições experimentais exigidas para esse processo podem afetar a estrutura e as propriedades da biomolécula e do

substrato. Este problema é minimizado com a imobilização de espécies ativas por interações não-covalentes. Metodologias baseadas neste tipo de interação são simples, rápidas e de menor custo, em comparação às covalentes, uma vez que tais interações podem ser promovidas sem o uso de reagentes químicos capazes de impactar na estrutura do adsorbato e do adsorvente. Entretanto, interações não-covalentes são baseadas em ligações fracas e de curto alcance, o que pode causar a instabilidade dos conjugados frente à diferentes condições físico-químicas.

Uma vasta gama de biomoléculas, em especial as enzimas, é explorada em procedimentos de imobilização, visando, principalmente, a construção de biossensores, biocatalisadores e para a remediação ambiental (BHAKTA *et al.*, 2015; BILAL *et al.*, 2016; ENSUNCHO; ALVAREZ-CUENCA; LEGGE, 2005; EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015; KAUSHIK *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2015).

Em relação aos substratos, materiais de carbono constituem alternativas atrativas para atuação como suportes para biomoléculas, tendo em vista a abundância do carbono na natureza que permite a obtenção de materiais carbonáceos de diferentes fontes de carbono e diferentes metodologias de preparação.

Devido às suas dimensões semelhantes àquelas das biomoléculas, como proteínas e DNA, sistemas híbridos nanomateriais-biomoléculas são estruturalmente compatíveis e apresentam-se muito atrativos para o desenvolvimento de biodispositivos que integrem as propriedades eletrônicas, ópticas e catalíticas singulares dos nanomateriais com a capacidade de reconhecimento, inibição e catálise das biomoléculas (KATZ; WILLNER, 2004). Desta forma, nanocarbons, como nanotubos (NAGARAJU; REDDY; REDDY, 2015), grafeno (YANG *et al.*, 2013) e C-dots (DING; ZHU; TIAN, 2014) são amplamente explorados em estudos de interação com biomoléculas devido às suas propriedades ópticas e eletrônicas singulares resultantes do confinamento quântico.

Alguns nanomateriais apresentam limitadas aplicações em meios biológicos por possuírem estruturas muito estáveis quimicamente e que dificultam processos fundamentais para aplicações biológicas, como a dispersão em solventes. Nanomateriais de carbono com estrutura hibridizada  $sp^2$ , tais como os nanotubos e o grafeno, são exemplos de nanomateriais de baixa reatividade e que necessitam ser modificados para tornarem-se mais reativos e reduzir sua hidrofobicidade (HAN *et al.*, 2016; NAGARAJU; REDDY; REDDY, 2015; SOUZA FILHO; FAGAN, 2007; VARDHARAJULA *et al.*, 2012).

Segundo Lynch e Dawson (2008) é quase uma regra universal que um material seja coberto por proteínas, logo após o contato com um ambiente fisiológico. Desta forma, como são as biomoléculas mais abundantes da matéria-viva e exercem grande variedade de funções

celulares, o estudo da imobilização de proteínas em materiais pode também auxiliar no entendimento de possíveis interações que possam ocorrer quando da inserção de materiais em meio biológico em diferentes condições.

Na literatura são encontrados muitos estudos relatando a imobilização de proteínas a materiais de carbono. Como exemplos, têm-se os trabalhos de Jiang *et al.* (2004) sobre o ancoramento da proteína albumina de soro bovino à nanotubos de carbono de paredes múltiplas, de Awasthi, Singh e Singh (2009), no qual albumina de soro bovino e DNA foram anexados à nanotubos de carbono de paredes múltiplas modificados com grupo amina, além do trabalho de Zhou *et al.* (2012), onde óxido de grafeno foi funcionalizado com a enzima glicose oxidase e a lectina ConA. No caso das partículas carbonáceas esféricas, podem-se citar os trabalhos de Wang *et al.* (2011), no qual é relatada a imobilização da enzima  $\alpha$ -quimotripsina e Muthukumar *et al.* (2014), em que a albumina de soro bovino é imobilizada. Em ambos os trabalhos, as proteínas são imobilizadas por adsorção.

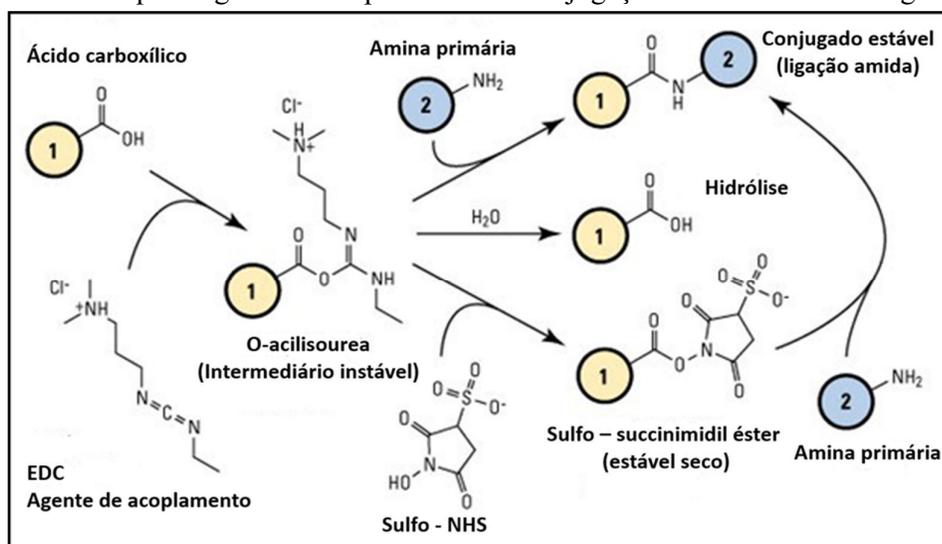
#### ***1.4.1 Metodologias de imobilização covalente e não-covalente entre biomoléculas e materiais***

Como mencionado anteriormente, existem diferentes metodologias para a imobilização de biomoléculas em materiais, as quais são classificadas de acordo com o tipo de interação que privilegiam. Mais comumente, as estratégias visam estabelecer ligações covalente e não-covalente específicas entre as biomoléculas e os suportes, através da interação entre espécies químicas reativas em cada um dos materiais. Entretanto, o procedimento mais adequado a ser utilizado dependerá, ainda, de fatores como tamanho, morfologia, estrutura, química de superfície, estabilidade e dispersividade dos materiais, além da finalidade proposta para o bioconjugado gerado (SAPSFORD *et al.*, 2013).

Ligações covalentes podem ser promovidas pelo contato direto da superfície do suporte com a biomolécula ou pela inserção de espécies químicas que atuam como conectores entre as biomoléculas e a superfície do material. Na primeira possibilidade, geralmente, a interação ocorre por ligação covalente dativa (ou covalente coordenada) entre os átomos na superfície da nanopartícula e da biomolécula. Entretanto, este tipo de ligação não é muito estável e pode ser desestabilizada por variações de pH e oxidação, por exemplo (SAPSFORD *et al.*, 2013). A segunda estratégia consiste em promover a ligação entre os dois materiais por meio de uma espécie química intermediária, que pode ser uma molécula reativa bifuncional (*cross-linking*) ou um grupo funcional gerado através da modificação da superfície do suporte. No primeiro caso, a molécula intermediária tem uma de suas extremidades ligada ao substrato,

enquanto a outra extremidade estabelece a ligação covalente com a biomolécula (FIGURA 8e). No segundo caso, agentes de acoplamento são utilizados de modo a gerar grupos na superfície do suporte, os quais permitam ou facilitem a imobilização da biomolécula (FIGURA 8b). A formação de ligação amida, pela ativação de grupos carboxílicos na superfície do suporte para a ligação com grupos amina da biomolécula, é um exemplo clássico deste tipo de interação (FIGURA 9).

Figura 9 - Esquema da reação de amidação por carbodiimida (EDC). As substâncias (1) e (2) podem ser peptídeos, proteínas ou qualquer espécie química que tenha grupos carboxilato e aminas primárias. Quando são peptídeos ou proteínas, essas moléculas são dezenas a milhares de vezes maiores que o agente de acoplamento e a conjugação ocorre como no diagrama.



Fonte: adaptada de Thermo Scientific Pierce (2012).

Esta metodologia, geralmente denominada amidação, baseia-se na ativação de grupos carboxílicos, presentes na estrutura do material, por meio dos agentes de acoplamento, convertendo-os em funções que reagirão de forma mais efetiva com os grupos amina na estrutura da biomolécula, através da formação de ligações amida.

Muito comumente, o agente de acoplamento consiste em uma carbodiimida, grupo orgânico caracterizado pela ligação  $RN=C=NR$ , como o cloreto de N-etil-N-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC ou EDC) e o N,N-diciclohexil-carbodiimida (DCC). Estes agentes reagem com ácido carboxílico para gerar o éster O-acilisourea que se liga com a amina da biomolécula. Entretanto, segundo Jiang *et al.* (2004), esta metodologia promove muitas reações intermoleculares indesejadas, uma vez que a carbodiimida pode, também, ativar os grupos carboxílicos presentes na estrutura da biomolécula e estes reagirem com as aminas livres na própria biomolécula. Além disso, o éster O-acilisourea é um intermediário instável.

Uma alternativa para evitar este problema é utilizar os compostos químicos N-hidroxisuccinimida (NHS) ou N-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS), que geram ésteres mais estáveis, o succinimidil éster ou o sulfo-succinimidil éster, respectivamente. Estes reagirão com a amina na estrutura da biomolécula, formando uma ligação amida.

Em relação às interações não covalentes, a mais comum e simples de ser promovida é a conjugação por interação eletrostática. Neste caso, é necessário, apenas, garantir que a nanopartícula e a biomolécula tenham grupos funcionais de cargas opostas.

Nesta Tese, a interação eletrostática foi uma das metodologias escolhidas para promover a interação entre micro e nanopartículas de carbono e a lectina ConBr. A carga elétrica superficial das partículas e da lectina, no pH do meio de interação, foi obtida por meio de medidas de potencial zeta. Em contrapartida, como estratégia de ligação covalente utilizou-se nesta Tese a metodologia de amidação ativada por carbodiimida baseada naquelas descritas nos trabalhos de Jiang *et al.* (2004) e Zhou *et al.* (2012).

### 1.5 Lectinas: A ConBr

Lectinas são proteínas de origem não imune, capazes de reconhecer e se ligar a estruturas de carboidratos específicas (DE SCHUTTER; VAN DAMME, 2015). Estas proteínas são encontradas amplamente na natureza, em microrganismos, animais e plantas (CAVADA *et al.*, 2001; FAHEINA-MARTINS *et al.*, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2012).

As lectinas mais estudadas são aquelas de origem vegetal, principalmente, as da família *Leguminosae*, as quais possuem a destacada propriedade de aglutinar eritrócitos e, algumas, podem até distinguir entre seus diferentes tipos (SHARON; LIS, 2004). Entretanto, sua função nas plantas não está bem esclarecida, sendo hipoteticamente atribuída à participação nos mecanismos de defesa e na simbiose microrganismo-planta (CAVADA *et al.*, 2001; MOREIRA *et al.*, 1991).

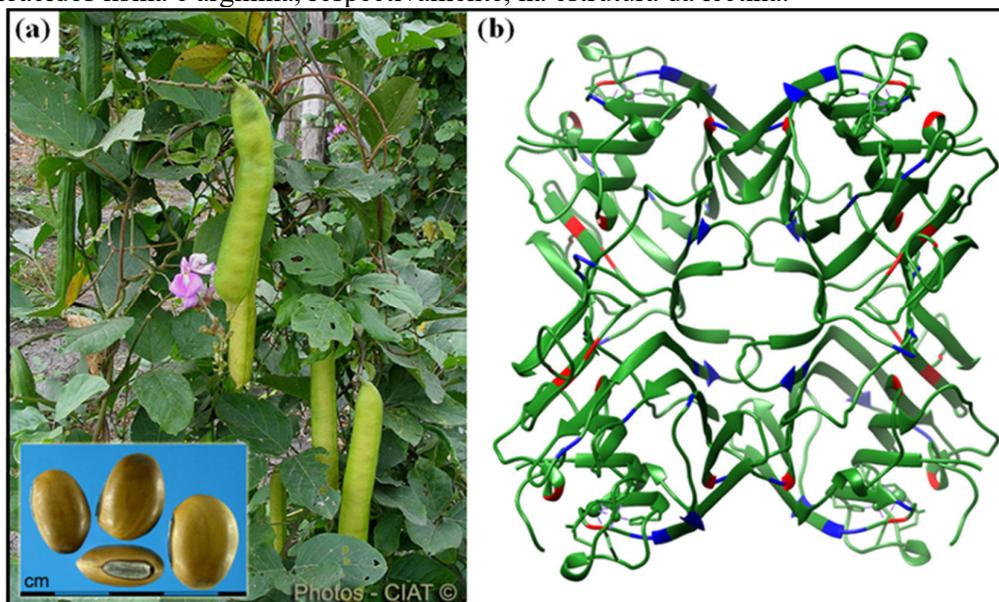
Lectinas em geral, podem ser usadas para diagnóstico de tumores, uma vez que há diferenças entre os perfis de glicosilação de células malignas e benignas e seu grau está relacionado à metástase. Além disso, estas proteínas apresentam propriedades que inibem a proliferação de células cancerosas, observadas *in vitro* e *in vivo*. Para esta abordagem destacam-se as lectinas de plantas que apresentam propriedades antitumorais mais destacadas, como, por exemplo, a indução de apoptose e autofagia de células cancerosas pela lectina Concanavalina A (FAHEINA-MARTINS *et al.*, 2012).

As lectinas são encontradas em quase todas as plantas comestíveis (MOREIRA *et*

*al.*, 1991). A Concanavalina-Br (ConBr) é encontrada em sementes de *Canavalia Brasiliensis*, ou feijão bravo do Ceará (FIGURA 10a). Esta lectina pertence à subtribo *Diocleinae*, da família *Leguminosae*, e possui afinidade pelos açúcares glicose e manose. Seu monômero é formado por 237 aminoácidos e os íons metálicos  $Mn^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ , os quais compõem o sítio de ligação da lectina com os carboidratos. A presença dos íons na estrutura da lectina é essencial, uma vez que, embora não interajam com os carboidratos, eles mantêm a estrutura em configuração ideal para a interação (CAVADA *et al.*, 2001).

A estrutura da lectina ConBr pode adquirir conformações dimérica (2 monômeros de 25,5 kDa) ou tetramérica (FIGURA 10b) de acordo com o pH do meio no qual está inserida. O equilíbrio entre estas duas configurações ocorre no intervalo de pH 5,0 a 8,5, com o número de tetrâmeros aumentando de acordo com o aumento do pH (GRANGEIRO *et al.*, 1997; NASCIMENTO *et al.*, 2010). O ponto isoelétrico teórico desta lectina encontra-se no pH 5,84 (ExPASy: SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS RESOURCE PORTAL, 2016).

Figura 10 - (a) Vagens e sementes de *Canavalia Brasiliensis* ou feijão bravo do Ceará. (b) Estrutura tridimensional do tetrâmero da lectina ConBr. As cores azul e vermelha destacam os aminoácidos lisina e arginina, respectivamente, na estrutura da lectina.



Fonte: (a) Cook *et al.* (2005); (b) adaptada de Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (1997).

É possível citar vários exemplos de trabalhos científicos em que foram determinadas diferentes atividades biológicas da lectina ConBr (TABELA 1). Desta forma, é possível afirmar que esta é uma proteína bastante investigada e caracterizada, com várias vias de administração já estudadas em bioensaios *in vivo* (oral, intravenosa, etc.). Além disso, ela possui

maior potencial de ação em relação às atividades biológicas que outras lectinas já estudadas. Todos estes aspectos influenciaram em sua escolha para o estudo das interações com as micro e as nanopartículas carbonáceas investigadas nesta Tese.

Tabela 1 - Exemplos de atividades biológicas determinadas para a lectina ConBr.

<b>Atividade biológica da lectina ConBr</b>	<b>Referência</b>
Indução <i>in vitro</i> da proliferação de linfócitos com a produção de interferon- $\gamma$	Barral-Netto <i>et al.</i> (1992)
Indução de edema de pata	Bento <i>et al.</i> (1993)
Indução de apoptose celular	Barbosa <i>et al.</i> (2001)
Efeito antidepressivo em ratos	Barauna <i>et al.</i> (2006)
Indução da síntese de proteases durante a cicatrização de lesões cutâneas em camundongos	Silva <i>et al.</i> (2009)

Fonte: elaborada pela autora.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Preparar micro e nanopartículas de carbono, utilizando a metodologia de carbonização hidrotérmica, e promover suas respectivas interações com a proteína extraída das sementes de *Canavalia Brasiliensis* (lectina ConBr), de modo a gerar sistemas híbridos nos quais a atividade biológica da lectina seja mantida.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Sintetizar micro e nanopartículas de carbono através da carbonização hidrotérmica de glicose;
- b) Purificar as nanopartículas de carbono coloidais e determinar a concentração de material carbonáceo disperso antes e após o processo de purificação;
- c) Promover interação covalente entre as micro e as nanopartículas de carbono e a lectina ConBr, através da metodologia de amidação ativada por carbodiimida;
- d) Promover interação não covalente entre as micro e as nanopartículas de carbono e a lectina ConBr, através de metodologia de adsorção;
- e) Caracterizar as propriedades físicas e químicas das micropartículas de carbono e dos sistemas gerados pelas interações com a lectina ConBr.
- f) Caracterizar propriedades físicas e químicas das nanopartículas de carbono e dos sistemas gerados pelas interações com a lectina ConBr.
- g) Avaliar a estabilidade das nanopartículas de carbono quanto ao tempo de acondicionamento, variação de pH e dispersão em soluções salinas (tampão fosfato salino (PBS) e soro fisiológico - NaCl 0,9%);
- h) Avaliar o efeito de variação do pH e da purificação por diálise sobre a fotoluminescência das nanopartículas de carbono;
- i) Avaliar a atividade de hemaglutinação da lectina ConBr quando imobilizada sobre as micro e as nanopartículas de carbono;
- j) Avaliar a toxicidade das nanopartículas de carbono através de bioensaio com o modelo experimental *Artemia salina*.

### 3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

#### 3.1 Reagentes e materiais

Os reagentes D(+)glicose anidra (dextrose), ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico (MES), N-hidroxisuccinimida (NHS), hidrocloreto de 1-etil-3-[3-dimetil-amino-propil] carbodiimida (EDAC), hidróxido de sódio (NaOH), cloreto de sódio (NaCl) e tampão fosfato salino (PBS) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. O hipoclorito de sódio (NaClO) foi adquirido da empresa Vetec.

A lectina ConBr foi fornecida pelo Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (Biomol - Lab) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Todos os procedimentos foram realizados utilizando água ultrapura. Para as filtrações foram utilizadas membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF), Merck Milipore, dotada de poros com 0,22  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Os procedimentos de diálise foram realizados utilizando membranas de celulose regenerada (celulose natural reconstituída de fibras de algodão) Spectra/Por® 7, com poros de peso molecular de corte (MWCO) de 1 kDa.

#### 3.2 Preparação das micro e nanopartículas de carbono

##### *3.2.1 Preparação das micro e nanopartículas de carbono através da carbonização hidrotérmica de glicose*

Para a carbonização hidrotérmica, primeiramente, a glicose e a água ultrapura foram pesadas em balança semianalítica (modelo AUW220D da Shimadzu) (TABELA 2). Em seguida, a glicose foi dissolvida na água ultrapura com auxílio de bastão de vidro. A solução homogênea gerada teve seu pH determinado (pHmetro modelo Q-400AS da Quimis) e foi transferida para um copo de Teflon®, de volume igual a 55,0 mL, o qual foi inserido em um reator de aço inox (autoclave) (FIGURA 11).

As reações de carbonização hidrotérmica de glicose foram promovidas em forno mufla (forno mufla microprocessado 7000 – 10P da EDG), à  $180 \pm 5$  °C por diferentes tempos predeterminados (TABELA 2). O reator foi inserido no forno ainda frio e este foi aquecido com velocidade de 10 °C/min. A contagem do tempo de reação iniciou-se após atingida a temperatura desejada.

Ao fim dos tempos reacionais estipulados, o reator resfriou dentro do forno até que este indicasse 150-100 °C, quando foi retirado e submetido à banho de gelo.

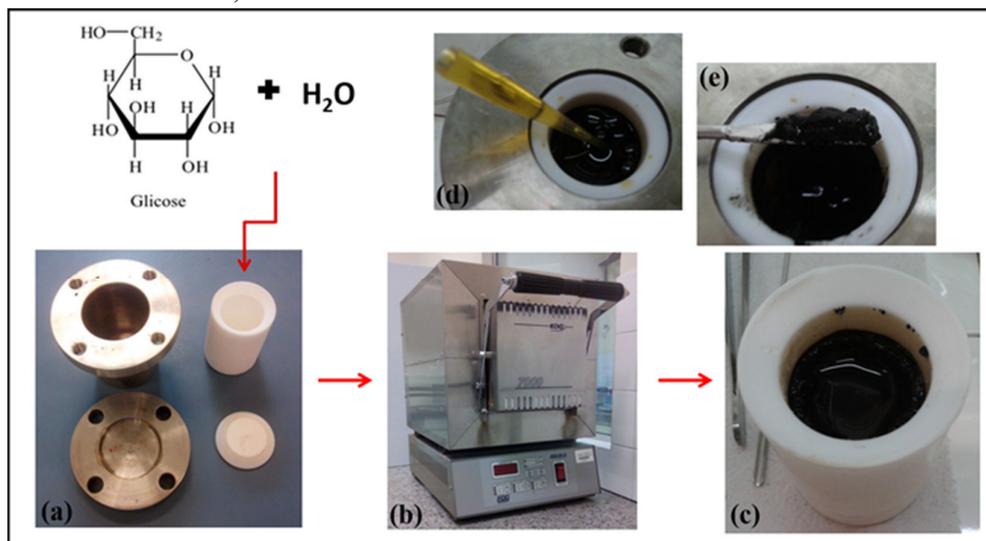
As amostras obtidas foram filtradas em sistema de filtração de vidro sob vácuo (bomba de vácuo modelo TE – 058 da Tecnal) (FIGURA 12). Esta etapa foi realizada de modo a separar a amostra em fase sólida (micropartículas) daquela em fase coloidal (nanopartículas) (FIGURA 12).

Tabela 2 - Relação de experimentos de carbonização hidrotérmica de glicose e as respectivas variações de parâmetros reacionais.

Amostras	Experimentos	Parâmetros reacionais		
		Massa de glicose (g)	Massa de água (g)	Tempo de reação (h)
Micropartículas de carbono	Reação I	4,0000	35,0000	12
	Reação II	4,0000	35,0000	24
	Reação III	4,0000	35,0000	48
Nanopartículas de carbono	Reação I	4,0000	35,0000	24
	Reação II	4,0000	35,0000	4
	Reação III	2,0000	35,0000	4
	Reação IV	1,0000	35,0000	4
	Reação V	0,5000	35,0000	4
	Reação VI	0,2000	35,0000	4

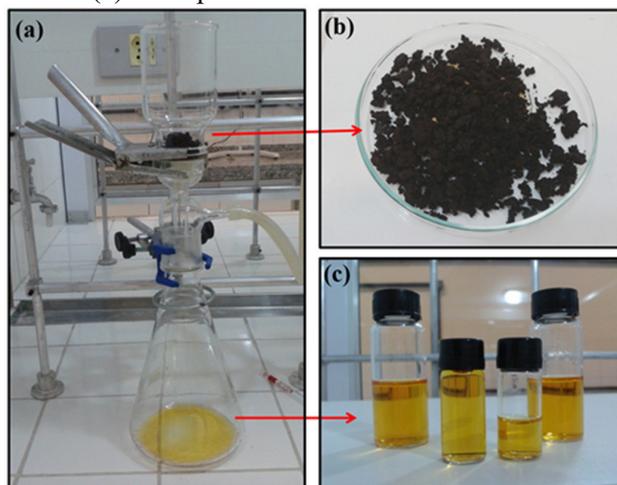
Fonte: elaborada pela autora.

Figura 11 - Preparação de micro e nanopartículas de carbono por carbonização hidrotérmica de glicose. (a) Reator de aço inox (autoclave) e copo de Teflon e (b) Forno mufla utilizado para as preparações; (c) Aspecto da amostra obtida por carbonização hidrotérmica de 4,0000 g de glicose à 180 °C, logo após a abertura do reator. É possível verificar que a amostra é constituída por materiais em fases (d) coloidal (nanopartículas de carbono) e (e) sólida (micropartículas de carbono).



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 12 - Separação das fases da amostra obtida por carbonização hidrotérmica de 4,0000 g de glicose à 180 °C, por 24 h. (a) Sistema de filtração à vácuo no momento da filtração. (b) Micropartículas de carbono (c) Nanopartículas de carbono coloidais.

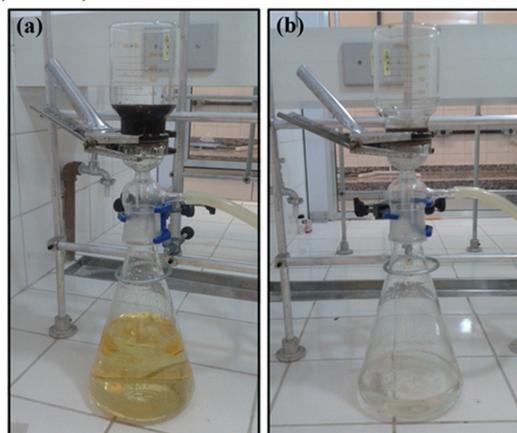


Fonte: elaborada pela autora.

### 3.2.2 Micropartículas de carbono: lavagem e secagem

As amostras na fase sólida, isto é, as micropartículas de carbono, foram lavadas no mesmo sistema usado para as filtrações. Com auxílio de pipeta Pasteur foram adicionadas porções de água ultrapura até que o filtrado se tornasse incolor (FIGURA 13) e o seu pH atingisse valor entre 6,00 e 7,00. A quantidade de água utilizada para as lavagens variou entre 3,0 e 7,5 litros a depender dos parâmetros reacionais da carbonização hidrotérmica.

Figura 13 - Lavagem das micropartículas de carbono obtidas por carbonização hidrotérmica de 4,0000 g de glicose à 180 °C, por 24 h, utilizando água ultrapura no mesmo sistema em que a amostra “como sintetizada” fora filtrada. (a) Início da lavagem: filtrado de cor amarela e com pH ácido, indicativos da presença de resíduos de carbonização. (b) Fim da lavagem: filtrado incolor e com pH entre 6,00 e 7,00.



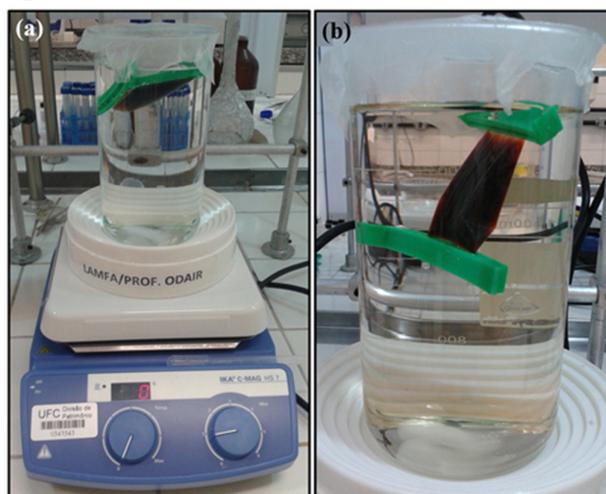
Fonte: elaborada pela autora.

Após as lavagens, as micropartículas foram submetidas à secagem em estufa (modelo 3 da Med Clave) à  $70 \pm 10$  °C. Os procedimentos de secagem foram acompanhados por pesagens, as quais determinaram o término do processo quando indicaram massa constante para as amostras. Por fim, as micropartículas de carbono foram acondicionadas a temperatura ambiente.

### 3.2.3 Nanopartículas de carbono: purificação por diálise

As suspensões coloidais de nanopartículas de carbono foram purificadas através de diálise, a fim de eliminar subprodutos do processo de carbonização hidrotérmica coexistentes com as nanopartículas de carbono nas amostras. Para os procedimentos, primeiramente, uma das extremidades da membrana foi selada com prendedor apropriado de Nylon® e, em seguida, a amostra foi inserida na membrana com auxílio de pipeta graduada. Por fim, a outra extremidade da membrana também foi selada e esta foi mergulhada em água ultrapura (volume igual a 100 vezes o volume da amostra na membrana) (FIGURA 14).

Figura 14 - Purificação das nanopartículas de carbono por diálise. (a) Aparato utilizado para realizar os procedimentos de diálise. Após adicionar a amostra na membrana, esta foi inserida em bquer com água ultrapura e o procedimento ocorreu sob agitação branda, com auxílio de agitador magnético. (b) Imagem mais detalhada da amostra dentro da membrana fechada nas duas extremidades por prendedores de Nylon®.



Fonte: elaborada pela autora.

Os processos de diálise ocorreram sob agitação magnética (agitador magnético modelo C-MAG HS 7 da IKA) branda e variaram entre 24 e 48 h. Os progressos foram acompanhados através de espectros de absorção na região do ultravioleta/visível de alíquotas do meio

aquoso externo à membrana, observando a redução na intensidade da banda de absorção em 285 nm, característica das amostras coloidais “como sintetizadas”.

### ***3.2.4 Determinação dos teores de sólidos dispersos nas suspensões coloidais de nanopartículas de carbono***

Este procedimento foi realizado com o objetivo de determinar a concentração de nanopartículas de carbono em mg/mL nas suspensões coloidais de nanopartículas de carbono antes e após o processo de purificação por diálise. A informação consiste em parâmetro importante para a avaliação da efetividade do processo de diálise, bem como é indispensável para o planejamento das reações de amidação e adsorção das referidas nanopartículas com a lectina ConBr.

O procedimento foi realizado utilizando cadinhos de platina, cujo volume total é 83,0  $\mu$ L (FIGURA 15). A limpeza dos cadinhos foi realizada em duas etapas: (i) aquecimento em forno mufla, à 500 °C, durante 1 h e (ii) limpeza com algodão embebido em álcool isopropílico, a fim de retirar os resíduos restantes da etapa (i).

Figura 15 - Cadinhos de platina utilizados para o procedimento de determinação de teor de sólidos solúveis.



Fonte: elaborada pela autora.

Os cadinhos limpos foram submetidos à secagem em estufa, à 110 °C, durante, aproximadamente, 12 h. Após esfriarem em dessecador, por 30 min, foram pesados e preenchidos com 70,0  $\mu$ L de amostra. Em seguida, os cadinhos com as amostras foram inseridos na estufa (modelo TE – 394/1 da Tecnal, com circulação de ar), à 110 °C.

Em períodos de 10 em 10 min, os cadinhos foram preenchidos com mais 70,0  $\mu$ L de amostra até que o volume de amostra utilizado atingisse 350,0  $\mu$ L. Esta primeira etapa do procedimento foi realizada tanto para amostras não purificadas como para amostras purificadas. Entretanto, para as amostras purificadas o procedimento supracitado foi repetido por mais duas vezes, até que o volume de amostra nos cadinhos atingisse 1050,0  $\mu$ L.

Quando o volume final de amostra foi inserido, os cadinhos com as amostras foram pesados durante o dia em intervalos de 4 h e deixados na estufa durante a noite. No dia seguinte, os cadinhos foram pesados.

### ***3.2.5 Ensaios de estabilidade das suspensões coloidais de nanopartículas de carbono***

Para os ensaios de estabilidade, amostras coloidais preparadas utilizando os parâmetros reacionais de Reação V (TABELA 2) foram purificadas e submetidas a ensaios de estabilidade em função da variação de pH, da temperatura (estabilidade acelerada) e da diluição em soro fisiológico (solução aquosa de NaCl 0,9%) e em solução de tampão fosfato salino (PBS).

Para os ensaios de estabilidade em função do pH, a amostra foi submetida à titulação em titulador automático (MPT-2, da Malvern), utilizando solução de NaOH 0,50 mol/L. O volume total da suspensão coloidal titulada foi de 15,0 mL. A estabilidade da amostra foi avaliada, para cada valor de pH, com duas medidas de diâmetro hidrodinâmico e duas medidas de potencial zeta. Os dados utilizados para as discussões resultaram da média aritmética dos valores obtidos através destas medidas.

Os testes de estabilidade em soluções salinas de NaCl 0,9% e de PBS foram realizados a partir da diluição da amostra nas soluções previamente preparadas. A solução de NaCl foi preparada a 1,8% (m:v), com a solubilização de 1,8017 g de NaCl em 100,0 mL de água ultrapura (pH final da solução: 6,05). Já a solução de PBS foi preparada a partir da diluição 1:1 (v:v) de uma solução de PBS concentrada previamente preparada (25,0 mL) em água ultrapura (25,0 mL) (pH final da solução: 7,42). Esta solução concentrada foi preparada conforme indicado pelo fornecedor (um tablete de PBS dissolvido em 200,0 ml rende solução de 0,010 mol/L de tampão fosfato, 0,0027 mol/L de cloreto de potássio (KCl) e 0,137 mol/L de cloreto de sódio), porém, solubilizando dois tabletes de PBS em 200,0 mL de água ultrapura, com auxílio de ultrassom de banho (modelo EW 08895-49 da Cole – Parmer). Em seguida, a amostra foi diluída em cada uma das soluções salinas na proporção 1:1 (v:v) e homogeneizadas com auxílio de vortex (vortex 1 da IKA). As diluições foram acondicionadas à temperatura ambiente. A estabilidade da amostra pura e diluída nas soluções salinas foi acompanhada através de inspeção visual e por medidas dos diâmetros hidrodinâmicos durante 1 mês. Os dados utilizados para as discussões resultaram da média, fornecida pelo software do equipamento, de quatro medidas realizadas para cada tempo de acondicionamento considerado.

Para os ensaios de estabilidade acelerada, dois frascos de vidro (volume igual a 5,0 mL) foram utilizados para acondicionar 3,0 mL de amostra cada um. Após vedar os frascos

com batoque e tampa rosqueada, um deles foi inserido em estufa (modelo TE – 394/1 da Tecnal, com circulação de ar) e o outro em geladeira. A amostra na estufa foi submetida a temperatura de 50 °C durante 48 h, enquanto a amostra na geladeira foi submetida à temperatura de 4 °C, também por 48 h. Após este período, ao atingirem a temperatura ambiente, as amostras tiveram seus pHs medidos e foram submetidas a medidas de diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta.

Os resultados obtidos foram comparados com aqueles correspondentes à amostra acondicionada em bancada, à temperatura ambiente, pelo mesmo período. Os dados utilizados para as discussões resultaram das médias, fornecidas pelo software do equipamento, de quatro medidas de diâmetro hidrodinâmico e dez medidas de potencial zeta feitas para as amostras nas três condições de acondicionamento.

### **3.3 Interações com a lectina ConBr**

#### ***3.3.1 Extração e purificação da lectina ConBr***

Sementes de *Canavalia brasiliensis* foram coletadas no estado do Ceará, Brasil, descascadas e trituradas em moinho até que um fino pó fosse obtido. As proteínas solúveis foram extraídas por suspensão deste pó em uma solução de NaCl 0,15 mol/L, contendo CaCl<sub>2</sub> (cloreto de cálcio) e MnCl<sub>2</sub> (cloreto de manganês) 0,0050 mol/L cada [1:10 (m:v)], sob constante agitação por 4 h a temperatura ambiente. O extrato foi centrifugado a 10000 x g por 20 min a 4 °C e o sobrenadante (extrato total) foi aplicado em coluna cromatográfica de afinidade Sephadex® G-50 (1.3 x 19 cm), previamente equilibrada com NaCl 0,15 mol/L, CaCl<sub>2</sub> e MnCl<sub>2</sub> 0,0050 mol/L. Material não ligado foi eluído com a mesma solução e a lectina foi eluída com solução de D-glicose 0,10 mol/L (MOREIRA; CAVADA, 1984). Os eluatos coletados em frações de 3,6 mL foram monitorados por UV/Vis a 280 nm, e usados para a determinação da atividade hemaglutinante (CAVADA *et al.*, 1998) e dosagem proteica total de acordo com o protocolo descrito por Bradford (1976). As frações foram dialisadas, liofilizadas e a homogeneidade da lectina foi monitorada por SDS-PAGE. A proteína pura foi usada nos testes posteriores.

#### ***3.3.2 Preparação de lectina ConBr com isotiocianato de fluoresceína (FITC)***

A ConBr foi solubilizada em tampão bicarbonato de sódio 0,10 mol/L pH 9,00, na concentração 5,0 mg/mL, e incubada com seu açúcar específico, metil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo

(0,10 mol/L) (MaM) para bloquear os domínios de reconhecimento de carboidratos (DRCs). Em seguida, 62,5 µL de FITC foram adicionados à solução contendo a lectina com os DRCs bloqueados (1,0 mg/mL). Protegida da luz, a solução lectina-açúcar-FITC foi submetida à agitação branda por 2 h. A lectina-açúcar-FITC e o FITC não conjugado foram separados por cromatografia de exclusão molecular em coluna PD-100™. Os materiais foram eluídos com tampão fosfato de sódio 0,010 mol/L pH 7,40, contendo KCl 0,027 mol/L e NaCl 0,138 mol/L. Aliquotas de 1,0 mL foram coletadas e analisadas por UV/Vis, a 280 nm e a 495 nm. Frações coletadas (valores de absorbância maiores que 0,400) foram submetidas à diálise contra água ultrapura (8 h de diálise, 8 trocas contra água ultrapura) e, então, liofilizadas.

### **3.3.3 Preparação dos reagentes e amostras para a imobilização da lectina ConBr**

Primeiramente foram preparadas as soluções tampão MES nas concentrações, 0,10 mol/L (pHs em torno de 5,00; 5,50 e 7,00) e 0,050 mol/L (pHs em torno de 6,00 e 6,50). Para isso, o reagente MES foi pesado, utilizando um béquer como suporte, e solubilizado em água ultrapura. Sob agitação magnética, o pH das soluções geradas foi ajustado com a adição de algumas gotas de solução de NaOH 3,0 mol/L. Todas as soluções foram acondicionadas em geladeira. Os agentes de acoplamento, EDAC e NHS, não necessitaram de preparação prévia.

As micropartículas de carbono foram maceradas em almofariz de ágata e dispersas em água ultrapura ou tampão MES (1,0 mg/mL), com auxílio de ultrassom de banho, durante 10 a 20 min. Já as suspensões coloidais de nanopartículas de carbono não foram submetidas à preparação adicional.

A lectina ConBr utilizada foi solubilizada em tampão MES, em proporções m:v variadas, sob agitação branda em *shaker* (mesa agitadora modelo Q225M da Quimis), em agitador magnético e/ou mecanicamente, durante 2 a 15 min. As concentrações das soluções geradas variaram de acordo com os parâmetros reacionais considerados.

### **3.3.4 Imobilização da lectina ConBr em micropartículas de carbono**

#### **3.3.4.1 Metodologia de interação covalente: amidação ativada por carbodiimida**

Inicialmente, as micropartículas de carbono foram submetidas à esterificação. Para isso, os agentes de acoplamento, 0,1159 g de EDAC e 0,0202 g de NHS, foram solubilizados em 50,0 mL de solução tampão MES 0,10 mol/L pH 4,98. Então, as micropartículas de carbono

dispersas em 10,0 mL água ultrapura foram adicionadas à solução dos agentes de acoplamento sob agitação magnética vigorosa, assim permanecendo durante, aproximadamente, 1,33 h. Após este período, a amostra foi separada da solução por filtração, sob vácuo, utilizando membrana de PVDF com poros de 0,22 µm de diâmetro e lavada com, aproximadamente, 160,0 mL de solução tampão de MES 0,050 mol/L pH 5,92, para remover o excesso dos reagentes EDAC e NHS.

Para promover a interação por amidação, as micropartículas de carbono esterificadas e 0,0120 g de lectina ConBr foram dispersas, separadamente, em 50,0 mL de tampão de MES 0,10 mol/L pH 7,01. Tais dispersões foram misturadas com auxílio de agitação branda em *shaker* e o volume final de tampão MES foi completado até que a concentração da lectina ConBr para a reação fosse de 0,10 mg/mL. O sistema ficou sob agitação durante 17 h.

Ao fim do período de reação, o meio reacional foi centrifugado a 3000 rpm (centrífuga Excelsa II modelo 206 BL da Fanem), em etapas de 15 min, à temperatura ambiente. Estes mesmos parâmetros de centrifugação foram utilizados para a lavagem da amostra final (precipitado), com, aproximadamente, 170,0 mL de solução tampão de MES 0,050 mol/L pH 5,92, de modo a remover a lectina não ligada às micropartículas. A amostra gerada (MPCs-ConBr) foi submetida à secagem sob vácuo, até que atingisse massa constante.

#### 3.3.4.2 Metodologia de interação não covalente: adsorção

Para promover a adsorção, as micropartículas de carbono e a lectina ConBr foram dispersas, separadamente, em solução tampão de MES 0,10 mol/L pH 5,56. As micropartículas de carbono foram dispersas em 10,0 mL do referido tampão, enquanto 0,0160 g da lectina foi solubilizado em 16,0 mL do mesmo tampão. A dispersão das micropartículas de carbono foi adicionada, cuidadosamente, àquela da lectina e o sistema foi mantido sob agitação em *shaker* durante, aproximadamente, 17 h.

Após este período, a amostra gerada foi centrifugada a 3000 rpm, em etapas de 5 min, à temperatura ambiente. Em seguida, a amostra foi lavada utilizando 60,0 mL de solução tampão de MES 0,050 mol/L pH 6,58 e centrifugada a 3000 rpm, em 6 etapas de 10 min. A amostra gerada (MPCs+ConBr) foi submetida à secagem sob vácuo, até que atingisse massa constante.

O procedimento supracitado também foi utilizado para a adsorção da lectina marcada com FITC (ConBr – FITC), com a diferença de que todas as etapas foram realizadas utilizando tampão de MES 0,10 mol/L pH 5,47 e a amostra final (MPCs+ConBr-FITC) não foi

submetida à secagem, mas sim, redispersa no referido tampão e seca sobre lamínulas de vidro para avaliação da emissão de fluorescência.

### **3.3.5 Imobilização da lectina ConBr em nanopartículas de carbono**

#### *3.3.5.1 Metodologia de interação covalente: amidação ativada por carbodiimida*

Para promover a ligação covalente entre as nanopartículas de carbono purificadas e a lectina ConBr, as primeiras foram submetidas ao processo de esterificação, utilizando os agentes de acoplamento NHS e EDAC. Para isso, 0,5030 g de NHS foram solubilizados em 3,0 mL de tampão de MES 0,10 mol/L pH 5,04 e 0,0504 g de EDAC foram solubilizados em 2,0 mL do mesmo tampão. Com a amostra (15,0 mL, pH 5,41) sob agitação magnética, a solução de NHS foi acrescentada. Por fim, a solução de EDAC foi adicionada ao meio reacional, o qual ficou sob agitação durante 30 min.

Ao final da etapa de esterificação, a amostra gerada foi centrifugada a 10000 rpm (centrífuga modelo 5418R da Eppendorf), em 2 etapas de 10 min. O precipitado resultante foi redisperso em 5,0 mL de tampão de MES 0,10 mol/L pH 7,05.

A lectina ConBr foi solubilizada (0,44 mg/mL) em 5,0 mL de tampão de MES 0,10 mol/L pH 7,05 e, em seguida, a solução foi adicionada à amostra esterificada dispersa, sob agitação magnética branda. O sistema permaneceu sob agitação durante 17 h.

A amostra gerada foi centrifugada e lavada com 14,0 mL de tampão de MES 0,050 mol/L pH 6,07 a 10000 rpm, em 3 etapas de 10 min, a 4°C. A amostra final (NPCs-ConBr(I)) obtida foi redispersa no mesmo tampão de lavagem.

Outra reação de amidação entre as NPCs e a lectina ConBr foi promovida, utilizando metodologia semelhante, porém, em todas as etapas foi empregada a solução tampão de MES 0,050 mol/L pH 6,10. Além disso, antes da etapa de esterificação, a suspensão coloidal de NPCs teve o pH ajustado com a adição de 5,0 mL do referido tampão. Tal ajuste de pH foi realizado para evitar queda brusca do pH após a adição do NHS e do EDAC, uma vez que o pH da amostra utilizada nesta reação era mais baixo (pH 5,00). A amostra obtida ao final deste processo (NPCs-ConBr(II)) foi redispersa no mesmo tampão de lavagem.

#### *3.3.5.2 Metodologia de interação não covalente: adsorção*

Para a interação por adsorção, primeiramente, 2,0 mL do tampão MES 0,050 mol/L

pH 6,14 foram adicionados a 3,0 mL da amostra de nanopartículas de carbono (pH 4,99), sob agitação magnética, para ajustar o pH para a reação.

A lectina foi solubilizada em 5,0 mL de tampão de MES 0,050 mol/L pH 6,14 na concentração de 0,20 mg/mL. A solução gerada foi adicionada a suspensão de nanopartículas de carbono e mantida sob agitação branda por 18 h.

Ao fim deste período, a agitação foi interrompida e a amostra final (NPCs+ConBr) foi acondicionada em geladeira, sendo centrifugada apenas no momento do preparo para as caracterizações. As centrifugações foram realizadas a 10000 rpm, em uma etapa de 5 min, a 4 °C.

### **3.4 Ensaios para a avaliação da atividade hemaglutinante da lectina ConBr após as interações covalente e não covalente**

O preparo dos eritrócitos para os testes iniciou com a coleta do sangue de coelhos albinos, adultos e sadios da raça Nova Zelândia, criados no Biotério do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, mantidos em gaiola individual e recebendo água e ração *ad libitum*.

Os eritrócitos foram lavados com NaCl 0,15 mol/L, por meio de centrifugação a 2000 x g para a remoção do soro e do anticoagulante (heparina) utilizado na coleta. Então, com base nos procedimentos descritos por Ainouz *et al.* (1992), uma parte dos eritrócitos foi tratada com a enzima proteolítica tripsina 1% (m/v), por 1 h, e, posteriormente, lavada com NaCl 0,15 mol/L para a remoção das enzimas.

As micropartículas de carbono antes e após as interações com a lectina ConBr foram dispersas em tampão TRIS (Tris-HCl 0,050 mol/L pH 7,60, contendo NaCl 0,15 mol/L), na concentração de 2,0 mg/mL. Já as nanopartículas puras e conjugadas foram misturadas ao mesmo tampão, na proporção 1:1 (v/v).

Os ensaios para a avaliação da atividade hemaglutinante das amostras referentes às micropartículas de carbono foram realizados em tubos de ensaio, em diluições seriadas e em duplicata. Primeiramente, foram adicionados aos tubos 100,0 µL de solução tampão TRIS e, em seguida, 100,0 µL das amostras dispersas em tampão TRIS. A dispersão resultante foi diluída em série na proporção (1/2, 1/4, 1/8). Por fim, em cada tubo foram adicionados 100,0 µL de eritrócitos de coelho tripsinizados.

Para as nanopartículas de carbono, os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços com fundo “U”, contendo 50,0 µL de tampão TRIS em cada poço. As amostras (50,0

$\mu\text{L}$ ) foram adicionadas aos poços e diluídas em série na proporção (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64), em duplicata. Em seguida, 50,0  $\mu\text{L}$  de eritrócitos de coelho tripsinizados ou daqueles sem tratamento enzimático a 3% (v/v) foram acrescentados a cada diluição.

Em procedimento baseado naquele apresentado por Moreira e Perrone (1977), após a adição dos eritrócitos, os tubos e microplacas foram incubados, em repouso, por 30 min, em estufa a 37 °C. Por fim, após mais 30 min, em repouso, à temperatura ambiente, a aglutinação foi observada macroscopicamente a olho nu e em lupa ou microscópio óptico.

Com a finalidade de avaliar se o sítio de ligação da proteína à carboidratos é o responsável pelo efeito de hemaglutinação foram realizados ensaios de inibição da atividade hemaglutinante pela incubação prévia das amostras pós-interação com o carboidrato de inibição, o açúcar MaM, em estufa a 37 °C, por um período de 30 min. Em seguida, prosseguiu-se com o ensaio de hemaglutinação como descrito nesta seção.

Algumas amostras de nanopartículas de carbono puras e após interação com a lectina ConBr foram submetidas a testes de inibição da atividade hemaglutinante por temperatura. Considerando o fato de que a lectina perde sua conformação natural (desnatura) quando submetida a altas temperaturas e, desta forma, perde a capacidade de aglutinar eritrócitos, as amostras dispersas em tampão TRIS foram fervidas à 100 °C, durante 5 minutos, e, em seguida, submetidas ao ensaio de hemaglutinação, como descrito nesta seção.

Os resultados considerados para as análises foram aqueles relativos aos testes feitos com as amostras nas menores diluições.

### **3.5 Bioensaio com náuplios de *Artemia salina* para avaliação preliminar da toxicidade das nanopartículas de carbono**

A toxicidade das nanopartículas de carbono obtidas a partir da Reação II (TABELA 2), antes e após a purificação por diálise, foi avaliada através do ensaio de toxicidade contra náuplios de *Artemia salina*, em procedimento baseado naquele apresentado por Meyer *et al.* (1982).

Primeiramente, os cistos de *Artemia salina* foram postos para eclodir em água do mar artificial (1000 g de sal marinho + 28,5 L de água doce), a temperatura ambiente, sob luminosidade constante e aeração, durante 48 h. Os cistos foram incubados em placas de Linbro com 24 poços. Em cada poço foram inseridos 1,0 mL de água do mar artificial. Em seguida, nos primeiros poços foram adicionados 1,0 mL da amostra a ser avaliada e o conteúdo destes poços foi diluído seriadamente. Por fim foram inseridos 10 exemplares de náuplios de *Artemia*

*salina* e mais 1,0 mL de água do mar artificial em cada poço, de modo que as concentrações finais das amostras foram 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 µg/mL. Os bioensaios foram realizados em quintuplicatas.

Como controle negativo foram utilizados 10 exemplares de náuplios em 2,0 mL de água do mar artificial. O controle positivo diferiu do negativo pela adição de hipoclorito de sódio (NaClO) 1% (v/v).

Durante os experimentos, os náuplios foram alimentados com uma gota de suspensão de levedura seca (0,0030 g de levedura em 5,0 mL de água do mar artificial), adicionada a cada poço, incluindo controles.

Após 24 h em contato com as amostras, o número de náuplios mortos em cada poço foi contado e foram realizadas análises de Microscopia Óptica e SEM para verificar se as partículas foram realmente internalizadas pelos náuplios, através da averiguação do abdômen e guelras dos náuplios, assim como proposto por Mesarič *et al.* (2015).

### **3.6 Caracterizações físico-químicas das micro e nanopartículas**

#### ***3.6.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)***

A técnica de FTIR foi utilizada para auxiliar no entendimento da estrutura e composição das amostras, através da análise dos espectros vibracionais obtidos por Refletância Total Atenuada (ATR). As medidas foram realizadas utilizando o espectrômetro Vertex 70v, da Bruker.

Para a obtenção dos espectros, as amostras foram maceradas em almofariz de ágata e dispostas sobre o acessório Platinum ATR, dotado de um cristal de diamante de reflexão única. Os espectros foram obtidos sob vácuo, na região do infravermelho médio (4000 - 400 cm<sup>-1</sup>), com resolução de 2 cm<sup>-1</sup> e 128 *scans* de acumulação.

#### ***3.6.2 Análise Elementar CHNS***

A quantificação dos teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre nas amostras foi realizada através da técnica de CHNS, utilizando um analisador elementar da Fisons, modelo EA 1108 CHNS-O.

As análises foram conduzidas com o forno aquecido a 1020 °C, sendo o gás He, sob o fluxo de 120 mL/min, utilizado como gás de arraste.

A preparação da amostra para a medida consistiu, apenas, em maceração em almofariz de ágata.

Os resultados obtidos foram utilizados para determinar o conteúdo de oxigênio nas amostras por meio da expressão  $[100\% - (\text{wt}\%C + \text{wt}\%H + \text{wt}\%N + \text{wt}\%S)]$ .

### ***3.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)***

As imagens SEM foram utilizadas para a aquisição de informações a respeito da morfologia e da organização das micropartículas de carbono antes e após as interações com a lectina ConBr. As imagens SEM foram obtidas utilizando o microscópio Quanta 450 FEG, da FEI. Para as análises foram utilizadas voltagens entre 10 e 20 kV.

Todas as amostras analisadas foram maceradas em almofariz de ágata e dispostas sobre os porta-amostras (*stubs*) de alumínio de dois modos distintos: dispersas em água ultra-pura ou distribuídas secas sobre fita de carbono. Na primeira preparação, (i) as micropartículas de carbono foram dispersas com auxílio de ultrassom de banho, durante 3 min e (ii) as amostras geradas após as interações com a lectina foram dispersas por agitação mecânica. Após as preparações descritas, as amostras foram gotejadas diretamente nos *stubs* e submetidas à secagem em dessecador com sílica. Já na segunda preparação, a amostra macerada foi disposta diretamente sobre fita de carbono fixada ao *stub* e submetida ao processo de recobrimento com ouro.

### ***3.6.4 Difratometria de raios-X (XRD)***

A análise por XRD visou determinar a estrutura das micropartículas de carbono. Para isso, a amostra foi submetida a medidas no difratômetro D8 Advance, da Bruker, operando com 40 mA de corrente e 40 kV de tensão elétrica, utilizando radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ ) e intervalo angular de 5 a 65° ( $2\theta$ ). O passo utilizado foi de 0,02° e o tempo de aquisição de 1 s em cada passo.

A preparação da amostra para a medida consistiu, apenas, em maceração em almofariz de ágata.

### ***3.6.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)***

As imagens TEM das amostras de micropartículas de carbono obtidas foram feitas utilizando um microscópio Tecnai 20, da FEI.

As amostras foram preparadas em grades de cobre de 3 mm de diâmetro e 300 *mesh*, cobertas com filme *formvar* (0,25% polivinil formal em dicloroetano) (SAWYER; GRUBB, 1987). As amostras de MPCs foram maceradas em almofariz de ágata e dispersas em água ultrapura com auxílio de ultrassom de banho.

As NPCs foram observadas utilizando o microscópio JEM-2100, da JEOL.

Sem preparação prévia adicional, as amostras foram depositadas em grades de cobre, de 400 *mesh*, recobertas com filme de *collodion* (solução de 0,5% de nitrocelulose em acetato de amila) (SAWYER; GRUBB, 1987).

### **3.6.6 Microscopia de Força Atômica (AFM)**

Informações sobre a morfologia e topografia das amostras de nanopartículas de carbono puras e conjugadas também foram obtidas por meio de imagens AFM. Os equipamentos Nanoscope Multimode IIIa, da Digital Instruments - Veeco, e MFP – 3D – Bio, da Asylum, foram utilizados para a obtenção das imagens das amostras dispostas sobre mica.

As imagens foram obtidas utilizando ponta de silício coberta por alumínio, de raio  $28 \pm 10$  nm, no modo contato intermitente (*tapping*).

A preparação das amostras consistiu em diluição em água ultrapura ou tampão MES, em diferentes proporções, conforme a necessidade. As amostras puras diluídas foram sonicadas, em ultrassom de banho, por 5 min, na tentativa de desfazer possíveis agregados.

Após a preparação, as amostras foram gotejadas sobre mica, utilizando pipeta automática, e homogeneizadas sobre este substrato, com auxílio de *spin coater*. Após secagem a temperatura ambiente, as amostras foram analisadas.

### **3.6.7 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Espalhamento de Luz Eletroforético (ELS)**

O diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta, informações imprescindíveis para a otimização dos parâmetros de síntese, os estudos de estabilidade das nanopartículas e para auxiliar no entendimento e elucidação das possíveis interações entre os materiais carbonáceos e a lectina ConBr, foram obtidas por DLS e ELS, respectivamente, utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS, da Malvern, com laser de He-Ne com comprimento de onda de 633 nm.

Para os estudos em que foram analisadas medidas de diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta, utilizou-se cubetas de policarbonato, dotadas de eletrodos de ouro revestidos com

berílio/cobre (DTS 1060, Malvern). Para os estudos em que apenas medidas de diâmetro hidrodinâmico foram consideradas, utilizou-se cubetas de poliestireno (DTS 0012, Malvern).

Para as medidas, (i) amostras sólidas foram maceradas em almofariz de ágata e dispersas em água ultrapura ou tampão MES e (ii) amostras coloidais foram analisadas sem nenhuma preparação prévia, apenas diluídas quando necessário.

### ***3.6.8 Espectroscopia de Absorção na região do Ultravioleta/Visível (UV/Vis)***

As medidas de UV/Vis tiveram como objetivo a obtenção de informações complementares sobre a estrutura das amostras e o acompanhamento dos procedimentos de diálise. O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro Specord 250, da Analytik Jena.

Para as medidas, as amostras foram inseridas em cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. As medidas de absorção foram realizadas entre 200 a 800 nm, em intervalos de 1 ou 5 nm e velocidade de 5 nm/s.

A preparação das amostras consistiu, apenas, em diluí-las em seu respectivo solvente, conforme a necessidade.

### ***3.6.9 Espectroscopia de Fotoluminescência (PL)***

A fotoluminescência das nanopartículas de carbono foi investigada por meio da obtenção de espectros de emissão, obtidos utilizando o espectrofluorímetro QM40, da Photon Technology International.

Para as medidas, as amostras foram inseridas em cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Os comprimentos de onda de excitação utilizados foram 285, 335, 365, 385, 435 e 485 nm. A varredura foi realizada com passo de 1 nm e 0,5 s de acumulação. A largura da fenda para a entrada da radiação de excitação era de 100  $\mu\text{m}$  e daquela para a saída da radiação emitida pelas amostras era de 100  $\mu\text{m}$  ou 500  $\mu\text{m}$ .

A preparação das amostras consistiu em diluídas em água ultrapura (em diferentes proporções).

### ***3.6.10 Microscopia Óptica***

As imagens de Microscopia Óptica obtidas para avaliar a aglutinação dos eritrócitos

foram obtidas utilizando o microscópio Eclipse 80i (para interações da lectina com MPCs) e o microscópio estereoscópio SMZ800 (para interações da lectina com NPCs), ambos da Nikon.

Alíquotas dos ensaios de atividade e inibição da atividade hemaglutinante da lectina após interação com MPCs foram analisadas após serem dispostas sobre lâminas de vidro e preparadas pela técnica de esfregaço.

Para os ensaios com NPCs foram obtidas imagens aumentadas dos poços das microplacas onde os ensaios de atividade e inibição da atividade hemaglutinante da lectina foram realizados, utilizando o estereoscópio. As imagens foram feitas antes e após agitação da suspensão tampão + amostra + eritrócitos, de modo a verificar a formação, ou não, de malhas e coágulos.

### ***3.6.11 Microscopia de Varredura Laser Confocal***

Imagens de emissão de fluorescência da amostra MPCs+ConBr-FITC foram obtidas em um equipamento LSM 710, da Zeiss, dotado de laser de Argônio (488 nm).

As emissões foram capturadas no intervalo de 493 a 610 nm.

Como a amostra já estava dispersa em tampão MES 0,10 mol/L (pH 5,47), esta foi, apenas, gotejada sobre lâmina de vidro. A ConBr-FITC e as MPCs puras dispersas em tampão MES 0,10 mol/L (pH 5,47) foram utilizadas como controles positivo e negativo para fluorescência, respectivamente. O referido tampão também foi utilizado como controle negativo. Os controles também foram gotejados sobre lâminas de vidro e, após secagem em dessecador com sílica, as amostras foram analisadas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

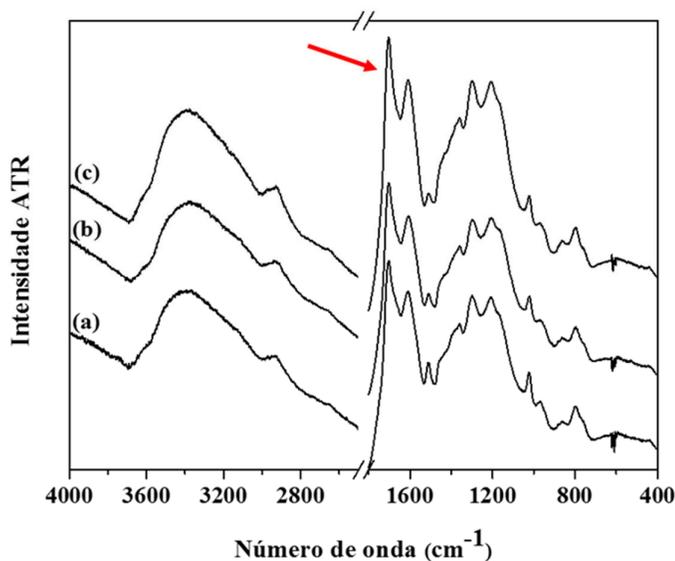
### 4.1 Micropartículas de carbono

#### 4.1.1 Propriedades físico-químicas

Como mencionado no capítulo anterior e especificado na Tabela 2, micropartículas de carbono (MPCs) foram obtidas a partir da carbonização hidrotérmica da glicose, utilizando três diferentes tempos reacionais, 12, 24 e 48 h. A escolha do melhor tempo de reação, inicialmente, seria realizada através da verificação da influência deste parâmetro sobre a massa final obtida e a formação de grupos ácidos carboxílicos na superfície das partículas. Tais grupos funcionais, essenciais para promover ligações amida com proteínas, foram verificados na estrutura das micropartículas através dos espectros FTIR.

No Gráfico 2, observa-se que os espectros apresentam perfis semelhantes e são dotados de uma banda intensa situada em torno de  $1700\text{ cm}^{-1}$  (indicada pela seta), a qual corresponde, principalmente, aos estiramentos de carbonila de ácidos carboxílicos (C=O).

Gráfico 2 - Espectros FTIR de micropartículas de carbono obtidas utilizando 4,0000 gramas de glicose para carbonização hidrotérmica à  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em diferentes tempos reacionais (a) 12 h; (b) 24 h e (c) 48 h.



Fonte: elaborado pela autora.

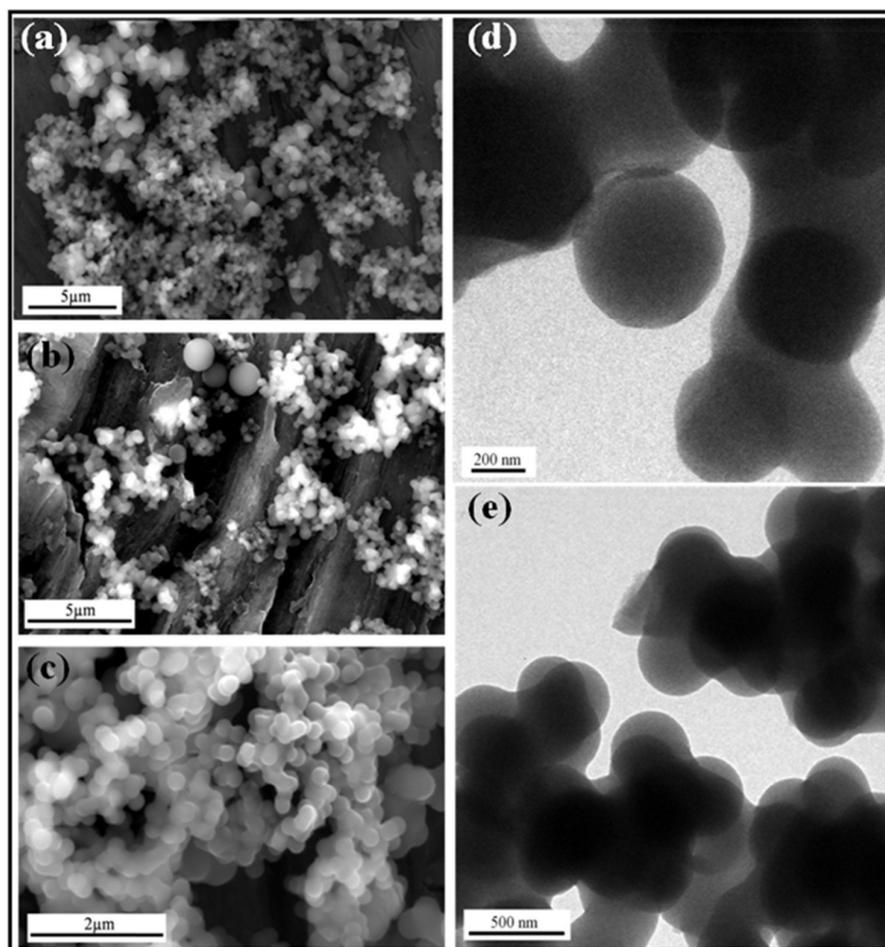
Quanto a massa final das MPCs após cada uma das reações verificou-se aumento de, aproximadamente, 0,5000 g na quantidade em função do aumento do tempo de reação. Com

os tempos reacionais de 12, 24 e 48 h recuperou-se em torno de 0,5000, 1,0000 e 1,5000 g de MPCs, respectivamente.

Desta forma, considerando o tempo da preparação (com base nos espectros FTIR) e a massa final das MPCs, o tempo de reação de 24 h foi escolhido para os estudos subsequentes, uma vez que se pode considerar este tempo de reação como moderado e a quantidade gerada de material sólido suficiente para os estudos pretendidos.

As imagens SEM e TEM, mostradas na Figura 16, revelam que o material sintetizado é constituído por partículas com morfologias esféricas e quasi-esféricas, distribuídas aleatoriamente em aglomerados ou coalescidas. A superfície das partículas mostra-se lisa, para os aumentos estudados, isto é, não apresenta nanopartículas aderidas ou revestimentos. O contraste homogêneo verificado nas imagens TEM (FIGURAS 16d, 16e), indica que as partículas são densas.

Figura 16 - Imagens SEM (a, b, c) e TEM (d, e) para as micropartículas de carbono geradas pela carbonização hidrotérmica de 4,0000 de glicose por 24 h a 180 °C.

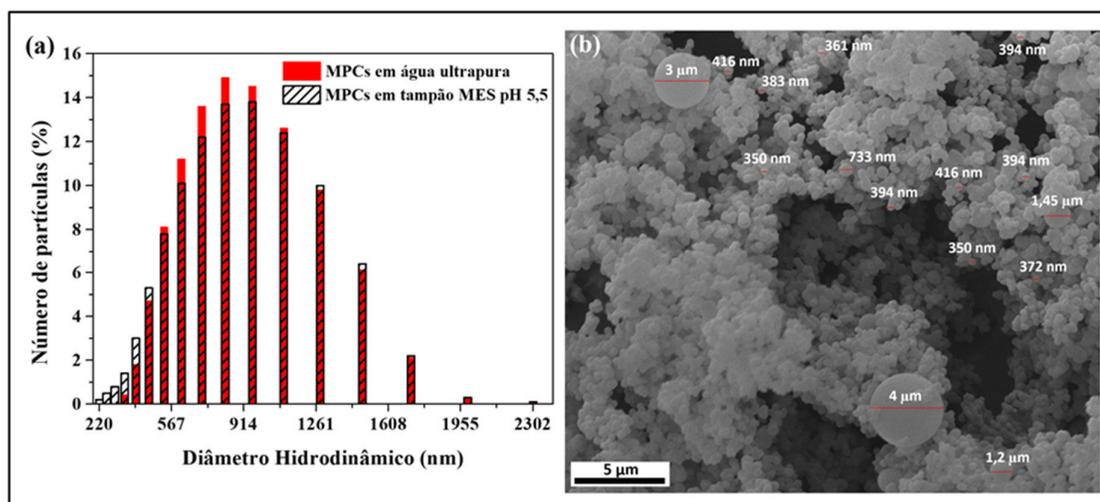


Fonte: elaborada pela autora.

Na Figura 17a, os histogramas construídos a partir das análises DLS, considerando a distribuição de diâmetro hidrodinâmico por porcentagem em número de partículas, mostram que as MPCs possuem diâmetros variando entre 220,0 nm e 2,3  $\mu\text{m}$ . Os histogramas em vermelho e em padrão listrado, referem-se às MPCs dispersas em água ultrapura e em solução tampão MES 0,10 mol/L pH 5,56, respectivamente, ambas na concentração de 1,0 mg/mL.

O diâmetro das partículas também foi estimado através da imagem SEM mostrada na Figura 17b. Verifica-se que as partículas apresentam diâmetros variados, sendo mais abundantes aquelas dotadas de diâmetros menores que 1,0  $\mu\text{m}$ . Micropartículas com diâmetros superiores a 1,0  $\mu\text{m}$  também são observadas, porém, surgem em número bastante reduzido em relação às menores.

Figura 17 - Estimativas dos diâmetros das MPCs (a) por DLS e (b) por imagem SEM. Carbonização hidrotérmica realizada com 4,0000 g de glicose a 180 °C por 24 h.



Fonte: elaborada pela autora.

Como mostrado na Tabela 3, as distribuições de diâmetro hidrodinâmico por intensidade de espalhamento de luz das MPCs em água ultrapura e em tampão de MES apresentam valor médio de 981,2 nm e 950,6 nm, respectivamente. Os índices de polidispersividade (PdI) obtidos para as MPCs nas duas dispersões são bastante próximos e indicam uma distribuição de diâmetros razoavelmente estreita.

Na Tabela 3 também estão dispostos os valores de potencial zeta das MPCs dispersas em água deionizada e em tampão MES pH 5,56. Em ambos os meios, as MPCs apresentam potencial zeta negativo. Tais resultados indicam que a superfície das MPCs é dotada de grupos funcionais negativamente carregados.

Tabela 3 - Resultados obtidos através de análises por DLS (diâmetro hidrodinâmico médio e Pdl) e por ELS (potencial zeta) das MPCs provenientes da carbonização hidrotérmica de 4,0000 g de glicose a 180 °C por 24 h.

Amostra	Diâmetro Hidrodinâmico Médio (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
MPCs em água ultrapura (1 mg/mL) pH entre 6,00 e 7,00	981,2	0,161	-40,4
MPCs em solução tampão MES 0,1 mol/L pH 5,56 (1 mg/mL)	950,6	0,159	-49,5

Fonte: elaborada pela autora.

A análise da composição química elementar CHNS (TABELA 4), revela que as micropartículas possuem carbono (C) e hidrogênio (H) em sua composição, como esperado. Considerando as porcentagens em massa calculadas para os elementos constituintes da molécula de glicose, verifica-se que no carbono hidrotérmico estes elementos apresentam-se em proporções relativas diferentes. Observa-se aumento no teor de C, de 40,00 % para 65,01%, redução do teor de H, de 6,71% para 4,51 % e, por conseguinte, de O, de 53,28% para 30,48% (o teor de oxigênio foi calculado pela diferença entre a massa total e aquelas obtidas experimentalmente para o carbono e o hidrogênio).

Tabela 4 - Teores de carbono (C), hidrogênio (H) e oxigênio (O) das MPCs e da glicose. Carbonização hidrotérmica realizada com 4,0000 g de glicose a 180 °C por 24 h.

Amostra	C [wt%]	H [wt%]	O [wt%]	H/C <sup>[b]</sup>	O/C <sup>[b]</sup>
Glicose	40,00 <sup>[a]</sup>	6,71 <sup>[a]</sup>	53,28 <sup>[a]</sup>	2,00	1,00
MPCs	65,01	4,51	30,48 <sup>[a]</sup>	0,76	0,33

Fonte: elaborada pela autora.

[a] Valores calculados. [b] Razão molar.

As razões molares H/C e O/C calculadas para as MPCs também apresentam significativa redução em relação àquelas calculadas para o seu precursor. Tais eventos sugerem, principalmente, a ocorrência de reações de desidratação da glicose, que resultam na formação de compostos furânicos, como, por exemplo, o hidroximetilfurfural (HMF), a partir dos quais é gerado o material carbonáceo após processos de polimerização e de desidratação intermolecular das cadeias polifurânicas formadas (HU *et al.*, 2010; PATRINOIU *et al.*, 2015; SEVILLA; FUERTES, 2009a; TITIRICI; ANTONIETTI; BACCILE, 2008).

Contudo, as razões molares O/C (0,33) e H/C (0,76) revelam a ocorrência de processos paralelos à desidratação, uma vez que a proporção de redução não foi exatamente 1:2, respectivamente. Assim, estes resultados também sugerem a ocorrência de desoxigenação da molécula de glicose ou dos intermediários de sua decomposição durante a HTC.

Quanto ao aumento da porcentagem em peso de carbono em relação àquela do precursor e àquelas do H e do O, Sevilla e Fuertes (2009b) afirmam que este resultado sugere que a estrutura final das MPCs possui alto grau de condensação de aromáticos. Tal fato pode ser entendido, também, como uma consequência da desidratação da glicose, que conduz à quebra das ligações C-H e O-H periféricas à cadeia principal da glicose (anel glicosídico) e, assim, à formação de ligações insaturadas. Desta forma, utilizando os dados obtidos na análise de CHNS das MPCs e considerando apenas a ocorrência da reação de desidratação da glicose, pode-se sugerir uma composição para o carbono hidrotérmico final através da equação:



onde as razões molares entre C/O e H/O foram aproximadas de 2,98 para 3 e de 2,26 para 2, de modo a permitir a elaboração da fórmula mínima para as MPCs.

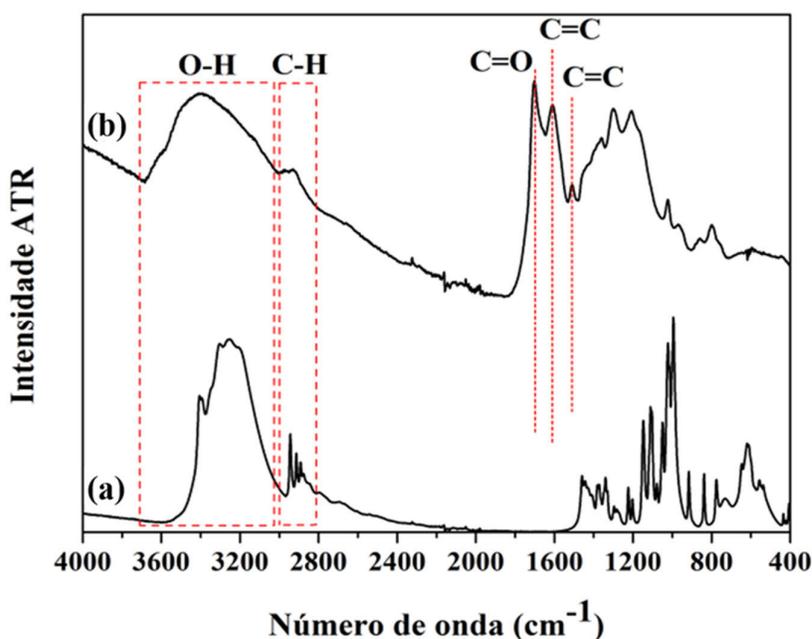
No Gráfico 3 são mostrados os espectros FTIR referentes à glicose e às MPCs. Em geral, observa-se que o perfil espectral das MPCs difere daquele da glicose. Para as MPCs na região entre 1800 e 1500  $\text{cm}^{-1}$ , são verificadas bandas características dos estiramentos C=O e C=C. Nota-se, ainda, alargamento e alteração do perfil de linha da banda referente aos estiramentos O-H, entre 3600 e 3000  $\text{cm}^{-1}$ . Mudanças drásticas também são observadas no perfil de linha das bandas atribuídas aos estiramentos C-H, entre 3000 e 2700  $\text{cm}^{-1}$ , e para os modos vibracionais na região de mais baixo número de onda (1500 a 400  $\text{cm}^{-1}$ ), correspondentes à estiramentos e deformações no plano e fora do plano das ligações C-H, C-O, O-H, C-O-C, C-O-H e C-C (PATNAIK, 2004; PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001; QI *et al.*, 2016; SEVILLA; FUERTES, 2009a; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006; WANG *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2012).

A banda larga e intensa centrada em 3396  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída aos estiramentos O-H das MPCs, indicam a presença de hidroxilas de distintas naturezas (água, álcoois, fenóis e ácidos carboxílicos). Ao contrário do observado para as MPCs, o espectro FTIR da glicose apresenta a banda atribuída aos estiramentos O-H mais estreita devido às vibrações das hidroxilas ligadas ao anel glicosídico da estrutura do carboidrato (PATNAIK, 2004; PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

Observam-se no espectro FTIR da glicose várias bandas na região entre 3000 e 2800  $\text{cm}^{-1}$  dotadas de intensidade média e mais definidas que aquelas observadas no espectro das MPCs. Tal perfil reflete as ligações dos grupos CH e CH<sub>2</sub> livres na estrutura da glicose (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006). Para as MPCs são observadas apenas duas

bandas de baixa intensidade, centradas em 2973 e 2931  $\text{cm}^{-1}$ , que podem ser atribuídas a estiramentos assimétricos dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006; YU *et al.*, 2012). As bandas referentes aos estiramentos simétricos destes grupos não são visualizadas no espectro, podendo ter sido sobrepostas devido à baixa intensidade. A mudança de perfil espectral nesta região, combinada ao surgimento das bandas referentes às ligações  $\text{C}=\text{C}$  corroboram a ocorrência da reação de desidratação da glicose, que reduz as ligações  $\text{C}-\text{H}$  existentes, contribuindo para a nucleação de cadeias carbônicas insaturadas e aromáticas que formam a estrutura das MPCs.

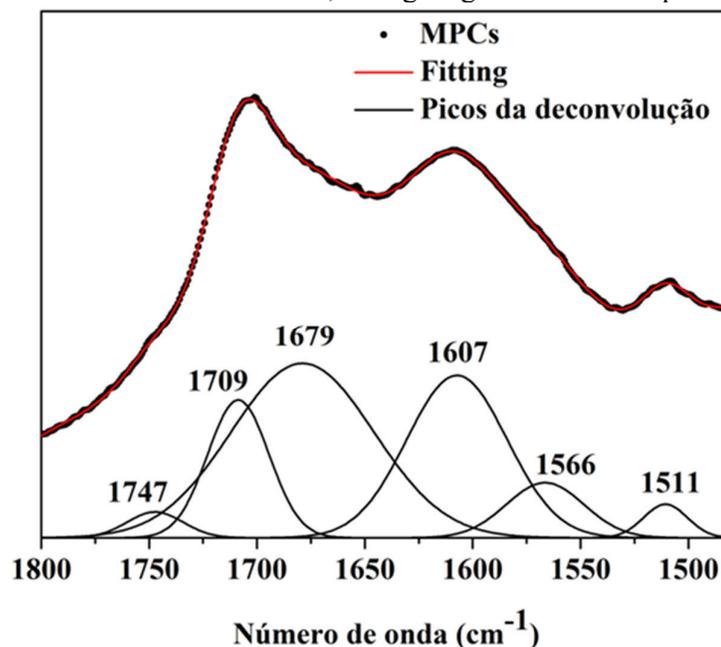
Gráfico 3 - Espectros FTIR (a) da glicose e (b) das MPCs, com algumas atribuições tentativa em destaque. Carbonização hidrotérmica realizada com 4,0000 g de glicose a 180 °C por 24 h.



Fonte: elaborado pela autora.

A deconvolução das bandas localizadas entre 1800 e 1500  $\text{cm}^{-1}$  (GRÁFICO 4, TABELA 5) revela que a banda correspondente aos estiramentos  $\text{C}=\text{O}$  possui contribuições que podem ser atribuídas à carbonilas de funções ésteres, lactonas, cetonas, quinonas, ácidos carboxílicos e carboxilatos (GENG *et al.*, 2009; PATNAIK, 2004; PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001; SEVILLA; FUERTES, 2009a; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006; WANG *et al.*, 2012). A existência de ésteres e cetonas na estrutura das MPCs provenientes de glicose foi confirmada por análises de XPS (YU *et al.*, 2012) e NMR (TITIRICI; ANTONIETTI; BACCILE, 2008), respectivamente.

Gráfico 4 - Deconvolução das bandas na região 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$  do espectro FTIR das MPCs. Carbonização hidrotérmica realizada com 4,0000 g de glicose a 180 °C por 24 h.



Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 5 - Discriminação e atribuições tentativas das bandas obtidas na deconvolução da região 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$  do espectro FTIR das MPCs.

Centro ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição tentativa
1747	C=O em ésteres, lactonas, cetonas,
1709	C=O em ácidos carboxílicos
1679	C=O em ácidos carboxílicos, quinonas
1607	C=C em alcenos e/ou aromáticos
1566	C=O em íons carboxilatos
1511	C=C em anéis aromáticos

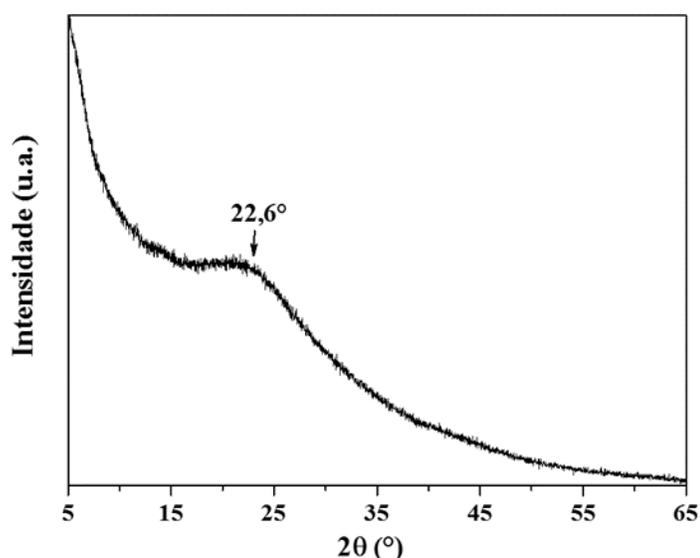
Fonte: elaborada pela autora.

As componentes da deconvolução em 1709 e 1679  $\text{cm}^{-1}$ , aliadas a banda larga e intensa dos estiramentos O-H e à banda de deformação C-O, centrada em 1298  $\text{cm}^{-1}$ , caracterizam a existência de funções ácidos carboxílicos e confirmam sua abundância na estrutura das MPCs (PATNAIK, 2004; PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

As componentes de deconvolução centradas em 1607 e 1511  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas aos estiramentos C=C (GENG *et al.*, 2009; PATNAIK, 2004; SEVILLA; FUERTES, 2009a; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006; WANG *et al.*, 2012). Adicionalmente, aquela centrada em 1566  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída aos estiramentos simétricos C=O em íons carboxilato (PATNAIK, 2004; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

O difratograma de raios-X obtido para as MPCs (GRÁFICO 5) apresenta um único pico, centrado em  $22,6^\circ$  ( $2\theta$ ) posição referente à reflexão entre os planos (002) na estrutura do grafite. Entretanto, a ampla largura do pico é característica de perfis de difração referentes a estruturas de natureza amorfa. Desta forma, tais considerações revelam que a estrutura das MPCs possui baixo ordenamento (LI *et al.*, 2012a; SHEN *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2010).

Gráfico 5 - Difratograma de raios-X obtido para as MPCs provenientes de glicose. Reação de carbonização hidrotérmica realizada com 4,0000 g de glicose a  $180^\circ\text{C}$  por 24 h.



Fonte: elaborado pela autora.

Desta forma, a carbonização hidrotérmica de glicose à  $180^\circ\text{C}$  por 24 h realizada nesta Tese deu origem a um material carbonáceo sólido constituído por partículas esféricas livres e interconectadas ou coalescidas (quasi-esferas), dotadas de diâmetros variando, entre  $0,2$  e  $4,0\ \mu\text{m}$  – considerando os resultados de DLS e calculados através da imagem SEM. Tais partículas possuem estrutura amorfa, constituídas por átomos de C, H e O em cadeias altamente condensadas e insaturadas.

O espectro FTIR sugere que o carbono preparado é dotado de grupos funcionais oxigenados, dentre os quais o grupo ácido carboxílico. A hipótese de que este grupo é abundante na superfície das partículas é sustentada pelo alto valor negativo obtido para o potencial zeta do material. Tal característica das partículas foi determinante para a escolha das metodologias de imobilização empregadas nesta Tese, uma vez que o processo de amidação (estratégia covalente) baseia-se na conversão dos íons carboxilato em ésteres ativos para ligação covalente com

as funções amina da lectina e o processo de adsorção (estratégia não covalente) promove a atração eletrostática entre a carga negativa destes íons e dos íons  $\text{NH}_3^+$  na estrutura da lectina ConBr.

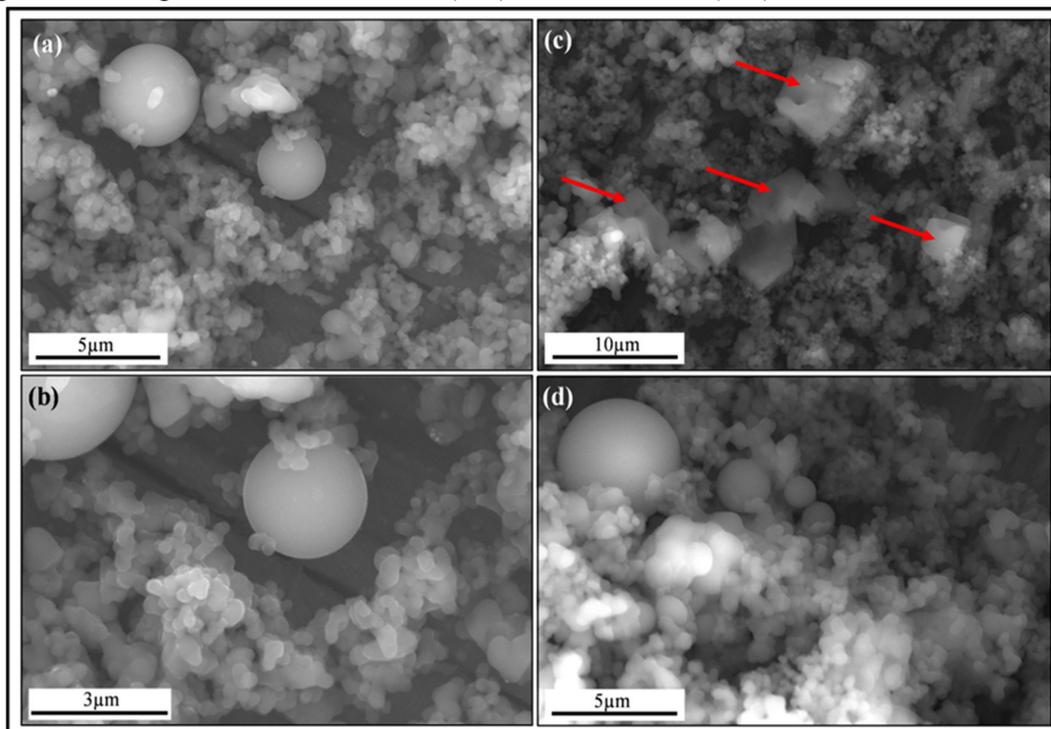
## 4.2 Sistemas micropartículas de carbono – lectina ConBr

### 4.2.1 Propriedades físico-químicas

Conforme descrito na seção 3.4, foram utilizadas duas estratégias para a interação das micropartículas de carbono hidrotérmico com a lectina ConBr: não-covalente e covalente. As amostras geradas através destas metodologias de interação foram denominadas MPCs+ConBr e MPCs-ConBr, respectivamente.

A partir das imagens SEM, mostradas na Figura 18, observa-se que as MPCs mantêm sua morfologia e organização dentro dos aglomerados após serem submetidas às metodologias de imobilização covalente e não covalente com a lectina, embora para a primeira estratégia as amostras de MPCs tenham sido submetidas a procedimentos mais drásticos (sonicação, agitação, centrifugação, esterificação e variações de pH).

Figura 18 - Imagens SEM dos sistemas (a, b) MPCs-ConBr e (c, d) MPCs+ConBr.



Fonte: elaborada pela autora.

Na Figura 18c verificam-se espécimes com morfologia bastante diferente das MPCs, com formato aproximado de cubos, os quais são sugeridos ser cristais do tampão MES, utilizado na lavagem final dos conjugados, formados devido ao procedimento de secagem.

A presença da lectina nos sistemas gerados é confirmada pela análise elementar. De acordo com os dados descritos na Tabela 6, as amostras MPCs-ConBr e MPCs+ConBr possuem nitrogênio (N) e enxofre (S), além de C, H e O, em sua composição. As razões molares N/S calculadas, utilizando as fórmulas químicas da lectina ConBr ( $C_{1140}H_{1765}N_{305}O_{360}S_2$ ) e do tampão MES ( $C_6H_{13}NO_4S$ ), permitem sugerir que o N presente nas amostras finais não é proveniente apenas do tampão MES, cristalizado na superfície ou entre as MPCs, como indicado pelas setas na Figura 18c.

Tabela 6 - Análise química elementar CHNS das partículas de carbono, da lectina ConBr, do tampão MES e dos sistemas MPCs-ConBr e MPCs+ConBr.

Amostra	C [wt%]	H [wt%]	O [wt%]	N [wt%]	S [wt%]	N/S <sup>[b]</sup>
MPCs	65,01	4,51	30,48 <sup>[a]</sup>	0	0	-
ConBr	53,55 <sup>[a]</sup>	6,96 <sup>[a]</sup>	22,53 <sup>[a]</sup>	16,71 <sup>[a]</sup>	0,25 <sup>[a]</sup>	152,95
MES	36,91 <sup>[a]</sup>	6,71 <sup>[a]</sup>	32,78 <sup>[a]</sup>	7,17 <sup>[a]</sup>	16,42 <sup>[a]</sup>	1,00
MPCs-ConBr	59,68	5,27	30,07	3,58	1,40	5,80
MPCs+ConBr	59,64	4,98	30,03	3,95	1,40	6,41

Fonte: elaborada pela autora.

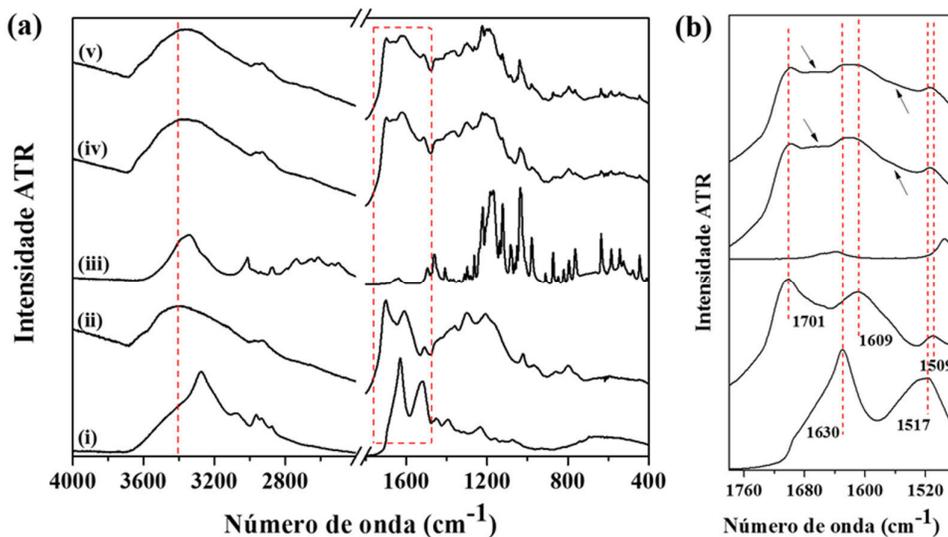
[a] Valores calculados. [b] Razão molar

Os valores encontrados para as razões molares N/S referentes às amostras MPCs-ConBr e MPCs+ConBr são superiores àquele correspondente ao tampão MES, o que sugere que o excedente de N em relação a S é proveniente da lectina imobilizada. Desta forma, embora baixas as porcentagens de N e S, as razões molares sugerem que ambas as metodologias permitem a imobilização da lectina nas MPCs. Além disso, o fato de que as porcentagens de N e S para os sistemas gerados apresentam valores muito próximos é indicativo de que, como ambos os procedimentos utilizam os mesmos sítios de conjugação nas MPCs (grupos ácidos carboxílicos), quantidades semelhantes da lectina podem ter sido imobilizadas. Tal suposição também é suportada pelo fato de que o uso de maior concentração da lectina no processo de adsorção (0,60 mg/mL), em relação à amidação (0,10 mg/mL), não apresentou influência significativa sobre este resultado.

Análises dos espectros FTIR da ConBr, das MPCs, do MES e dos sistemas conjugados MPCs-ConBr e MPCs+ConBr (FIGURAS 19, 20, TABELA 7), corroboram os resultados da análise elementar CHNS, também indicando que a lectina está imobilizada nas amostras

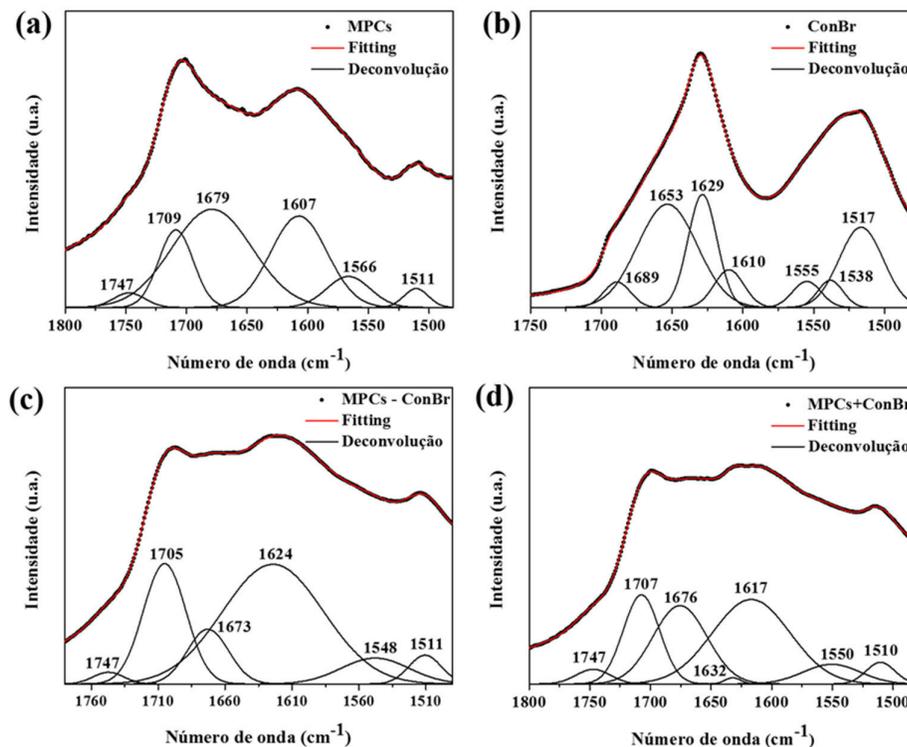
geradas por ambos os processos de imobilização.

Figura 19 – (a) Espectros FTIR da (ai) lectina ConBr; (aii) MPCs; (aiii) tampão MES, (aiv) MPCs-ConBr e (av) MPCs+ConBr. (b) A região contornada pelo tracejado vermelho em (a) é destacada e aumentada para melhor visualização das bandas na região de 1800-1480  $\text{cm}^{-1}$ .



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 20 - Deconvolução das bandas na região entre 1780-1480  $\text{cm}^{-1}$  dos espectros FTIR das amostras (a) MPCs; (b) ConBr; (c) MPCs-ConBr e (d) MPCs+ConBr.



Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 7 - Atribuições tentativa para as componentes calculadas nas deconvoluções mostradas na Figura 20c e na Figura 20d.

MPCs-ConBr	MPCs+ConBr	Atribuições tentativa	Referências
Centro (cm <sup>-1</sup> )	Centro (cm <sup>-1</sup> )		
1747	1747	C=O em ésteres; lactonas; cetonas.	Patnaik (2004); Sevilla e Fuertes (2009a); Silverstein, Webster e Kiemle (2006); Wang <i>et al.</i> (2012)
1705	1707	C=O em ácidos carboxílicos	Patnaik (2004); Sevilla e Fuertes (2009a); Silverstein, Webster e Kiemle (2006); Wang <i>et al.</i> (2012)
1673	1676	C=O em ácidos carboxílicos conjugados; quinonas.	Geng <i>et al.</i> (2009); Patnaik (2004); Pavia, Lampman e Kriz (2001)
1624	1632	C=O em amidas secundárias. N-H em NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Barth (2007); Silverstein, Webster e Kiemle (2006)
-	1617	C=O em íons carboxilato. N-H em NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ; NH <sub>2</sub> <sup>+</sup> .	Patnaik (2004); Silverstein, Webster e Kiemle (2006)
1548	1550	C=O em íons carboxilato. N-H e C-N em amidas secundárias. N-H em NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Patnaik (2004); Silverstein, Webster e Kiemle (2006)
1511	1510	C=C em anéis aromáticos, N-H em NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> .	Patnaik (2004); Sevilla e Fuertes (2009a); Silverstein, Webster e Kiemle (2006); Wang <i>et al.</i> (2012)

Fonte: elaborada pela autora.

No espectro FITR da ConBr (FIGURA 19ai) são observadas bandas intensas com máximos em 3329, 1630 e 1517 cm<sup>-1</sup>, características de estiramentos N-H e C=O e deformações N-H em amidas, respectivamente (BARTH, 2007; KONG; YU, 2007; PATNAIK, 2004).

É sabido que, para proteínas, a banda localizada na região entre 1700 e 1600 cm<sup>-1</sup> tem 80% da intensidade atribuída ao estiramento da carbonila enquanto os 20% restantes são atribuídos às vibrações C-N, C-C-N e N-H. Além disso, esta banda é muito sensível às alterações na estrutura secundária da proteína, sendo resultante de vibrações provenientes de cadeias de aminoácidos principais (ligações peptídicas) e laterais (BARTH, 2007; KONG; YU, 2007;

LÓPEZ-LORENTE; MIZAIKOFF, 2016).

Na Figura 20b, a deconvolução das bandas na região entre 1800 e 1480  $\text{cm}^{-1}$  para o espectro FTIR da proteína permite estimar componentes centradas em 1689 e 1610  $\text{cm}^{-1}$ . Tais bandas podem ser atribuídas aos estiramentos simétrico e assimétrico de  $\text{CN}_3\text{H}_5^+$  em arginina (BARTH, 2007). Além disso, a componente centrada em 1629  $\text{cm}^{-1}$  pode reunir contribuições de estiramento C=O em amidas e estiramento assimétrico N-H em  $\text{NH}_3^+$  da lisina. Já a componente em 1538  $\text{cm}^{-1}$  pode se referir ao estiramento simétrico de N-H em  $\text{NH}_3^+$  da lisina (BARTH, 2007). Na estrutura da ConBr, a lisina e a arginina estão presentes nas cadeias laterais e, desta forma, potencialmente disponíveis para interação com os carboxilatos presentes na superfície das MPCs por interação eletrostática.

O espectro FTIR do MES não solubilizado (FIGURA 19a) também foi investigado de modo a verificar sua interferência nos espectros das amostras conjugadas, uma vez que o procedimento final de lavagem destas amostras é realizado com solução tampão de MES. Observa-se que o espectro possui muitas bandas intensas na região de baixos números de onda (entre 1500 e 400  $\text{cm}^{-1}$ ). Entretanto, na região entre 1800 e 1600  $\text{cm}^{-1}$ , pode-se observar duas bandas de baixa intensidade em 1656 e 1638  $\text{cm}^{-1}$ . Tal perfil espectral possibilita utilizar esta região para análise dos espectros das amostras conjugadas, obtidas após interação das MPCs com a lectina ConBr, tendo em vista a pouca influência do espectro do tampão na referida região.

Os espectros FTIR das amostras MPCs-ConBr (FIGURA 19aiv) e MPCs+ConBr (FIGURA 19av) apresentam perfis de linha semelhantes entre si e razoavelmente diferentes daquele observado para as MPCs (FIGURA 19a).

A linha tracejada vermelha na Figura 19a, destaca o deslocamento no máximo de intensidade da banda larga entre 3690 e 3000  $\text{cm}^{-1}$  [de 3406 para 3383  $\text{cm}^{-1}$  (MPCs-ConBr) e para 3366  $\text{cm}^{-1}$  (MPCs+ConBr)], em comparação com a mesma região no espectro das MPCs (FIGURAS 19a, 19aiv, 19av). Este deslocamento indica que nos espectros das amostras conjugadas há sobreposição das bandas correspondentes às vibrações O-H na ConBr, MPCs e MES e N-H na ConBr. Além da contribuição nesta banda, o tampão MES contribui para os espectros das amostras conjugadas na região de baixo número de onda (entre 1400 e 400  $\text{cm}^{-1}$ ), onde é possível distinguir bandas características do tampão nos espectros das amostras.

Na região entre 1800 e 1480  $\text{cm}^{-1}$ , mudanças mais importantes são observadas, dentre estas, a alteração das intensidades relativas das bandas em 1700 e 1610  $\text{cm}^{-1}$ , sendo que nestes sistemas a primeira tem menor intensidade que a segunda. Tais diferenças nos perfis espectrais, tornam-se mais evidentes com a expansão desta região, mostrada na Figura 19b,

onde as linhas verticais tracejadas possibilitam verificar que os espectros das amostras MPCs-ConBr e MPCs+ConBr são uma combinação dos espectros correspondentes a ConBr (FIGURA 19ai) e as MPCs (FIGURA 19aii).

Primeiramente é possível observar na Figura 19b, nos espectros das amostras conjugadas, uma banda correspondente a vibração da carbonila em ácidos carboxílicos, semelhante à identificada no espectro das MPCs. A diferença no perfil de linha das referidas bandas sugere que a interação com a lectina ocorreu por meio destes grupos funcionais.

A região espectral entre 1645 e 1580  $\text{cm}^{-1}$  seria composta pelas bandas centradas em 1630  $\text{cm}^{-1}$ , proveniente do espectro da ConBr, e por aquela centrada em 1609  $\text{cm}^{-1}$ , verificada no espectro das MPCs. A banda com máximo em 1516  $\text{cm}^{-1}$  seria correspondente àquela observada em 1509  $\text{cm}^{-1}$  no espectro das MPCs, com alguma contribuição da banda centrada em 1517  $\text{cm}^{-1}$  no espectro da ConBr.

As setas destacam elevações dos perfis de linha em relação às mesmas regiões no espectro das MPCs, as quais são indicativas de sobreposição de bandas presentes nos espectros da ConBr e das MPCs. Desta forma, para análise mais detalhada, também foram feitas deconvoluções das bandas dos espectros das amostras conjugadas localizadas nesta região (1800 a 1480  $\text{cm}^{-1}$ ). Os resultados são mostrados nas Figuras 20c e 20d e Tabela 7.

As elevações indicadas pelas setas apontadas para baixo são sugeridas resultar da combinação das componentes centradas em 1673 e 1624  $\text{cm}^{-1}$ , verificadas na deconvolução do espectro da MPCs-ConBr, e em 1676, 1632 e 1617  $\text{cm}^{-1}$ , da deconvolução do espectro de MPCs+ConBr. Por outro lado, as elevações indicadas pelas setas apontadas para cima podem resultar das componentes em 1624 e 1548  $\text{cm}^{-1}$  e 1550  $\text{cm}^{-1}$ , no espectro de MPCs-ConBr e MPCs+ConBr, respectivamente. As componentes em 1673 (MPCs-ConBr) e 1676  $\text{cm}^{-1}$  (MPCs+ConBr) correspondem àquela centrada em 1679  $\text{cm}^{-1}$ , estimada na deconvolução das MPCs (FIGURA 20a). Verifica-se, então, deslocamento para menores números de onda das componentes das deconvoluções dos espectros das amostras conjugadas em relação àquela correspondente na deconvolução do espectro das MPCs. No caso da amostra resultante da amidação, a componente em 1705  $\text{cm}^{-1}$  (FIGURA 20c) também apresenta significativo deslocamento para menores números de onda em relação à componente em 1709  $\text{cm}^{-1}$  observada na deconvolução das MPCs (FIGURA 20a). Tais eventos reforçam a hipótese da interação da lectina com a superfície das MPCs ocorrem via grupos ácidos carboxílicos em ambas as metodologias.

A componente em 1632  $\text{cm}^{-1}$  na deconvolução do espectro FTIR da amostra MPCs+ConBr (FIGURA 20d) corresponde àquela centrada em 1629  $\text{cm}^{-1}$  da deconvolução espectral da ConBr (FIGURA 20b). Para a amostra proveniente da conjugação por amidação, a

componente correspondente a esta última não aparece explicitamente na deconvolução. Entretanto, é possível que a contribuição desta componente proveniente do espectro da ConBr esteja implícita na componente larga e intensa centrada em  $1624\text{ cm}^{-1}$ . Além disso, a componente larga da deconvolução centrada  $1617\text{ cm}^{-1}$  (Figura 25d), provavelmente, possui contribuições das componentes centradas em  $1607\text{ cm}^{-1}$ , da deconvolução dos espectros das MPCs (FIGURA 20a), e aquela centrada em  $1610\text{ cm}^{-1}$ , da deconvolução do espectro da ConBr (FIGURA 20b). As componentes largas em  $1548$  (FIGURA 20c) e  $1550$  (FIGURA 20d)  $\text{cm}^{-1}$  são possivelmente formadas pela contribuição das componentes em  $1566\text{ cm}^{-1}$  na deconvolução do espectro das MPCs, e em  $1555$  e  $1538\text{ cm}^{-1}$  na deconvolução espectral da ConBr.

É importante destacar que as componentes em  $1624$  e  $1548\text{ cm}^{-1}$  da deconvolução do espectro da amostra MPCs-ConBr (FIGURA 20c) e em  $1632$ ,  $1617$  e  $1550\text{ cm}^{-1}$  (FIGURA 20d) da deconvolução do espectro da amostra MPC+ConBr estão localizadas no intervalo de vibração de deformações angulares simétricas e assimétricas de N-H em sais de amina primária ( $-\text{NH}_3^+$ ) e secundária ( $\text{NH}_2^+$ ) e também de estiramentos C=O em íons carboxilato (PATNAIK, 2004; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006). Tais atribuições sugerem que a interação da lectina com as MPCs possa ter ocorrido por interação eletrostática independente da metodologia utilizada.

Embora a imobilização da ConBr nas MPCs, em ambas as metodologias, pudesse envolver a ligação/interação dos grupos ácidos carboxílicos do carbono hidrotérmico com as aminas da proteína, a ocorrência de outros tipos de interação não deve ser descartada (MU *et al.*, 2014; PUDDU; PERRY, 2012).

As MPCs utilizadas nesta Tese foram obtidas após 24 h de carbonização hidrotérmica e, como descrito na introdução, este processo gera materiais carbonáceos através de processos em cascata, sendo o mais importante deles a desidratação (FALCO *et al.*, 2011; HU *et al.*, 2010; LI; WANG; SHAHBAZI, 2015; SEVILLA; FUERTES, 2009a; TITIRICI; ANTONIETTI; BACCILE, 2008; YU *et al.*, 2012). Assim, o tempo de reação influencia na quantidade de grupos oxigenados presente na superfície das MPCs, tal que quanto maior o tempo de reação, mais grupos oxigenados são perdidos para o meio reacional. Tal fato poderia conduzir a formação de mais domínios aromáticos hidrofóbicos.

Ainda, também é sabido que o tempo de reação influencia no tamanho das partículas, promovendo a formação de partículas maiores e agregados em tempos de reação mais longos (QI *et al.*, 2016; SEVILLA; FUERTES, 2009a). Desta forma, partículas maiores possuem menos grupos funcionais oxigenados em sua superfície e mais regiões aromáticas (hidrofóbicas) disponíveis (SEVILLA; FUERTES, 2009a).

No caso das MPCs utilizadas nesta Tese, o tempo de reação pode ter favorecido a formação de partículas maiores com uma distribuição não homogênea de grupos funcionais oxigenados e, desta forma, com regiões hidrofóbicas na superfície, atuando como sítios de interação para a lectina. Assim, também pode ser considerada a interação entre tais regiões do carbono hidrotérmico e a parte central da estrutura tetramérica da proteína, que também é hidrofóbica.

A ocorrência de interações hidrofóbicas no sistema MPCs+ConBr é suportada pelo trabalho de Puddu e Perry (2012), no qual confirmaram a manifestação destas interações entre peptídeos e suportes negativamente carregados. Estes autores mostraram que peptídeos com diferentes sequências de aminoácidos, neutros e carregados positiva e negativamente interagem com nanopartículas de sílica, cuja superfície é negativamente carregada. Tal resultado suporta a ideia de que outros tipos de interação não-covalente podem ser estabelecidos, além da interação eletrostática.

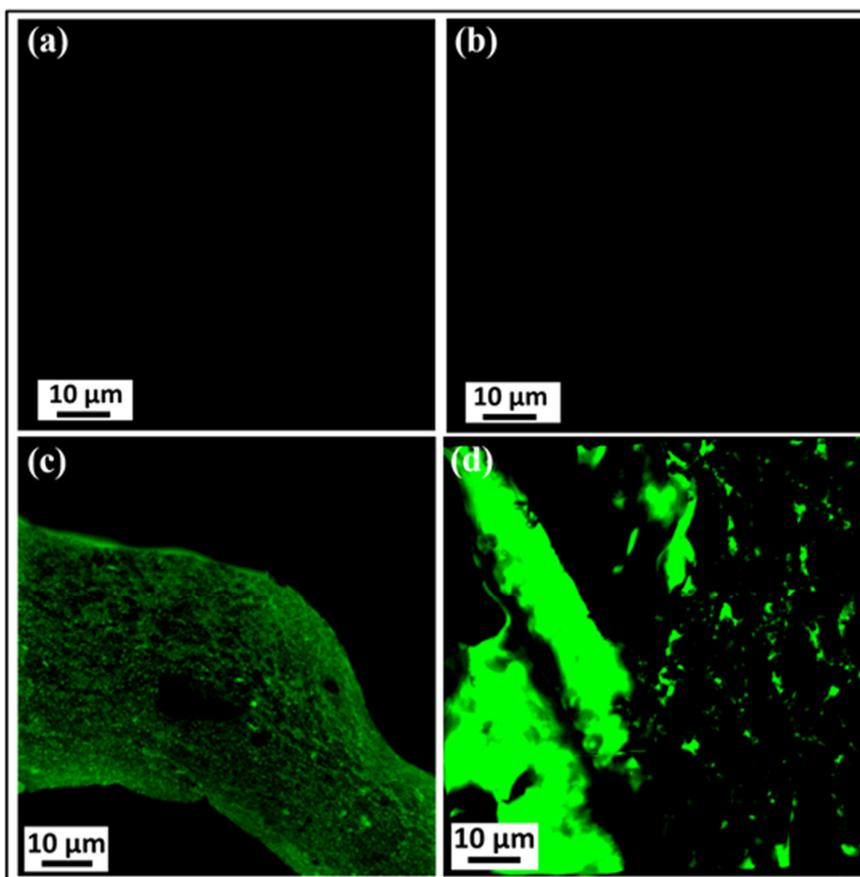
Os resultados obtidos para a amostra resultante da metodologia de imobilização covalente também reforçam a possibilidade da ocorrência de interações hidrofóbicas. Como mencionado anteriormente, os valores muito próximos obtidos para as porcentagens de N e S, juntamente com o perfil espectral no infravermelho semelhante das amostras conjugadas por ambas as metodologias, sugerem que a imobilização da lectina nas MPCs ocorreu por interações não covalentes. Entretanto, como a interação covalente é promovida em pH acima do ponto isoelétrico teórico da lectina, tal fato impossibilitaria interações eletrostáticas entre a biomolécula e o suporte.

Deste modo, para demonstrar que a lectina ConBr pode ser conjugada às MPCs através de interações não-covalentes, realizou-se uma nova reação de adsorção, utilizando a lectina marcada com o corante FITC (ConBr-FITC). A amostra resultante foi analisada por Microscopia de Varredura Laser Confocal e as imagens obtidas são mostradas na Figura 21.

Como se pode verificar nas Figuras 21a e 21b, o tampão MES e as MPCs dispersas neste tampão não apresentam fluorescência. Na Figura 21c é observada a emissão de fluorescência da lectina marcada com o FITC, na cor verde. A mesma emissão pode ser verificada na Figura 21d para a amostra MPCs+ConBr-FITC.

Desta forma, como as partículas puras ou o tampão não apresentam emissão de fluorescência e o corante está ligado covalentemente à lectina (eliminando a possibilidade de estar disperso isoladamente no tampão), a emissão observada para a amostra indica que a lectina foi imobilizada às MPCs.

Figura 21 - Imagens obtidas por Microscopia de Varredura Laser Confocal. (a) Tampão MES 0,10 mol/L pH 5,47; (b) MPCs + Tampão MES 0,10 mol/L pH 5,47; (c) ConBr-FITC + Tampão MES 0,10 mol/L pH 5,47; (d) MPCs+ConBr-FITC + Tampão MES 0,10 mol/L pH 5,47.



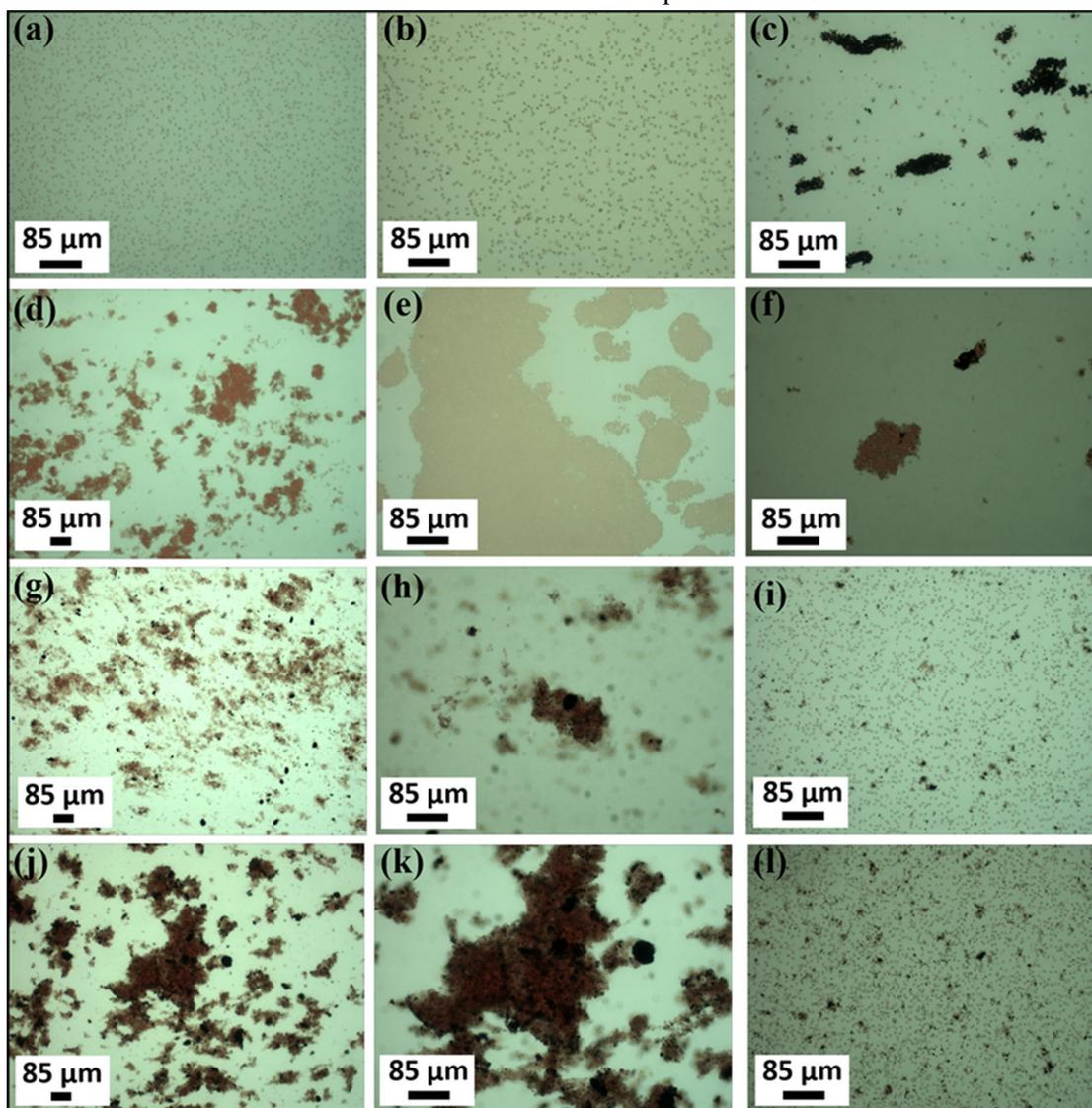
Fonte: elaborada pela autora.

#### 4.2.2 Avaliação da atividade hemaglutinante da lectina

As imagens de Microscopia Óptica apresentadas na Figura 22 mostram os resultados obtidos a partir dos ensaios realizados para avaliação da atividade e inibição da atividade hemaglutinante da lectina ConBr nos sistemas gerados.

As Figuras 22(a-e) mostram os ensaios utilizados como referência (controles), onde a formação de coágulos originados pela aglutinação dos eritrócitos só foram verificados no ensaio com a lectina (FIGURA 22b). As Figuras 22a e 22e revelam que os tampões TRIS e MES não apresentam qualquer interação com as hemácias, as quais aparecem distribuídas sobre a lâmina e com a morfologia normal. As MPCs também não interagem com as hemácias, como mostra a Figura 22d. A imagem permite observar, claramente, as partículas dispostas em aglomerados distribuídos em meio aos eritrócitos, sem nenhum indício da formação de coágulos.

Figura 22 - Imagens de Microscopia Óptica obtidas nos ensaios de atividade hemaglutinante e inibição. (a) Tampão TRIS + eritrócitos de coelho tratados com tripsina; (b) Tampão MES 0,050 mol/L + eritrócitos de coelho tratados com tripsina (c) Tampão TRIS + MPCs + eritrócitos de coelho tratados com tripsina; (d, e) Tampão TRIS + ConBr + eritrócitos de coelho tratados com tripsina; (f) Controle das MPCs e da lectina ConBr misturados; (g, h) Tampão TRIS + amostra MPCs-ConBr + eritrócitos de coelho tratados com tripsina; (i) Tampão TRIS + amostra MPCs-ConBr + MaM + eritrócitos de coelho tratados com tripsina; (j, k) Tampão TRIS + amostra MPCs + ConBr + eritrócitos de coelho tratados com tripsina; (l) Tampão TRIS + amostra MPCs + ConBr + MaM + eritrócitos de coelho tratados com tripsina.



Fonte: elaborada pela autora.

Os ensaios realizados nas amostras MPCs-ConBr (FIGURAS 22g, 22h) e nas amostras MPCs+ConBr (FIGURAS 22j, 22k) revelam a formação de coágulos distribuídos aleatoriamente sobre a lâmina, semelhante ao observado no ensaio da lectina. Foi possível observar MPCs no interior dos coágulos, o que permite sugerir que a lectina ConBr foi imobilizada sobre

a superfície das MPCs e, conseqüentemente, os coágulos foram formados pela aglutinação das hemácias em torno das partículas.

Para garantir que os coágulos verificados não foram formados por lectina livre, que foi de alguma maneira removida da superfície das micropartículas, misturou-se os ensaios de controle da lectina e das MPCs para comparação com os ensaios dos sistemas conjugados. Na Figura 22f verifica-se que, na mistura, a maioria das MPCs visualizadas encontra-se, principalmente, nas bordas dos coágulos, diferente do que acontece nos conjugados, onde se observam muitas MPCs no interior dos coágulos.

A atividade da lectina nos conjugados pôde ser comprovada e assegurada, ainda, pelos ensaios de inibição mostrados nas Figuras 22i (MPCs-ConBr) e 22l (MPCs+ConBr). Neste caso, os sistemas conjugados foram postos em contato com o açúcar MaM antes do contato com os eritrócitos, de modo a “bloquear” os DRCs. Desta forma, como esperado, não é observada a formação de coágulos pelos sistemas, uma vez que os sítios ativos da lectina estão indisponíveis.

Diante destes resultados é possível afirmar que as MPCs podem ser utilizadas como alternativa sustentável de suporte para proteínas. Os dados obtidos evidenciam a imobilização da lectina ConBr às MPCs, de modo que sua atividade biológica de hemaglutinação foi mantida. Como resultados semelhantes foram obtidos para ambas as metodologias empregadas, destaca-se o procedimento de imobilização por adsorção como mais viável neste caso, uma vez que é mais simples e menos dispendioso.

### **4.3 Nanopartículas de carbono**

#### ***4.3.1 Propriedades físico-químicas***

Nanopartículas de carbono (NPCs) foram obtidas por meio da carbonização hidrotérmica de glicose a 180 °C, em dois tempos de permanência distintos e utilizando seis diferentes massas do carboidrato, conforme descrito na Tabela 2.

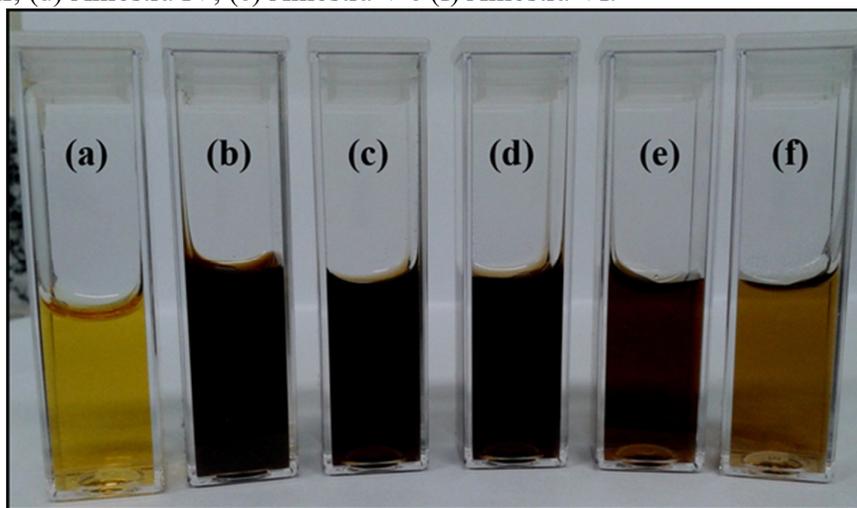
As suspensões coloidais obtidas pelas Reações relacionadas na Tabela 2 serão doravante denominadas Amostras, acompanhadas da respectiva numeração da Reação. Desta forma, a suspensão coloidal obtida pela Reação I recebe o nome de Amostra I, e assim por diante.

Como as MPCs escolhidas para os procedimentos experimentais realizados foram obtidas com o tempo de reação de 24 h, estudou-se também a suspensão coloidal obtida neste

processo de HTC. Adicionalmente, o tempo de reação de 4 h também foi avaliado para a obtenção das nanopartículas. Este tempo foi escolhido com base no trabalho de Titirici (2012), no qual investigou a carbonização hidrotérmica de glicose (10% m:v) a 180 °C. Segundo a autora, com o tempo de reação de apenas 2 h foi possível verificar a ocorrência da desidratação da glicose e a formação do HMF e dos demais subprodutos já citados, enquanto as etapas de polimerização e aromatização no carbono hidrotérmico só foram verificadas com o tempo de reação de 4 h. Consequentemente, a partir de 5 h de reação, as primeiras partículas foram observadas.

A partir das análises das amostras obtidas com a variação do tempo de permanência de 24 para 4 h, também foram realizadas as investigações a respeito do efeito da variação da massa de glicose no produto final, visando a obtenção de nanopartículas. Na Figura 23, são mostradas as suspensões coloidais obtidas a partir reações de HTC realizadas. As NPCs encontram-se dispersas nestas amostras, as quais apresentam diferentes aspectos físico-químicos.

Figura 23 – Suspensões coloidais (Amostras) obtidas através da carbonização hidrotérmica, utilizando diferentes tempos de reação e massas de glicose. (a) Amostra I; (b) Amostra II; (c) Amostra III; (d) Amostra IV; (e) Amostra V e (f) Amostra VI.



Fonte: elaborada pela autora.

Os resultados descritos na Tabela 8 revelam que as suspensões de nanopartículas de carbono, em geral, possuem pH ácido e valores de potencial zeta negativos. Observa-se, ainda, que os diâmetros hidrodinâmicos (DHs) médios, índices de polidispersividade e concentrações do material suspenso nas amostras são dependentes dos parâmetros de preparação. Os valores de DH médio e potencial zeta relacionados na Tabela 8 consistem nas médias de 4 e 10 medidas realizadas para cada amostra, respectivamente, e fornecidas pelo próprio equipamento.

Na Tabela 8 também estão relacionados os resultados obtidos para as amostras após a purificação por diálise (Amostras PI, PII, PIII, PIV, PV e PVI). Tais resultados sugerem que a purificação impacta, principalmente, no pH e na concentração de nanopartículas nas amostras.

Tabela 8 - Diâmetro hidrodinâmico médio e Pdl obtidos por DLS, potencial zeta obtido por ELS e concentração das nanopartículas, obtidas por diferentes reações de carbonização hidrotérmica de glicose, antes e depois da purificação por diálise.

Amostra	Diâmetro Hidrodinâmico Médio (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)	pH	Concentração (mg/mL)
I	106,8	0,426	-21,4	2,52	15,43
PI	155,6	0,068	-36,0	4,87	0,076
II	106,5	0,037	-38,2	2,95	92,88
PII	107,4	0,036	-41,7	6,85	1,37
III	86,00	0,037	-29,7	3,07	50,94
PIII	79,08	0,043	-30,0	4,65	0,72
IV	59,74	0,030	-30,0	3,28	27,33
PIV	58,97	0,042	-34,2	4,92	0,33
V	28,08	0,067	-27,4	3,43	12,00
PV	28,28	0,085	-31,5	4,94	0,21
VI	22,35	0,231	-27,2	3,26	4,46
PVI	26,00	0,344	-29,0	5,12	0,028

Fonte: elaborada pela autora.

#### 4.3.1.1 Efeitos da variação do tempo de reação

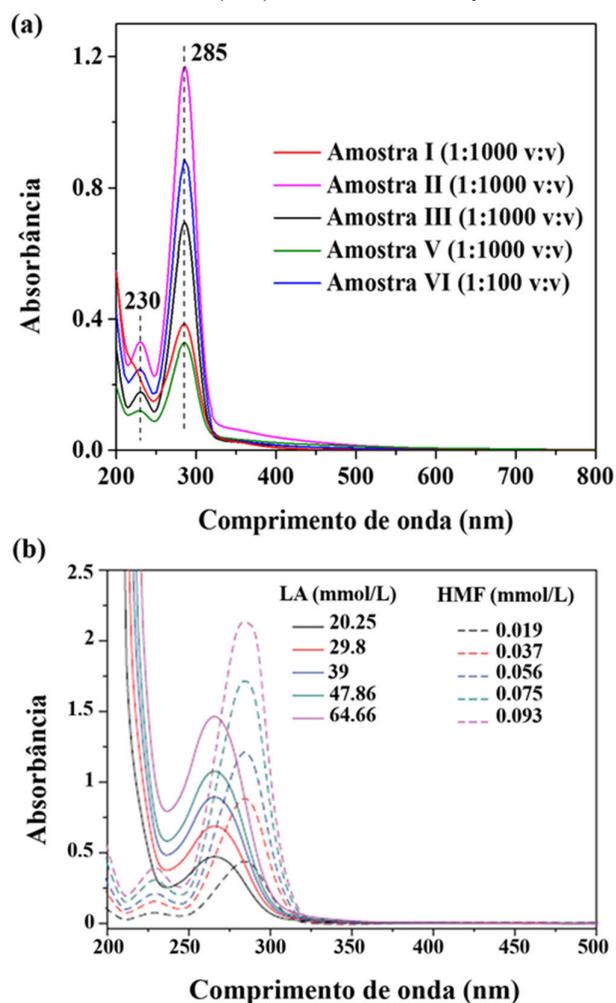
As Amostras I e II foram obtidas por HTC de 4,0000 g de glicose, a 180 °C durante 24 e 4 h de reação, respectivamente. A inspeção visual da Amostra I indica suspensão límpida de cor laranja, enquanto a Amostra II possui cor marrom escura. A concentração do material solúvel/suspensão nestas amostras difere, sendo maior para a Amostra II. Quanto aos DHs médios das NPCs, as duas amostras apresentam valor semelhante, mas Pdl's diferentes.

Como mencionado anteriormente, o HMF é o principal produto da desidratação de hexoses por ação de calor, e tal fato pode ser verificado a partir dos perfis das bandas de absorção que constituem os espectros UV/Vis referentes as Amostras I, II, III, V e VI (FIGURA 24a). Tais perfis são semelhantes àquele do HMF (FIGURA 24b), que apresenta bandas de absorção centradas em 230 e 284 nm (ZHANG *et al.*, 2013). Por outro lado, Chen *et al.* (2013) atribuem a primeira absorção a múltiplos cromóforos poliaromáticos e, a segunda, a transições  $\pi-\pi^*$ .

Para a Amostra I nota-se que a banda centrada em 230 nm é quase imperceptível. Segundo Titirici (2012), a análise por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa da

suspensão coloidal resultante do processo de HTC de glicose (10% m:v), a 180 °C durante 20 h, revela que não há mais HMF residual. O composto teria sido consumido totalmente para a formação dos materiais carbonáceos. Desta forma, pode-se sugerir que o perfil de absorção da Amostra I corresponda a outras espécies furânicas intermediárias da desidratação do HMF ainda suspenso/solúvel.

Figura 24 – (a) Espectros UV/Vis das Amostras I, II, III, V e VI diluídas em água ultrapura. (b) Espectros UV/Vis de ácido levulínico (LA) e HMF em solução com diferentes concentrações.



Fonte: (a) elaborado pela autora. (b) adaptada de Zhang *et al.* (2013).

Os espectros UV/Vis referentes a todas as amostras apresentam absorção significativa na região entre 200 e 400 nm, onde comumente absorvem substâncias com estrutura aromática, como o naftaleno e seus derivados e compostos fenólicos, como os flavonóides e os ácidos fenólicos (FERNÁNDEZ-SOLIS *et al.*, 2015; ROJAS; LONDOÑO; CIRO, 2016; GIL, *et al.*, 2000).

Considerando as estruturas sugeridas para as MPCs, mostradas nas Figuras 4 e 5a, é possível inferir que estas cadeias carbônicas aromáticas também constituem a estrutura das NPCs e/ou de subprodutos da carbonização (polímeros solúveis), juntamente com os não-aromáticos, como o ácido levulínico (LA) (FIGURA 24b), cuja banda da absorção está centrada em 266 nm.

Ainda, há possibilidade de haver glicose remanescente da carbonização incompleta nas amostras. Esta hipótese é sustentada pelo fato de que a secagem tanto em estufa quanto por liofilização, resulta em material visualmente semelhante a “caramelo”, como mostrado na Figura 25 para a Amostra II.

Figura 25 - Cadinhos de platina com a Amostra PII (à esquerda) e Amostra II (à direita), logo após o término do procedimento de determinação do teor de sólidos solúveis.



Fonte: elaborada pela autora.

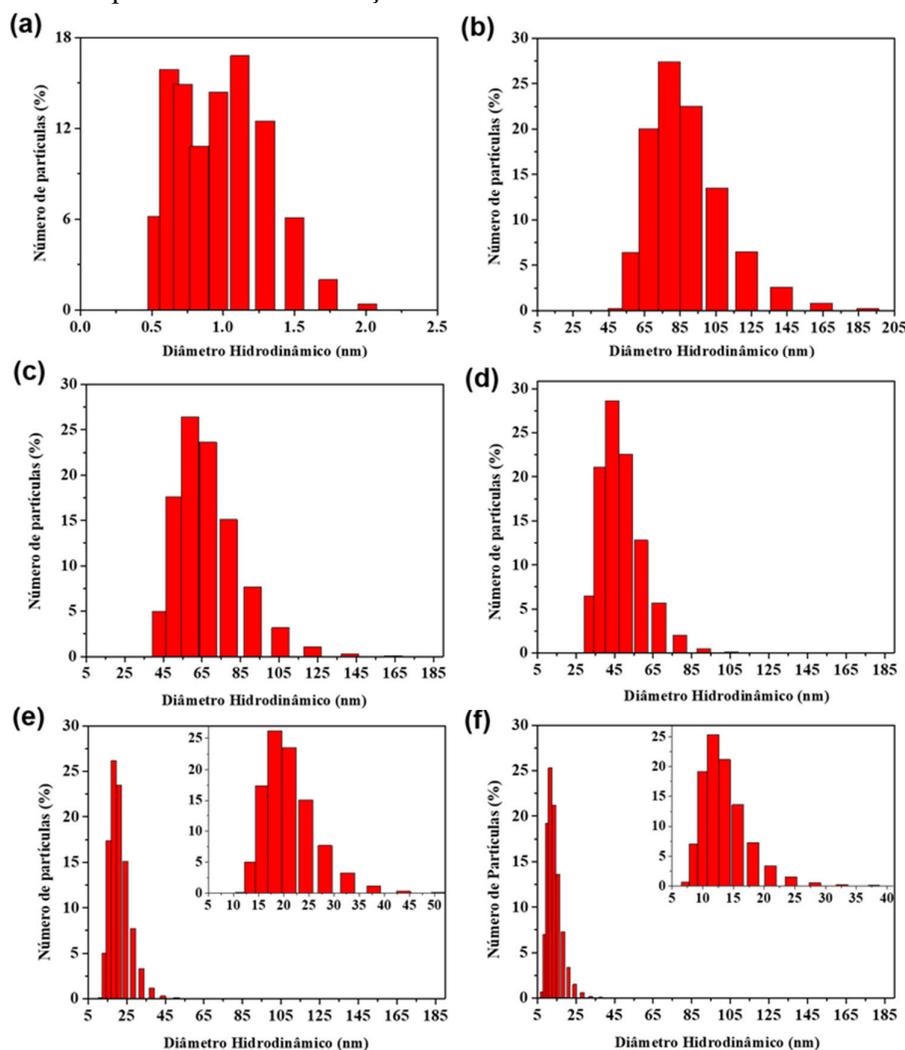
A diferença de cor entre as Amostras I e II pode ser motivada pela diferença de concentração de material carbonáceo disperso. O tempo reacional de 4 h conduz a formação de coloide com elevada concentração de NPCs, enquanto que para o tempo reacional de 24 h, grande quantidade de material carbonáceo atinge a fase sólida (MPCs) e é separado da fase coloidal (Amostra I) por filtração. Assim é esperado que a Amostra I apresente menor quantidade de material disperso que a Amostra II. Neste sentido, pode-se sugerir esta diferença de concentração como um fator responsável pela disparidade entre as cores destas amostras, devido aos conhecidos efeitos de absorção e dispersão da luz por partículas em soluções mais ou menos concentradas.

Os produtos da reidratação (ácido levulínico, ácido fórmico) e decomposição (ácido acético) do HMF no meio reacional são responsáveis pelos pHs ácidos observados (TABELA 8). O pH muito ácido, aliado ao baixo valor de potencial zeta medido para a Amostra I (-21,4 mV), indicam a tendência a instabilidade, o que, por sua vez, é confirmado pelo valor do PdI. O alto valor obtido para o PdI, em relação àqueles observados para a maioria das demais amostras, indica que esta é polidispersa (SHAW, 2014), o que pode resultar da existência de NPCs e/ou agregados com diferentes diâmetros no material suspenso. Já a Amostra II apresenta valor

de PDI indicativo de monodispersividade (SHAW, 2014), o que sugere uma amostra mais estável e homogênea que a Amostra I.

A variação no tempo de reação parece não causar efeitos sobre os DHs médios das partículas nas Amostras I e II (TABELA 8). Entretanto, na Figura 26, observa-se que os histogramas de porcentagem em número de partículas por DH são completamente diferentes. Na Figura 26a, o histograma correspondente à Amostra I, indica que a maior parte das nanopartículas de carbono apresenta DH de até 2 nm. O D90, diâmetro de, aproximadamente, 90% das partículas, encontra-se entre 0,5 e 1,3 nm (TABELA 9). Estes resultados sugerem cuidado na interpretação dos DHs médios, que, no caso da Amostra I, é de 106,8 nm.

Figura 26 – Histogramas de porcentagem em número de partículas por distribuição de diâmetro hidrodinâmico obtidos para as Amostras (a) I, (b) II, (c) III, (d) IV, (e) V e (f) VI por análise de DLS. Detalhes em (e) e (f): histograma com eixo referente ao diâmetro hidrodinâmico com maior incremento para melhor visualização.



Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 9 – Faixas de distribuição de diâmetros hidrodinâmicos por número de partículas (D25, D50 e D90) obtidas para as Amostras I, II, III, IV, V e VI.

Amostra	Faixas de distribuição de diâmetros hidrodinâmicos (nm)		
	D25	D50	D90
I	0,5 – 0,6	0,5 - 0,8	0,5 - 1,3
II	50,7 – 68,1	50,7 – 78,8	50,7 – 105,7
III	43,8 - 50,7	43,8 – 58,8	43,8 – 78,8
IV	32,7 - 37,8	32,7 – 43,8	32,7 – 58,8
V	11,7 - 15,7	11,7 – 18,2	11,7 – 24,4
VI	7,5 – 10,1	7,5 – 11,7	7,5 – 15,7

Fonte: elaborada pela autora.

Esta disparidade pode ser resultado da presença de NPCs com diâmetros maiores ou agregados, que podem influenciar na intensidade de luz espalhada que chega ao detector do equipamento, mas não existem em quantidade suficiente para serem contabilizadas na distribuição por número de partículas. Como estas partículas maiores espalham mais luz e o diâmetro hidrodinâmico médio é obtido através da análise da intensidade de luz espalhada, o valor obtido pode se apresentar maior que o valor real para a amostra.

Para a Amostra II, o histograma (FIGURA 26b) e o D90 calculado (TABELA 9) também revelam discrepância em relação ao valor do DH médio, entretanto, de forma menos expressiva. Aproximadamente 90% das partículas na amostra apresentam DHs entre 50,0 e 106,0 nm, enquanto o DH médio é de 106,5 nm. Tal resultado, coerente com os valores dos PdIs, indica que a distribuição de DHs na Amostra II é mais uniforme que na Amostra I.

#### 4.3.1.2 Efeitos da variação da massa de glicose

Para as amostras obtidas fixando o tempo de reação em 4 h (Amostras II, III, IV, V e VI) observa-se que, de modo geral, a cor das suspensões varia com a redução da massa de glicose utilizada, com exceção das Amostras III e IV, que, aparentemente, apresentam a mesma coloração.

Da Tabela 8, verifica-se que a concentração de material suspenso nas amostras reduz quanto menor a massa do precursor. Deste modo, pode-se considerar novamente que a concentração de material suspenso/solúvel nas amostras é fator importante para as variações de aspecto nas amostras, de modo que, quanto menor a concentração destes materiais, mais translúcida é a amostra.

A Amostra III apresenta cor similar a da Amostra IV, embora a concentração e DH médio sejam menores (TABELA 8) nesta última. No histograma obtido para a Amostra III

(FIGURA 26c) nota-se que as nanopartículas apresentam DH de até 165,0 nm, entretanto, o cálculo do D90 indica que a maior parte das partículas está entre 43,8 e 78,8 nm (TABELA 9). Observa-se também que as faixas da distribuição de tamanho D25, D50 e D90 obtidos para as Amostras III e IV são semelhantes (TABELA 9), o que também concorda com os valores bastante próximos dos PdIs destas amostras (TABELA 8). Aliando estes dados com àqueles de potenciais zeta e pHs, sugere-se que as Amostras III e IV são semelhantes, diferenciando-se mais destacadamente apenas pela quantidade de material carbonáceo suspenso, não suficiente para causar efeito sobre a cor das amostras.

Da Tabela 8, observa-se que a concentração e o DH médio da Amostra V são menores que os verificados para a Amostra IV e maiores que àqueles da Amostra VI. O histograma na Figura 26e e os valores para D25, D50 e D90 (TABELA 9) obtidos para a Amostra V indicam significativa queda dos DHs e estreitamento das faixas de distribuição de diâmetros em relação aos mesmos dados correspondentes à Amostra IV – maior massa - (FIGURA 26d). Os dados obtidos para a Amostra VI (FIGURA 26f, TABELA 9) revelam o mesmo comportamento, ou seja, redução dos valores de DHs das partículas e na concentração de material suspenso, quando comparados aos dados da Amostra V.

As Amostras III, IV, V e VI apresentam potenciais zeta semelhantes, o que sugere que as NPCs geradas apresentam superfícies de natureza similar. Entretanto, dentre elas, a Amostra VI apresenta o maior valor de PdI, indicativo de polidispersividade. Este resultado sinaliza tendência a instabilidade da amostra, apesar do potencial zeta (-27,2 mV) próximo ao intervalo teórico de estabilidade. Tal fato é coerente com os pequenos DHs observados para as NPCs provenientes da Amostra VI (TABELA 9), uma vez que quanto menor o tamanho da partícula, maior sua energia livre de superfície, o que conduz as partículas a agregarem por meio de reação e/ou interação entre seus grupos funcionais superficiais (QI *et al.*, 2016) a fim de reduzir esta energia e atingir um estado de equilíbrio.

#### 4.3.1.3 Efeitos da purificação por diálise

As amostras obtidas após o processo de diálise são denominadas nesta Tese como purificadas. Assim, a Amostra I após a diálise foi nomeada como Purificada I, ou PI. A nomenclatura usada para as demais amostras foi similar.

Após o processo de purificação por diálise em membrana com MWCO de 1 kDa foi notável a redução das concentrações das NPCs e o aumento do pH e do potencial zeta das mostras. Contudo, em geral, as amostras apresentam valores semelhantes para os DHs e os PdIs

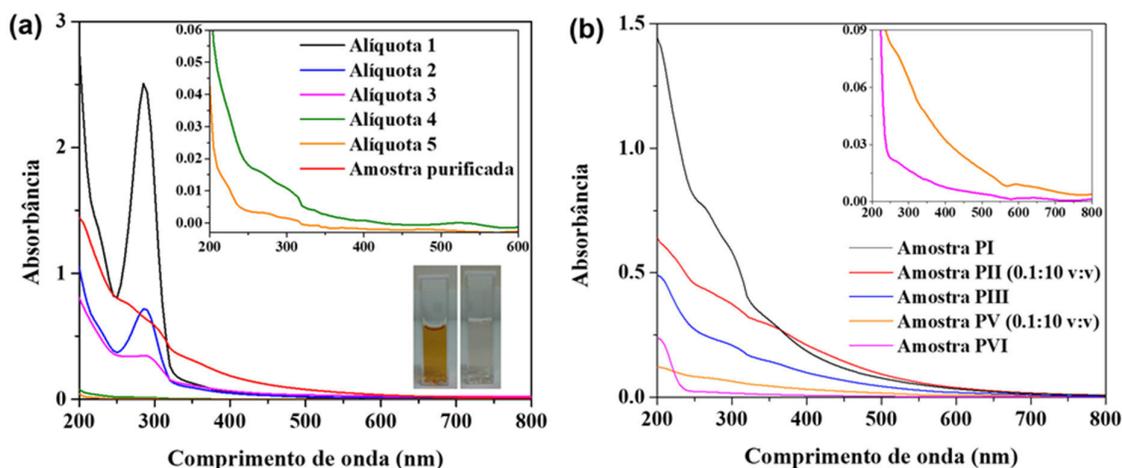
antes e depois da diálise, com exceção da Amostra I.

O processo de diálise promove o aumento do volume da amostra em até 2 mL. Tal fato, aliado a modificação do meio, com a conseqüente remoção dos ácidos provenientes de reidratação e decomposição do HMF explicam o aumento do pH das amostras (TABELA 8).

A retirada de subprodutos da carbonização, também pode ser sugerida pela alteração de cor da Amostra I, que se torna quase incolor após a diálise, e pela supressão gradual da banda de absorção em 285 nm (FIGURA 27a). Tal comportamento nos espectros UV/Vis foi observado para todos os processos de diálise realizados.

Visualmente, observa-se que as amostras purificadas quando submetidas à secagem não apresentam o aspecto final “caramelado”. O material remanescente do processo apresenta-se com aspecto de pó, depositado no fundo do cadinho de platina (FIGURA 25), sugerindo que resíduos de glicose das amostras também foram eliminados no processo de purificação.

Figura 27 – (a) Espectros UV/Vis obtidos para as alíquotas do líquido externo à membrana em cada troca de água realizada durante o processo de purificação por diálise da Amostra I e para a amostra ao fim do processo (Amostra purificada). Os espectros obtidos para as alíquotas 4 e 5 são mostrados em escala aumentada para melhor visualização. As fotografias mostram alíquotas da Amostra I (esquerda) e da Amostra PI (direita). (b) Espectros UV/VIS obtidos para as Amostras PI, PII, PIII, PV e PVI. Os espectros obtidos para as Amostras PV e PVI são mostrados em escala aumentada para melhor visualização.



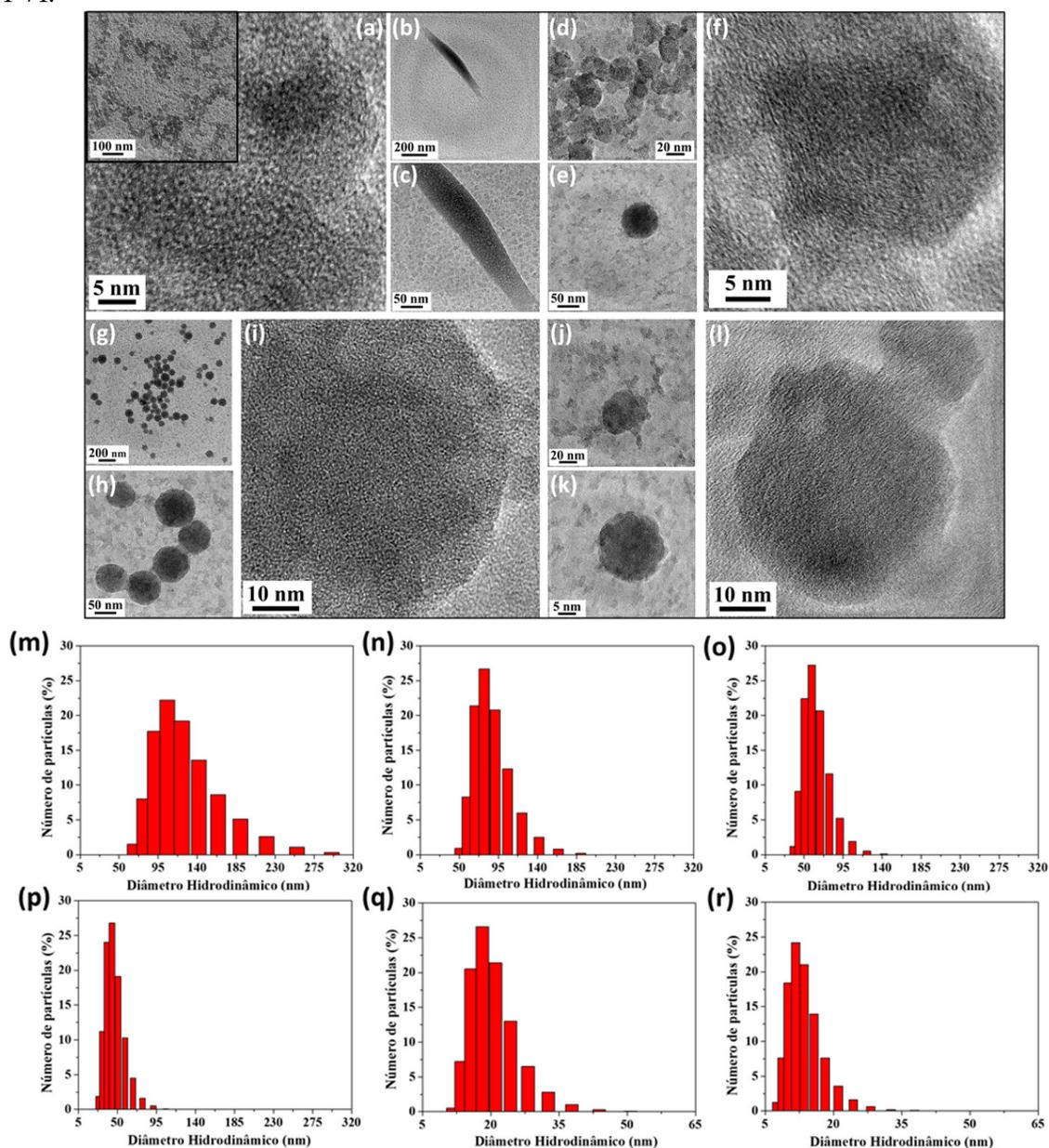
Fonte: elaborada pela autora.

Das Figuras 27a e 27b observa-se que o perfil espectral das amostras purificadas difere fortemente daquele observado para as amostras não purificadas (FIGURA 24a). Os espectros para as amostras purificadas apresentam uma ampla região de absorção (de 200 a 700 nm) (FIGURA 27b). A região localizada entre 250 e 320 nm, pode ser atribuída, principalmente, transição eletrônica  $\pi \rightarrow \pi^*$  em anéis aromáticos e, aquela entre 320 e 400 nm, à transição  $n \rightarrow \pi^*$

do grupo carbonila (SHEN *et al.*, 2014; VAZ *et al.*, 2015).

Na Figuras 28(a-l) são mostradas as imagens TEM das NPCs constituintes das Amostras PI, PII, PIII, V e PV, enquanto dados referentes ao diâmetro hidrodinâmico das NPCs nas amostras obtidas após a purificação por diálise são mostrados por meio dos histogramas (FIGURAS 28m, 28n, 28o, 28p, 28q, 28r) e faixas de distribuição de DHs relacionadas na Tabela 10.

Figura 28 – Imagens TEM das Amostras (a) V, (b, c) PV, (d-f) PI, (g-i) PII, (j-l) PIII e histogramas obtidos por análises de DLS das Amostras (m) PI, (n) PII, (o) PIII, (p) PIV, (q) PV e (r) PVI.



Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 10 – Faixas de distribuição de diâmetros hidrodinâmicos por número de partículas (D10, D60 e D90) para as Amostras PI, PII, PIII, PIV, PV e PVI.

Amostra	Faixas de distribuição de diâmetros hidrodinâmicos (nm)		
	D10	D60	D90
PI	68,1 – 78,8	68,1 – 122,4	68,1 – 164,2
PII	50,7 – 58,8	50,7 – 78,8	50,7 – 105,7
PIII	37,8 – 43,8	37,8 – 58,8	37,8 – 78,8
PIV	28,2 – 32,7	28,2 – 43,8	28,2 – 58,8
PV	11,7 – 13,5	11,7 – 18,2	11,7 – 24,4
PVI	7,5 – 8,7	7,5 – 11,7	7,5 – 18,2

Fonte: elaborada pela autora.

A Figura 28a refere-se à Amostra V e as Figuras 28b e 28c referem-se à Amostra PV. Observa-se que a Amostra V apresenta NPCs amorfas, quasi-esférica e distribuídas em aglomerados, como mostrado na imagem em maior escala no detalhe. Após a diálise, estas NPCs aparecem distribuídas de forma mais homogênea sobre o substrato. A “mancha” mais escura nas imagens da Amostra PV é um efeito da secagem da amostra.

As imagens TEM da Amostra PI são mostradas nas Figuras 28(d-f). A partir destas imagens é possível verificar que a Amostra PI é composta por agregados de NPCs esféricas e quasi-esféricas aglomeradas ou dispersas (FIGURAS 28d, 28e). As NPCs dispersas têm estrutura amorfa, enquanto aquelas observadas em aglomerados possuem estrutura parcialmente cristalina (FIGURA 28f).

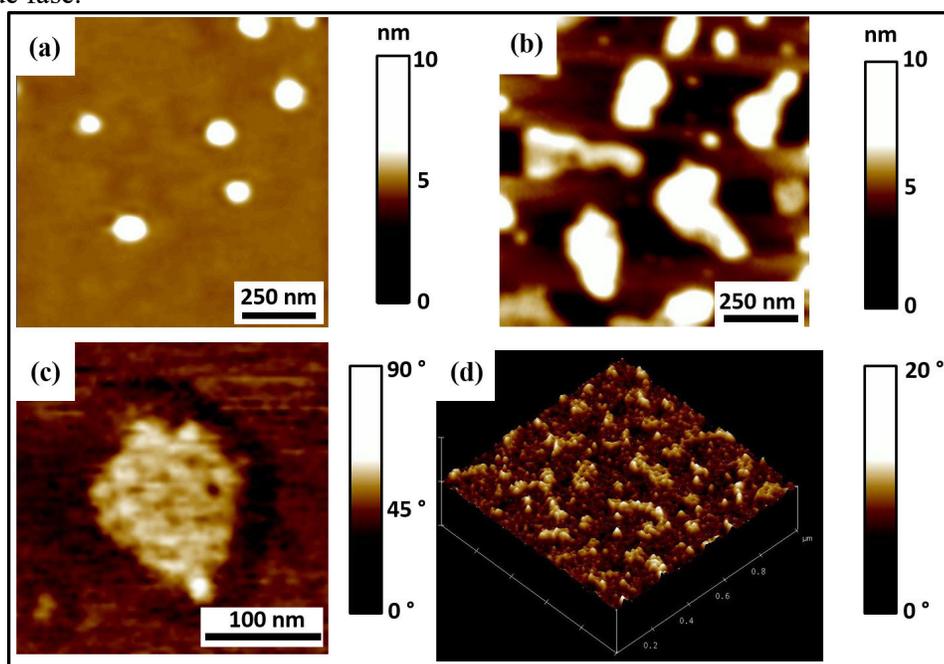
Nas Figuras 28(g-i), as imagens TEM referem-se a Amostra PII. As imagens revelam que esta amostra é formada por NPCs esféricas, amorfas (FIGURA 28i) e com diâmetros bastante semelhantes. A maioria das NPCs encontra-se individualizada, embora existam algumas reunidas em aglomerados, como mostrado na Figura 28h.

Para a Amostra PIII, as imagens TEM, mostradas nas Figuras 28(j-l), permitem observar que NPCs maiores coexistem com NPCs menores aglomeradas, como verificado para as Amostras PI e PV. Na Figura 28k nota-se que as NPCs maiores são quasi-esféricas, com bordas irregulares, que tornam clara a identificação de que consiste em um aglomerado de NPCs menores. Da Figura 28l tem-se que estas NPCs são amorfas.

Ao comparar os histogramas e as faixas de distribuição de DHs por número de partículas nas amostras antes (FIGURA 26, TABELA 9) e após o processo de diálise (FIGURA 28, TABELA 10), nota-se que apenas a Amostra PI apresenta resultados que diferem consideravelmente da amostra correspondente não purificada. Entretanto, os DHs obtidos para as partículas da Amostra PI são concordantes com os diâmetros observados para as partículas a partir das imagens TEM, assim como ocorre para as demais amostras.

Imagens AFM da topografia da Amostra PI são mostradas na Figura 29. As imagens mostram que a amostra é formada por NPCs cuja altura está em torno de 10,0 nm, mas que, entretanto, estão dispostas em aglomerados. Na Figura 29a observam-se espécimes quasi-esféricos dotados de alturas de até 10,0 nm, mas com diâmetros em torno de até 100,0 nm. Na Figura 29b, é possível verificar que a amostra também é composta por aglomerados, mas com altura semelhante àquela das partículas na Figura 29a. A imagem de fase na Figura 29c confirma que os espécimes maiores e disformes mostrados na Figura 29b são aglomerados. A variação no contraste observado revela que o aglomerado é formado pela reunião de várias partículas menores. Na Figura 29d, a imagem de fase tridimensional mostra que, em geral, a Amostra PI é formada por nanopartículas de carbono dispostas em aglomerados de diferentes tamanhos.

Figura 29 – Imagens AFM da Amostra PI. (a, b) Imagens topográficas. (c, d) Imagens de contraste de fase.



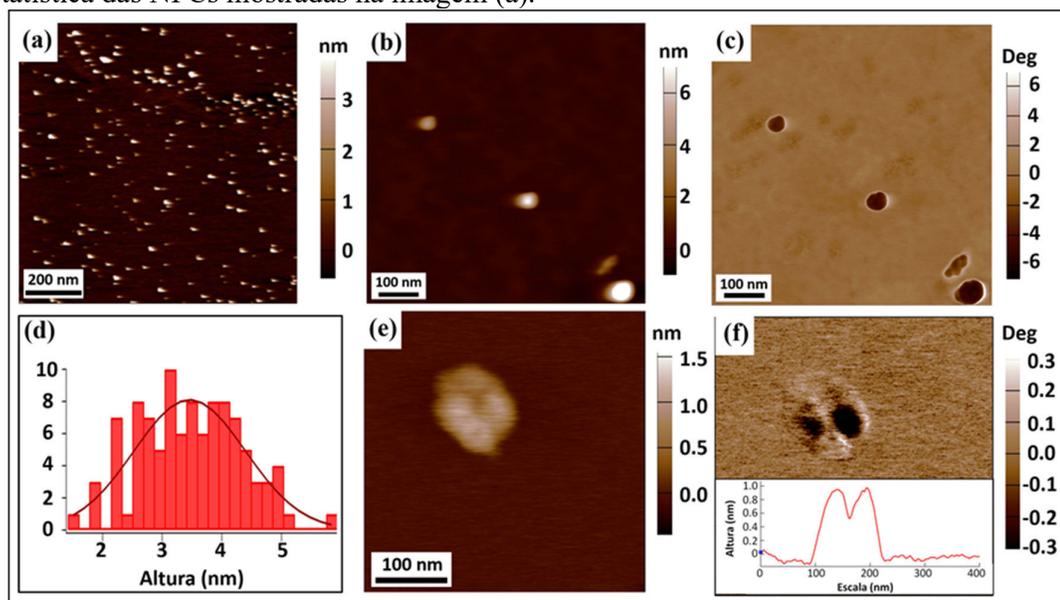
Fonte: elaborada pela autora.

Para a Amostra PV obteve-se resultado semelhante ao observado para a Amostra PI, isto é, ambas são formadas por NPCs e aglomerados (FIGURA 30). Entretanto, em geral, a altura dos espécimes é ligeiramente mais baixa. Na Figura 30a, observa-se que as NPCs e aglomerados são distribuídos aleatoriamente e possuem, em sua maioria, alturas de até 5,0 nm, como mostrado no histograma obtido a partir da Figura 30a (FIGURA 30d).

As Figuras 30b e 30c, imagens de topografia e contraste de fase, respectivamente, mostram espécimes individualmente dispersos. A imagem de um destes espécimes, feita com

maior magnitude (Figura 30e), revela que consistem em aglomerados de partículas. A imagem de contraste de fase, mostrada na Figura 30f, confirma esta hipótese, uma vez que é possível verificar pelo menos dois espécimes com contraste distinto (cor escura) daquele do substrato. O perfil de altura, mostrado no detalhe da Figura 30f, também indica que o espécime verificado é composto por pelo menos duas nanopartículas aglomeradas, com altura em torno de 1,0 nm.

Figura 30 - Imagens AFM da Amostra PV. (a, b, e) Imagens feitas por análise de topografia. (c, f) Imagens feitas por análise de contraste de fase. (d) Histograma obtido a partir da análise estatística das NPCs mostradas na imagem (a).



Fonte: elaborada pela autora.

De acordo com o mecanismo de formação das MPCs obtidas por HTC de sacarose proposto por Qi *et al.* (2016), mostrado na Figura 3, as partículas primárias com, aproximadamente, 5,0 nm agregam para formar partículas com diâmetros maiores. Desta forma, verificou-se a possibilidade de obtenção de NPCs a partir do ajuste do tempo da reação e da massa de glicose, a temperatura constante (180 °C), com a finalidade de reduzir ou interromper o processo de agregação destes primeiros núcleos gerados.

Do exposto observou-se que os ajustes realizados conduziram à diminuição dos diâmetros das partículas obtidas, isto é, permitiram a obtenção de NPCs com diferentes faixas de distribuição de diâmetros. A redução do tempo de reação de 24 h para 4 h, interrompeu o estágio de agregação e não permitiu que as partículas atingissem diâmetros maiores. Já a redução da massa de glicose conduz a formação de menor quantidade de partículas primárias e, por conseguinte, menos material para agregação. Além disso, em geral, menor quantidade de material

mantém as partículas mais distantes uma da outra, o que reduz a atração de Van der Waals e a tendência a agregação. Os dois estágios de formação das partículas primárias e a contínua reação entre os agregados, o HMF e os ácidos no meio reacional, sugeridos por Qi *et al.* (2016), explicam a heterogeneidade dos DHs observados para as NPCs em uma mesma amostra.

### 4.3.2 Fotoluminescência

Na Figura 31 são mostrados os espectros de emissão de fotoluminescência obtidos para as Amostras (a) I, (c) V e (e) VI, que apresentaram os menores DHs, e suas correspondentes amostras purificadas, Amostras (b) PI, (d) PV e (f) PVI. Nota-se que todas as amostras exibem bandas largas de emissão, centradas na região do visível, aproximadamente no intervalo de comprimentos de onda entre 430 e 550 nm, correspondentes às cores azul e verde. Observa-se que o comprimento de onda da emissão apresenta dependência com o comprimento de onda de excitação ( $\lambda_{ex}$ ) para todas as amostras embora os deslocamentos batocrômicos observados sejam bastante discretos para alguns comprimentos de onda.

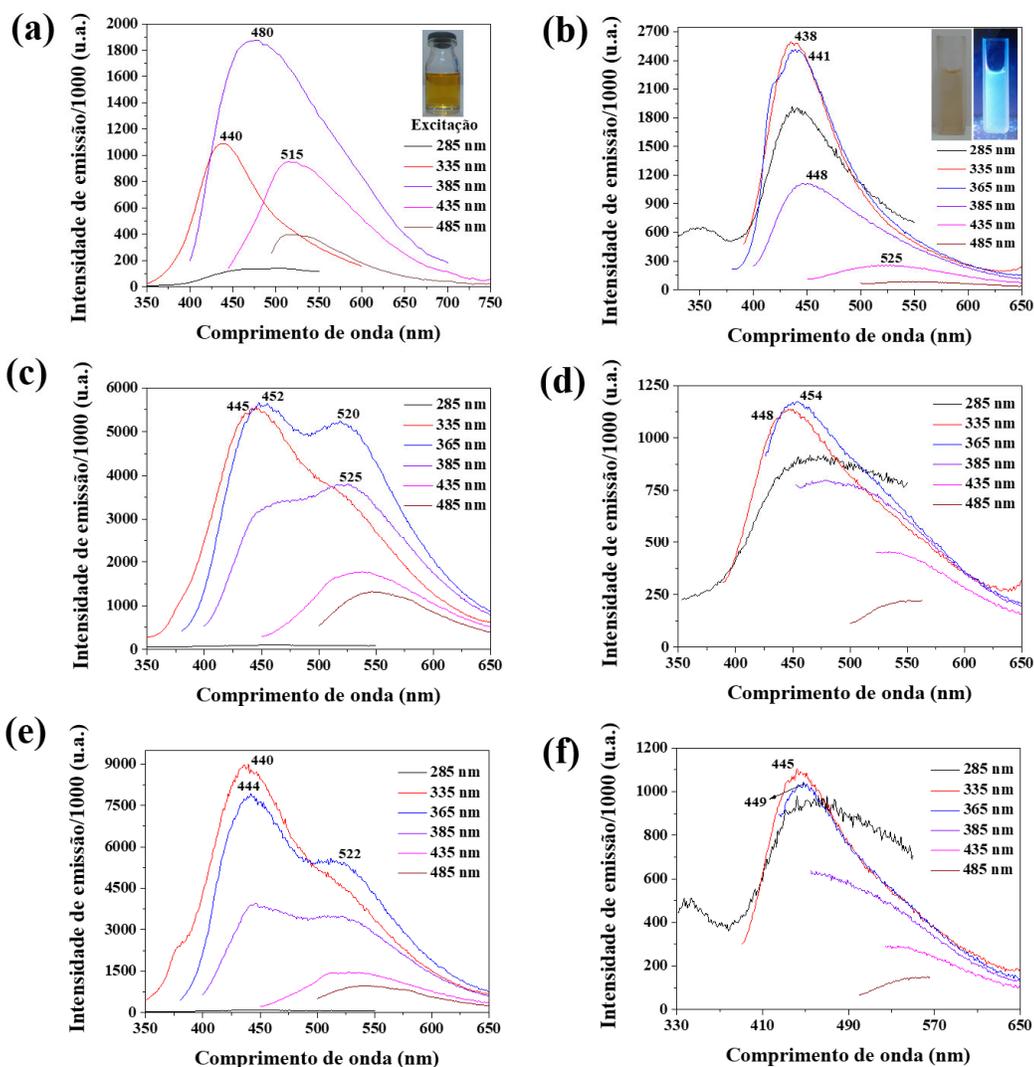
No espectro de emissão da Amostra I (FIGURA 31a), para cada comprimento de onda de excitação observa-se apenas uma banda de emissão. Entretanto, estas bandas são assimétricas, o que indica que podem se tratar de sobreposições de bandas de emissão provenientes de diferentes emissores. Nos espectros referentes às Amostras V (FIGURA 31c) e VI (FIGURA 31e), para os comprimentos de onda de excitação 335, 365 e 385 nm, é possível observar mais claramente duas bandas de emissão com máximos em torno de 440 e 520 nm. A primeira já é visualizada no espectro da Amostra I, mas a segunda está sobreposta e causa a assimetria das bandas neste espectro para os referidos  $\lambda_{ex}$ . Estes resultados sugerem que mecanismo de emissão nas três amostras é semelhante.

Dos espectros das amostras não purificadas destaca-se, ainda, que, com o aumento do  $\lambda_{ex}$ , as bandas com máximos em torno de 440 nm sofrem um leve deslocamento batocrômico e perdem intensidade. Para os comprimentos de onda de excitação 435 e 485 nm, observa-se, apenas, a banda em torno de 520 nm. Tal efeito indica que a fotoluminescência das NPCs preparadas apresenta mais de uma origem.

Os espectros UV/Vis para as amostras não purificadas (FIGURA 24a) apresenta uma banda intensa referente a transições  $\pi-\pi^*$  em anéis aromáticos, sinalizando que estes domínios podem ser um dos emissores de fotoluminescência das NPCs. Outros emissores podem ser os as armadilhas emissivas provenientes da oxidação das NPCs. Para ambas as considerações também está implícito o efeito de tamanho da partícula, uma vez que diâmetros diferentes

correspondem a distintos graus de oxidação, além de quantidades e tamanhos dos domínios aromáticos, o que pode influenciar na intensidade e no deslocamento das bandas de emissão.

Figura 31 - Espectros de emissão de fotoluminescência obtidos para (a) Amostra I, (b) Amostra PI, (c) Amostra V, (d) Amostra PV, (e) Amostra VI e (f) Amostra PVI. Detalhe em (a) imagem da Amostra I sob luz ambiente. Detalhe em (b) Amostra PI sob luz ambiente, à esquerda e sob luz negra (365 nm), à direita.



Fonte: elaborado pela autora.

#### 4.3.2.1 Efeitos do processo de purificação na fotoluminescência das nanopartículas de carbono

Os espectros de emissão referentes às amostras purificadas (FIGURAS 31b, 31d, 31f) mostram que o procedimento de purificação das amostras por diálise não afeta sobremaneira a emissão das NPCs, de modo que continuam a emitir nas mesmas regiões, mantém o

padrão de dependência do  $\lambda_{ex}$  e apresentam bandas de emissão assimétricas, principalmente, para as Amostras V e VI.

De fato, pode-se observar que as bandas presentes nos espectros para as amostras purificadas são as mesmas observadas nos espectros referentes às amostras não purificadas. Entretanto, as bandas em torno de 520 nm perdem intensidade. Este efeito é percebido, principalmente, no espectro da Amostra PI e pode indicar a perda de portadores de emissão.

É notável, para todas as amostras purificadas, em relação às não purificadas, o aumento na intensidade de emissão das NPCs quando excitadas a 285 nm, comprimento de onda onde ocorre a banda intensa de absorção para as amostras antes da purificação (FIGURA 24a). Tal efeito revela a existência de portadores, cuja emissão era suprimida antes da purificação das amostras.

Sabe-se que a intensidade de emissão depende fortemente da concentração do número de portadores da emissão. Desta forma, pode-se sugerir que a diálise promove a perda de espécies emissoras. Considerando que subprodutos da carbonização possam apresentar fotoluminescência, a redução da banda com máximo em torno de 520 nm pode significar a perda da contribuição destes portadores para a emissão das amostras. Outra possibilidade seria de que o processo de diálise resulta na perda de NPCs com sítios emissores específicos.

A supressão de banda em 520 nm e o aumento da intensidade das bandas de emissão correspondentes a absorção em 285 nm podem, ainda, ser resultado da variação de pH. A diálise promove o aumento do pH das amostras e a variação de tal parâmetro atinge diretamente os grupos funcionais de superfície das NPCs, causando a protonação ou a desprotonação destes grupos e, por conseguinte, a ativação ou a desativação de espécies emissoras (SANTIAGO *et al.*, 2016).

#### 4.3.2.2 Efeitos da variação do pH na fotoluminescência das nanopartículas de carbono

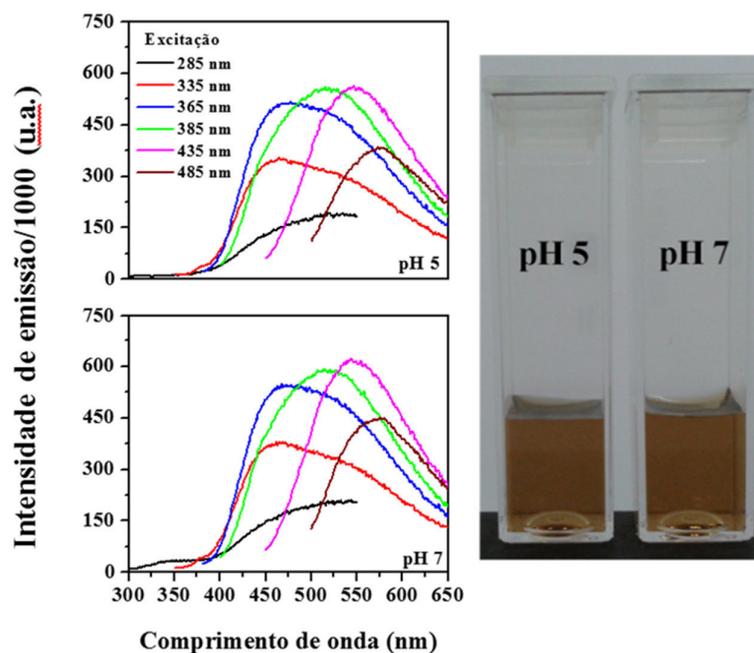
Para a análise dos efeitos da variação do pH sobre a fotoluminescência das NPCs, escolheu-se a Amostra PV. O pH desta amostra foi ajustado utilizando 80,0  $\mu$ L de solução de NaOH 0,010 mol/L para 8,0 mL da amostra. O pH inicial da Amostra PV era 5,11 e foi ajustado para 7,03 (pH fisiológico).

Como é possível observar na Figura 32, a amostra apresenta características macroscópicas semelhantes antes e após o ajuste do pH com a referida solução de NaOH, isto é, cor marrom clara, límpida e nenhum vestígio de material precipitado. Esta condição concorre para que a fotoluminescência da amostra também não apresente alterações e, de fato, os espectros

de emissão obtidos para a amostra em ambos os pHs são semelhantes. Apresentam bandas de mesmo perfil e nas mesmas faixas de comprimento de onda de emissão para cada  $\lambda_{ex}$  utilizado.

Desta forma, pode-se considerar que o volume da solução de NaOH utilizado foi suficiente, apenas, para mudar o pH do meio, não interferindo consideravelmente na propriedade de emissão das NPCs.

Figura 32 - Espectros de emissão de fotoluminescência obtidos para a Amostra PV quando em pH 5,11 (seu pH após a purificação) e em pH 7,03 (ajustado com solução de NaOH 0,010 mol/L).



Fonte: elaborada pela autora.

#### 4.4 Estabilidade das nanopartículas de carbono

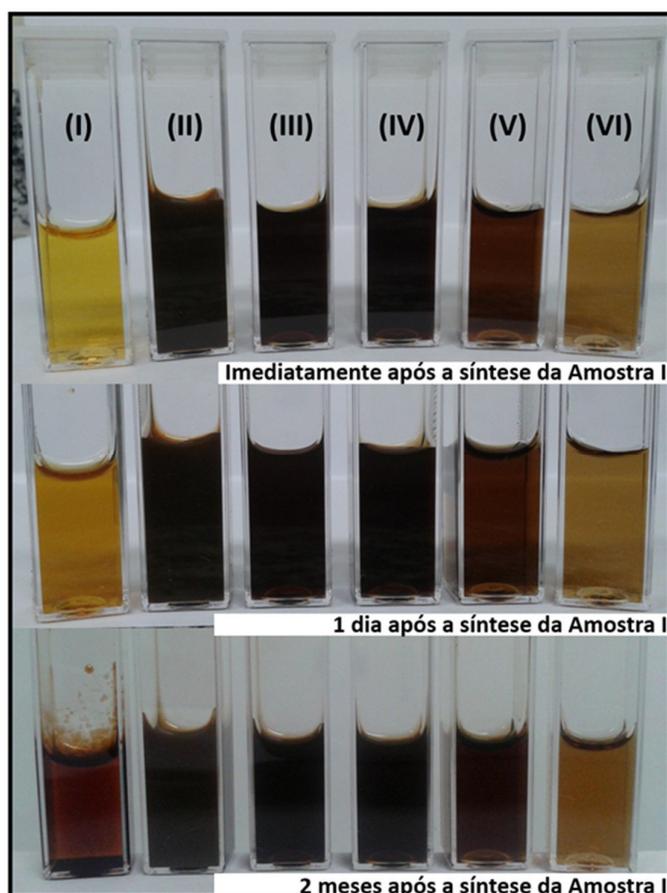
A avaliação da estabilidade das amostras coloidais em função do tempo de armazenamento em condição ambiente do Laboratório, foi realizado com as amostras sem purificação. Na Figura 33 é possível observar que a Amostra I, imediatamente após a preparação, apresenta cor laranja e é límpida. Entretanto, 24 h após seu acondicionamento a temperatura ambiente, a amostra apresenta-se turva. Após dois meses de acondicionamento, a amostra apresenta cor avermelhada e muito material precipitado.

A instabilidade observada para a Amostra I poderia ser advinda de seu pH ácido (TABELA 8), com consequente, redução do potencial zeta, uma vez que nestas partículas o tal potencial tem forte relação com a natureza e quantidade de grupos oxigenados nas superfícies

das NPCs. Ainda, as NPCs constituintes desta amostra possuem DH médio em torno de 100,0 nm (TABELA 8), devido aos aglomerados de partículas já formados e que, posteriormente, continuariam o processo de aglomeração e, por conseguinte, a floculação/coagulação e a precipitação observadas. Desta forma, reações utilizando novos parâmetros foram realizadas, de modo a obter amostras mais estáveis e dotadas de NPCs com diâmetro hidrodinâmico menor, também após a diálise.

As demais reações realizadas resultaram em amostras mais estáveis. Na Figura 33, pode-se perceber que as Amostras de II a VI não apresentaram mudanças macroscópicas, mesmo após dois meses de acondicionamento a temperatura ambiente. Assim, considerando as reações de interação das nanopartículas com a lectina e a possibilidade de uso das NPCs em meio biológico, escolheu-se uma amostra dotada de NPCs com diâmetros pequenos e maior concentração de material possível para a realização de testes de estabilidade. Desta forma, a amostra escolhida foi a Amostra V.

Figura 33 - Fotografias mostrando a evolução das Amostras (I a VI) em função do tempo de acondicionamento em condição ambiente do Laboratório.



Fonte: elaborada pela autora.

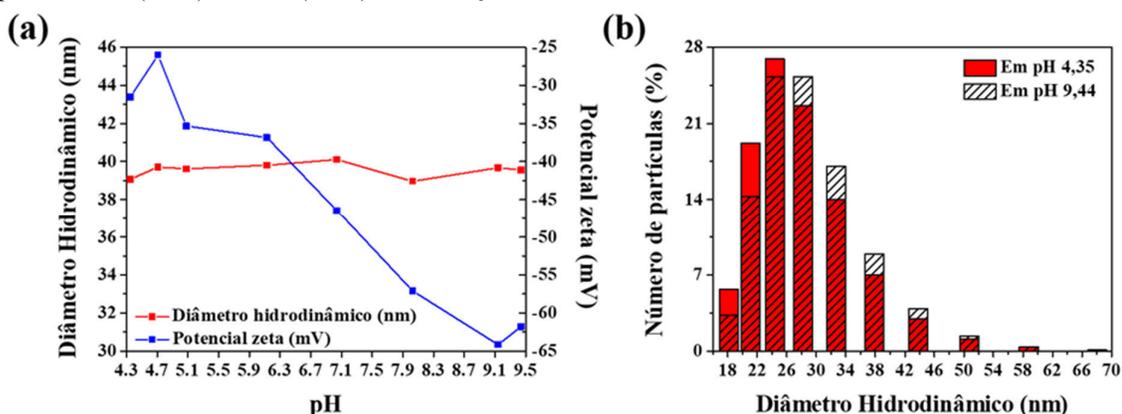
#### 4.4.1 Efeitos da variação do pH

O gráfico mostrado na Figura 34a apresenta os resultados, obtidos a partir da titulação, acompanhada por medidas de DLS e potencial zeta da Amostra PV em função do pH. Antes da adição de NaOH 0,25 mol/L, a amostra apresentava pH 4,35, DH médio de 39,1 nm e potencial zeta de -31,5 mV.

A contínua adição de NaOH promove o aumento, em módulo, do valor médio do potencial zeta que, ao fim do procedimento, foi de -61,8 mV. Entretanto, o DH médio das NPCs oscila entre 38,4 e 40,4 nm, o que sugere que a amostra não sofre alteração significativa. No pH final de 9,44, as NPCs apresentam DH médio de 39,6 nm.

O histograma mostrado na Figura 34b revela que a adição de NaOH conduziu à redução do número de partículas com DH de até 26,0 nm proporcionalmente ao aumento na porcentagem daquelas com diâmetro entre 27,0 e 52,0 nm. Apesar desta alteração, da Tabela 11, nota-se que as faixas de distribuição do número de partículas na amostra em cada pH analisado são, em geral, as mesmas. Em cada pH, 95% das partículas na amostra possui DHs entre 18,2 e 37,8 nm. Assim, o aumento do pH da amostra, por meio da adição de NaOH, não promoveu aumento significativo dos diâmetros das NPCs. Por outro lado, a adição de NaOH promove o aumento da camada de carga elétrica em torno das partículas devido ao aumento da concentração de cargas na amostra, possivelmente, devido a reação dos íons  $\text{OH}^-$  com funções ácidos carboxílicos na superfície das partículas, formando carboxilatos. Tal fato explicaria porque o valor do potencial zeta torna-se ainda mais negativo.

Figura 34 - (a) Gráfico do diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta em função do pH da Amostra PV. O aumento de pH foi promovido com a adição de solução de NaOH 0,25 mol/L. (b) Histogramas referentes às distribuições de diâmetros hidrodinâmicos das NPCs na Amostra PV nos pHs inicial (4,35) e final (9,44) da titulação.



Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 11 – Faixas de distribuição de diâmetros hidrodinâmicos por número de partículas (D25, D50 e D95) para a Amostra PV nos pHs analisados durante a titulação.

pH	Faixas de distribuição de diâmetros hidrodinâmicos (nm)		
	D25	D50	D95
4,35	18,2 – 21,0	18,2 – 24,4	18,2 – 37,8
4,71	18,2 – 21,0	18,2 – 24,4	18,2 – 37,8
5,08	18,2 – 21,0	18,2 – 24,4	18,2 – 37,8
6,13	18,2 – 21,0	18,2 – 24,4	18,2 – 37,8
7,04	18,2 – 21,0	18,2 – 24,4	18,2 – 37,8
8,03	15,7 – 21,0	15,7 – 24,4	15,7 – 37,8
9,14	15,7 – 21,0	15,7 – 24,4	15,7 – 37,8
9,44	18,2 – 21,0	18,2 – 24,4	18,2 – 37,8

Fonte: elaborada pela autora.

Desta forma, entende-se que, ao elevar o pH da amostra, esta torna-se mais estável. O valor do potencial zeta no pH 9,44 (-61,8 mV) auxiliou na estabilidade da amostra, refletindo a existência de densidade de cargas suficiente na superfície das partículas para promover o afastamento das NPCs por repulsão eletrostática, superando a atração de Van der Waals e impedindo a agregação. Esta hipótese foi corroborada por medidas de DLS e PDI realizadas para a amostra quatro meses após a titulação, pois o DH médio obtido foi de 38,9 nm e o PDI de 0,089. Macroscopicamente, a amostra também se revelou estável, sem a ocorrência de precipitados ou mudança na coloração.

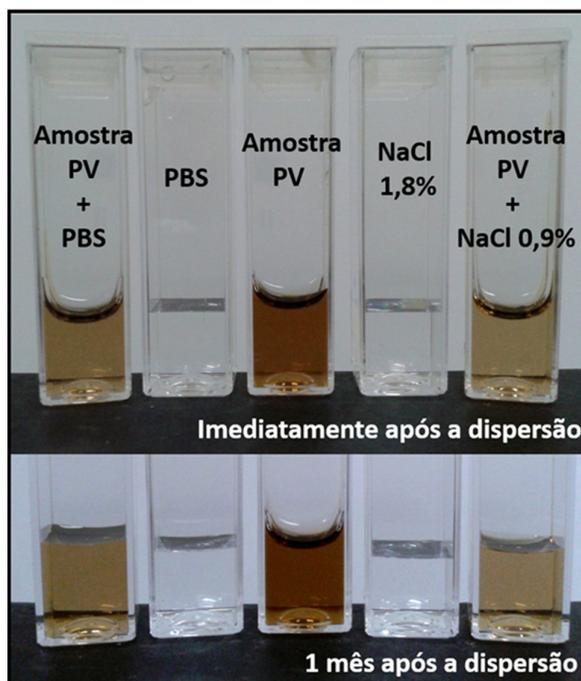
#### ***4.4.2 Nanopartículas de carbono em meio salino – soro fisiológico (NaCl 0,9%) e tampão fosfato salino (PBS)***

A estabilidade das NPCs na Amostra PV também foi investigada em relação ao aumento da força iônica promovida pela dispersão da amostra nas soluções salinas NaCl 0,9% e PBS.

A Figura 35 mostra alíquotas das soluções salinas preparadas (NaCl 1,8% e PBS), da amostra pura (Amostra PV) e dispersa em PBS (Amostra PV + PBS) e em NaCl (Amostra PV + NaCl 0,9%), imediatamente e 1 mês após as preparações. Através da inspeção visual é possível observar, logo após a dispersão, que a Amostra PV + PBS apresenta cor mais escura que a Amostra PV + NaCl 0,9% e que não houve alteração de cor ou formação de precipitado em nenhuma das alíquotas durante o mês de acondicionamento monitorado.

Além do acompanhamento visual, as amostras também foram analisadas por DLS, em diferentes intervalos de tempo. Os resultados obtidos estão descritos nas Tabelas 12 e 13.

Figura 35 - Fotografias de alíquotas das soluções NaCl (1,8%) e tampão fosfato salino (PBS), da Amostra PV e das dispersões desta amostra nestes meios salinos (Amostra PV + NaCl 0,9% e Amostra PV + PBS) em função do tempo de acondicionamento nas condições ambiente do Laboratório.



Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 12 - Diâmetros hidrodinâmicos médios e PdIs obtidos por DLS para a Amostra PV pura e quando dispersa em soluções salinas de NaCl 0,9% e tampão fosfato salino (PBS) em função do tempo de acondicionamento nas condições ambiente do Laboratório.

Tempo	Amostra PV		Amostra PV + PBS		Amostra PV + NaCl 0,9%	
	DH Médio (nm)	PdI	DH Médio (nm)	PdI	DH Médio (nm)	PdI
0 hora	26,1	0,160	31,8	0,237	46,1	0,191
1 hora	-	-	27,8	0,230	105,9	0,314
4 horas	-	-	23,7	0,084	114,2	0,366
18 horas	-	-	25,1	0,158	89,4	0,198
42 horas	24,6	0,105	25,5	0,164	82,3	0,211
1 semana	26,4	0,216	42,8	0,356	69,6	0,228
1 mês	28,0	0,247	78,4	0,343	76,9	0,408

Fonte: elaborada pela autora.

Da Tabela 12, observa-se que, até 4 h de acondicionamento, os valores de DH médio e PdI referentes as dispersões apresentam-se variados e, em geral, diferem significativamente daquele observado para a Amostra PV (no tempo de 0 h). Tais variações sugerem um período de perturbação, desequilíbrio das NPCs pela inserção dos íons das soluções salinas.

Da Tabela 13 verifica-se que este desequilíbrio é maior para a dispersão Amostra PV + NaCl 0,9%, que apresenta faixas de distribuição de DHs mais distintas que as observadas para a Amostra PV.

Tabela 13 – Faixas de distribuição de diâmetros hidrodinâmicos por número de partículas (D20, D60 e D90) para a Amostra PV quando em soluções salinas de NaCl 0,9% e tampão fosfato salino (PBS) em função do tempo de acondicionamento nas condições ambiente do Laboratório.

Tempo	Amostra	Faixas de distribuição de diâmetros hidrodinâmicos (nm)		
		D20	D60	D90
0 hora	Amostra PV	8,7 – 11,7	8,7 – 15,7	8,7 – 21,0
	Amostra PV + PBS	6,5 – 8,7	6,5 – 15,7	6,5 – 18,2
	Amostra PV + NaCl 0,9%	11,7 – 15,7	11,7 – 21,0	11,7 – 32,7
1 hora	Amostra PV	-	-	-
	Amostra PV + PBS	8,7 – 10,1	8,7 – 13,5	8,7 – 18,2
	Amostra PV + NaCl 0,9%	11,7 – 18,2	11,7 – 24,4	11,7 – 37,8
4 horas	Amostra PV	-	-	-
	Amostra PV + PBS	10,1 – 11,7	10,1 – 15,7	10,1 – 21,0
	Amostra PV + NaCl 0,9%	10,1 – 15,7	10,1 – 24,4	10,1 – 37,8
18 horas	Amostra PV	-	-	-
	Amostra PV + PBS	10,1 – 11,7	10,1 – 15,7	10,1 – 21,0
	Amostra PV + NaCl 0,9%	15,7 – 18,2	15,7 – 28,2	15,7 – 50,7
42 horas	Amostra PV	10,1 – 11,7	10,1 – 15,7	10,1 – 21,0
	Amostra PV + PBS	8,7 – 11,7	8,7 – 18,2	8,7 – 21,0
	Amostra PV + NaCl 0,9%	21,0 – 24,4	21,0 – 32,7	21,0 – 50,7
1 semana	Amostra PV	10,1 – 13,5	10,1 – 18,2	10,1 – 21,0
	Amostra PV + PBS	13,5 – 18,2	13,5 – 24,4	13,5 – 28,2
	Amostra PV + NaCl 0,9%	10,1 – 15,7	10,1 – 21,0	10,1 – 28,2
1 mês	Amostra PV	11,7 – 13,5	11,7 – 18,2	11,7 – 24,4
	Amostra PV + PBS	10,1 – 13,5	10,1 – 18,2	10,1 – 24,4
	Amostra PV + NaCl 0,9%	10,1 – 13,5	10,1 – 18,2	10,1 – 28,2

Fonte: elaborada pela autora.

As análises das dispersões nos períodos de 18 e 42 h de acondicionamento indicam que estas atingiram um equilíbrio, uma vez que os DHs médios e PdIs (TABELA 12) e faixas de distribuição de DHs (TABELA 13) para estes dois períodos são semelhantes. Entretanto, os dados revelam aglomeração das NPCs na dispersão Amostra PV + NaCl 0,9%, em relação aos dados correspondentes às outras duas amostras. A dispersão passa a apresentar 90% das partículas com DHs de até 50,7 nm, enquanto para a Amostra PV e para a Amostra PV + PBS, os referidos DHs são de até 21,0 nm.

Os dados obtidos após 1 semana de ensaio evidenciam aglomeração das NPCs na dispersão Amostra PV + PBS, refletida no aumento do DH médio e do PdI (TABELA 12). O DH médio para esta dispersão continua a aumentar após 1 mês de ensaio (TABELA 12), o que

indica o avanço do processo de aglomeração. Entretanto, este processo é lento, tendo em vista que as faixas de distribuição de DHs não sofrem variação significativa, em relação aos demais períodos (TABELA 13), assim como turbidez ou precipitação não são verificadas na fotografia correspondente a este tempo de acondicionamento (FIGURA 35).

Para a Amostra PV + NaCl 0,9%, as NPCs, também é possível considerar a ocorrência de um processo de aglomeração lenta, o que é evidenciado pelo aumento nos valores dos PdIs após 1 semana e 1 mês de ensaio e por não haver alterações nas fotografias durante todo o período do ensaio (FIGURA 35).

A Amostra PV também apresenta certa aglomeração nos dois últimos períodos analisados, denotada pelo aumento do PDI (TABELA 12). Desta forma, sugere-se que, embora as dispersões nas soluções salinas tenham apresentado resultados que indicam aglomeração, as NPCs apresentaram relativa estabilidade nestes sistemas durante o período de 1 mês.

#### ***4.4.3 Efeitos da variação de temperatura***

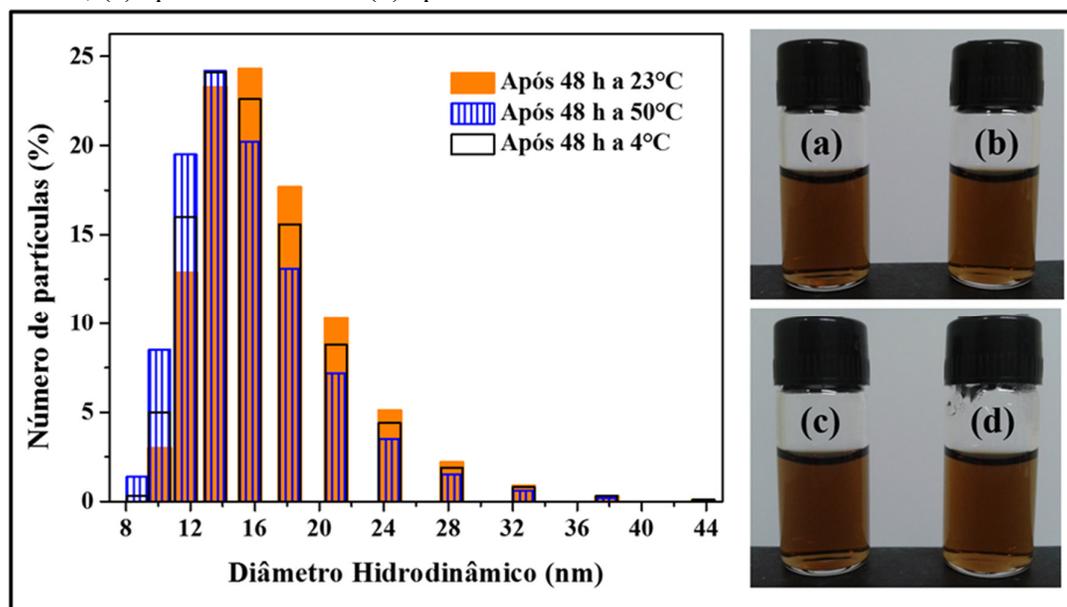
A estabilidade das NPCs na Amostra PV também foi avaliada quando a amostra é submetida a diferentes temperaturas (estabilidade acelerada). Os resultados dos ensaios promovidos também foram obtidos por meio de inspeção visual e de medidas de DLS e ELS (FIGURA 36, TABELA 14, TABELA 15).

Na Figura 36, as fotografias mostram a Amostra PV antes e após os ensaios realizados, a temperatura ambiente. Nas Figuras 36a e 36b são mostrados os frascos com a amostra antes dos ensaios. É possível observar a cor marrom e límpida da amostra e sem nenhum material precipitado. Na Figura 36c tem-se o frasco com a amostra após o ensaio a 4 °C e, na Figura 36d, após o ensaio a 50 °C. Destas imagens, verifica-se que não houve alterações de cor, turbidez ou precipitação nem na amostra resfriada em geladeira, nem naquela aquecida em estufa.

A comparação dos histogramas, também mostrados na Figura 36, revela que não houve variação significativa nos diâmetros hidrodinâmicos estimados. O mesmo pode ser observado através dos dados nas Tabelas 14 e 15.

Os resultados sugerem que tanto o resfriamento (4 °C) quanto aquecimento (50 °C) não afetaram significativamente a Amostra PV, uma vez que os DHs médios, os PdIs, os potenciais zeta e os pHs (TABELA 14), além das faixas de distribuição de DHs (TABELA 15) das alíquotas submetidas a diferentes temperaturas apresentaram-se semelhantes aos valores obtidos para a amostra acondicionada à temperatura ambiente.

Figura 36 - Histograma comparativo referente às faixas de distribuições de diâmetro hidrodinâmico por número de partículas para a Amostra PV, após 48 h sob as temperaturas 50 °C, 4 °C, e temperatura ambiente (23 °C). As fotografias mostram a Amostra PV (a) e (b) sob temperatura ambiente, (c) após 48 h a 4 °C e (d) após 48 h a 50 °C.



Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 14 – Dados obtidos através de análises por DLS, ELS e pH da Amostra PV antes e após os ensaios de estabilidade acelerada.

Amostra	Diâmetro Hidrodinâmico Médio (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)	pH
Sob temperatura ambiente (23 °C)	26,1	0,148	-29,9	5,15
Após 48 h sob temperatura ambiente (23 °C)	26,6	0,185	-30,4	5,19
Após 48 h a 50 °C	26,7	0,193	-32,5	5,10
Após 48 h a 4 °C	27,7	0,204	-32,1	4,88

Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 15 – Faixas de distribuição de diâmetros hidrodinâmicos por número de partículas (D15, D65 e D95) para a Amostra PV antes e após os ensaios de estabilidade acelerada.

Amostra	Faixas de distribuição de diâmetros hidrodinâmicos (nm)		
	D15	D65	D95
Sob temperatura ambiente (23 °C)	8,7 – 11,7	8,7 – 15,7	8,7 – 24,4
Após 48 h sob temperatura ambiente (23 °C)	10,1 – 11,7	10,1 – 15,7	10,1 – 24,4
Após 48 h a 50 °C	8,7 – 10,1	8,7 – 15,7	8,7 – 21,0
Após 48 h a 4 °C	8,7 – 11,7	8,7 – 15,7	8,7 – 24,4

Fonte: elaborada pela autora.

## 4.5 Toxicidade

Bioensaios preliminares para a avaliação da toxicidade das Amostras II e PII foram realizados, utilizando náuplios (fase larval) de *Artemia salina*, como modelo experimental. Estas amostras foram escolhidas por apresentarem concentração de NPCs mais apropriada para o bioensaio. Além disso, como estas amostras possuem as maiores concentrações dentre as amostras geradas nesta Tese e os testes são realizados utilizando a amostra em diferentes diluições, os resultados obtidos poderiam servir como base para estudos posteriores com as demais amostras dotadas de menor concentração.

As espécies *Artemia* são zooplânctons geralmente utilizados para alimentar peixes. O uso destes organismos é muito comum em testes para avaliação prévia da toxicidade de materiais, uma vez que tais ensaios são de fácil manuseio, baixo custo, a espécie apresenta ciclo de vida curto, possibilidade de armazenamento dos cistos a temperatura ambiente e, por vários meses, sem perda de viabilidade, etc. (ARRUDA *et al.*, 2013; ATES *et al.*, 2013). Além disso, as artêmias são organismos filtradores, por isso estão em constante locomoção para se alimentar, sendo capazes de ingerir facilmente partículas menores de 50,0  $\mu\text{m}$  (ATES *et al.*, 2013). Desta forma, podem ser considerados altamente sensíveis a modificações do meio em que estão inseridos.

Na Figura 37, imagens de Microscopia Óptica e SEM ilustram alguns resultados obtidos para o bioensaio. A imagem de Microscopia Óptica na Figura 37a mostra um náuplio de *Artemia salina* do controle negativo. É possível observar que o náuplio é “transparente” a luz, de modo que poderia ser visualizado acúmulo de aglomerados de nanopartículas, da ordem de poucos microns, em seu interior. As imagens SEM nas Figuras 37f e 37k, mostram as guelras e o abdômen do náuplio, respectivamente, onde poderiam se depositar os materiais suspensos no meio. As esferas observadas nestas imagens são leveduras.

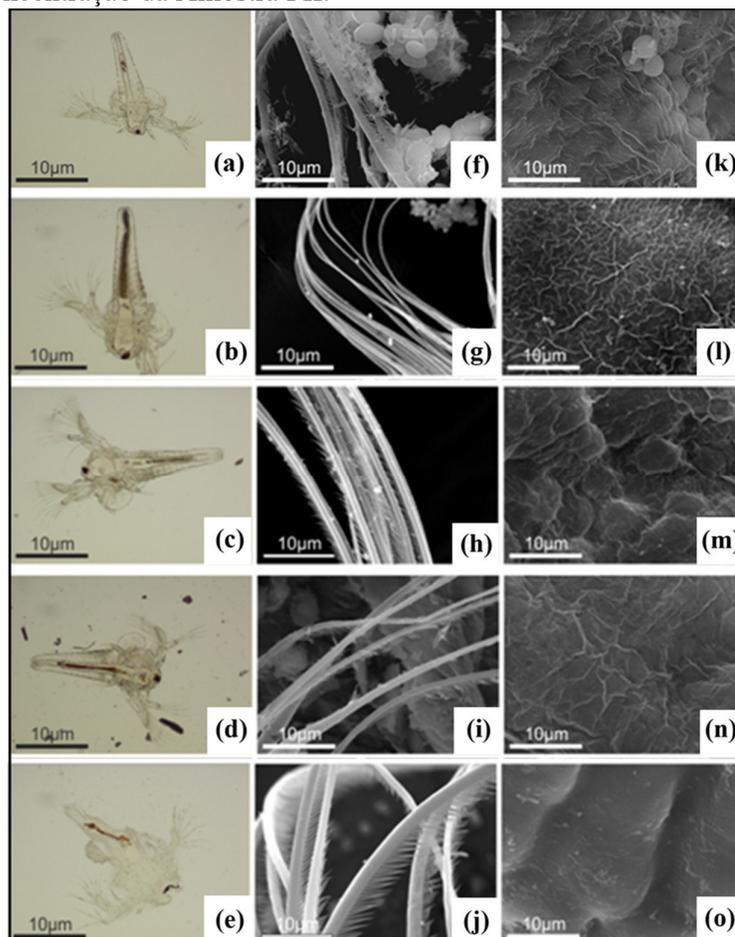
As Figuras 37b e 37c e as Figuras 37d e 37e referem-se a náuplios após 24 h de bioensaios com as Amostras II e PII, nas maiores e menores concentrações testadas, respectivamente. Para todas as imagens, é possível observar o abdômen escuro dos náuplios, indicando que as NPCs foram internalizadas.

Nas Figuras 37g e 37h é possível observar pontos brancos, que poderiam corresponder a aglomerados de NPCs, depositados nas guelras do náuplio, após o contato com a Amostra II na maior e na menor concentração, respectivamente. Pontos brancos também podem ser visualizados no abdômen do náuplio (FIGURA 37l) após o contato com a Amostra II na maior concentração.

Para a Amostra PII não se observaram alterações em relação ao controle negativo, para nenhuma das concentrações testadas.

Embora possam ter sido verificadas partículas depositadas no corpo dos náuplios, ao término do bioensaio, nenhum indivíduo morreu, para nenhuma das concentrações estudadas. Desta forma, estes resultados preliminares indicam que as Amostras II e PII são de baixa toxicidade.

Figura 37 – Imagens de Microscopia Óptica de náuplios de *Artemia salina* em (a) controle negativo, (b) ensaio de toxicidade com a maior concentração da Amostra II, (c) ensaio de toxicidade com a menor concentração da Amostra II, (d) ensaio de toxicidade com a maior concentração da Amostra PII e (e) ensaio de toxicidade com a menor concentração da Amostra PII. Imagens SEM de guelras de náuplios de *Artemia salina* em (f) controle negativo, (g) ensaio de toxicidade com a maior concentração da Amostra II, (h) ensaio de toxicidade com a menor concentração da Amostra II, (i) ensaio de toxicidade com a maior concentração da Amostra PII, (j) ensaio de toxicidade com a menor concentração da Amostra PII. Imagens SEM de abdomens de náuplios de *Artemia salina* em (k) controle negativo, (l) ensaio de toxicidade com a maior concentração da Amostra II, (m) ensaio de toxicidade com a menor concentração da Amostra II, (n) ensaio de toxicidade com a maior concentração da Amostra PII e (o) ensaio de toxicidade com a menor concentração da Amostra PII.



Fonte: elaborada pela autora.

## 4.6 Sistemas nanopartículas de carbono – ConBr

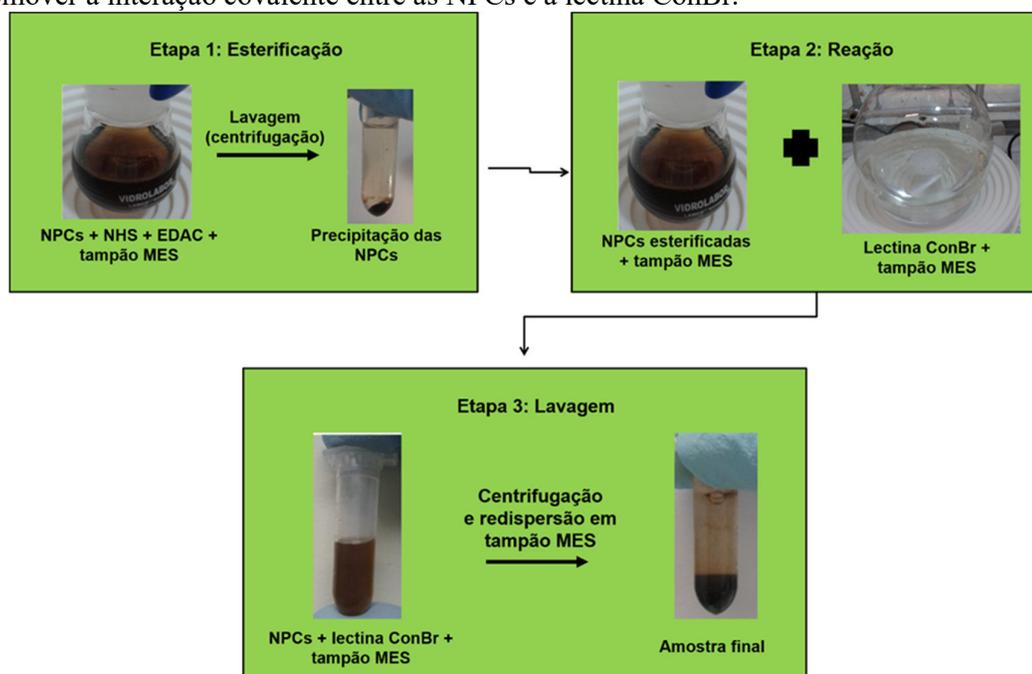
### 4.6.1 Propriedades físico-químicas

Para a conjugação da proteína ConBr às nanopartículas de carbono também foram utilizadas as estratégias de interação covalente e não covalente. Na Figura 38, as fotografias ilustram etapas da reação de amidação utilizada para promover a conjugação covalente das NPCs e da lectina ConBr.

Na etapa 1 (esterificação), verifica-se que ocorreu a precipitação das NPCs. A centrifugação da amostra esterificada, resultou na formação de um precipitado e um sobrenadante límpido.

Para a etapa de reação (etapa 2), as NPCs foram redispersas em tampão MES e, macroscopicamente, a redispersão torna-se semelhante a amostra inicial, sem partículas visíveis ou precipitados e mesma cor, porém, só permanecem redispersas sob agitação. Uma vez precipitadas, as NPCs não apresentaram mais estabilidade em água ou tampão MES.

Figura 38 - Representação esquemática das principais etapas do procedimento realizado para promover a interação covalente entre as NPCs e a lectina ConBr.



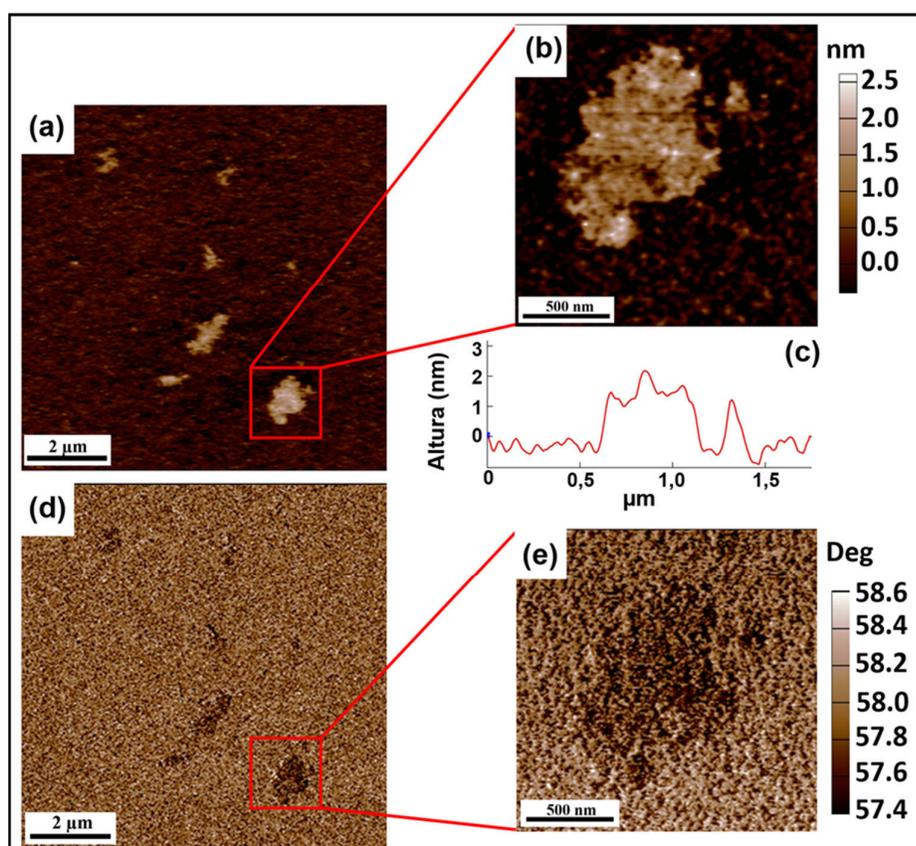
Fonte: elaborada pela autora.

Ao final das reações, os conjugados gerados também foram centrifugados e lavados (etapa 3) para a retirada de lectina não ligada. Tais conjugados também apresentaram o mesmo

comportamento das NPCs após esterificação, redispersando satisfatoriamente, mas, minutos após acondicionamento em repouso, nota-se a formação dos primeiros precipitados. Nos ensaios de interação não-covalente (adsorção), o mesmo comportamento instável foi observado para as NPCs. Tal fato sugere um desequilíbrio causado pelo ajuste do pH com o tampão MES e/ou devido a interação com a proteína.

A avaliação morfológica dos sistemas preparados foi realizada através de imagens AFM, no modo topografia e contraste de fase. Para auxiliar nas interpretações, imagens AFM da lectina ConBr também foram obtidas (FIGURA 39).

Figura 39 - Resultados obtidos por análise de AFM da lectina ConBr. (a, b) Imagens de topografia, (c) Perfil de altura do espécime mostrado em (b), (d, e) Imagens de fase.



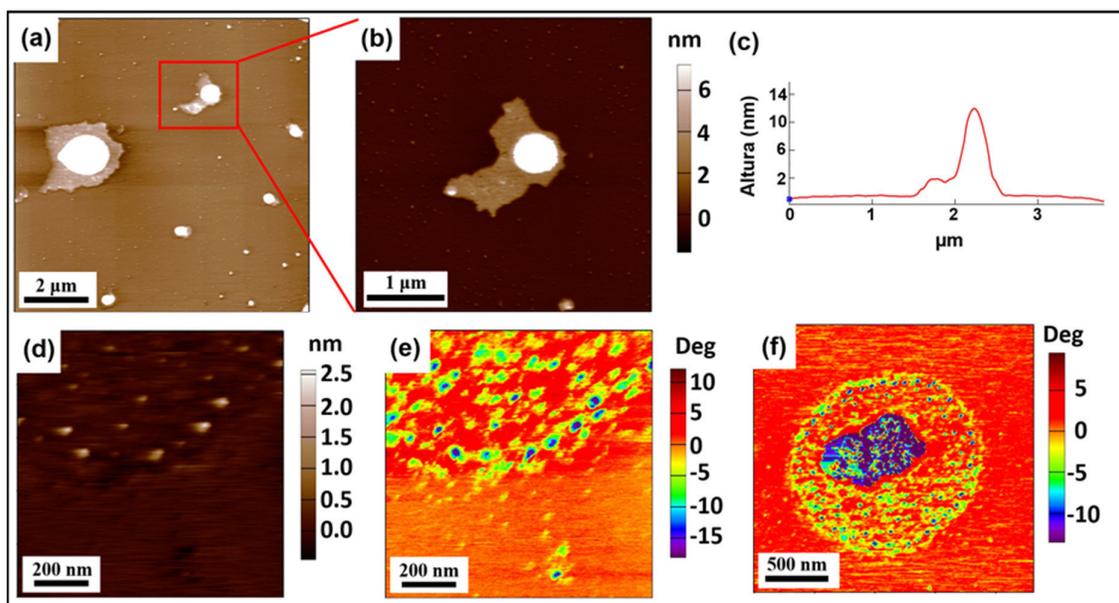
Fonte: elaborada pela autora.

Das imagens é possível observar que a lectina após a secagem no substrato apresenta partículas com bordas e superfície irregulares, com regiões dotadas de alturas entre 1 e 2,5 nm (FIGURAS 39a, 39b, 39c). O contraste de fase da lectina em relação ao do substrato é muito sutil e aparenta homogeneidade, isto é, percebe-se a mesma cor para toda a superfície do espécime analisado (FIGURAS 39d, 39e). Imagens de contraste de fase resultam da mudança

na oscilação da sonda utilizada para o mapeamento do material e tais mudanças podem resultar, dentre outros fatores, das características morfológicas e químicas da amostra analisada (COSTA; RIPPEL; GALEMBECK, 2002). Desta forma, é razoável afirmar que o contraste homogêneo observado para a porção de lectina analisada é coerente com o fato de que este espécime possui topografia e propriedades químicas uniformes.

Na Figura 40 são mostradas as imagens AFM da topografia e de contraste de fase obtidas para os conjugados provenientes das estratégias de interação covalente, NPCs-ConBr(I) e NPCs-ConBr(II).

Figura 40 – Imagens AFM dos conjugados NPCs-ConBr(I) e NPCs-ConBr(II). (a, b) Imagens de topografia do conjugado NPCs-ConBr(I); (c) Perfil de altura da imagem topográfica (b); (d) Imagem de topografia do conjugado NPCs-ConBr(II); (e, f) Imagens de contraste de fase do conjugado NPCs-ConBr(II).



Fonte: elaborada pela autora.

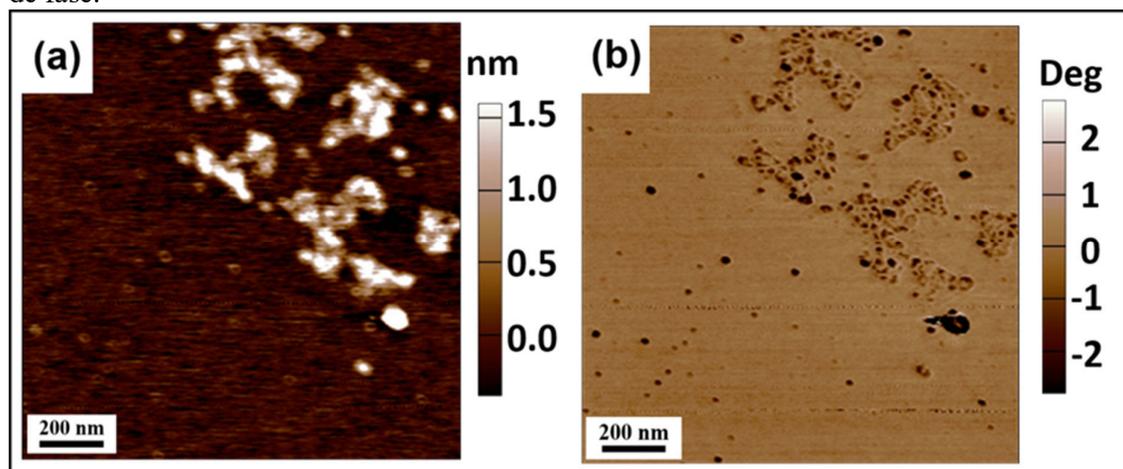
As imagens AFM da topografia obtidas para o primeiro conjugado são mostradas nas Figuras 40a e 40b. Verificam-se espécimes formados por material quasi-esférico em contato com outro material de contorno disforme, semelhante a uma membrana. O perfil de altura na Figura 40c revela que, no espécime em destaque na Figura 40b, os materiais possuem altura de, aproximadamente, 14,0 nm (material quasi-esférico) e de 2,0 nm (membrana). Neste sentido, o material quasi-esférico pode ser entendido como sendo um aglomerado de NPCs, formado devido à perda de estabilidade em decorrência do processo de interação covalente. Já a membrana tem altura semelhante à observada para a lectina ConBr (FIGURA 39c) e, desta forma, sugere-

se que o espécime na Figura 40b é formado por um aglomerado de NPCs envoltas pela lectina ConBr.

A imagem de topografia, na Figura 40d, e as imagens de contraste de fase, Figuras 40e e 40f, mostram que os espécimes constituintes da amostra NPCs-ConBr(II) são semelhantes àqueles observados para a amostra NPCs-ConBr(I) (FIGURAS 40a, 40b). Na imagem de topografia é possível notar pontos mais claros (maior altura) envoltos por borrões menos claros (menor altura). A imagem de contraste de fase da mesma região mostrada na Figura 40d (FIGURA 40e) torna mais perceptível a configuração dos espécimes, nos quais um material é envolto por outro. As cores azul e verde confirmam que os materiais que compõem os espécimes são diferentes (contraste de fase distintos).

Imagens de AFM da topografia e contraste de fase obtidas para o conjugado preparado pela estratégia não covalente (NPCs+ConBr) são mostradas na Figura 41. Para esta amostra, em geral, também se observam espécimes com configuração semelhante à apresentada pelos conjugados obtidos por amidação, sugerindo que as estratégias de conjugação covalente e não covalente levaram a sistemas organizados de modo semelhante: aglomerados de NPCs envoltos por lectina.

Figura 41 - Imagens AFM do conjugado NPCs+ConBr. (a) Imagem de topografia, (b) Imagem de fase.



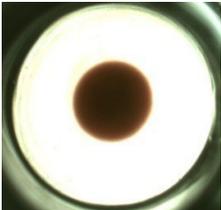
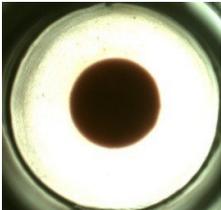
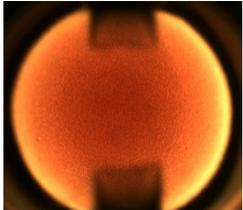
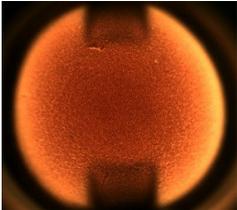
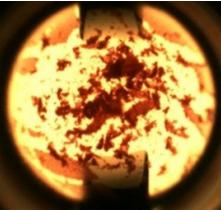
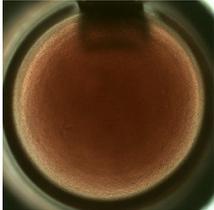
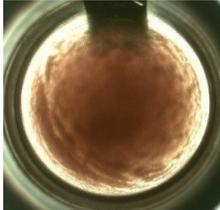
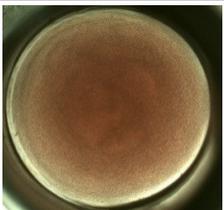
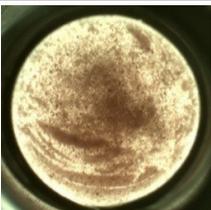
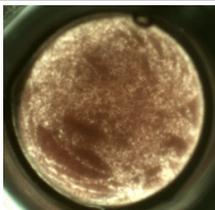
Fonte: elaborada pela autora.

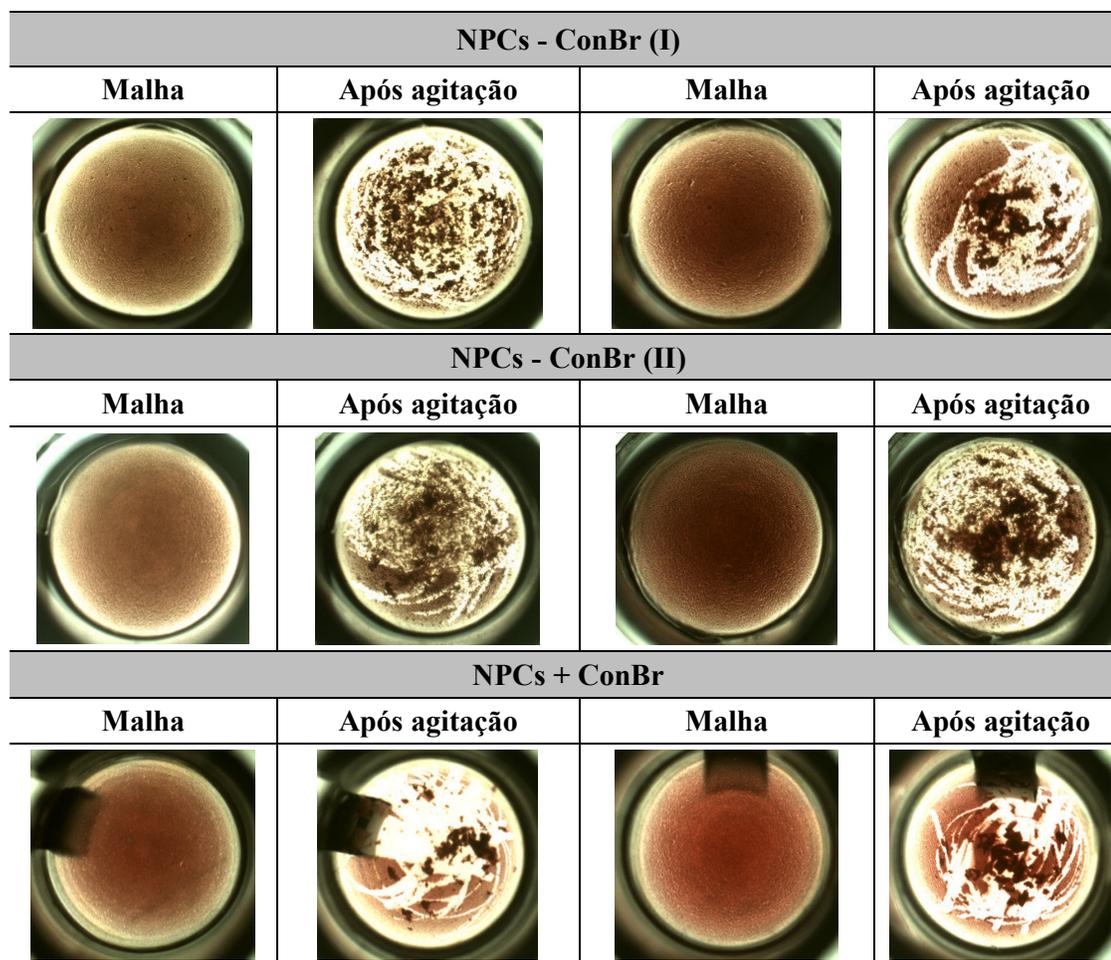
#### 4.6.2 Avaliação da atividade da lectina

Os resultados dos ensaios para a averiguação da atividade de hemaglutinação da lectina quando nos conjugados NPCs-ConBr e NPCs+ConBr são mostrados na Figura 42. A

figura mostra imagens feitas com o microscópio estereoscópio, diretamente dos poços das microplacas, ao fim dos ensaios realizados.

Figura 42 - Imagens de Microscopia Óptica obtidas utilizando microscópio estereoscópio para avaliação da atividade hemaglutinante da lectina ConBr quando conjugada às NPCs purificadas. As imagens mostram os poços das microplacas onde foram realizados os ensaios com os controles (tampão TRIS + eritrócitos) e com as menores diluições da solução de lectina ConBr e das dispersões das amostras de NPCs não purificadas (Amostra V), NPCs purificadas (Amostra PV) e dos conjugados NPCs-ConBr e NPCs+ConBr (tampão TRIS + amostra + eritrócitos).

Ensaio com eritrócitos nativos		Ensaio com eritrócitos tripsinizados	
<b>Controles</b>			
<b>Eritrócitos nativos puros</b>		<b>Eritrócitos tripsinizados puros</b>	
			
<b>Lectina ConBr</b>			
<b>Malha</b>	<b>Após agitação</b>	<b>Malha</b>	<b>Após agitação</b>
			
<b>Amostra V</b>			
<b>Malha</b>	<b>Após agitação</b>	<b>Malha</b>	<b>Após agitação</b>
<i>Amostra não testada com eritrócitos nativos</i>	<i>Amostra não testada com eritrócitos nativos</i>		
<b>Amostra PV</b>			
<b>Malha</b>	<b>Após agitação</b>	<b>Malha</b>	<b>Após agitação</b>
			



Fonte: elaborada pela autora.

Os eritrócitos nativos puros (sem tratamento enzimático) e tripsinizados utilizados como controles negativos apresentam-se como esperado, isto é, precipitados ao fundo dos respectivos poços, não revelando qualquer tipo de interação com o tampão TRIS. Já para a lectina ConBr (solubilizada em tampão TRIS, 1,0 mg/mL), a atividade hemaglutinante foi verificada para os dois tipos de eritrócitos. Nota-se que ocorre a formação de uma malha, ao contrário do que ocorre com os controles, nos quais os eritrócitos precipitam. Após agitação com ponteira para micropipeta é possível observar a coagulação dos eritrócitos, que não redispersam no tampão. Estes resultados foram considerados como controle positivo de atividade de hemaglutinação da lectina ConBr.

As Amostras V e PV foram testadas de modo a verificar seu comportamento quando em contato com os eritrócitos e avaliar os resultados obtidos para os conjugados de forma mais segura.

Nos ensaios com a Amostra PV e observou-se a formação de uma malha semelhante

àquela observada para a ConBr, tanto quando em contato com os eritrócitos nativos quanto com os tripsizinados. Entretanto, quando agitado com a ponteira, o perfil diferiu daquele observado para a lectina. Não foi possível verificar a formação de coágulos, apenas uma malha granulosa que dispersa na solução. Comportamento similar foi observado para a Amostra V, sugerindo que tal comportamento se deve a natureza das partículas.

Segundo Cortés-Giraldo *et al.* (2012), polifenóis podem apresentar atividade de aglutinação de eritrócitos. Em trabalho em que atestam que polifenóis extraídos de 4 grãos de leguminosas (soja, lentilha, grão-de-bico e fava) podem aglutinar eritrócitos humanos tratados com glutaraldeído e tripsizinados, os autores também afirmam que a atividade da lectina de lentilha (utilizada como controle positivo) é duas ordens de magnitude maior que a atividade dos polifenóis testados. Tal característica se deveria ao fato de que a lectina interage com os eritrócitos de forma específica, através dos DRCs, enquanto para os polifenóis a interação ocorreria de forma não específica, por meio de interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio estabelecidas entre os anéis aromáticos e grupos hidroxila na estrutura dos polifenóis e os eritrócitos.

Considerando o mecanismo de formação e a estrutura sugerida para as MPCs explorados na seção 1.2.3, juntamente com os espectros UV/Vis das amostras coloidais purificadas (FIGURA 27), que indicam a existência de aromáticos e carbonila na estrutura das NPCs, é razoável sugerir que estas possam interagir com eritrócitos de forma semelhante aos polifenóis.

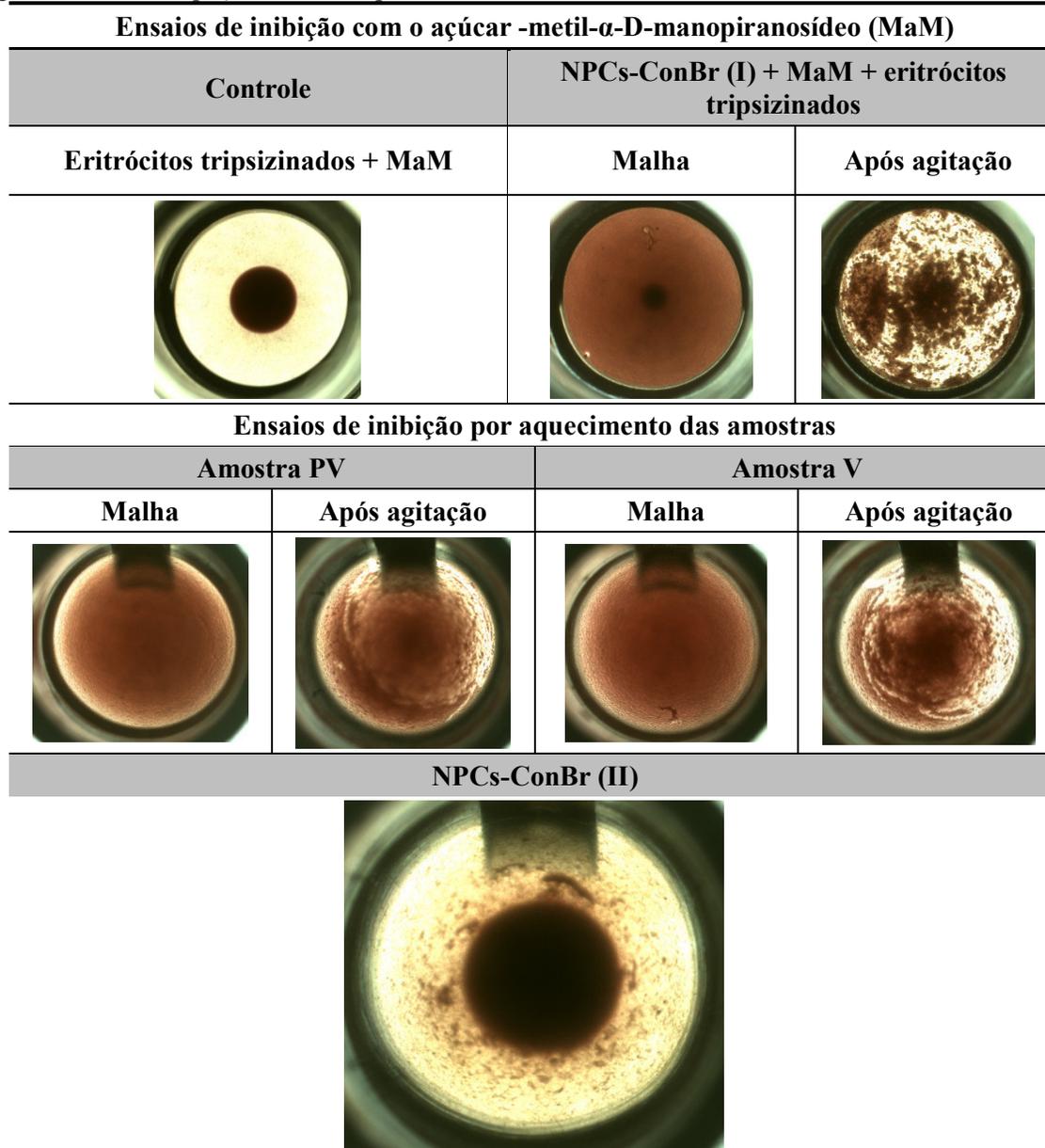
Para descartar a presença de “contaminação por lectina” nas Amostras V e PV, estas foram aquecidas a 100 °C, durante 5 min, de modo a garantir a desnaturação da possível lectina contaminante e, por conseguinte, a perda de sua atividade biológica de hemaglutinação. Na Figura 43, estão apresentados os resultados para o ensaio de inibição de atividade da lectina por aquecimento e verifica-se que as amostras continuam a exibir o mesmo comportamento, o que indica que o efeito é proveniente das nanopartículas provenientes das amostras.

Entretanto, como dito anteriormente, embora os eritrócitos não tenham precipitado e apresentado um perfil semelhante ao observado para os controles negativos do ensaio, como esperado, não foi possível verificar a formação de coágulos semelhantes aos observados para o controle positivo. Desta forma, pode-se considerar os eventos como uma “falsa atividade” gerada pelas nanopartículas, mas que não prejudicaria a avaliação da atividade da lectina nos conjugados, uma vez que a “falsa atividade” apresenta um perfil bem diferente daquele observado para a atividade da lectina ConBr.

Desta forma, pode-se afirmar que os conjugados obtidos por ambas as metodologias

(covalente e não-covalente) apresentaram atividade hemaglutinante. As imagens dos poços onde foram realizados os ensaios para cada conjugado (FIGURA 42), mostram, claramente, a formação da malha e dos coágulos com perfil muito semelhante ao observado para a lectina ConBr.

Figura 43 - Imagens de Microscopia Óptica obtidas utilizando microscópio estereoscópico para avaliação da inibição da atividade hemaglutinante da lectina ConBr na amostra NPCs-ConBr (I) pela ação do açúcar MaM e nas amostras com NPCs não purificadas (Amostra V), NPCs purificadas (Amostra PV) e na amostra NPCs-ConBr (II) por aquecimento a 100 °C. As imagens mostram os poços das microplacas onde foram realizados os ensaios.



Fonte: elaborada pela autora.

Todavia, os ensaios de inibição da atividade hemaglutinante da lectina nos conjugados mostraram resultados controversos (FIGURA 43). Para a amostra NPCs-ConBr (I), o ensaio de inibição foi feito utilizando o açúcar MaM, e, ainda assim, houve a formação de uma malha e de coágulos após agitação. É possível perceber que uma parte do material no poço encontra-se precipitada, mas ainda há a formação da malha e dos coágulos. Já a amostra NPCs-ConBr (II) foi submetida à aquecimento e posta em contato com os eritrócitos tripsinizados. Neste caso, a atividade foi quase totalmente suprimida, mas ainda é possível ver uma malha disforme formada ao redor da amostra precipitada, o que indica que a atividade não foi totalmente suprimida. Tais observações poderiam estar associadas a um possível efeito coagulante das nanopartículas de carbono.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados descritos nesta Tese corroboram o caráter sustentável da técnica de carbonização hidrotérmica na preparação de materiais carbonáceos, cujas propriedades e interação satisfatória com a lectina ConBr permitem vislumbrar aplicações em biotecnologia.

Micro e nanopartículas carbonáceas foram obtidas de forma simples, rápida, sem o uso de precursores tóxicos, a partir de uma fonte de carbono sustentável, a glicose, aliada a um solvente abundante e livre de periculosidade, a água. A temperatura de 180 °C, considerada baixa, e tempos de médio (24 h) a curto (4 h), contribuíram para a economia de energia. A amostra como sintetizada é de fácil manipulação e não exigiu procedimentos elaborados até a preparação final (filtração, lavagem, secagem, diálise) das micro e nanopartículas carbonáceas. Além disso, nenhuma das etapas de preparação gerou resíduos de difícil descarte, questão imprescindível no contexto da sustentabilidade.

Em concordância com o divulgado na literatura, as MPCs preparadas apresentaram morfologia esférica ou quasi-esférica, isoladas ou coalescidas, estrutura amorfa e grupos funcionais oxigenados em sua superfície, tais como ácidos carboxílicos os quais permitiram a interação com a lectina ConBr, tanto por estratégia covalente quanto por estratégia não covalente. Embora as análises indiquem que baixa quantidade da lectina tenha sido imobilizada sobre as MPCs, ainda foi possível notar atividade de aglutinação de eritrócitos proveniente das lectinas imobilizadas. As caracterizações realizadas não permitiram averiguar se a metodologia de amidação foi efetiva no que tange ao estabelecimento da ligação amida. Como os conjugados obtidos por ambas as rotas apresentam características semelhantes, sugere-se que, interações eletrostáticas e hidrofóbicas governaram a imobilização da lectina, independente da metodologia utilizada. Tendo em vista este resultado, a imobilização de proteínas no carbono hidrotérmico por meio da rota de adsorção é mais indicada, pois constitui uma via mais simples, barata e efetiva de imobilização de biomoléculas nas MPCs.

A variação de parâmetros da HTC de glicose permitiu a obtenção de NPCs com diferentes diâmetros. Em geral, NPCs foram obtidas a partir do carboidrato com o auxílio de moléculas estabilizadoras a fim de evitar ou reduzir aglomerações. Nesta Tese, tal objetivo foi buscado com a variação dos parâmetros reacionais. Contudo, as NPCs obtidas apresentaram-se em aglomerados de alguns nanômetros, revelando que deve haver um balanço preciso entre a quantidade do precursor e o tempo de reação de modo a priorizar apenas a nucleação das NPCs e não seu crescimento por aglomeração das partículas primárias.

As caracterizações realizadas mostraram que as NPCs obtidas pelas seis reações de HTC possuem propriedades ópticas (absorção na região do ultravioleta/visível e emissão de fotoluminescência) semelhantes e diferenciam-se pelos diferentes diâmetros e concentração nas amostras, os quais reduzem quanto menor a massa de glicose utilizada como precursor.

As NPCs apresentaram fotoluminescência na região do visível, com emissões nas cores azul e verde, dependentes do comprimento de onda de excitação. Tais emissões foram sugeridas originar do aprisionamento de éxcitons em domínios aromáticos e/ou em armadilhas de superfície geradas pela oxidação das NPCs.

A purificação das NPCs por diálise apresentou-se efetiva para a retirada de subprodutos da HTC, o que pôde ser verificado, tanto macroscopicamente pela secagem das amostras antes e após a diálise, quanto através dos espectros UV/Vis e aumento do pH das amostras. Entretanto, não foi possível verificar se a perda de NPCs concorre para a queda na concentração das amostras ou apenas subprodutos da carbonização incompleta estão sendo excluídos da amostra. Esta redução na concentração após o processo de purificação pode ter influenciado na emissão das amostras, cujos espectros apresentam perfil distinto daquele observado antes da purificação. A supressão de uma das bandas de emissão é sugerida resultar da eliminação de subprodutos da HTC que possam emitir fotoluminescência ou da perda de NPCs com sítios de emissão específicos. Outra explicação para a mudança observada nos espectros seria a alteração do pH promovida pela diálise que desativaria e/ou ativaria novos sítios de emissão, como indicado pelo aumento de intensidade da banda de emissão excitada a 285 nm em relação ao observado nos espectros das amostras antes da diálise. Assim, são necessárias mais análises para assegurar se a diálise é o processo de purificação mais viável e efetivo para as amostras.

Os ensaios de estabilidade realizados com NPCs obtidas por carbonização hidrotérmica de 0,5000 g de glicose a 180 °C por 4 h apresentaram resultados satisfatórios em meios com diferentes forças iônicas e acondicionamento sob temperaturas distintas. Em tampão fosfato salino, as NPCs apresentam DHs estáveis por, pelo menos, 42 h de acondicionamento, enquanto em NaCl 0,9% apresentam aumento dos DHs pelo mesmo período mencionado. Entretanto, ao fim do mês de monitoração, a ausência de alterações visuais e nas faixas de distribuição de DHs, permite sugerir que o processo de aglomeração nas dispersões ocorre, mas de forma bastante lenta e não significativa o bastante, por, pelo menos, 1 mês. No segundo caso, os ensaios de estabilidade acelerada, sob as temperaturas e tempo de acondicionamento testados, revelaram que os DHs das NPCs também não sofreram alterações significativas, assim como nenhuma alteração visual foi verificada para as amostras após os ensaios. Tais resultados, aliados ao resultado preliminar dos bioensaios toxicidade de NPCs obtidas por carbonização

hidrotérmica de 4,0000 g de glicose a 180 °C por 4 h em náuplios de *Artemia salina*, que permitem considerar as NPCs não tóxicas, sugerem que estas partículas apresentam potencial para uso em sistemas biológicos.

O estudo dos novos sistemas de NPCs com a lectina ConBr indicaram a manutenção da atividade de hemaglutinação da lectina nos conjugados formados. A atividade característica da lectina foi verificada para as amostras geradas, juntamente com uma “falsa atividade”, apresentada também pelas nanopartículas puras. Tal evento não prejudicou a avaliação dos resultados dos testes de hemaglutinação, uma vez que foi possível distinguir visualmente este efeito e a formação dos coágulos proveniente da atividade da lectina. Em contrapartida, as metodologias de imobilização tornaram as suspensões de NPCs instáveis, de modo que não mais dispersam em água ou tampão. Tal fato impediu análises seguras da emissão de fotoluminescência dos conjugados.

Assim, os sistemas híbridos gerados permitem vislumbrar a imobilização de outras biomoléculas às micro e nanopartículas de carbono, de modo a contribuir para o entendimento deste tipo de interação e para o desenvolvimento de biodispositivos e biomateriais provenientes de fontes e processos de preparação sustentáveis.

## REFERÊNCIAS

- AINOUZ, I. L. *et al.* Agglutination of enzyme treated erythrocytes by Brazilian marine algal extracts. **Botanica Marina**, v. 35, n. 6, p. 475-479, jan. 1992.
- ARRUDA, F. V. S. *et al.* Toxicity and binding profile of lectins from the genus *Canavalia* on brine shrimp. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-7, 2013.
- ATES, M. *et al.* Comparative evaluation of impact of Zn and ZnO nanoparticles on brine shrimp (*Artemia salina*) larvae: effects of particle size and solubility on toxicity. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 15, n. 1, p. 225-233, jan. 2013.
- AWASTHI, K.; SINGH, D. P.; SINGH, S. Attachment of biomolecules (protein and DNA) to amino-functionalized carbon nanotubes. **Xinxing Tan Cailiao/ New Carbon Materials**, v. 24, n. 4, p. 301-306, dez. 2009.
- BACCILE, N. *et al.* Structural characterization of hydrothermal carbon spheres by advanced solid-state MAS <sup>13</sup>C NMR investigations. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, p. 9644-9654, jun. 2009.
- BAGHERI, S.; JULKAPLI, N. M. Effect of hybridization on the value-added activated carbon materials. **International Journal of Industrial Chemistry**, v. 7, n. 3, p. 249-264, set. 2016.
- BARAUNA, S. *et al.* Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, n. 1, p. 160-169, set. 2006.
- BARBOSA, T. *et al.* *In vivo* lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the *Diocleinae* subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 673-678, jul. 2001.
- BARRAL-NETTO, M. *et al.* Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the *Dioclae* tribe. **Immunological Investigations**, v. 21, n. 4, p. 297-303, 1992.
- BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1767, n. 9, p. 1073-1101, set. 2007.
- BENEŠOVÁ, E.; KRÁLOVÁ, B. **Affinity Interactions as a Tool for Protein Immobilization. Affinity Chromatography Sameh Magdeldin**. IntechOpen, 2012. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/affinity-chromatography/affinity-interactions-as-a-tool-for-a-protein-immobilization>>. Acesso em: 10 ago. 2015.
- BENTO, C. A. M. *et al.* Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. **Agents and Actions**, v. 38, n. S1, p. 48-54, jan. 1993.
- BETTLELHEIM, F. A. *et al.* **Introduction to general, organic and biochemistry**. 10. ed. Belmont: Cengage Learning, 2013.

- BHAKTA, S. A. *et al.* Protein adsorption onto nanomaterials for the development of biosensors and analytical devices: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 872, p. 7–25, mai. 2015.
- BILAL, M. *et al.* Horseradish peroxidase-assisted approach to decolorize and detoxify dye pollutants in a packed bed bioreactor. **Journal of Environmental Management**, v. 183, p. 836–842, dez. 2016.
- 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**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, mai. 1976.
- BYRAPPA, K.; ADSCHIRI, T. Hydrothermal technology for nanotechnology. **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**, v. 53, n. 2, p. 117–166, jun. 2007.
- CALVARESI, M.; ZERBETTO, F. The devil and holy water: protein and carbon nanotube hybrids. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 11, p. 2454–2463, nov. 2013.
- CAVADA, B. S. *et al.* Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* duke. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 675–680, out. 1998.
- CAVADA, B. S. *et al.* Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the *Diocleinae* subtribe lectins. **Current Protein & Peptide Science**, v. 2, n. 2, p. 123–135, 2001.
- CHEN, B. *et al.* Large scale synthesis of photoluminescent carbon nanodots and their application for bioimaging. **Nanoscale**, v. 5, n. 5, p. 1967–71, mar. 2013.
- CHUNTANAPUM, A.; MATSUMURA, Y. Formation of tarry material from 5-HMF in subcritical and supercritical water. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 22, p. 9837–9846, nov. 2009.
- COOK, B. *et al.* **Canavalia Brasiliensis**. Disponível em: <[http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Canavalia\\_brasiliensis.htm](http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Canavalia_brasiliensis.htm)>. Acesso em: 28 jun. 2016.
- CORTÉS-GIRALDO, I. *et al.* Hemagglutinating activity of polyphenols extracts from six grain legumes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 6, p. 1951–1954, jun. 2012.
- COSTA, C. A. R.; RIPPEL, M. M.; GALEMBECK, F. Heterogeneidade da capacidade dissipativa e do módulo de Young em superfícies poliméricas: contraste de fase em AFM com contato periódico. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 12, n. 3, p. 188–192, 2002.
- CUI, X.; ANTONIETTI, M.; YU, S.-H. Structural effects of iron oxide nanoparticles and iron ions on the hydrothermal carbonization of starch and rice carbohydrates. **Small**, v. 2, n. 6, p. 756–759, jun. 2006.
- DE SCHUTTER, K.; VAN DAMME, E. Protein-carbohydrate interactions as part of plant defense and animal immunity. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 9029–9053, mai. 2015.

- DEMIR-CAKAN, R. *et al.* Carboxylate-rich carbonaceous materials via one-step hydrothermal carbonization of glucose in the presence of acrylic acid. **Chemistry of Materials**, v. 21, p. 484–490, fev. 2009.
- DING, C.; ZHU, A.; TIAN, Y. Functional surface engineering of C-dots for fluorescent biosensing and *in vivo* bioimaging. **Accounts of Chemical Research**, v. 47, n. 1, p. 20–30, 21 jan. 2014.
- DING, H. *et al.* Full-color light-emitting carbon dots with a surface-state-controlled luminescence mechanism. **American Chemical Society Nano**, v. 10, n. 1, p. 484–491, jan. 2016.
- EDA, G. *et al.* Blue photoluminescence from chemically derived graphene oxide. **Advanced Materials**, v. 22, n. 4, p. 505–509, jan. 2010.
- ELNASHAR, M. M. M. Review article: immobilized molecules using biomaterials and nanobiotechnology. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 1, n. 1, p. 61–77, out. 2010.
- ENSUNCHO, L.; ALVAREZ-CUENCA, M.; LEGGE, R. L. Removal of aqueous phenol using immobilized enzymes in a bench scale and pilot scale three-phase fluidized bed reactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 27, n. 3, p. 185–191, mai. 2005.
- EŞ, I.; VIEIRA, J. D. G.; AMARAL, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 5, p. 2065–2082, mar. 2015.
- ExPASy: SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS RESOURCE PORTAL. **ProtParam Tool**. Disponível em: <<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam1?P55915@1-237@>>. Acesso em: 08 set. 2016.
- FAHEINA-MARTINS, G. V. *et al.* Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 7, p. 1161–1169, out. 2012.
- FALCO, C. *et al.* Hydrothermal carbon from biomass: structural differences between hydrothermal and pyrolyzed carbons via <sup>13</sup>C solid state NMR. **Langmuir**, v. 27, n. 23, p. 14460–14471, dez. 2011.
- FELTRE, R. **Química: Físico-química**, v. 2, 6. ed. São Paulo: Moderna, 2004. 418 p.
- FERNÁNDEZ-SOLIS, C. *et al.* Uptake of aromatic compounds by DNA: toward the environmental application of DNA for cleaning water. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 129, p. 146–153, mai. 2015.
- GENG, W. *et al.* Analysis of carboxyl group in coal and coal aromaticity by Fourier transform infrared (FT-IR) spectrometry. **Fuel**, v. 88, n. 1, p. 139–144, jan. 2009.
- GIL, M. I.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; HESS-PIERCE, B.; HOLCROFT, D. M.; KADER, A. A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic

composition and processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 10, p. 4581–4589, out. 2000.

GRANGEIRO, T. B. *et al.* Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. **European Journal of Biochemistry**, v. 248, n. 1, p. 43–48, set. 1997.

HAN, X. *et al.* Interactions between carbon nanomaterials and biomolecules. **Journal of Oleo Science**, v. 65, n. 1, p. 1–7, 2016.

HSU, P.-C. *et al.* Synthesis and analytical applications of photoluminescent carbon nanodots. **Green Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 917, abr. 2012.

HSU, P.-C. *et al.* Extremely high inhibition activity of photoluminescent carbon nanodots toward cancer cells. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, p. 1774–1781, abr. 2013.

HU, B. *et al.* Engineering carbon materials from the hydrothermal carbonization process of biomass. **Advanced Materials**, v. 22, n. 7, p. 813–828, fev. 2010.

JAGADEESAN, D. *et al.* Carbon spheres assisted synthesis of porous bioactive glass containing hydroxycarbonate apatite nanocrystals: a material with high *in vitro* bioactivity. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 19, p. 7379–7384, mai. 2008.

JAGADEESAN, D.; ESWARAMOORTHY, M. Functionalized carbon nanomaterials derived from carbohydrates. **Chemistry - An Asian Journal**, v. 5, n. 2, p. 232–243, fev. 2010.

JIANG, K. *et al.* Protein immobilization on carbon nanotubes via a two-step process of diimide-activated amidation. **Journal of Materials Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 37, 2004.

KAMBO, H. S.; DUTTA, A. A comparative review of biochar and hydrochar in terms of production, physico-chemical properties and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 359–378, mai. 2015.

KATZ, E.; WILLNER, I. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, n. 45, p. 6042–6108, nov. 2004.

KAUSHIK, M. *et al.* Protein engineering and de novo designing of a biocatalyst. **Journal of Molecular Recognition**, v. 29, n. 10, p. 499–503, out. 2016.

KONG, J.; YU, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 39, n. 8, p. 549–559, ago. 2007.

LAI, Z. *et al.* Synthesis of novel functional hydrothermal carbon spheres for removal of uranium from aqueous solution. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 310, n. 3, p. 1335–1344, dez. 2016.

LI, H. *et al.* Carbon nanodots: synthesis, properties and applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 46, p. 24230, nov. 2012a.

LI, R.; WANG, L.; SHAHBAZI, A. A review of hydrothermal carbonization of carbohydrates for carbon spheres preparation. **Trends in Renewable Energy**, v. 1, n. 1, p. 43–56, mar. 2015.

LI, Y. *et al.* Nitrogen-doped graphene quantum dots with oxygen-rich functional groups. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 1, p. 15–18, jan. 2012b.

LI, Y. *et al.* Fabrication of carbon/SiO<sub>2</sub> composites from the hydrothermal carbonization process of polysaccharide and their adsorption performance. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 320–328, nov. 2016a.

LI, Y. *et al.* Superior CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, and H<sub>2</sub> uptakes over ultrahigh-surface-area carbon spheres prepared from sustainable biomass-derived char by CO<sub>2</sub> activation. **Carbon**, v. 105, p. 454–462, ago. 2016b.

LIM, S. Y.; SHEN, W.; GAO, Z. Carbon quantum dots and their applications. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 1, p. 362–381, jan. 2015.

LÓPEZ-LORENTE, Á. I.; MIZAIKOFF, B. Mid-infrared spectroscopy for protein analysis: potential and challenges. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 408, n. 11, p. 2875–2889, abr. 2016.

LYNCH, I.; DAWSON, K. A. Protein-nanoparticle interactions. **Nano Today**, v. 3, n. 1–2, p. 40–47, fev. 2008.

MESARIČ, T. *et al.* High surface adsorption properties of carbon-based nanomaterials are responsible for mortality, swimming inhibition, and biochemical responses in *Artemia salina* larvae. **Aquatic Toxicology**, v. 163, p. 121–129, jun. 2015.

MEYER, B. *et al.* Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 5, p. 31–34, mai. 1982.

MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (MART.). Isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum (Praha)**, v. 26, n. 2, p. 113–120, mar 1984.

MOREIRA, R. DE A. *et al.* Plant lectins, chemical and biological aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. Supl. II, p. 211–218, 1991.

MOREIRA, R. DE A.; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant physiology**, v. 59, p. 783–787, mai. 1977.

MU, Q. *et al.* Chemical basis of interactions between engineered nanoparticles and biological systems. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 15, p. 7740–7781, ago. 2014.

MULDER, M. *et al.* **Basic wound care**. 1. ed. Cidade do Cabo: Pearson Education South Africa, 2002. 443 p.

MUTHUKUMAR, T. *et al.* Bio-modified carbon nanoparticles loaded with methotrexate: possible carrier for anticancer drug delivery. **Materials Science and Engineering C**, v. 36, n. 1, p. 14–19, mar. 2014.

NAGARAJU, K.; REDDY, R.; REDDY, N. A review on protein functionalized carbon nanotubes. **Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials**, v. 13, n. 4, p. e301–e312, out./dez. 2015.

NASCIMENTO, K. S. *et al.* Partitioning and recovery of *Canavalia brasiliensis* lectin by aqueous two-phase systems using design of experiments methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 75, n. 1, p. 48–54, set. 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger - Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975 p.

OLIVEIRA, S. F. *et al.* Protein functionalized carbon nanomaterials for biomedical applications. **Carbon**, v. 95, p. 767–779, dez. 2015.

PATNAIK, P. **Dean's analytical chemistry book**. 2 ed. New York: McGRAW-HILL, 2004. 1280 p.

PATRINOIU, G. *et al.* Solid vs. hollow oxide spheres obtained by hydrothermal carbonization of various types of carbohydrates. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 5, n. 40, p. 31768–31771, 2015.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry**. 3 ed. Estados Unidos: Thomson Learning, Inc., 2001. 680 p.

PRIETO-SIMÓN, B.; CAMPÀS, M.; MARTY, J.-L. Biomolecule immobilization in biosensor development: tailored strategies based on affinity interactions. **Protein & Peptide Letters**, v. 15, n. 8, p. 757–763, ago. 2008.

PUDDU, V.; PERRY, C. C. Peptide adsorption on silica nanoparticles: evidence of hydrophobic interactions. **American Chemical Society Nano**, v. 6, n. 7, p. 6356–6363, jul. 2012.

QI, Y. *et al.* Mechanism for the formation and growth of carbonaceous spheres from sucrose by hydrothermal carbonization. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 6, n. 25, p. 20814–20823, 2016.

RABENAU, A. The role of hydrothermal synthesis in preparative chemistry. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 24, p. 1026–1040, dez. 1985.

RESEARCH COLLABORATORY FOR STRUCTURAL BIOINFORMATICS PROTEIN DATA BANK. Image from RSCB PDB ([www.rscb.org](http://www.rscb.org)) of PDB ID 1AZD (Sanz-Aparicio, Julia Hermoso, Juan Grangeiro, Thalles B. Calvete, Juan J. Cavada, Benildo S.) The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 405, n. 1, p. 114–118, mar. 1997.

ROJAS, J.; LONDOÑO, C.; CIRO, Y. The health benefits of natural skin uva photoprotective compounds found in botanical sources. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 3, p. 13-23, mar. 2016.

RUEDAS-RAMA, M. J. *et al.* Fluorescent nanoparticles for intracellular sensing: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 751, p. 1–23, nov. 2012.

SAHU, S. *et al.* Simple one-step synthesis of highly luminescent carbon dots from orange juice: application as excellent bio-imaging agents. **Chemical Communications**, v. 48, n. 70, p. 8835, set. 2012.

SANTIAGO, S. R. M. *et al.* Origin of tunable photoluminescence from graphene quantum dots synthesized via pulsed laser ablation. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 32, p. 22599–22605, ago. 2016.

SAPSFORD, K. E. *et al.* Functionalizing nanoparticles with biological molecules: developing chemistries that facilitate nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 3, p. 1904–2074, mar. 2013.

SAWYER, L. C.; GRUBB, D. T. **Polymer Microscopy**. 1. ed. London, New York: Chapman and Hall, 1987. 302 p.

SEVILLA, M.; FUERTES, A. B. Chemical and structural properties of carbonaceous products obtained by hydrothermal carbonization of saccharides. **Chemistry - A European Journal**, v. 15, n. 16, p. 4195–4203, abr. 2009a.

SEVILLA, M.; FUERTES, A. B. The production of carbon materials by hydrothermal carbonization of cellulose. **Carbon**, v. 47, n. 9, p. 2281–2289, ago. 2009b.

SEVILLA, M.; FUERTES, A. B.; MOKAYA, R. High density hydrogen storage in superactivated carbons from hydrothermally carbonized renewable organic materials. **Energy & Environmental Science**, v. 4, n. 4, p. 1400, abr. 2011.

SHANDILYA, M.; RAI, R.; SINGH, J. Review: hydrothermal technology for smart materials. **Advances in Applied Ceramics**, v. 115, n. 6, p. 354–376, ago. 2016.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53–62, nov. 2004.

SHAW, R. **Dynamic Light Scattering Training: achieving reliable nanoparticle sizing**. Malvern, 2014. Disponível em: <<http://149.171.168.221/partcat/wp-content/uploads/Malvern-Zetasizer-LS.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2014.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, mar. 2013.

SHEN, C. *et al.* Facile route to highly photoluminescent carbon nanodots for ion detection, pH sensors and bioimaging. **Nanoscale**, v. 6, n. 15, p. 9139–9147, ago. 2014.

SHEN, L. *et al.* The production of pH-sensitive photoluminescent carbon nanoparticles by the carbonization of polyethylenimine and their use for bioimaging. **Carbon**, v. 55, p. 343–349, abr. 2013.

SIGMA-ALDRICH. **Sodium chloride physiological solution**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/07982?lang=pt&region=BR>>. Acesso em: 15 dez. 2016a.

SIGMA-ALDRICH. **Phosphate buffered saline**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p4417?lang=pt&region=BR>>. Acesso em: 15 dez. 2016b.

SILVA, F. D. O. *et al.* Perfil de proteases de lesões cutâneas experimentais em camundongos tratadas com a lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis*. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1808–1814, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7 ed. Tradução de Ricardo Bicca de Alencastro. Rio de Janeiro: LTC, 2006. 490 p.

SOUZA FILHO, A. G. DE; FAGAN, S. B. Funcionalização de nanotubos de carbono. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1695–1703, 2007.

SUN, X.; LI, Y. Colloidal carbon spheres and their core/shell structures with noble-metal nanoparticles. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, n. 5, p. 597–601, 23 jan. 2004.

TEIXEIRA, E. H. *et al.* **Biological applications of plants and algae lectins: an overview. Carbohydrates: comprehensive studies on glycobiology and glycotecology Chuan-Fa Chang**. IntechOpen, 2012. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/carbohydrates-comprehensive-studies-on-glycobiology-and-glycotecology/biological-applications-of-plants-and-algae-lectins-an-overview>>. Acesso em: 03 out. 2016.

THERMO SCIENTIFIC PIERCE. **Crosslinking technical handbook**. Rockford: Thermo Fisher Scientific Inc., 2012. 56 p. Disponível em: <<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602163-Crosslinking-Reagents-Handbook.pdf>>. Acesso em: 30 mar. 2015.

TITIRICI, M.-M. *et al.* Black perspectives for a green future: hydrothermal carbons for environment protection and energy storage. **Energy & Environmental Science**, n. 5, p. 6796, mai. 2012.

TITIRICI, M.-M. **Hydrothermal carbonisation: a sustainable alternative to versatile carbon materials**. 2012. 351 f. (Tese de Habilitação em Química dos Materiais) - Max-Planck Institute of Colloids and Interfaces, Universidade de Potsdam, Potsdam, 2012.

TITIRICI, M.-M. *et al.* Sustainable carbon materials. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 1, p. 250–290, jan. 2015.

TITIRICI, M.-M.; ANTONIETTI, M.; BACCILE, N. Hydrothermal carbon from biomass: a comparison of the local structure from poly- to monosaccharides and pentoses/hexoses. **Green Chemistry**, v. 10, n. 11, p. 1204, nov. 2008.

TITIRICI, M. M. *et al.* A direct synthesis of mesoporous carbons with bicontinuous pore morphology from crude plant material by hydrothermal carbonization. **Chemistry of Materials**, v. 19, n. 17, p. 4205–4212, ago. 2007.

TITIRICI GROUP. **Sustainable materials**. Disponível em: <<https://titiricigroup.org/research/hydrothermal-carbonization/>>. Acesso em: 2 jul. 2016.

TOOR, S. S.; ROSENDAHL, L.; RUDOLF, A. Hydrothermal liquefaction of biomass: A review of subcritical water technologies. **Energy**, v. 36, n. 5, p. 2328–2342, mai. 2011.

VARDHARAJULA, S. *et al.* Functionalized carbon nanotubes: biomedical applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5361–5374, out. 2012.

VAZ, R. *et al.* Preparação de pontos de carbono e sua caracterização óptica: um experimento para introduzir nanociência na graduação. **Química Nova**, v. 38, n. 10, p. 1366–1373, 2015.

WANG, H. *et al.* Selective solid-phase extraction of uranium by salicylideneimine-functionalized hydrothermal carbon. **Journal of Hazardous Materials**, v. 229–230, p. 321–330, ago. 2012.

WANG, J. *et al.* Hard-templating synthesis of mesoporous carbon spheres with controlled particle size and mesoporous structure for enzyme immobilization. **Materials Chemistry and Physics**, v. 129, n. 3, p. 1035–1041, out. 2011.

WANG, J.; QIU, J. A review of carbon dots in biological applications. **Journal of Materials Science**, v. 51, n. 10, p. 4728–4738, mai. 2016.

WANG, Q. *et al.* Monodispersed hard carbon spherules with uniform nanopores. **Carbon**, v. 39, n. 14, p. 2211–2214, nov. 2001.

YAN, H. *et al.* Development of multicolor carbon nanoparticles for cell imaging. **Talanta**, v. 108, p. 59–65, abr. 2013.

YAN, Q.; STREET, J.; YU, F. Synthesis of carbon-encapsulated iron nanoparticles from wood derived sugars by hydrothermal carbonization (HTC) and their application to convert bio-syngas into liquid hydrocarbons. **Biomass and Bioenergy**, v. 83, p. 85–95, dez. 2015.

YANG, Y. *et al.* Graphene based materials for biomedical applications. **Materials Today**, v. 16, n. 10, p. 365–373, out. 2013.

YANG, Z.-C. *et al.* Intrinsically fluorescent carbon dots with tunable emission derived from hydrothermal treatment of glucose in the presence of monopotassium phosphate. **Chemical Communications**, v. 47, n. 42, p. 11615, nov. 2011.

YANG, Z.-C.; LI, X.; WANG, J. Intrinsically fluorescent nitrogen-containing carbon nanoparticles synthesized by a hydrothermal process. **Carbon**, v. 49, n. 15, p. 5207–5212, dez. 2011.

YU, L. *et al.* Carbohydrate-derived hydrothermal carbons: a thorough characterization study. **Langmuir**, v. 28, n. 33, p. 12373–12383, ago. 2012.

ZHANG, J. *et al.* Controlled synthesis of green and blue luminescent carbon nanoparticles with high yields by the carbonization of sucrose. **New Journal of Chemistry**, v. 34, n. 4, p. 591, abr. 2010.

ZHANG, J. *et al.* Rapid method for the determination of 5-hydroxymethylfurfural and levulinic acid using a double-wavelength UV spectroscopy. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–6, 2013.

ZHAO, A. *et al.* Recent advances in bioapplications of C-dots. **Carbon**, v. 85, p. 309–327, abr. 2015.

ZHOU, L. *et al.* Oriented immobilization of glucose oxidase on graphene oxide. **Biochemical Engineering Journal**, v. 69, p. 28–31, dez. 2012.

ZHOU, M. *et al.* Titanium dioxide nanotube films for electrochemical supercapacitors: biocompatibility and operation in an electrolyte based on a physiological fluid. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 162, n. 5, p. A5065–A5069, jan. 2015.