

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa de Pós-graduação em Química

Aniely Pereira de Souza

**Funcionalização de *carbon dots* com peptídeo antimicrobiano
ecPis-4s**

Diamantina
2021

Aniely Pereira de Souza

**Funcionalização de *carbon dots* com peptídeo antimicrobiano
ecPis-4s**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo de Mesquita
Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Moreira Verly

**Diamantina
2021**

Catálogo na fonte - Sisbi/UFVJM

S713 2021	<p>Souza, Aniely Pereira de</p> <p>Funcionalização de carbon dots com peptídeo antimicrobiano ecPis-4s [manuscrito] / Aniely Pereira de Souza. -- Diamantina, 2021.</p> <p>95 p. : il.</p> <p>Orientador: Prof. João Paulo de Mesquita. Coorientador: Prof. Rodrigo Moreira Verly.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Química) -- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Programa de Pós-Graduação em Química, Diamantina, 2021.</p> <p>1. Funcionalização. 2. Carbon dots. 3. Peptídeo antimicrobiano. 4. ecPis-4s. 5. antioxidante. I. Mesquita, João Paulo de. II. Verly, Rodrigo Moreira. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. IV. Título.</p>
--------------	--

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFVJM
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Bibliotecário Rodrigo Martins Cruz / CRB6-2886
Técnico em T.I. Thales Francisco Mota Carvalho



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

ANIELY PEREIRA DE SOUZA

**FUNCIONALIZAÇÃO DE CARBON DOTS COM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO
ecPIS-4S**

Dissertação apresentada ao
Programa de pós-graduação em
Química da Universidade Federal dos
Vales Jequitinhonha e Mucuri, nível de
MESTRADO como parte dos requisitos
para obtenção do título de MESTRA EM
QUÍMICA

Orientador: **Prof. João Paulo de
Mesquita**

Data de aprovação 30/04/2021

Prof.Dr. JOAO PAULO DE MESQUITA - UFVJM

Prof.Dr. VICTOR HUGO DE OLIVEIRA MUNHOZ - UFVJM

Prof.Dr. FABIANO VARGAS PEREIRA - UFMG



Documento assinado eletronicamente por **Joao Paulo de Mesquita, Docente**, em 30/04/2021, às 16:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiano Vargas Pereira, Usuário Externo**, em 30/04/2021, às 16:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Victor Hugo de Oliveira Munhoz, Docente**, em 05/05/2021, às 10:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0342500** e o código CRC **D01986B0**.

Referência: Processo nº 23086.001684/2021-01

SEI nº 0342500

AGRADECIMENTOS

Realizar o mestrado durante uma pandemia foi à experiência mais complexa, desafiadora e enriquecedora que passei durante a minha vida acadêmica até o momento, suportar os medos e as incertezas dessa difícil fase não foi nada simples. Então, só tenho a agradecer.

Primeiramente, agradeço à minha família pelo apoio emocional, principalmente, a minha mãe Elisângela e ao meu pai Juscelino por toda dedicação, amor e investimento realizado ao longo da minha vida acadêmica e aos meus irmãos pelo apoio e torcida apesar da distância.

Ao meu marido, pelas palavras de encorajamento e sabedoria, sempre que as coisas ficavam difíceis para mim, além do total apoio e carinho.

Ao meu Orientador Prof. Dr. João Paulo de Mesquita, pelo apoio, dedicação e “puxões de orelha”, que foram fundamentais tanto para o desenvolvimento deste trabalho quanto na minha aprendizagem científica. E por não ter desistido do meu trabalho apesar de todas as dificuldades.

Ao professor e ao Prof. Dr. Rodrigo Verly pela coorientação e colaboração em diversos experimentos.

Ao Kelton pela colaboração com o peptídeo.

À técnica Poliana pela colaboração e ensinamentos sobre a parte de aplicação Biológica do trabalho.

Ao Prof. Dr. Victor Munhoz pelo auxílio na parte de química orgânica e discussões sobre os mecanismos.

Ao Prof. Dr. Lucas pelo auxílio nos experimentos de FTIR.

Aos meus amigos e colegas de laboratório: Wanessa, Vinícius, Taty, Priscila e Eliane...

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Enfim, agradeço a todos que colaboraram e torceram pelo sucesso deste trabalho.

RESUMO

Neste trabalho, os *carbon dots* (CDs) foram funcionalizados com o peptídeo ecPis-4s, com o objetivo de obter um (bio)nanomaterial com propriedades antioxidantes e antibacterianas, para futuras aplicações relacionadas a interações peptídeo-membranas celular. Os CDs foram preparados a partir de reações de desidratação e oxidação ácida do biopolímero celulose. A metodologia utilizada foi escolhida devido á possibilidade de obtenção de nanopartículas com alta concentração de grupos funcionais oxigenados, que serão úteis para o ligação do peptídeo antimicrobiano ecPis-4s nanopartículas. A funcionalização dos CDs foi realizada através da reação dos grupos carbonila e/ou hidroxila com o grupo amino ou amônio do peptídeo por meio da ativação destes grupos usando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) e acetato de etil-2-ciano-2-(hidroxiimino)(Oxyma pure®). Os materiais obtidos foram caracterizados com diferentes técnicas, incluindo Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR- do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) e potencial zeta. Após a funcionalização com o peptídeo, o potencial zeta das nanopartículas de CDs passou de -50,5 mV para -23,4 mV, sugerindo o consumo de alguns grupos funcionais negativamente carregados, como os carboxílicos, em pH inferior a 6. Nos espectros no infravermelho e de RMN ^1H dos CDs funcionalizados, após purificação, pôde-se observar bandas características de ambos os compostos. Destaca-se, por exemplo, as absorções em 1360 e 1050 cm^{-1} , a primeira observada somente no espectro do CDs e a segunda bem definida no espectro do peptídeo. Em adição, observa-se a presença do grupo funcional amida por meio das absorções em 1638 e 1560 cm^{-1} . Além dessas observações, a funcionalização pode ser indiretamente relacionada ao estreitamento da absorção em 3340 cm^{-1} (ν O-H), o que sugere uma diminuição das ligações de hidrogênio na amostra de CDs após a reação. Se, por um lado, as nanoestruturas funcionalizadas não apresentaram atividade antioxidante, por outro, os resultados da atividade antimicrobiana *in vitro*, mostraram que as nanopartículas funcionalizadas são capazes de inibir o crescimento bacteriano similarmente ao ecPis-4s para *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), e *Escherichia coli* (*E. coli*), mostrando que elas podem inibir tanto o crescimento de bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. Este resultado está diretamente relacionado à conformação em α -hélice do peptídeo covalentemente ligado à superfície dos CDs, como mostrado pelos resultados obtidos por dicroísmo circular em meio mimético de membranas.

Palavras- chaves: *carbon dots*, funcionalização covalente, peptídeo antimicrobiano, ecPis-4s, antioxidante.

ABSTRACT

Carbon dots (CDs) were functionalized with the ecPis-4s peptide, with the objective of obtaining a (bio)nanomaterial with antioxidant and antibacterial properties and future applications related with peptide-cell membrane interactions, such as biomarkers. The CDs were prepared from acid dehydration and oxidation reactions of the cellulose biopolymer. This methodology was chosen because, it allows the obtainment of nanoparticles with a high concentration of oxygenated functional groups, which are be useful for the binding of the antimicrobial peptide ecPis-4s on the nanoparticle. The functionalization of the CDs was performed through the reaction of the carboxyl and hidroxil groups (CDs) with the amino group of the peptide through the activation of carboxyl and/or OH groups using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC) and ethyl-2-cyano-2- (hydroxyimino) acetate (Oxyme Pure®). The materials obtained were characterized through different techniques, including proton Nuclear Magnetic Resonance of hydrogen (^1H NMR), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and zeta potential. After the functionalization with the peptide, the zeta potential of the CD nanoparticles changed from -50.5 mV to -23.4 mV, suggesting the consumption of some negatively charged functional groups, such as carboxy, at a pH below 6. In the FTIR and ^1H NMR spectra of the functionalized CDs, after purification, characteristic bands of both compounds were observed. For example, the absorptions at 1360 and 1050 cm^{-1} , the former observed only in the spectrum of the CDs and the latter well-defined in the spectrum of the peptide. The presence of the amide functional group is observed through absorptions in 1638 and 1560 cm^{-1} . In addition to these observations, the functionalization can be also indirectly related to the narrowing of absorption band around by 3340 cm^{-1} (ν O-H), which suggests a decrease in hydrogen bonds in the sample of CDs after the reaction. If, on the one hand, the functionalized nanostructures did not show antioxidant activity, on the other, the results of the antimicrobial activity, *in vitro*, showed that the functionalized nanoparticles are capable of inhibiting bacterial growth similary to ecPis-4s for *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), and *Escherichia coli* (*E. coli*), showing that they can inhibit growth with both Gram-positive and Gram-negative bacteria. This outcome is directly related to the α -helix conformation of the peptide covalently attached to the surface of the CDs, as shown by the results obtained with circular dichroism in a membrane mimetic medium.

Keywords: carbon dots, covalent functionalization, antimicrobial peptide, ecPis-4s, antioxidant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Nanomateriais de carbono	20
Figura 2- Categorias principais de Nanodots de carbono.....	21
Figura 3- Resumo da fotoluminescência de CDs.....	23
Figura 4- Resumo dos métodos de preparação dos carbon dots	24
Figura 5- Estrutura molecular da celulose.....	27
Figura 6- Síntese de CDs pelo método ionotérmico	27
Figura 7- Formação de estruturas de carbono a partir de NCCs.....	31
Figura 8- Estrutura dos aminoácidos arginina, histidina e lisina com caráter catiônico.....	39
Figura 9- Ângulos diedros ϕ e ψ entre dois resíduos de aminoácidos	40
Figura 10- Esquema resumido da síntese manual em fase sólida de peptídeos utilizando uma seringa de poliestireno.....	42
Figura 11- Estrutura tridimensional de menor energia do ecPis-4s. Estrutura do peptídeo ecPis-4s em vista lateral com destaque aos resíduos hidrofílicos (em azul) e hidrofóbicos (em verde) (A). Vista frontal pelo eixo da hélice do peptídeo ecPis-4s (B). Resíduo de histidina-4 destacado em rosa.	46
Figura 12- Representação esquemática da reação de ativação dos grupos carboxílicos dos CDs.....	48
Figura 13- Representação esquemática da etapa de funcionalização dos CDs com ecPis-4s.....	49
Figura 14- Imagens digitais das soluções (a) Luz ambiente (b) luz UV ($\lambda_{\text{máx}}=365$ nm).....	56
Figura 15- Imagens de microscopia de força atômica da solução de carbon dots.....	57
Figura 16- Difrátogramas de raios-X obtidos para as amostra de celulose de algodão antes(a) e após as rações de desidratação/oxidação, (b) CDs.....	57
Figura 17- Detalhes da manipulação dos dados de difração de raios-X para obtenção dos parâmetros β e θ da Equação 1 para determinação do tamanho do cristalito dos CDs. a) linha de base e b) posições onde foram obtidos os valores de β e θ	58
Figura 18- a) Espectros FTIR para celulose de algodão e b) CDs obtidos a partir da desidratação/oxidação deste material.	60

Figura 19- Curvas de titulação potenciométrica obtidas para a solução de HCl e HCl+CDs.....	61
Figura 20- RMN ^1H obtidos para os carbon dots preparados a partir de celulose de algodão.....	62
Figura 21- a) Espectros UV-vis dos CDs com diferentes concentrações (b) Absorbâncias nos comprimentos de onda de 220 e 290 nm.....	63
Figura 22- Efeito da excitação em 360nm no comprimento de onda na usando soluções de CDs na concentração de 3,95 g/L	64
Figura 23- Espectros de absorção no UV-Vis (a) obtidos para o sulfato de quinino em diferentes concentrações e (b) para os CDs. Espectros UV-vis (c) de fluorescência, com excitação em 360 nm em diferentes concentrações para o sulfato de quinino e (d) obtido para os CDs em diferentes concentrações (e) Curvas de fluorescência integrada versus absorbância em 360 nm usado na estimativa do rendimento quântico.	65
Figura 24- Esquema simplificado da reação de síntese dos CDs.....	67
Figura 25- Representação de formação do intermediário o-acilisouréia, sendo R= cadeia carbônica pertencente ao CDs.	68
Figura 26- Ataque nucleofílico ao carbono carbonílico do intermediário acilisouréia, sendo R_2 a cadeia carbônica pertencente a oxima.	68
Figura 27- Formação da ligação amídica entre CDs ativados e o peptídeo ecPis-4s.....	68
Figura 28- Resíduos de aminoácidos positivos presente no ecPis-4s.....	69
Figura 29- Espectro de infravermelho dos CDs, do CDs + Peptídeo (CD funcionalizados), peptídeo ecPis-4s.	70
Figura 30- Espectros RMN ^1H obtidos para os, carbon dots funcionalizados(CDs-(ecPis-4s) , peptídeo ecPis-4s, carbon dots(CDs). Sendo hidrogênios de carbonos sp^3 ($\text{H-C}(\text{sp}^3)$) e hidrogênios ligados a carbonos alfa (H-carbono alfa).	71
Figura 31- Representação estrutural dos CDs funcionalizados.....	73
Figura 32- Imagens de fotografia digital da solução de CDs funcionalizados, a) sob luz natural e em b) sob a luz UV.....	74
Figura 33- Espectro de absorção no UV-vis a) Peptídeo e b) CDs funcionalizados.....	75
Figura 34- Efeito da excitação em 360 nm no comprimento de onda na solução de CDs funcionalizados com concentração de $1,39 \times 10^{-5}$ g/L.....	76

Figura 35-(a) Espectro de fluorescência de CDs funcionalizados com excitação em 360 nm.	
(b) gráfico de absorvância (360 nm) x fluorescência integrada da solução de CDs funcionalizados e usado no cálculo do rendimento quântico.	77
Figura 36- Estudos conformacionais por Dicroísmo circular para o ecPis-4s e os <i>carbon dots</i> e <i>carbon dots</i> funcionalizados com o peptídeo (<i>carbon dots</i> + ecPis-4s).	79

LISTA DE TABELAS

Tabela1- Número de peptídeos cadastrados no banco de dados APD (2020) classificados de acordo com atividade biologia	38
Tabela 2- Concentração das amostras em g/L	54
Tabela 3- Composição elementar relativa entre C, N e O obtido para amostra de CDs	59
Tabela 4- Propriedades ácido-base, o logaritmo da constante de acidez (pKa) com a respectiva quantidade de grupos dos grupos funcionais ácidos, dos <i>carbon dots</i> derivados celulose.....	61
Tabela 5- Propriedades ácido-base obtidas por meio da titulação potenciométrica da amostra de peptídeo ecPIS- 4s.....	73
Tabela 6- Propriedades ácido-base da amostra de CDs funcionalizada com ecPis-4s....	73
Tabela 7- Valores de MIC das amostras	81
Tabela 8- Resultado da Inibição de DPPH dado em porcentagem	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDs	<i>carbon dots</i>
NCC	Nanocristais de celulose
SWCNTs	Nanotubos de carbono
DRX	Difração por raios-X
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
AFM	Microscopia de Força Atômica (do inglês <i>Atomic Force Microscopy</i>)
ATR	Acessório de Reflectância total atenuada
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier do inglês <i>Fourier transform infrared spectrometry</i>
EDAC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDS	Energia dispersiva de raios-X
pH	Potencial Hidrogeniônico
TG- MS	Análise termogravimétrica acoplada ao espectrômetro de massas
APD	Banco de dados de peptídeos antimicrobianos, do inglês <i>Antimicrobial Peptide Database</i>
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonila
LUV	Vesículas unilamelares grandes, do inglês <i>large unilamellar vesicles</i>
MIC	concentração inibitória mínima, do inglês <i>minimal inhibitory concentration</i>
DIC	<i>N, N'</i> -diisopropilcarbodiimida
NHS	<i>N</i> - hidroxisuccinimida
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
POPG	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)]
UV- vis	Região do Ultravioleta e visível
ζ	Zeta (Potencial zeta)
λ	Comprimento de onda
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Carbono	20
2.2 Os <i>carbon dots</i>	21
2.3 Propriedades dos <i>Carbon Dots</i>	22
2.4. Métodos de síntese de CDs	25
2.5 Precursores “verdes”.....	26
2.6 Funcionalização de <i>carbon dots</i>	33
2.7 Peptídeos antimicrobianos	37
3 OBJETIVOS	44
3.1 Objetivos Gerais	44
3.2 Objetivo específicos	44
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	45
4.1 Materiais e Reagentes	45
4.2 Síntese dos ecPis-4s.....	45
4.3 Síntese e funcionalização dos <i>Carbon dots</i> de celulose	47
4.3.1. Síntese dos carbon dots.....	47
4.3.2 Funcionalização dos carbon dots.....	47
4.4 Caracterização	49
4.4.1 Imagens digitais das suspensões de CDs sob luz ambiente e UV	49
4.4.2 Microscopia de força atômica (MFA)	49
4.4.3 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	49
4.4.4 Potencial Zeta (ζ)	50
4.4.5 Ressonância magnética nuclear.....	50
4.4.6 Composição elementar	50
4.4.7 Titulação Potenciométrica	50
4.4.8 Difração de Raios-x (DRX)	51
4.5 Propriedades ópticas	51
4.5.1 Espectroscopia de absorção molecular (UV-vis)	51
4.5.2 Espectroscopia de fotoluminescência.....	52
4.6 Dicroísmo Circular	53
4.7 Ensaios de atividades antibacterianas	53
4.8 Ensaios de atividade antioxidante.	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
4.1 Caracterização dos <i>carbon dots</i>	56
4.2 Modificações químicas e funcionalização dos <i>carbon dots</i>	66
4.3 Caracterizações dos CDs funcionalizados	69
4.4 Efeitos da funcionalização nas propriedades ópticas dos CDs.	74
4.5 Dicroísmo Circular	78
4.6 Ensaios de atividade antibacteriana	80
4.7 Atividade antioxidante.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
ANEXOS.....	92

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de superfícies e materiais com propriedades antimicrobianas é cada vez mais necessário para garantir a segurança alimentar e cuidados com a saúde (HASAN, CRAWFORD e IVANOVA, 2013) (SOFI, SINGH, *et al.*, 2018) (ADLHART, VERRAN, *et al.*, 2018). Por outro lado, devido ao crescimento da resistência aos antibióticos, a pesquisa de novas abordagens para o tratamento de infecções bacterianas é urgentemente necessária e torna-se um dos maiores desafios da medicina moderna (MELA e KAMINSKI, 2020).

Dentre as diversas abordagens investigadas para superar esses desafios, o desenvolvimento de nanoestruturas com essas propriedades é um fator chave (MUNIR, AHMED, *et al.*, 2020), uma vez que podem ser utilizadas diretamente em superfícies, como cargas na preparação de nanocompósitos poliméricos para o desenvolvimento de embalagens e “entrega” de maneira precisa e direcionada, agentes antimicrobianos existentes potencializando seus efeitos terapêuticos (ABDOU, WANG, *et al.*, 2020).

Os *carbon dots* (CDs) são uma das mais recentes classes de nanopartículas (< 10 nm) fluorescentes, de baixa toxicidade, biocompatíveis, solúveis em água e que, portanto, podem ser utilizados em diferentes aplicações biológicas. Outra vantagem dos carbon dots é a possibilidade de utilização de métodos de síntese simples a partir de moléculas precursoras de baixo custo. Um exemplo de precursor barato, abundante e renovável é a celulose (SOUZA, MESQUITA, *et al.*, 2016).

Existem diversos métodos para a síntese de CDs, sendo eles classificados em duas abordagens *Top-down* e *Bottom-up*. O método *Top-down* inicia-se com um material precursor e, durante o processo, há uma redução das partículas de carbono em partículas menores em escala nanométrica, tais como o método de ablação a laser (GONÇALVES, JORGE, *et al.*, 2010) e esfoliação eletroquímica a partir de uma fonte de grafite (SUN, ZHOU, *et al.*, 2006). Por outro lado, na metodologia *Bottom-up* os átomos são reorganizados e reunidos para formação de nanoestruturas, tais como oxidação térmica dos precursores moleculares adequados (BOURLINOS, BAKANDRITSOS, *et al.*, 2012), desidratação de hidratos de carbono usando ácido sulfúrico concentrado (SOUZA, CAMINHAS, *et al.*, 2018), métodos solvotermiais, a partir dos quais são obtidas nanopartículas de carbono com alto rendimento quântico, ou seja, elevada eficiência na emissão da fluorescência (WANG, CAO, *et al.*, 2010) e aquecimento em forno de micro-ondas (ZHU, WANG, *et al.*, 2009).

As propriedades dos *carbon dots* podem ser modificadas, principalmente, por meio da dopagem, passivação e funcionalização. A funcionalização é um método de modificação dos grupos funcionais presentes na superfície de nanopartículas. Um exemplo dessa estratégia é a formação de uma ligação covalente que pode ser alcançada usando diferentes tipos de agentes de acoplamento. A escolha do reagente de acoplamento deve levar em consideração os grupos funcionais presentes na superfície das nanopartículas ou na molécula (NAMDARI, NEGAHDARIB e EATEMADI, 2017).

Neste trabalho, utilizou-se a funcionalização da superfície dos *carbon dots* com peptídeo ecPis-4s por meio da ativação dos grupos carboxílicos e posterior reação com o grupo amino do peptídeo. Alguns estudos têm mostrado que a funcionalização de nanomateriais com antimicrobianos ativos pode potencializar a eficiência destes compostos (ALVES e PEREIRA, 2014). Um estudo realizado por Torres e colaboradores mostrou a síntese de nanopartículas de alumina modificadas com 3-aminopropiltriethoxysilano que foram funcionalizadas com um análogo do peptídeo antimicrobiano BP100. Embora a nanobioestrutura tenha apresentado um grau relativamente baixo de funcionalização, as atividades antibacterianas observadas contra as cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* foram apreciavelmente maiores do que as atividades do peptídeo livre (TORRES, BRAGA, *et al.*, 2018). Já Chaudhari e colaboradores prepararam nanotubos de carbono de parede única revestidos com prata (SWCNTs-Ag) e funcionalizaram com um peptídeo antimicrobiano, o TP359. Os autores mostraram que as concentrações inibitórias mínimas (MIC) das nanoestruturas funcionalizadas eram muito menores e elas não eram tóxicas para as células eucarióticas quando comparadas ao SWCNTs-Ag (CHAUDHARI, ASHMORE, *et al.*, 2016).

Os peptídeos antimicrobianos são um campo interessante de pesquisa, tendo em vista o seu potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos, devido ao seu amplo espectro de atividade. Ressalta-se também o fato de que os peptídeos podem dificultar o surgimento de resistência antimicrobiana (SHARMA, SINGH e RANA, 2011), pois têm como alvo os componentes lipídicos na membrana dos patógenos invasores por meio de interações que geram perturbações, desorganização ou até desestruturação da bicamada lipídica causando a lise celular desses agentes infecciosos (MANSOUR, PENA e HANCOCK R.E, 2014).

O ecPis-4s é um peptídeo antimicrobiano pertencente à família das piscidinas, que são isoladas de espécies de peixes que, em geral esses peptídeos apresentam estruturas com

caráter catiônicas, α -helicoidais (comum em estruturas peptídicas) e elevada anfipaticidade. Esses peptídeos apresentam uma alta proporção de aminoácidos básicos, o peptídeo ecPis-4s foi isolado de tecidos e células sanguíneas do peixe da espécie *Epinephelus coioides*, é constituído por 22 resíduos de aminoácidos (FFRHIKSFWKGAKAIFRGARQG-NH₂) e, segundo Zhuang e colaboradores, apresenta uma forte atividade antibacteriana, contra as cepas de bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), atividade antifúngica e baixa atividade hemolítica (ZHUANG, YANG, et al., 2017). Logo, esses peptídeos são considerados bons candidatos para utilização como agentes terapêuticos alternativos, uma vez que não atuam apenas sobre um alvo específico (ALVES e PEREIRA, 2014).

Devido ao fato de os *carbon dots* possuírem propriedades promissoras para se tornarem agentes antibacterianos, eles podem ser utilizados em aplicações biomédicas, uma vez que há diversas e recentes revisões sobre a atividade antibacteriana dos CDs, nos quais várias dessas abordagens envolveram reações mediadas por espécies reativas de oxigênio, para inibição do crescimento de microrganismos (SUN, WUA, et al., 2021), (LIN, TSAI, et al., 2019).

Dentro desse contexto, o presente trabalho mostra o estudo da síntese de *carbon dots* a partir da celulose de algodão e a funcionalização dessas nanopartículas com peptídeo ecPis-4s. A funcionalização proposta é uma alternativa à reação tradicional que usa cloreto de tionila na formação de amidas a partir de ácidos carboxílicos e aminas. Neste trabalho, a reação foi realizada por meio da ativação dos grupos carboxílicos presente na superfície dos CDs usando como reagentes o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) e acetato etil-2-ciano-2-(hidroxiimino), e posterior formação de ligações amídicas entre os CDs e o peptídeo. Essa funcionalização dos CDs com o peptídeo ecPIS-4s foi caracterizada com diferentes técnicas incluindo Ressonância Magnética Nuclear de ¹H (RMN ¹H), FTIR e potencial zeta. Além disso, foram analisadas as propriedades ópticas desses materiais por meio de técnicas de absorção e fotoluminescência na região do UV-vis, bem como a atividade antimicrobiana *in vitro* em cepas de para *S. aureus* (Gram-positiva), e *E. coli* (Gram-negativa).

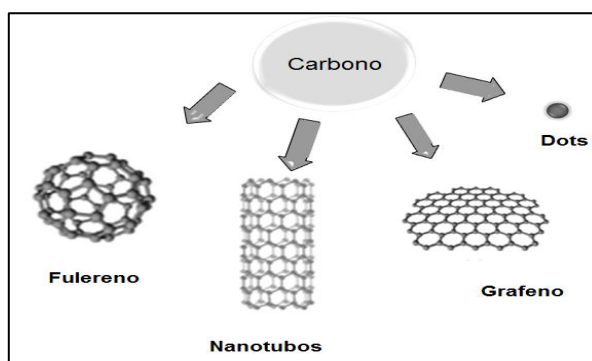
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Carbono

O carbono é um dos elementos químicos mais abundantes na natureza e de importância fundamental para a vida na Terra. Este elemento pode ser encontrado em diversas formas alotrópicas (Figura 1) como o grafite, grafeno, nanotubos, fulerenos ou amorfo, como no carvão mineral. Nos últimos anos, a família de nanomateriais à base de carbono tem se destacado devido ao seu potencial de uso em inúmeras aplicações, tais como nano compósitos, eletrônica, armazenamento e conversão de energia, catálise, sensores e bioimageamento (ZHANG¹, ZHANG², *et al.*, 2012) (KARFA, DE e MADHURI, 2018).

Entre as principais descobertas de alótropos de carbono, ou melhor, de nanomateriais de carbono, encontra-se: o fulereno. Este alótropo de carbono apresenta uma estrutura semelhante a uma esfera formada por anéis de 5 a 7 átomos de carbono de carbono, desse modo, os carbonos continuam unidos por fortes hibridização sp^2 (KROTO, HEATH, *et al.*, 1985). Os nanotubos de carbono são formados de uma estrutura de parede única contendo átomos de carbono organizados em forma tubular, de 3 a 10 nm, podendo apresentar propriedades metálicas ou semicondutoras (IIJIMA, 1991). Já o grafeno é uma das formas cristalina do carbono e possui uma estrutura com anéis hexagonais com átomos individualmente distribuídos, que formam uma fina camada de carbono. E, por fim, os dots ou nanodots de carbono que foram observados pela primeira vez em 2004, e posteriormente, denominada como *carbon dots* (XU, RAY, *et al.*, 2004).

Figura 1- Nanomateriais de carbono

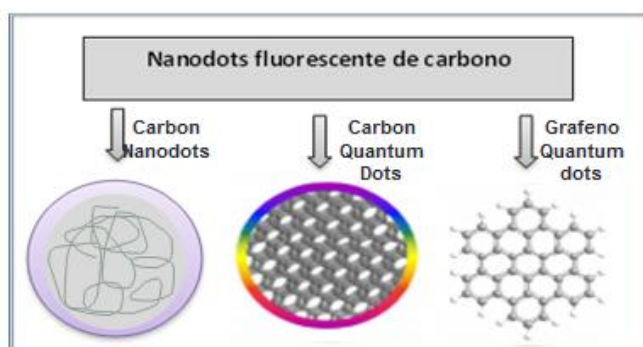


Fonte: Zhu et al. (2015). Adaptada.

Tuerhong e colaboradores definem nanodots de carbono como partículas em escala nanométrica que apresentam diversas propriedades que podem depender do tamanho e

estrutura, sendo divididos em três categorias principais: *Carbon Nano Dots* ou *Carbon Dots*, *Carbon Quantum Dots* e *Grafeno Quantum Dots* (Figura 2). Desse modo, os *Grafenos Quantum Dots* são constituídos por um disco de grafeno com diâmetro entre 2 e 20nm, enquanto os *Carbon Quantum Dots* são pontos quânticos esféricos, obtidos a partir de outros nanomateriais a base de carbono com estrutura cristalina ou de precursores orgânicos, que apresentam propriedades dependentes do tamanho (TUERHONG, XU e XUE-BO, 2017).

Figura 2- Categorias principais de Nanodots de carbono



Fonte: TUERHONG, XU e XUE-BO, (2017). Adaptada.

2.2 Os carbon dots

Os *carbon dots* (CDs) foram descobertos em 2004 durante a produção e purificação de nanotubos de carbono realizada por Xu *et al.* (2004). A técnica utilizada foi a descarga por arco que consistiu, basicamente, na geração de um arco elétrico entre dois eletrodos de grafite em uma elevada temperatura (maior que 3000 °C). Essa produção levou à vaporização do carbono do ânodo e deposição deste material sobre o cátodo. Após a purificação por meio da técnica de eletroforese em gel (aplicação de uma diferença potencial em uma placa de gel com polo positivo e negativo que separa partículas de acordo com a velocidade de migração) os pesquisadores identificaram uma mistura de nanopartículas e impurezas com propriedades fluorescentes dependentes do tamanho, ao término da análise dessas impurezas, os autores as relataram como “nanomateriais interessantes” (XU, RAY, *et al.*, 2004). Esses nanomateriais interessantes fluorescentes foram posteriormente denominados como pontos de carbono (do inglês *carbon dots*).

Desde a descoberta dos CDs, diversos grupos de pesquisa têm preparado e estudado esse nanomaterial (BAKER e BAKER, 2010). Isso fez com que nos últimos anos muitos progressos fossem alcançados com relação aos métodos de síntese, propriedades, modificações e aplicações (CHEN, LIU, *et al.*, 2019).

Os CDs, em geral, podem ser partículas com morfologia quase esféricas com tamanho médio obtido em escala nanométrica. Além disso, são constituídas majoritariamente por átomos de carbono com hibridização sp^2 e sp^3 em proporções variáveis e podem apresentar domínios cristalinos e não cristalinos bem como diversos grupos funcionais em proporções que variam de acordo com o método de obtenção e o precursor empregado (SUN, ZHOU, *et al.*, 2006).

2.3 Propriedades dos *Carbon Dots*

Os CDs apresentam diversas propriedades interessantes, como a luminescência, alta solubilidade em água, baixa toxicidade, fácil modificação, biocompatibilidade e boa estabilidade química e fotoquímica, além do fato de poder ser sintetizado por um baixo custo (WANG e HU, 2014).

As propriedades ópticas são uma das propriedades mais fascinantes dos CDs. Essas propriedades são conhecidas como luminescência e elas são resultantes da emissão de fótons a partir de uma excitação causada por uma fontes externas de energia, tais como emissões consequentes de reações químicas (Quimiluminescência), aplicação de uma diferença de potencial (Eletroquimioluminescência) e após absorção de fótons de maior energia (Fotoluminescência) (VALE, VIEIRA, *et al.*, 2015).

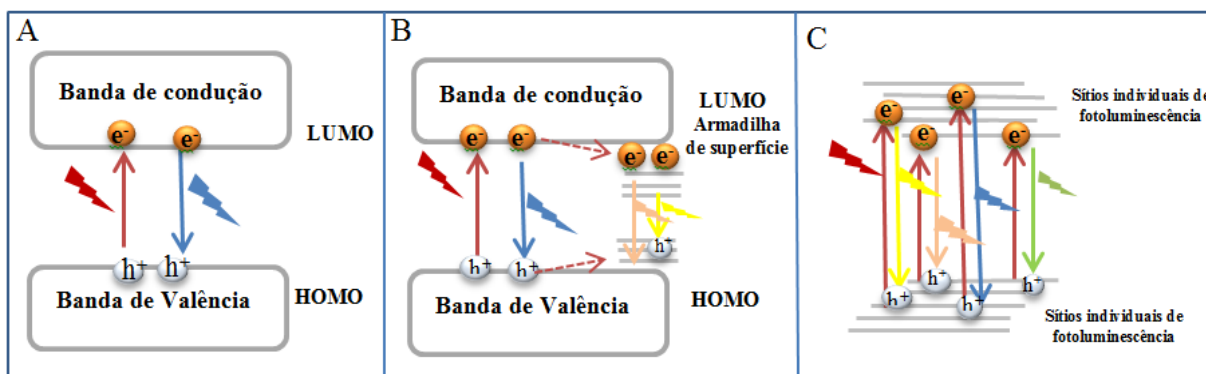
A Fotoluminescência pode ser dividida em fosforescência e fluorescência; a primeira é um caso particular de emissão de fótons de longa duração, já a segunda ocorre de forma rápida. A origem da fotoluminescência dos *carbon dots* não foi totalmente elucidada, visto que a utilização de diferentes rotas de síntese e precursores produz materiais com características químicas e estruturais variadas, o que dificulta a obtenção de resultados uniformes. Contudo, diversos estudos têm sido realizados a fim de entender como essas características afetam o comportamento óptico dos CDs (BAE, MYUNG e BARD, 2004) (CHEN, LIU, *et al.*, 2019).

Os CDs podem ser semicondutores cristalinos que apresentam o efeito de confinamento quântico (*Carbon Quantum Dots*). Este efeito está relacionado ao confinamento, nas três dimensões do espaço, dos portadores de carga (par elétron/buraco). Devido ao efeito de confinamento quântico, as propriedades eletrônicas e ópticas dos pontos quânticos dependem do tamanho dessas nanopartículas (VALE *et al.*, 2015; DABBOUSI *et al.*, 1997).

O confinamento quântico consiste na limitação de movimento dos portadores de carga entre os níveis quantizados onde ocorre o aumento da energia de *band gap*, ou seja, uma

energia de separação entre as bandas de valência e as bandas de condução devido à diminuição do tamanho do material, no qual a emissão de fótons deve-se ao fato do elétron excitado da banda de condução para banda de valência gerar um “buraco” positivo nesta banda e quando ocorre a recombinação das bandas ocasionar a emissão de um fóton. A fotoluminescência causada por essa emissão de fótons muitas vezes é denominada fluorescência *band gap* intrínseca ou transição entre os orbitais de fronteira HOMO-LUMO (do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital* - *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*). Todavia, os *carbon dots* são nanopartículas que podem apresentar estruturas heterogêneas, a quais os grupos funcionais apresentam vários níveis de energia, o que pode resultar em uma série de “armadilhas” emissivas conhecidas como defeitos de superfície, e assim produzir fótons com comprimento de onda maior, ou seja, com menor energia. A Figura 3 apresenta um resumo da fotoluminescência onde A- *Carbon Quantum Dots*, B- *Carbon dots* com armadilhas superficiais e C- emissão direta de fluoróforos devido à composição heterogênea na superfície da partícula (CAYUELA, SORIANO, *et al.*, 2016).

Figura 3- Resumo da fotoluminescência de CDs (A- *Carbon Quantum Dots*, B- *Carbon dots* com armadilhas superficiais e C- emissão direta de fluoróforos).



Fonte: Cayuela *et al.*, (2016). Adaptada.

Um estudo realizado Yuan *et al.* (2018) investigou a fotoluminescência de *Carbon Quantum Dots* (CQDs) com uma estrutura triangular rígida que apresentou alta pureza na emissão de cor, possibilidade de seleção cores (do azul para o vermelho) e um rendimento quântico de 54 a 72%. A síntese foi conduzida por tratamentos solvotérmicos utilizando floroglicinol como reagente, e através da ciclização e, consequente, formação de anéis de seis membros os autores conseguiram sintetizar CQDs com estruturas triangulares contendo grupos hidroxilas na superfície. Por meio de caracterizações estruturais e ópticas associadas a cálculos teóricos os autores revelaram que o elevado rendimento quântico obtido estaria

associado á estrutura triangular cristalina e, consequente, diminuição da energia de *band gap*. Devido ao fato de os CQDs sintetizados pelos autores apresentarem estruturas e composições químicas semelhantes, os resultados das caracterizações ópticas indicaram que o efeito de fotoluminescência seria dominado pelos tamanhos, devido ao efeito de confinamento. Além disso, os autores relatam que neste caso a ausência de grupos cromóforos como carbonilas e carboxilas é benéfica, uma vez que a presença desses grupos poderiam causar armadilhas emissivas na superfície derivada da associação com carbonos hibridizados em sp^2 , já que a presença dessas armadilhas poderia induzir distorções nas nuvens eletrônicas e “prender” os transportadores de carga, dificultando, assim a emissão de fótons e consequente diminuição na eficiência de emissão de cor (YUAN¹, YUAN, *et al.*, 2018).

Todavia, os CDs possuem muitas diferenças e alguns estudos, como o realizado por Li *et al.* (2010), indicam que o ajuste da fotoluminescência e a emissão de cor por controle do tamanho é pouco eficaz pois, na maioria das vezes, a emissão de cor dos CDs está relacionada aos grupos funcionais na superfície dessas nanopartículas (LI, HE, *et al.*, 2010) (ZHU *et al.*, 2015). Na literatura, existem diversos trabalhos relatando que a síntese de *carbon dots* tem mostrado resultados similares. Por exemplo, Sahu e colaboradores relataram uma síntese de nanopartículas de carbono realizada em uma única etapa por tratamento hidrotérmico a partir da introdução do suco de laranja com etanol em uma autoclave de Teflon[®] a 120 °C durante 2,5 horas. O mecanismo para a formação desses *carbon dots* envolveu a carbonização hidrotérmica dos principais constituintes do suco de laranja, como sacarose, glicose, frutose, ácido cítrico e ácido ascórbico. Os autores obtiveram nanopartículas de carbono parcialmente cristalinas com fotoluminescência no verde, rendimento quântico (eficiência de fluorescência) de 26% e tamanho médio entre 1,5 a 4,5 nm. Segundo eles, essa fotoluminescência dependente da excitação, deve-se à presença de estados de superfície, ou seja, à presença de grupos funcionais tais como carbonilas (C=O) que podem funcionar como armadilhas emissivas. Além disso, os autores consideraram também o efeito do tamanho da nanopartículas de CDs e o pH da solução, pois eles observaram que a intensidade da fluorescência permanecia quase inalterada em pH entre 4,8 a 8,7, porém variava em outros valores de pH (SAHU, BEHERA, *et al.*, 2012).

Sendo assim, a fotoluminescência dos CDs pode estar associada a diversos fatores que, apesar de controversos, variam de acordo com a estrutura dessas nanopartículas. Dentre os fatores já relatados encontram-se: o pH, a estrutura, o tamanho e a presença de grupos funcionais químicos (ZHU, SONG, *et al.*, 2015). Em geral, o método de síntese e a

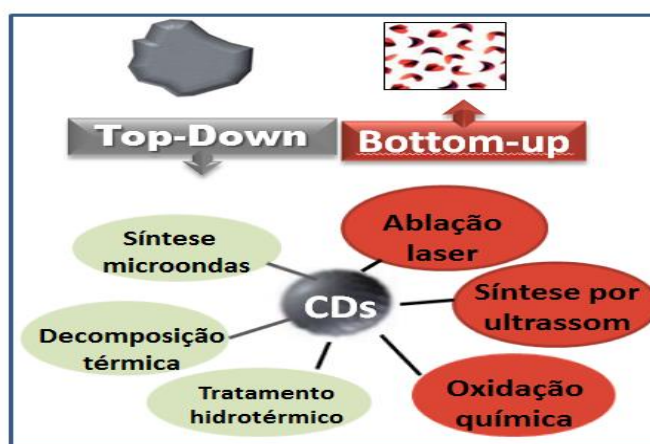
composição química tem influência na fotoluminescência e podem ser alteradas por diversos métodos como dopagem, funcionalização ou passivação.

2.4. Métodos de síntese de CDs

Na literatura já foram relatados diversos métodos para a síntese de *carbon dots* que podem ser classificados em duas abordagens, *Top-down* e *Bottom-up*. Sendo possível a modificação destas nanopartículas durante ou após sua preparação (WANG e HU, 2014; SILVA e GONÇALVES, 2011).

O método *Top-down* inicia-se com um material precursor e, durante o processo há uma redução das partículas de carbono a partículas menores em escala nanométrica, por meio de métodos de ablação a laser (GONÇALVES, JORGE, *et al.*, 2010) e esfoliação eletroquímica a partir de uma fonte de grafite (SUN, ZHOU, *et al.*, 2006). Por outro lado, na metodologia *Bottom-up* os átomos são reorganizados e reunidos para formação de nanoestruturas a partir de técnicas como a: oxidação térmica de precursores moleculares (BOURLINOS, BAKANDRITSOS, *et al.*, 2012), a desidratação de hidratos de carbono usando ácido sulfúrico concentrado (PENG e TRAVAS-SEJDIC, 2009), síntese de nanopartículas de carbono com alto rendimento quântico com solventes orgânicos (WANG, CAO, *et al.*, 2010) e o aquecimento em forno de micro-ondas (ZHU, WANG, *et al.*, 2009). A Figura 4 apresenta um resumo desses métodos.

Figura 4- Resumo dos métodos de preparação dos *carbon dots*



Fonte: Wang e Hu *et al.*(2014) Adaptado.

Um exemplo de síntese via método *Top-down* foi a realizado por Hu e colaboradores em 2009, a qual os *carbon dots* foram preparados por ablação a laser usando uma suspensão de materiais de carbono em um solvente orgânico e consistiu em transferir a

energia de um laser para o alvo, e assim, romper as ligações e eliminar os *CDs* da superfície. Os *CDs* sintetizados apresentaram tamanhos entre 1-8 nm, sendo que a origem da luminescência foi atribuída aos grupos funcionais da superfície, que podem variar de acordo com o solvente orgânico escolhido (HU, NIU, *et al.*, 2009).

Já um exemplo de método de síntese via *Bottom-up* foi um método realizado por Peng e Travas em 2009. Eles prepararam *CDs* luminescentes através de um método simples e barato, conhecido como desidratação ácida. No qual os carboidratos, foram desidratados com a utilização de ácido sulfúrico concentrado, produzindo materiais carbonosos. Os materiais carbonosos, assim que obtidos, foram então oxidados por um tratamento em ácido nítrico. Por fim, as nanopartículas foram passivadas com compostos terminados em amina, produzindo *CDs* luminescentes. Com a utilização desta técnica, as propriedades ópticas dos nanomateriais obtidos podem ser ajustadas, com a utilização de diferentes materiais de partida e alteração do tempo de tratamento com ácido nítrico (PENG e TRAVAS-SEJDIC, 2009).

Os métodos *Top-down* e *Bottom-up* mencionados acima possuem algumas desvantagens, tais como: Síntese em alta temperatura (ZHU, WANG, *et al.*, 2009), utilização de reagentes tóxicos (BOURLINOS, BAKANDRITSOS, *et al.*, 2012), custos elevados (SUN, ZHOU, *et al.*, 2006), necessidade de equipamento especial (ZHU, WANG, *et al.*, 2009), uso de solventes orgânicos não polares (WANG, CAO, *et al.*, 2010). Essas desvantagens podem restringir as aplicações desses *CDs* no campo da ciência biomédica e análises clínicas. Para superar alguns destes problemas, o uso de precursores mais “verdes” ganhou muita popularidade no campo da síntese de *CDs*. A síntese utilizando precursores “verdes” apresenta várias vantagens, como o fato de serem ecologicamente corretos, biocompatíveis, além de possibilitar a síntese em larga escala de nanopartículas utilizando precursores baratos e abundantes (DAS, BANDYOPADHYAY e PRAMANIK, 2018).

Sob esse contexto, os *carbon dots* sintetizados a partir da celulose de algodão ou de nanocristais de celulose são materiais promissores em diversas aplicações.

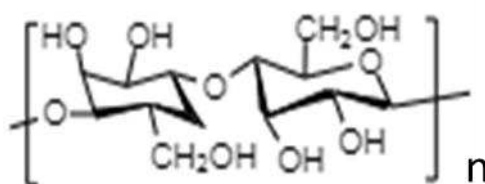
2.5 Precursores “verdes”

Uma vez demonstradas as distintas propriedades dos *carbon dots* e suas inúmeras e potenciais aplicações, o uso de precursores alternativos, baratos, abundantes e renováveis é fundamental para a produção em larga escala.

A celulose é o composto orgânico mais abundante na crosta terrestre, sendo que a

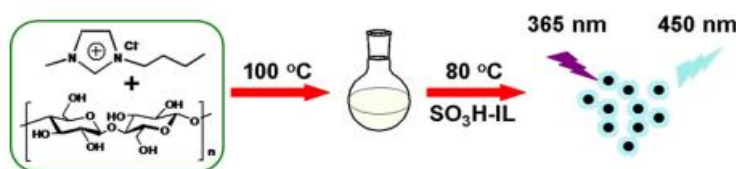
imensa maioria é biossintetizada por plantas superiores e algas, por meio da fotossíntese, e por outros organismos não-fotossintetizantes como bactérias, invertebrados marinhos, fungos e amebas. Independente de sua origem, a celulose pode ser caracterizada com uma rede de ligações de hidrogênio e como um homopolímero de alta massa molar (Figura 5) (MOON, MARTINI, *et al.*, 2011). Sendo assim, a celulose pode ser um precursor interessante para reduzir o custo final de produção das nanopartículas de carbono.

Figura 5- Estrutura molecular da celulose.



Dentro do contexto já discutido sobre o uso de precursores mais “verdes”, em 2015 foi publicado o primeiro relato na literatura sobre o uso de celulose para produção de *carbon dots*. Neste trabalho os autores prepararam CDs solúveis em água por meio do tratamento ionotérmico de celulose com líquido iônico funcionalizado com grupos sulfo (SO_3H) dissolvido em cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (Figura 6). Os *carbon dots* com morfologia esférica e diâmetro médio de 8 nm foram obtidos em uma temperatura relativamente baixa sob pressão ambiente. Devido às singulares propriedades fluorescentes apresentadas pelos nanomateriais, os autores avaliaram o seu uso na detecção seletiva de íons Hg^{2+} . O monitoramento da supressão da fluorescência dos CDs pelos íons metálicos apresentou uma faixa linear entre as concentrações de 6 a 80 μM (WANG¹, WANG², *et al.*, 2016).

Figura 6- Síntese de CDs pelo método ionotérmico



Fonte: Wang¹, Wang² *et al.*, 2016. Adaptado.

Shen e colaboradores sintetizaram CDs à base de celulose dopados com nitrogênio através de um método hidrotérmico (carbonização, desidratação e condensação da celulose a uma elevada temperatura em solução) utilizando ureia como fonte de nitrogênio. A dopagem com nitrogênio levou a um aumento no rendimento quântico do CDs (21,7%) quando comparado a outros métodos de síntese, já que a introdução de nitrogênio induz à

formação de grupos nitrogenados, elevando assim, a intensidade da fluorescência devido ao aumento no comprimento de onda deslocado para o vermelho (*red shift*), causado pela conjugação do sistema π do composto com a introdução dos elétrons desemparelhados. Para isso, os autores focaram na obtenção de uma proporção ótima de nitrogênio e carbono. Primeiramente, a massa de celulose foi fixada em 0,5 g e obtiveram uma razão ótima de 0,7 ureia/celulose o que correspondeu a uma massa de ureia igual 0,35 g. Além disso, os CDs apresentaram um formato esférico com um diâmetro médio de 4,2 nm em imagens de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução, cor azul esverdeada na presença de luz UV, baixa citotoxicidade e alta biocompatibilidade, comprovadas através do ensaio da imagem demicroscopia confocal e citotoxicidade celular (CCK-8) e bioimagem de fluorescência. CDs conforme obtidos foram caracterizados via espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR), Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS - do inglês *X-ray Photoelectron spectroscopy*), Microscopia eletrônica de transmissão (TEM do inglês *Transmission electron microscopy*), e espectroscopia de absorção no UV-vis o que revelou uma promissora aplicação no bioimageamento de células (SHEN, GAO, *et al.*, 2016).

Independentemente e quase simultaneamente, Araújo *et al.* (2016) prepararam *carbon dots* a partir de celulose de algodão usando reações de desidratação e oxidação com ácidos sulfúrico e nítrico, respectivamente. Neste trabalho, os CDs obtidos apresentaram tamanho inferior a 10 nm, morfologia quase-esférica e nanopartículas com estrutura cristalina e não-cristalina. Em adição, apresentaram uma superfície com concentração relativamente alta de grupos funcionais ácidos, os quais foram fundamentais para a formação de heteroestruturas com $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e consequente melhora da atividade fotocatalítica do material para a fotodegradação do corante índigo-carmin. Os grupos funcionais oxigenados na superfície dos CDs foram caracterizados e quantificados através de técnicas como FTIR, análise termogravimétrica e titulação potenciométrica. A presença destes grupos ácidos foi primordial para a dispersão dos CDs em meio aquoso e causaram um grande impacto nas propriedades eletrônicas e ópticas dessas nanoestruturas. Com relação às propriedades ópticas, os CDs apresentaram absorção na região do ultravioleta até 500 nm, um *band gap* de 2,7 eV e um espectro de fluorescência com amplas faixas de emissão dependente do comprimento de onda de excitação, o que deve-se aos diferentes tamanhos da nanopartículas e à presença de grupos funcionais na superfície das mesmas (ARAÚJO, OLIVEIRA, *et al.*, 2016).

Alves e colaboradores publicaram um trabalho mostrando a importância da caracterização desses grupos funcionais usando um método simples, rápido e barato baseado na titulação potenciométrica. Neste trabalho, os autores obtiveram CDs com um diâmetro

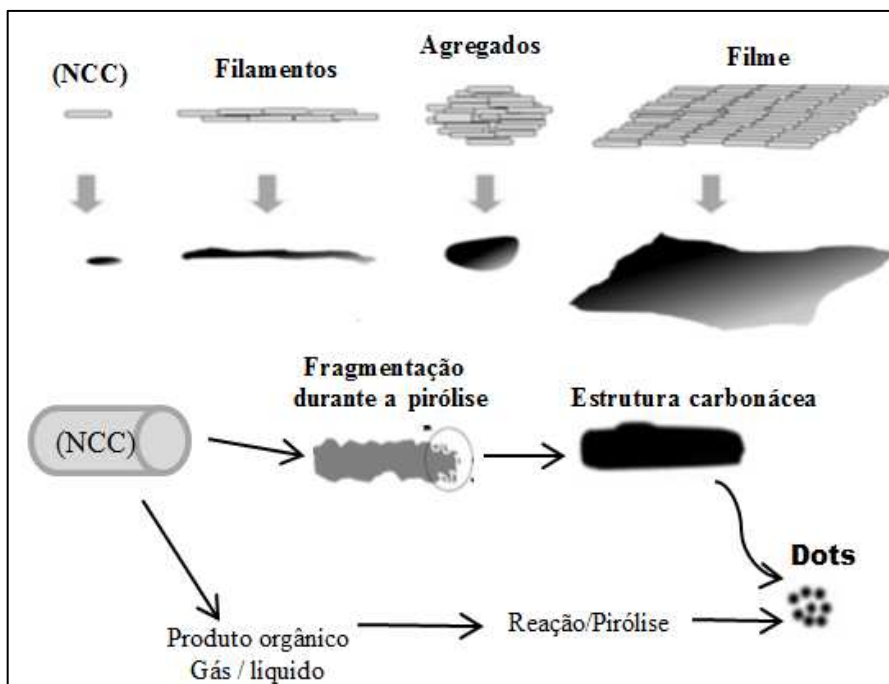
médio de $2,7 \pm 0,5$ nm e comprovaram por meio de uma titulação potenciométrica, que os CDs preparados a partir da celulose de algodão são caracterizados por uma alta concentração de diferentes grupos funcionais (ácidos carboxílicos, fenólicos etc.) com constantes de acidez (apresentado aqui como o seu logaritmo) entre 3 e 10. Em adição mostraram que a maioria (65%) dos grupos funcionais apresentam pK_a inferior a 5 que são atribuídos a ácidos carboxílicos, 17% são lactonas, sendo o restante grupos fenólicos (18%). Após o ajuste com método iterativo (*Pegasus*) associado ao algoritmo (*Levenberg-Marquardt*) (GORGULHO, MESQUITA, *et al.*, 2008), os autores verificaram uma densidade de grupos funcionais ácidos e oxigenados em torno de 5 mmol/g, no qual 2,9 mmol/g foram atribuídos a ácidos carboxílicos. Além disso, foram realizadas três titulações com diferentes massas de CDs onde os valores de pK_a e a concentração dos grupos funcionais foram aproximadamente semelhantes, o que permitiu aos autores concluir que o método de preparação de *carbon dots* via degradação e oxidação da celulose de algodão, nas mesmas condições experimentais, sempre formam grupos funcionais com as mesmas propriedades ácido-base. Esses resultados foram utilizados em paralelo com técnicas de caracterização como FTIR, Dessorção programada por temperatura (TPD - do inglês *Temperature programmed desorption* ou XPS para uma maior precisão, possibilitando um monitoramento dos grupos funcionais na superfície destas nanopartículas o que é de extrema importância para a funcionalização, como citado anteriormente, permite uma alteração da estrutura eletrônica e as propriedades ópticas do CDs (ALVES, CASTRO, *et al.*, 2016).

Em 2016, Pinto *et al.* usaram esses nanomateriais para produção de filmes finos com quitosana, obtidos pela técnica de deposição por camadas alternadas desses materiais sem lâminas de vidro. Esses filmes foram analisados por microscopia eletrônica e caracterizados por diversas técnicas como FTIR, Análise termogravimétrica (TG-MS - do inglês *Thermogravimetric analysis- mass spectrometry*) e titulação potenciométrica, o que permitiu aos autores determinar a densidade de carga, ou seja, a presença de grupos carregados, sendo uma informação importante para estabilizar a solução, rugosidade da superfície e forças de coesão. Os CDs utilizados apresentaram aproximadamente 63% do pK_a característico de grupos carboxílicos em pH de 5,4. Após alterações no pH, foi concluído que a capacidade de adsorção entre as camadas de CDs e quitosana em pH baixo e alta força iônica aumentam a espessura do filme, devido a maiores interações moleculares e flexibilização na conformação da estrutura. Foi verificada também, uma maior absorção nos espectros de UV-vis e coloração mais amarelada. Os autores acreditam que os filmes formados possam ser utilizados como proteção ultravioleta (PINTO, ALVES, *et al.*, 2016).

Os mesmos autores em 2019 prepararam filmes finos de CDs com colágeno hidrolisado que podem ser úteis para o desenvolvimento de uma futura classe de dispositivos eletrônicos como sensores, e bionanocompositos para o monitoramento do ambiente fisiológico. Devido às propriedades fotoativas e a biocompatibilidade das nanoestruturas formadas, a incorporação de CDs em matrizes poliméricas é uma excelente estratégia para aplicação industrial e biomédica das mesmas, porém é necessário um estudo mais aprofundado da interação desses componentes como, o conhecimento da química superficial. Os autores observaram que a espessura e a morfologia dos filmes de colágeno e CDs são afetados por mudanças no pH e na força iônica das soluções, como nos filmes com quitosana, pois alteram as configurações dos polímeros, e consequentemente a energia de interação entre os componentes, o que resultou em fibrilogênese (interações hidrofóbicas e eletrostáticas espontâneas *in vitro*) da biomolécula e formação de fibrilas (morfologia única). Através de técnicas de caracterização, eles constataram mudanças significativas como alteração na rugosidade superficial, mudança na densidade de carga superficial, aumento na absorbância, alteração na conformação das cadeias poliméricas com a adição de CDs. Este resultado foi atribuído ao aumento da flexibilidade das cadeias poliméricas dos biopolímeros, o que contribui para um controle sutil das propriedades dos materiais (PINTO, RODRIGUES, *et al.*, 2019).

Souza e colaboradores mostraram pela primeira vez que *carbon dots* podem ser obtidos a partir da pirólise de nanocristais de celulose. Os nanocristais de celulose (NCCs) são nanopartículas em formato de agulhas, obtidas geralmente a partir da hidrólise controlada com ácidos inorgânicos de diferentes fontes de celulose, algodão, tunicata etc. Durante a reação de hidrólise, as regiões amorfas das microfibrilas, mais acessíveis, reagem primeiro e, com a interrupção da reação no tempo certo, os nanocristais de celulose são obtidos. Esses nanomateriais apresentam interessantes propriedades ópticas e mecânicas e, em geral, comprimentos entre 0,05 até 4 μm e diâmetro de aproximadamente 10 nm (PEREIRA, PAULA, *et al.*, 2014). Após a obtenção, os NCCs foram pirolisados em um forno tubular, levando a formação de diferentes estruturas de carbono, incluindo *carbon dots* (Figura 7).

Figura 7- Formação de estruturas de carbono a partir de NCCs



Fonte: Adaptada de Pereira *et al.* 2014

Os CDs também apresentaram um tamanho que variou de 4 a 8 nm, além de um rendimento quântico considerado baixo variando entre 0,8 e 1,64%, o que segundo os autores pode ser aumentado com passivação ou uso de um agente dopante (SOUZA, MESQUITA, *et al.*, 2016).

Já em 2018, Souza e colaboradores utilizaram polpa de celulose como precursor para formação de *carbon dots*, pelo método de carbonização ácida com ácido sulfúrico concentrado e posterior oxidação em ácido nítrico (HNO_3). Durante a reação entre as fibras de celulose e ácido sulfúrico, diversas reações químicas ocorreram, envolvendo uma combinação simultânea de desidratação, polimerização (condensação e adição) e aromatização, levando à formação do material carbonoso, com quantidades significativas de grupos sulfônicos. Com a adição de HNO_3 , houve a introdução de grupos funcionais oxigenados, constatados por caracterizações como titulação potenciométrica, em que 77% dos grupos presente na superfície dos CDs apresentaram pK_a menor que 5, tipicamente atribuído a ácidos carboxílicos, 14% atribuídos a lactonas, e 9% apresentaram pK_a maior que 8, atribuídos a grupos fenólicos. O rendimento quântico de fluorescência foi de 1,2% para a amostra de CDs não modificada, usando sulfato de quinino como padrão. Com intuito de aumentar o rendimento quântico, os autores utilizaram a dopagem com nitrogênio através de moléculas oligoméricas PEG1500N. Primeiramente foram adicionados 5 mL de cloreto de tionil (destilado e refluxado por 6 horas) na solução obtida anteriormente. Em seguida, o cloreto de

tionila foi removido sob uma pressão reduzida e finalmente 250 mg de PEG1500N (previamente secos) foram adicionados ao meio da reacional, sendo o sobrenadante retirado após o refluxo de 72 h. Devido à funcionalização com PEG1500N (moléculas oligoméricas), os grupos oxigenados dos CDs foram substituídos por aminas e amidas e o rendimento quântico foi elevado para 3,2%, o que, segundo os autores, deve-se à reação de redução que eliminou grupos funcionais oxigenados e restaurou os carbonos com hibridização sp^2 , ou seja, aumentou a densidade eletrônica no núcleo reduzindo as armadilhas superficiais e consequentemente, o *gap* de energia alterando a fotoluminescência para o azul (SOUZA, CAMINHAS, *et al.*, 2018).

Shen e colaboradores sintetizaram CDs à base de celulose dopados com nitrogênio através de um método hidrotérmico (carbonização, desidratação, condensação. da celulose a uma elevada temperatura em solução) utilizando ureia como fonte de nitrogênio. A dopagem com nitrogênio levou um aumento no rendimento quântico do CDs (21,7%) quando comparado a outros métodos de síntese, já que a introdução do nitrogênio induz a formação de grupos nitrogenados elevando assim a intensidade da fluorescência, devido ao aumento no comprimento de onda (*red shift*- causado pela conjugação do sistema π do composto por ressonância com a introdução dos elétrons desemparelhados). Para isso, os autores focaram na obtenção de uma proporção ótima de nitrogênio e carbono. Primeiramente, a massa de celulose foi fixada em 0,5 g e uma razão de 0,7 ureia/celulose o que correspondeu a uma massa de ureia igual 0,35 g. Além disso, os CDs apresentaram um formato esférico com um diâmetro médio de 4,2 nm em imagens de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução, cor azul esverdeada na presença de luz UV, baixa citotoxicidade e alta biocompatibilidade, comprovadas através do ensaio da imagem de microscopia confocal, ensaios de citotoxicidade celular e bioimagem de fluorescência. Os CDs conforme obtidos foram caracterizados via FTIR, XPS, Microscopia Eletrônica de transmissão, UV-vis, revelando assim, uma promissora aplicação no bioimageamento de células (SHEN, GAO, *et al.*, 2016).

Em 2019, Chekini e colaboradores sintetizaram CDs por via hidrotérmica escalonável e direta, dopados com nitrogênio sob condição de refluxo usando nanocristais de celulose, a fim de combinar, a fotoluminescência e as propriedades sensoriais dos CDs com a quiralidade, citobiocompatibilidade e a alta absorção celular dos nanocristais de celulose. As nanopartículas híbridas formadas podem introduzir uma nova estratégia de bioimagem, como biomarcadores celular, agentes de entrega de drogas, e controles solares para janelas inteligentes. A síntese foi realizada pela adição da etilenodiamina e ácido bórico a uma solução aquosa de nanocristais de celulose sob refluxo e dialisada durante 5 dias. A etilenodiamina foi utilizada como fonte de nitrogênio para a dopagem dos CDs, além de facilitar as reações de condensação e polimerização. Já o ácido bórico foi utilizado como um catalisador nas reações de condensação e polimerização. Os autores concluíram que os CDs combinados com nanocristais de celulose não apresentam citotoxicidade mesmo com a concentração de nitrogênio acima 0,1% em sistema de cultura de células monitoradas de 24 a 48 horas (CHEKINI, PRINCE, *et al.*, 2019).

Após a descrição de alguns métodos de síntese de *carbon dots*, a utilização de precursores mais “verdes” e as propriedades. Uma das formas de melhorar ainda mais tais propriedades seria a funcionalização ou modificação dos CDs.

2.6 Funcionalização de *carbon dots*

A funcionalização é um método de modificação dos grupos funcionais presente na superfície de moléculas e consiste na ligação de uma molécula ou material na superfície de outro material. Essa estratégia é muito utilizada para modificar a superfície de um material, bem como alterar as propriedades de interesse (KARFA, DE e MADHURI, 2018). A funcionalização dos *carbon dots* é uma estratégia poderosa para melhorar o desempenho fotofísico e fotoquímico, além disso, pode conferir aos CDs propriedades exclusivas, ampliando, assim as possibilidades de aplicação (CHEN, LIU, *et al.*, 2019).

Segundo Karfa e colaboradores a modificação da superfície dos nanomateriais de carbono pode ser realizada por dois métodos de funcionalização, por meio de ligações covalentes e não covalente (conjugações de natureza $\pi \rightarrow \pi^*$, utilizando a natureza hidrofóbica do material). A funcionalização covalente modifica a conectividade da ligação alterando, assim, os grupos funcionais e as propriedades do nanomaterial. Em geral, essa funcionalização ocorre por meio de reações químicas usando, principalmente, materiais com caráter hidrofílico. Em termos de funcionalização, a natureza da ligação covalente é mais robusta em comparação com a ligação não covalente, ou seja, a ligação covalente formada

entre as moléculas e o nanomaterial de carbono pode ser altamente estável. Sendo assim, existem diversas reações que podem ser usadas para esse fim, dentre elas, destacam-se as reações de cicloadição, fluoração / bromação, adição eletrofílica, adição nucleofílica e reações radicalares (KARFA, DE e MADHURI, 2018).

Todavia, funcionalizar covalentemente materiais a base de grafeno como os GQDs (*Grafenos Quantum Dots*) é considerado por alguns pesquisadores como uma estratégia desafiadora devido à alta estabilidade e a energia coesiva presente no núcleo poliaromático do grafeno. Logo, são necessárias reações químicas específicas que podem permitir essa modificação, como por exemplo o tratamento desses materiais de carbono com agentes oxidantes fortes, durante a síntese, como permanganato de potássio / ácido sulfúrico, ácido nítrico, dicromato de potássio / ácido sulfúrico e oxigênio, uma vez que esses agentes geram grupos funcionais oxigenados como ácido carboxílico, cetonas, álcool ou éster na superfície desses nanomateriais que são muito importantes para posterior conjugação com outras moléculas (KARFA, DE e MADHURI, 2018) (CHEN, LIU, *et al.*, 2019).

Um exemplo de funcionalização covalente utilizada em nanomateriais de carbono contendo grupos funcionais oxigenados, principalmente grupos carboxílicos, é a ativação desses grupos por carbodiimida como 1,3-diciclo-hexilcarbodiimida (DCC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) e *N*-hidroxisuccinimida (NHS), que resulta em grupos intermediários altamente reativos. O método de amidação por EDAC / NHS foi amplamente utilizado para a conjugação covalente de vários ligantes na superfície dos nanomateriais. Essa conjugação tem como base a reação entre os grupos carboxílicos e amino nas superfícies dos materiais (SHEEHAN, CRUICKSHANK e BOSHART, 1961). Logo, as modificações de nanomateriais de carbono contendo grupos amino ou carboxílicos na superfície podem ser projetadas para conjugação adicional a diversas moléculas e assim oferecer uma oportunidade de torná-los nanomateriais atraentes com uma infinidade de aplicações. Essa metodologia permite diminuir a toxicidade, aumentar a solubilidade em água, além do fato de que as propriedades físico-químicas deste nanomaterial carbonáceo funcionalizado têm sido exploradas para o armazenamento de energia, transporte de drogas anticâncer e antivirais em meios biológicos, bem como outras aplicações biomédicas (PIRSAHEB, MOHAMMADI, *et al.*, 2019).

Sendo assim, existem diversos trabalhos na literatura que utilizam CDs funcionalizados em aplicações biológicas. Em 2010, Li e colaboradores relataram a síntese de CDs a partir de esferas de sílica tratadas com ácido nítrico concentrado, para introdução de grupos carboxílicos, sobre as quais, foram adicionados posteriormente três tipos polímeros: o

poli etilenoglicol, polietilenodiamina e polietilenimida. Além disso, para estudos de imagem *in vitro*, os CDs foram conjugados com transferrina (uma glicoproteína com a capacidade de direcionar-se a células cancerosas) usando EDAC. A conjugação foi realizada por meio de uma ligação covalente entre a proteína e grupo amino dos CDs. O estudo realizado pelos autores mostrou que a presença de grupos funcionais na superfície, de todos os três tipos de CDs obtidos pela adição dos polímeros, permitiu a capacidade de uma eficiente conjugação com biomoléculas, através da ligação química da carbodiimida. Logo, os CDs obtidos podem ser usados como nanossondas ópticas ajustáveis em comprimento de onda com flexibilidade para funcionalização de superfícies e bioconjugação, além da capacidade de direcionamento para células cancerosas (LI, OHULCHANSKY, *et al.*, 2010).

Liu *et al.* 2015 sintetizaram *carbon dots* por tratamento hidrotérmico de glucosamina, com excesso de pirofosfato sódio, que levou à formação de CDs com grupos amino na superfície e forte emissão de fluorescência no verde. Posteriormente, os CDs obtidos pelos autores foram modificados com nanopartículas de ouro com ácido hialurônico (HA-AU). Os grupos funcionais presentes nestas nanopartículas apresentaram cargas negativas que foram conjugadas por meio de interações eletrostáticas com os grupos aminos na superfície do *carbon dots*. O estudo desenvolvido pelos autores apresentou como propósito a criação de um biossensor fluorescente baseado em CDs conjugados com nanopartículas de ouro, para a detecção sensível e seletiva de hialuronidase (Hase). Como a Hase é uma hialuronidase que pode degradar moléculas de ácido hialurônico e a presença dessa hialuronidase está envolvida em uma variedade de processos fisiológicos, como, o crescimento de tumores (a mudança no nível de Hase no sangue ou na urina humana está associada a diversos tumores como câncer de bexiga e próstata) (LIU, ZHAO, *et al.*, 2015).

Também no ano de 2015, Huang e colaboradores realizaram a síntese de CDs com atividade promissora em nanocarregadores multifuncionais para a entrega de drogas e auxílio no diagnóstico, usando imagens ópticas em diversos tipos de câncer. A síntese foi realizada a partir da desidratação do pó de grafite em ácido sulfúrico, seguida da oxidação por ácido nítrico. Posteriormente, o ácido fólico foi covalentemente ligado aos CDs usando o EDAC e NHS para a ativação dos grupos carboxílicos do ácido fólico e amina na superfície dos CDs. Além disso, o nanomaterial obtido pelos autores foi quelado com íon paramagnético gadolínio Gd^{3+} (íon utilizado como contraste positivo em ressonância magnética). Devido ao fato de os CDs funcionalizados e quelados apresentarem boa capacidade de direcionamento para diagnóstico de câncer de forma não invasiva e biocompatível, os autores realizaram também uma mistura desse material com uma doxorrubicina, medicamento quimioterápico, e

após essa conjugação os CDs tornaram-se eficientes transportadores de drogas sensíveis ao pH (menores pH acarretaram maior liberação de drogas) (HUANG¹, HUANG², *et al.*, 2014).

Além da biomarcação de células cancerígenas e transporte de drogas, os CDs podem ser utilizados também na detecção de microrganismos. Estudos recentes relatam que os *carbon dots* são nanomateriais de carbono com propriedades promissoras para se tornarem agentes antibacterianos em aplicações biomédicas *in vitro* e *in vivo* (CHEN, LIU, *et al.*, 2019). Diversas abordagens revelam que a modificação e atividade antibacteriana dos CDs, envolveram reações fotocatalíticas, ou seja, esterilização mediada por radicais oxigenados (ROS), para eliminação de microrganismos. Além disso, os fatores decorrentes da funcionalização dos CDs bem como a carga superficial são conhecidos por influenciar este efeito antibacteriano (DONG, LIANG, *et al.*, 2020).

Um estudo recente realizado por Sun e colaboradores mostrou a utilização de cepas bacterianas de *E. coli* e *S. aureus*, para avaliar a relação entre o tamanho das partículas de CDs e as diferenças na atividade antibacteriana. Para isso, os autores sintetizaram *carbon dots* utilizando como precursor o antimicrobiano biguanida em uma solução com cerca de 20% m/v de um conservante tensoativo (CG catiônico), via método hidrotérmico durante 6 horas a uma temperatura de 180 °C em uma autoclave revestida de Teflon[®]. Posteriormente, a solução foi dialisada para que ocorresse a separação das nanopartículas obtidas em diferentes tamanhos (aproximadamente 2,0 nm a 5,3 nm) e em seguida liofilizada. Segundo os autores, essas descobertas sugerem preliminarmente que o tamanho da partícula tem certa influência na atividade antibacteriana, tanto em cepas de *E. Coli* quanto em *S. Aureus*. Além disso, foi relatado que os CDs combinados com a solução de CG (denominado CGCDs) carregados positivamente (potencial zeta = + 34 mV) são capazes de destruir a integridade da membrana plasmática bacteriana, negativamente carregada, de forma mais eficaz do que os *carbon dots* convencionais. Após uma avaliação sistemática da toxicidade induzida pelos CGCD foi relatado que estas nanopartículas podem matar bactérias de forma seletiva. Devido ao fato de a permeabilidade e da consequente distribuição desses nanomateriais na membrana plasmática das bactérias estarem relacionada ao tamanho, os autores constataram que as nanopartículas de menor tamanho apresentaram uma maior atividade antibacteriana. Logo, o trabalho revelou que é possível verificar o efeito do tamanho dos *carbon dots* na atividade antibacteriana quando os demais fatores são aproximadamente iguais (SUN, WUA, *et al.*, 2021).

Lin e colaboradores em 2019 realizaram pela primeira vez a síntese de CDs dopados com P³⁺ e Mn²⁺ para regular a emissão no comprimento de onda no vermelho e eliminar radicais livres, de forma que esse material servisse como uma nano sonda para

obtenção de imagens e como agente antioxidante. Os autores sintetizaram CDs por meio de um método de pirólise contendo 1,4-dietil-feniletilenodiamina como fonte de carbono e realizaram uma dupla dopagem sob irradiação de microondas. Neste sistema, o dopante P^{3+} foi introduzido para aumentar a eficiência de fluorescência dos CDs, enquanto o dopante Mn^{2+} concedeu capacidade de detecção por ressonância magnética. Além disso, foi realizada uma conjugação dos CDs, dopados com Mn^{2+} e P^{3+} , com ácido hialurônico, para possibilitar o direcionamento de forma seletiva em várias culturas de células e realizar a captura de radicais livres como o hidroperoxil (HO^*_2) e hidroxil (*OH). Esses radicais são conhecidos por induzir danos em lipídios, proteínas, causar a aceleração do envelhecimento celular e induzir o aparecimento de diversas doenças humanas debilitantes. Segundo os autores, os *carbon dots* sintetizados por eles podem funcionar como uma plataforma teranóstica, pois agem simultaneamente como agentes terapêuticos promovido pela eliminação de radicais livres, além de auxiliar no diagnóstico mais preciso através de imagens de fluorescência e detecção por ressonância magnética (LIN, TSAI, *et al.*, 2019).

A partir desses estudos, pode-se inferir que a funcionalização de CDs é uma estratégia promissora para utilização em atividades biológicas, principalmente se a funcionalização for realizada usando uma molécula ou material com a atividade desejada para a aplicação, por exemplo, atividade antibacteriana.

2.7 Peptídeos Antimicrobianos

Os peptídeos são moléculas constituídas por resíduos de aminoácidos, unidos através de ligações covalentes, denominadas ligações peptídicas, formadas por reação amídica entre os grupos α -carboxílicos e α -amino de dois aminoácidos. Por definição, o resíduo de aminoácido na extremidade com um grupo α -amino livre é denominado resíduo amino-terminal (*N*-terminal), enquanto o resíduo da extremidade contendo grupo carboxil livre é denominado resíduo carboxi-terminal (*C*-terminal) (NELSON & COX, 2002). Essas moléculas são responsáveis por diversas funções fisiológicas e bioquímicas importantes para os organismos, sendo o primeiro trabalho sobre a atividade biológica desenvolvido em 1950, a partir disso, os peptídeos vêm sendo estudados e classificados de acordo com a função e atividade (SANCHEZ, 2017). Atualmente, existem diversos peptídeos antimicrobianos identificados e catalogados em bancos de dados como o *Antimicrobial Peptide Database* (APD) atualizado em 2020. Como é possível observar na Tabela 1 os peptídeos com atividade antibacteriana representam a maioria dos peptídeos bioativos cadastrados, o que revela a

potencialidade do estudo e aplicação desses peptídeos como agentes antibacterianos (BISWARO, 2018).

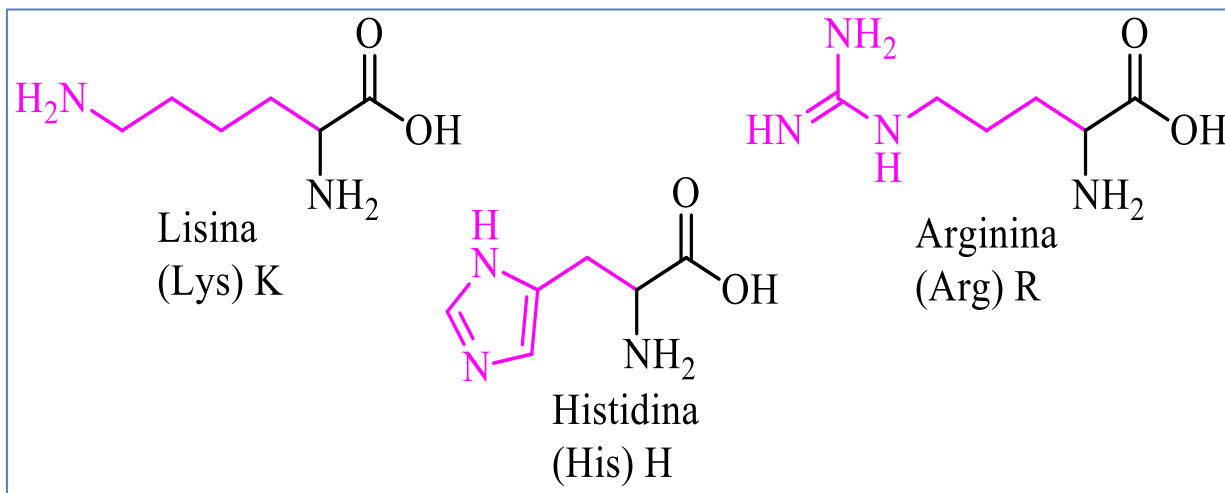
Tabela 1- Número de peptídeos antimicrobianos cadastrados no banco de dados APD classificados de acordo com a atividade biológica.

Atividade biológica dos peptídeos antimicrobianos	Número de peptídeos cadastrados na plataforma APD
Antibacteriano/ antebiofilme	2727
Anti MRSA (<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a Methicillin)	14
Antitoxicante	85
Anti-virais	190
Anti-HIV	109
Antifúngico	1210
Anticândida	676
Antiparasitário	138
Antimalárico	33
Anticâncer	251
Antidiabético	16
Cicatrizantes	23
Quimioterápico	62
Anti-inflamatório	24
Espermicida	14
Inseticida	39
Inibidores de canal iônico	7
Protease	31

Fonte: Banco de Dados de peptídeos antimicrobianos (APD, Dept of Pathology & Microbiology (<https://aps.unmc.edu/AP/main.php>), acesso em abril de 2021.

Em geral, os peptídeos antimicrobianos possuem caráter catiônico devido à presença de resíduos de aminoácidos com cadeias laterais básicas e protonáveis, como arginina, lisina ou histidina (Figura 8). Além disso, esses peptídeos apresentam caráter anfipático associado à conformação adotada ao interagir com a bicamada fosfolipídica. Esses peptídeos associam-se preferencialmente à membrana celular, predominantemente aniônica, das bactérias, estimulados primeiramente por atrações iônicas que geram perturbações e/ou desestruturação dessas membranas, podendo provocar o rompimento, formação de poros, divisão e lise celular (SHARMA, SINGH e RANA, 2011).

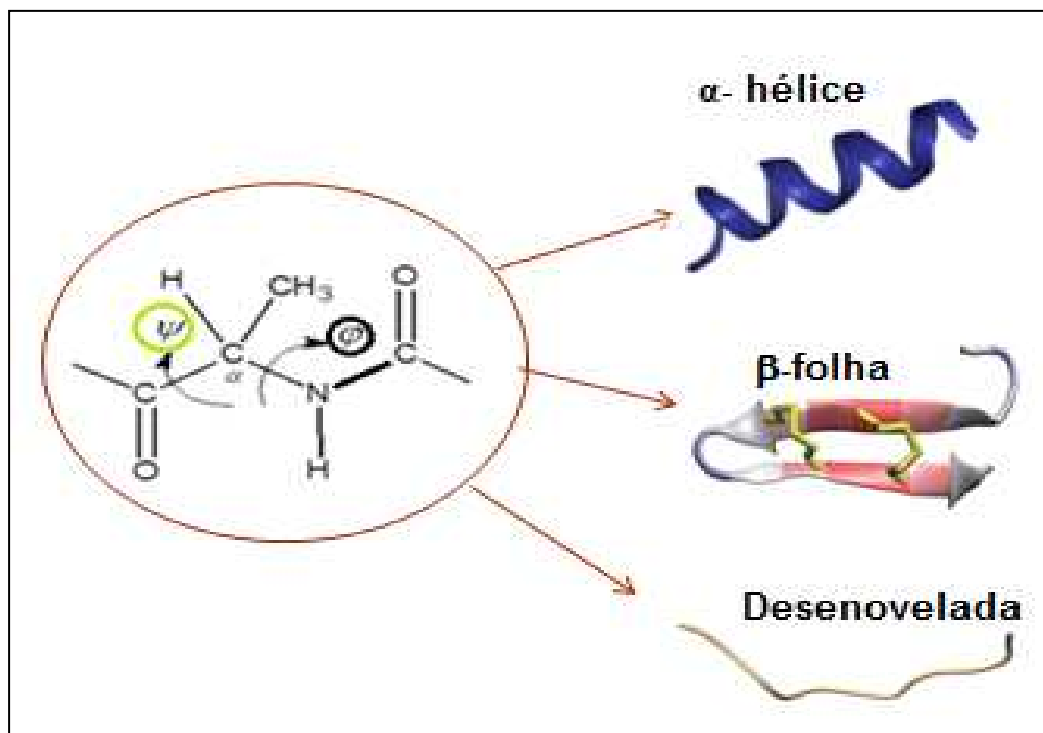
Figura 8- Estrutura dos aminoácidos arginina, histidina e lisina com caráter catiônico.



As estruturas dos peptídeos também podem ser classificadas em primárias, secundárias, terciárias e quaternárias. A representação de todas as ligações covalentes dos resíduos de aminoácidos de uma cadeia polipeptídica constitui a sua estrutura primária e define a sequência de aminoácidos do peptídeo, que é normalmente descrita da região *N*-terminal para a *C*-terminal (NELSON & COX, 2002).

Já as estruturas secundárias são conformações preferenciais que os peptídeos adotam em certo meio, devido principalmente, a variações nos ângulos diedros ϕ (Φ) e ψ (Ψ) da cadeia peptídica. Os ângulos Φ e ψ são normalmente iguais a 180° quando a conformação está totalmente desenovelada. Devido à variação nos ângulos há diversas possibilidades de conformações, e essas conformações dão origem a diferentes estruturas sendo as mais comuns as α -hélices, β -folhas e desenoveladas (VERLY, 2010). A Figura 9 mostra os ângulos diedros entre dois resíduos de aminoácidos e as estruturas secundárias mais comuns.

Figura 9- Ângulos diedros ϕ e ψ entre dois resíduos de aminoácidos e as estruturas secundárias (α -hélice, β -folha e desenovelada).



Fonte: Adaptada de Souza, 2019.

A estrutura terciária de um peptídeo está relacionada à organização espacial de duas ou mais estruturas secundárias presentes no mesmo peptídeo, estabilizada por interações intramoleculares ou por ligações de dissulfeto. Quando um peptídeo apresenta mais de uma cadeia, a disposição no espaço dessas cadeias é denominada de estrutura quaternária denominadas proteínas. Logo, a combinação de todas as estruturas: primária, secundária, terciária e quaternária, determinam a função do peptídeo no meio de atuação (BERGER, LI, *et al.*, 2016).

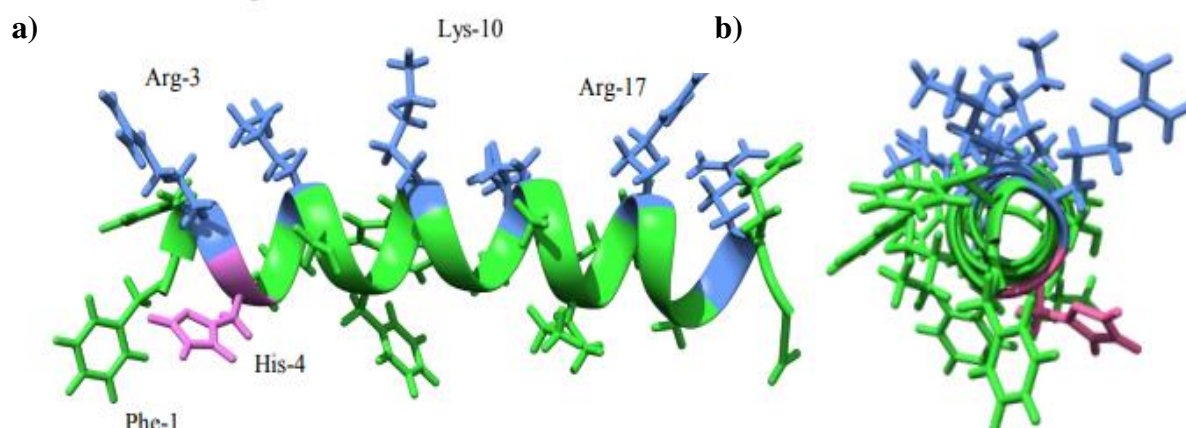
Além de apresentar estruturas versáteis a elevada eficiência contra microrganismos possibilita que os peptídeos atuem como agentes antibióticos. Devido a isso, diversas pesquisas revelam a potencial aplicação dos peptídeos em fármacos, conservantes de alimentos e antissépticos em cosméticos, dentre outros (ZHOU, LAI, *et al.*, 2015) (TORRES, BRAGA, *et al.*, 2018).

Uma classe interessante de peptídeos antibacterianos são as piscidina. Esses peptídeos constituem uma classe de peptídeo antimicrobiano encontrado em espécies de peixes. Em geral, são formados por 18 a 46 resíduos de aminoácidos (COLE, DAROUICHE, *et al.*, 2000). Esses peptídeos podem ser encontrados na mucosa, pele e mastócitos de peixes (RAJU, SARKAR, *et al.*, 2020). Um peptídeo da classe das piscidinas identificado como tendo forte atividade antibacteriana é o ecPis-4s, isolado da espécie de peixe *Epinephelus scoioides*. Esse peptídeo é constituído por 22 resíduos de aminoácidos

(FFRHIKSFWKGAKAIFRGARQG-NH₂) e apresentou atividade antibacteriana contra o patógeno de peixes *V. parahaemolyticus* e os patógenos humanos (*E. coli* e *S. aureus*), além de baixa atividade hemolítica, ou seja, baixa atividade em eritrócitos humanos (ZHUANG, YANG, *et al.*, 2017).

Os estudos realizado por Souza (2019) revelaram um elevado potencial de interação do peptídeo ecPis-4s, principalmente em membrana aniônica de POPC:POPG (3:1). E o autor verificou que o peptídeo assumiu uma estrutura secundária em α -hélice, conformação ativa durante o processo de interação com as membranas. Além disso, o autor observou na estrutura de menor energia uma pequena torção na estrutura α -helicoidal ao final da porção C-terminal, próximo à posição do resíduo de glicina 18 (Gly-18). Os resíduos de glicina possibilitam normalmente uma maior flexibilidade à estrutura de peptídeos, podendo atuar como uma espécie de âncora ou dobradiça de modo a facilitar a inserção de uma região do peptídeo na bicamada fosfolipídica. Segundo o autor essa peculiaridade da estrutura secundária do peptídeo pode indicar uma maior flexibilidade, ou seja, uma maior liberdade da estrutura peptídica para um possível ancoramento ou inserção dessa região (C-terminal) na superfície da membrana fosfolipídica, durante o processo de interação. Outra característica interessante relatada por Souza é a posição estratégica do resíduo de histidina (His-4) que é o único resíduo carregado em (pH menor que 6) e hidrofílico que está presente na região hidrofóbica do peptídeo ecPis-4s (Figura 8). Uma vez que a cadeia lateral da histidina possui um pK_a em torno de 6 para seu ácido conjugado e, por isso, pode existir tanto na forma protonada ou desprotonada próximo a valores do pH fisiológico, pois é o único aminoácido que apresenta significativa capacidade tamponante ao pH (entre 6,5 e 7,5), o que permite sua interação tanto com a cabeça polar dos fosfolipídios da bicamada celular quanto a parte externa da membrana celular e também com a parte apolar dos fosfolipídios, quando esse resíduo é inserido juntamente com os outros resíduos hidrofóbicos na membrana (NELSON & COX, 2014 apud Souza, 2019). A Figura 10 mostra a estrutura tridimensional do ecPis-4s, que apresenta uma hélice com alta qualidade estrutural e grande anfipaticidade, com uma face hidrofóbica e hidrofílica bem distintas (SOUZA, 2019).

Figura 10- Estrutura tridimensional de menor energia do ecPis-4s. Estrutura do peptídeo ecPis-4s em vista lateral com destaque aos resíduos hidrofílicos (em azul) e hidrofóbicos (em verde) (A). Vista frontal pelo eixo da hélice do peptídeo ecPis-4s (B). Resíduo de His-4 destacado em rosa.



Fonte: Adaptado de Souza, 2019.

Enfim, os resultados apresentados por Souza (2019) relatam que o modo de ação do peptídeo ecPis-4 deve-se ao caráter anfipático, e que esse peptídeo tem características importantes para formação de bionanoestruturas, principalmente através da ligação covalente na porção em *N*-terminal deixando a *C*-terminal livre para interação com a membrana de bactérias (SOUZA, 2019). Sendo assim, a utilização de peptídeos antimicrobianos associados a materiais é uma opção interessante para o desenvolvimento de materiais biocompatíveis e multifuncionais (COSTA, CARVALHO, *et al.*, 2011).

Todavia, o único estudo encontrado até o momento que mostra a associação de peptídeos com *carbon dots* é o estudo realizado por Yang e colaboradores em 2017. Esses autores realizaram uma conjugação física (adição pura de ambos reagentes) de peptídeos iRGD (CRGKGPDG) em CDs (CDs-iRGD). Os CDs foram partir do tratamento hidrotérmico da melamina, com emissão de fluorescência no comprimento de onda deslocado para o vermelho. As propriedades de luminescência, tamanho de partícula, grupos funcionais, estabilidade e compatibilidade dos iRGD-CDs foram avaliados por diversas técnicas como UV-vis, potencial zeta, FTIR, Microscopia Eletrônica de Transmissão, EDS e os de imagem por fluorescência, bem com, estudos de distribuição em tecidos (microscopia confocal) foram realizados para elucidar o efeito de direcionamento de tumor. Por meio dessas análises ou autores concluíram que o peptídeo iRGD se dirige a tumores tendo inicialmente como alvo receptores encontrados nas células tumorais, portanto, a conjugação dos CDs com esse peptídeo pode melhorar a penetração no tecido e apresentar uma permeabilidade específica nas células tumorais (YANG, WANG, *et al.*, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Os objetivos gerais desse trabalho envolvem a preparação de nanopartículas de carbono fluorescentes, isto é, *carbon dots*, a partir do biopolímero celulose, sua funcionalização com o peptídeo antimicrobiano ecPis-4s e a avaliação das suas propriedades antibacterianas e antioxidantes.

3.2 Objetivo específicos

- Preparar *carbon dots* com alta concentração de grupos funcionais oxigenados a partir de reações de desidratação e oxidação da celulose;
- Caracterizar os CDs com uma variedade de técnicas, incluindo FTIR, RMN ^1H , Difractometria de raios-X (DRX), microscopia de força atômica (AFM) entre outras;
- Avaliar as propriedades ópticas das nanopartículas usando espectroscopia de absorção e fotoluminescência na região do UV-vis;
- Ativar os grupos funcionais -COOH dos CDs com reações alternativas ao uso de cloreto de tionila, usando como reagentes o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e acetato de etil-2-ciano-2-(hidroxiimino).
- Funcionalizar as nanoestruturas com o peptídeo antimicrobiano ecPis-4s e caracterizá-las com diferentes técnicas e avaliar as propriedades antimicrobianas, antioxidantes e realizar estudo de Dicroísmo Circular em meio mimético de membranas.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Neste tópico serão descritos todos os procedimentos experimentais realizados nesta pesquisa. Primeiramente, será descrita a metodologia de síntese dos CDs a partir do biopolímero celulose bem como a estratégia implementada para a funcionalização dessas nanopartículas com o peptídeo ecPis-4s. Em seguida, serão descritos todos os procedimentos experimentais usados nas diferentes técnicas de caracterizações, incluindo técnicas espectroscópicas, microscopias, dentre outras. Por fim, serão descritos os dos ensaios para avaliação das propriedades antimicrobianas e antioxidantes de todos os materiais preparados para essa dissertação.

4.1 Materiais e Reagentes

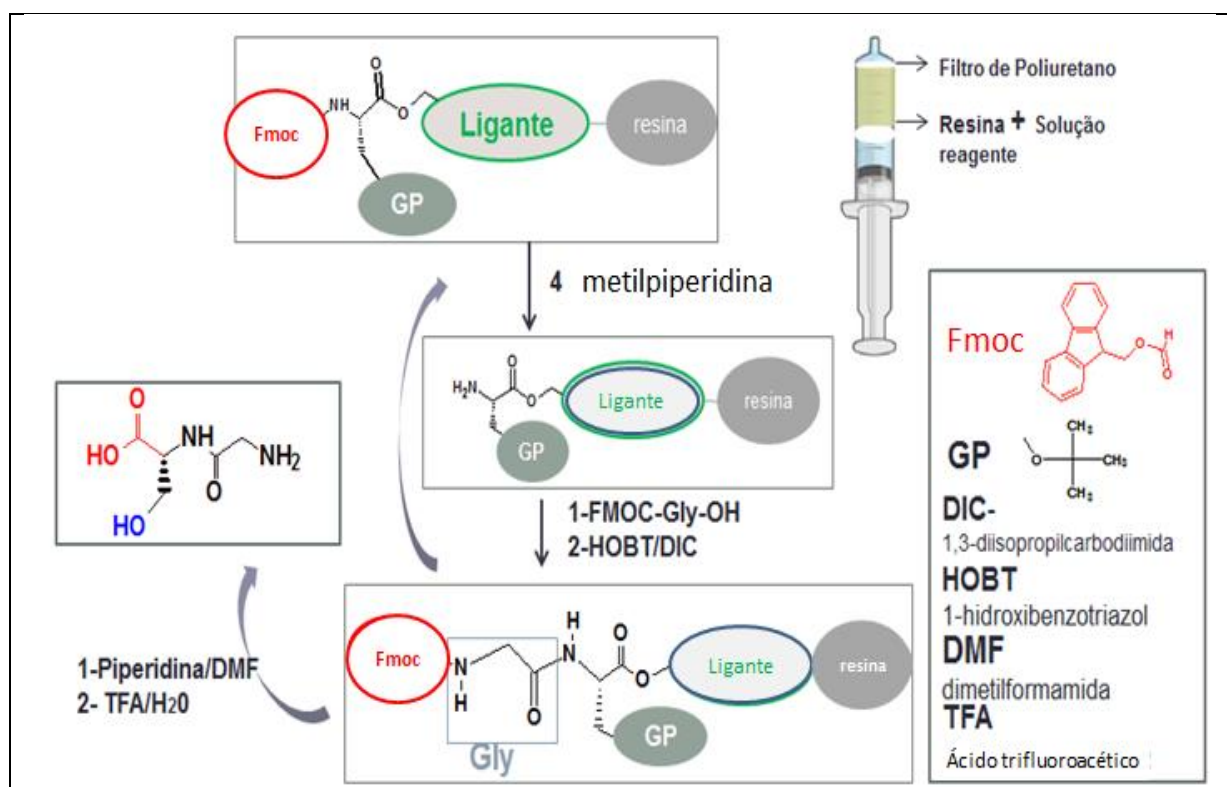
O algodão da marca Apolo[®] foi adquirido no comércio local, Ácido nítrico (HNO₃-*Neon Comercial*[®]), Ácido sulfúrico (H₂SO₄-*Dinâmica Química*[®]), ácido clorídrico (HCl – *Vetec Química*[®]), Hidróxido de sódio (NaOH-*Cromato produtos Química*[®]), Sulfato de quinina (*Dinâmica*[®]), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC - 191,7 g/mol. Merck – Darmstadt, Alemanha), acetato de etil-2-ciano-2-(hidroxiimino) (oxima – *Oxyma Pure*[®]), peptídeo ecPis-4s (FFRHIKSFWKGAIAIFRGARQG-NH₂, 2008,77 g/mol), aminoácidos-*Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, USA)) sintetizado pelo Laboratório de síntese e análise estrutural de biomoléculas (LASEB), Diclorometano (CH₂Cl₂ –*ISO FAR*[®]), 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) – *SIGMA-ALDRICH*[®], Álcool metílico P.A (Metanol) – *VETEC*[®], Ácido Gálico – *IMPEX*[®].

4.2 Síntese dos ecPis-4s

O peptídeo usado nesse trabalho foi sintetizado e fornecido pelo LASEB, aqui mostramos apenas um resumo da síntese. O peptídeo antimicrobiano ecPis-4s (FFRHIKSFWKGAIAIFRGARQG-NH₂) foi sintetizado pelo método de síntese em fase sólida, usando 9- fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc) conforme Chan & White (2000). Neste procedimento, a síntese ocorre a partir da adição um derivado de aminoácido em cada etapa do acoplamento da cadeia peptídica, a qual está ligada covalentemente a um suporte sólido (resina) por meio do grupo região carboxi-terminal. As etapas de acoplamento dos aminoácidos foram realizadas empregando-se um excesso estequiométrico de três a quatro vezes, tanto para os derivados de aminoácidos quanto para os reagentes ativadores, 1,3-diisopropilcarbodiimida (DIC) e 1-hidroxibenzotriazol (HOBt). Primeiro, a resina foi

submetida à etapa de desproteção, ou seja, à remoção do grupo protetor Fmoc, usando uma solução básica de 4-metilpiperidina (PIPE) em *N,N*-dimetilformamida (DMF) 25% (v/v). Após a desproteção, a resina foi lavada três vezes por uma série alternada de 2 mL de DMF e álcool isopropílico e por fim com 2 mL de diclorometano. Para a confirmação da desproteção, foi realizado o teste de Kaiser, ou teste de Ninidrina. Em seguida, foi realizado o acoplamento do primeiro derivado de aminoácido (Fmoc-Gly-OH) na presença dos ativadores HOBt e DIC, solubilizados em 3 mL de solução DMF:DCM (2:1 v/v). Após a reação, foram realizados os procedimentos de desproteção (remoção do grupo protetor Fmoc), lavagem em três etapas e confirmação da desproteção com o teste de Kaiser. Todas essas etapas foram repetidas até que a sequência peptídica almejada fosse obtida. O tempo de acoplamento para o primeiro resíduo (Fmoc-Gly-OH) foi de 3 horas e, para os demais derivados de aminoácidos, o tempo para reação de acoplamento foi de 2 a 2,5 horas. Ao final da síntese, a cadeia peptídica é removida do suporte sólido, juntamente com os grupos protetores das cadeias laterais, por meio de uma etapa de clivagem em meio ácido (TFA). Os reagentes utilizados na clivagem foram definidos de acordo com os grupos protetores presentes na sequência peptídica sintetizada. Detalhes experimentais podem ser encontrados na dissertação (SOUZA, 2019). A Figura 11 mostra um esquema resumido da síntese do peptídeo ecPIS-4s.

Figura 11- Esquema resumido da síntese do peptídeo ecPIS-4s.



4.3 Síntese e funcionalização dos *carbon dots* de celulose

4.3.1. Síntese dos *carbon dots*

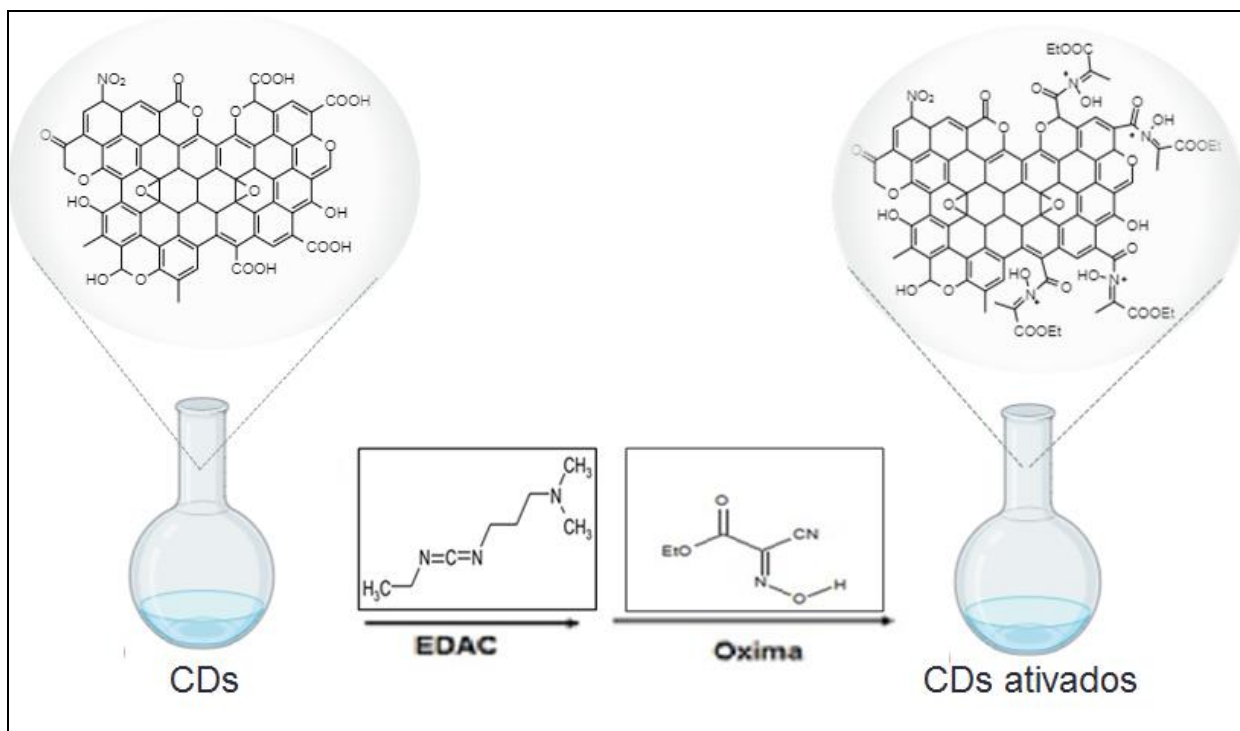
A preparação dos CDs foi realizada através da hidrólise controlada da celulose com ácido sulfúrico concentrado, seguida da oxidação com ácido nítrico. Os procedimentos experimentais foram conduzidos conforme os trabalhos de Araújo *et al.* (2016) e Alves *et al.* (2016), os quais foram baseados no trabalho de Peng *et al.* (2009), com algumas modificações. Neste procedimento, 5,0 g de celulose de algodão foram dispersos cuidadosamente em um béquer contendo 20 mL de H₂SO₄ 98% (mol/L) aquecido, sob agitação constante, até uma temperatura de 80 °C, com o auxílio de uma chapa aquecedora. Após 40 minutos, a reação foi interrompida pela adição cuidadosa de 100 mL de água destilada e o material de carbono obtido foi filtrado a vácuo e lavado por quatro vezes seguidas com água destilada para a retirada do ácido em excesso. Em seguida, esse material foi seco em uma estufa a 60 °C. Posteriormente, o material carbonoso foi disperso em 125 mL de uma solução de HNO₃ (2,0 mol/L) e refluxado por 8 horas. Durante a reação, observou-se a mudança da coloração da suspensão de preta para amarelo-amarronzada. Após essa reação de oxidação foram adicionados, lentamente, aproximadamente 13,24 g de bicarbonato de sódio para a neutralização da solução. Finalmente, a solução que apresentava uma condutividade de 98 mS/cm foi dialisada contra água deionizada, usando uma membrana Sigma® até uma condutividade constante de 25,7 µS/cm. No trabalho de Alves *et al.*, (2016) as soluções aquosas de CDs foram obtidas com uma concentração de 1 g/L. Aqui, diferentemente, a concentração obtida foi de 2,26 g/L.

4.3.2 Funcionalização dos *carbon dots*

A reação de modificação superficial dos CDs foi planejada com base na concentração de grupos funcionais superficiais oxigenados (mol/g), usando a titulação potenciométrica que será descrita a seguir. Neste sentido, 50 mg de *carbon dots*, ou seja, 0,000223 mol de grupos funcionais com caráter ácido (obtidos após quantificação via titulação potenciométrica) foram misturados com 0,03 g de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) a 45 °C sob agitação constante em um balão de fundo chato de 25 mL. Após 30 minutos de reação, adicionou-se 0,02g de acetato de etil-2-ciano-2-(hidroxiimino) (Oxyma Pure® - 142,11 g/mol). A reação foi conduzida sob as condições supracitadas por mais 3 horas, obtendo-se os “CDs ativados”. Na Figura 12 é mostrada uma representação

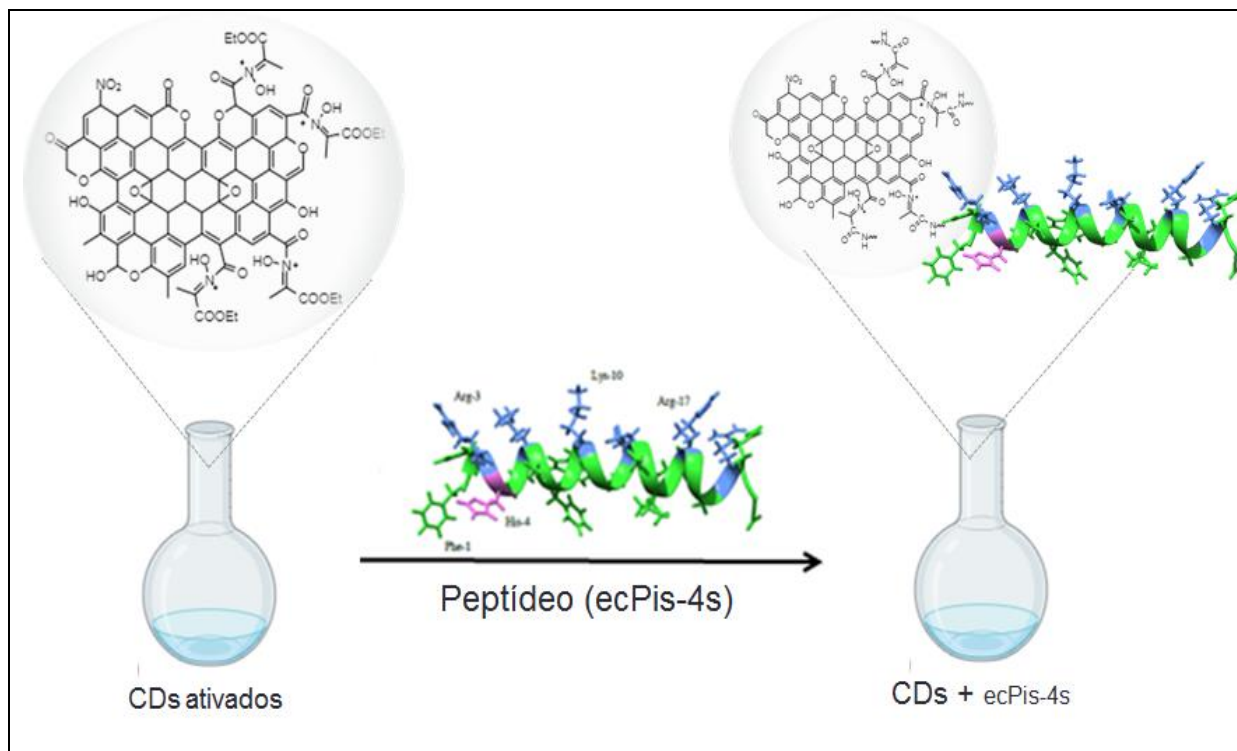
esquemática da reação de ativação dos grupos carboxílicos dos CDs com EDAC e Oxyma Pure® (oxima).

Figura 12- Representação esquemática da reação de ativação dos grupos carboxílicos dos CDs.



Ao mesmo sistema reacional contendo os “CDs ativados”, foi adicionado 1 mL de uma solução preparada a partir de peptídeo ecPis-4s 10 mg/mL. A adição dessa solução foi realizada em frações de 50 µL com intervalos de 10 minutos entre cada adição. Essa reação prosseguiu por mais 4 horas após a adição de toda a solução do peptídeo. Por fim, a suspensão obtida foi liofilizada e o material seco foi redisperso em diclorometano para remoção do excesso de reagentes e subprodutos da reação. A Figura 13 mostra a representação da reação de funcionalização dos CDs.

Figura 13- Representação esquemática da etapa de funcionalização dos CDs com ecPis-4s.



4.4 Caracterização

4.4.1 Imagens digitais das suspensões de CDs sob luz ambiente e UV

As imagens realizadas com auxílio de uma câmera digital das suspensões de *carbon dots* foram obtidas, primeiramente, sob a luz ambiente e posteriormente, a mesma suspensão foi submetida a uma luz UV de emissão máxima em 360 nm.

4.4.2 Microscopia de força atômica (MFA)

A avaliação morfológica e do tamanho das partículas de CDs foram determinadas com Microscopia de Força Atômica. Neste procedimento, uma gota da suspensão de CDs descrita em 4.3.2 foi depositada sobre uma placa de mica (1 cm^2), clivada no momento da deposição. Após a evaporação da água presente na suspensão por meio de um dessecador, as imagens foram obtidas em um equipamento da marca SHIMADZU, modelo SPM-9700. O equipamento está disponível no laboratório de pesquisas em Química do Vale do Jequitinhonha (LABVALE) da UFVJM.

4.4.3 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para caracterização dos grupos funcionais dos CDs com e sem funcionalização, espectros FTIR foram obtidos na janela de 4000 a 400 cm^{-1} e resolução 2 cm^{-1} . Os espectros

mostrados neste trabalho foram obtidos com 64 varreduras em um espectrômetro FTIR Cary 630 da Agilent, usando o acessório de refletância total atenuada (ATR).

4.4.4 Potencial Zeta (ζ)

O potencial zeta (ζ) das suspensões de *carbon dots* de celulose e da amostra funcionalizada com o peptídeo foram determinadas sem adição de tampão em pH 6,7, após a diluição adequada das suspensões. Todas as medidas de potencial zeta foram realizadas em um equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments®, GB) disponível no laboratório multiusuário do Departamento de Farmácia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

4.4.5 Ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN de ^1H do peptídeo livre, CDs e CDs funcionalizados com o peptídeo foram registrados usando um espectrômetro NMR 400 MHz da Bruker (Suíça) operando a 400,28 MHz para ^1H disponível no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais. As amostras foram suspensas em uma mistura de $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10, v/v) contendo 10 mM de 2,2-dimetil-2-silapentanossulfonato (DSS) como referência interna''. Todos os espectros de RMN unidimensionais (1D) foram registrados usando uma sonda padrão de 5 mm de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ a 20 °C e processados usando o *software* Topspin 3.1 desenvolvido por Bruker BioSpin®. Os espectros de ^1H foram adquiridos com supressão de água usando técnicas de pré-saturação com o programa de pulsos zgpg30. A largura espectral foi de 6103,52 Hz para todas as amostras.

4.4.6 Composição elementar

A composição elementar dos nanomateriais foram determinadas pela técnica de energia dispersiva de raios X (EDS) da *Oxford Instruments*® modelo SwiftED3000, acoplado ao microscópio eletrônico de varredura HITACHI® modelo TM3000 (*bench top*). Os valores obtidos são uma média de três medidas em diferentes regiões da amostra com tensão de 15 KV.

4.4.7 Titulação Potenciométrica

As curvas de titulação potenciométrica foram obtidas a 25 °C, sob atmosfera inerte (purga com N_2), utilizando eletrodo de pH modelo N6280 (SCHOTT), acoplado a um

titulador automático SCHOTT (TitroLine 7000), disponível no Departamento de Química da UFVJM. A uma célula de vidro foram adicionados 2,2 mL da solução de CDs (2,26 g/L) e 20 mL de uma solução de HCl (preparada com auxílio de pH-metro até que o pH da solução estabilizasse em 2,8). Esta solução é titulada em seguida com uma solução de NaOH (0,065 mol/L), com baixíssima concentração de CO₂, preparada a partir da diluição de uma solução de NaOH 15 mol/L em água fervente e padronizada com a com biftalato de potássio. Ambas as soluções tiveram suas forças iônicas ajustadas para 0,1 mol/L com NaCl. Após a obtenção dos dados experimentais (pH e volume de titulante), os grupos funcionais ácidos (concentração e força ácida - pKa) presentes na superfície dos materiais são estimados segundo o método descrito por Alves et al. (2016), o que é baseado na resolução da equação 1.

$$f(V_i, [H^+]_i) = (V_i - V_{HA0})Cb + \left\{ [H^+]_i - \frac{K_w}{[H^+]_i} \right\} (V_0 + V_i) - \sum_{j=1}^N (V_{HA_n} - V_{HA_{n-1}})Cb \frac{K_{HA_n}}{K_{HA_n} + [H^+]_i} \quad (1)$$

Para a resolução desta equação é necessário fornecer os valores de pH e volume de titulante adicionado (V_i), o volume inicial presente na célula de titulação (V_0), o valor de K_w na respectiva força iônica, o número de grupos funcionais estimados (n) bem como seus respectivos valores de K_{HA_n} (constante de ionização ácida) e V_{HA_n} (volume de equivalência do grupo funcional ácido). Através do método matemático de Levenberg-Marquardt como descrito por Gorgulho *et al.* (2008), sendo determinados os dois últimos parâmetros a representação da força ácida dos grupos funcionais e as respectivas concentração.

4.4.8 Difração de Raios-x (DRX)

A estrutura cristalina dos CDs foi analisada através dos difratogramas de raios-X. Os dados foram obtidos em um difratômetro XRD6000, Shimadzu®, disponível no Departamento de Química da UFVJM, usando radiação Cu-K α ($\lambda = 0,154$ nm) filtrada com Ni, tensão de 30 kV e corrente de 30 mA. Os dados de difração de raios X foram de 10 a 80° 2 θ com velocidade de varredura igual a 1° por minuto.

4.5 Propriedades ópticas

4.5.1 Espectroscopia de absorção molecular (UV-vis)

A espectroscopia UV-vis foi realizada com a utilização de um espectrofotômetro Varian®, modelo Cary 50, disponível no Departamento de Química da UFVJM. As medições para a determinação da absorvidade molar das soluções de CDs e peptídeo foram realizadas utilizando células de quartzo de 1,0 cm e os espectros foram obtidos na região espectral do UV-Vis de 200 a 800 nm. Para a determinação da absorvidade (ϵ), foram utilizadas diferentes concentrações das soluções de *carbon dots* e de CDs modificados com peptídeos. A absorvidade¹ pode ser quantificada pela lei de Lambert-Beer através da relação (Equação 2):

$$A = -\log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right) = \epsilon lc \quad (2)$$

Onde I e I_0 representam respectivamente a intensidade de luz detectada e fornecida pela fonte, ϵ representa a absorvidade molar, l o percurso óptico, c a concentração da amostra e A absorbância.

4.5.2 Espectroscopia de fotoluminescência

Os espectros de fotoluminescência foram obtidos usando o equipamento Molecular Devices / SpectraMax® do Laboratório de Pesquisas Clínicas do Departamento da Farmácia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

Para calcular o rendimento quântico, as soluções de CDs foram preparadas nas concentrações de 0,002 g/L, 0,015 g/L, 0,06 g/L, 0,03 g/L. Para as amostras de CDs funcionalizados, foram utilizadas concentrações de 0,001 g/L, 0,0000125g/L e 0,0000025g/L. Para determinação do rendimento quântico fotofluorescência, usaram-se os valores de absorbância em 360 nm e a intensidade de fluorescência integrada sob excitação neste mesmo comprimento de onda. Dessa forma, o rendimento quântico da fotofluorescência da amostra foi obtido em comparação com os resultados de uma amostra padrão (sulfato de quinina), ou seja, com ϕ já definido, por meio da equação 3:

$$\phi_{CD} = \phi_{sq} \left(\frac{S_{CD}}{S_{sq}} \right) \left(\frac{\eta_{CDs}^2}{\eta_{sq}^2} \right) \quad (3)$$

Na equação 3, ϕ representa o rendimento quântico, S a inclinação da reta obtida, η é o índice de refração do solvente. Os subscritos CDs, SQ são, respectivamente, os *carbon dots* e o padrão utilizado (sulfato de quinina).

¹ Neste trabalho foram utilizadas concentrações em g/L.

4.6 Dicroísmo Circular

As análises foram realizadas em um espectropolarímetro da JASCO® J-810 (Tóquio-Japão) equipado com sistema de controle de temperatura *Petier Jasco*® PFD425S, disponível no Departamento de Química da UFMG. As análises de dicroísmo circular foram realizadas em janela espectral de comprimentos de onda de 190 a 260 nm, a 25 ° C, utilizando uma cubeta de quartzo com percurso óptico de 1 mm. Os espectros ficaram com largura de banda de 1 nm e a leitura da elipticidade foi realizada a cada 0,5 nm. Para cada amostra, foram realizadas cinco varreduras consecutivas. Como o modelo mimético de membrana, foram usadas vesículas lipídicas unilamelares grandes (LUV). A preparação destas LUVs foi realizada utilizando os fosfolipídios 1-palmitoil-2-oleilfosfatidilcolina (POPC) e 1-palmitoil-2-oleilfosfatidilglicerol (POPG) em solução tampão de Tris-HCl a 20 mM, pH 8,5, conforme a metodologia de hidratação do filme lipídico proposta por Kirby & Gregoriadis (1984) e utilizado por Torres *et al.*(2018) e Souza(2019).

4.7 Ensaios de atividades antibacterianas

Foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), bactéria Gram-negativa, e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29313), bactéria Gram-positiva, utilizando como referência a metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico (ANVISA, 2003; NCCLS, 2012). Os microrganismos foram cultivados no laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Farmácia da UFVJM em Diamantina, MG. Inicialmente, para obtenção das células bacterianas utilizadas nos experimentos, foi realizada a padronização da suspensão bacteriana conforme descrito no manual do CLSI (2006). A partir de uma cultura de 24 horas em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) sólido, foram retiradas colônias isoladas e posteriormente resuspendidas em solução salina (NaCl) 0,09% (m/V) estéril até atingir turvação igual à suspensão do tubo correspondente a 0,5 da escala de McFarland. Em seguida, foi verificada a concentração de microrganismos por leitura espectrofotométrica (Femto®) a 620 nm, onde a faixa de absorbância deve se encontrar entre 0,08 a 0,1, resultando, assim, em uma suspensão contendo aproximadamente de $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL (unidades formadoras de colônia/mL). Logo após, foi realizada uma diluição na proporção de 1:10 em caldo Mueller-Hinton da Kasvi® e obteve-se uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL. Em seguida, os poços da microplaca de 96 poços (Global®) foram preenchidos com 50 µL da suspensão e acrescidos de mais 50 µL da suspensão bacteriana padronizada. O cloranfenicol (MM: 323,132 g/mol)

(antibiótico convencional) da Sigma-Aldrich® foi utilizado como padrão para controle de morte celular (controle positivo) na concentração de 30 µg/mL (92,8 µmol/L). Ao final da confecção das microplacas, estas foram submetidas à agitação por 20 minutos em agitador orbital (Fanem®). As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. As concentrações das amostras empregadas no ensaio de atividade antibacteriana estão detalhadas na Tabela 2. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 2- Concentração das amostras em g/L utilizada no ensaio antibacteriano para as amostras de CDs funcionalizados, peptídeo e dos *carbon dots*, respectivamente.

CDs funcionalizados (g/L)	peptídeo ecPis-4s (g/L)	carbon dots (g/L)
0,169	0,169	0,339
0,085	0,085	0,170
0,042	0,042	0,085
0,021	0,021	0,042
0,011	0,011	0,021

Após 22 horas em uma estufa com a temperatura controlada de 37° C foram adicionados a cada poço 30 µL de uma solução de 0,01% (m/v) de corante 7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido – Resazurina (Sigma®). Em seguida, esta solução foi colocada por 20 minutos sob agitação magnética e posteriormente reincubada por mais 2 horas na ausência de luz, para o desenvolvimento de coloração que foi observada. O crescimento ou a morte celular das bactérias é indicado pela alteração de cor. A mudança de coloração do meio, de azul para rosa, indica que não houve crescimento dos microrganismos. Além disso, foram realizadas medidas espectrofotométricas utilizando uma Multileitora Spectramax Paradigm Molecular Devices®, LLC (Sunnyvale, CA, USA) efetuadas em $\lambda_{\text{máx}} = 620$ nm, para obtenção da concentração inibitória mínima (MIC), que é definida como a menor concentração de amostra que pode inibir completamente o crescimento de microrganismos.

4.8 Ensaio de atividade antioxidante.

Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 244 µL de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH• - 60 µM), em ambiente escuro e, em seguida, adicionou-se uma alíquota de 6 µL de cada diluição das amostras (mesmas concentrações utilizadas na atividade antibacteriana, porém diluídas em metanol) e do padrão ácido gálico, obtendo um volume final de 250 µL. Uma amostra controle, contendo somente o reagente DPPH•, também foi preparada para análise dos resultados. A placa foi mantida à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por um período de 30 minutos. Após este intervalo de tempo, foi realizada a leitura das

absorbâncias do meio reacional a 515 nm em leitor de microplacas Spectramax[®], utilizando metanol como branco.

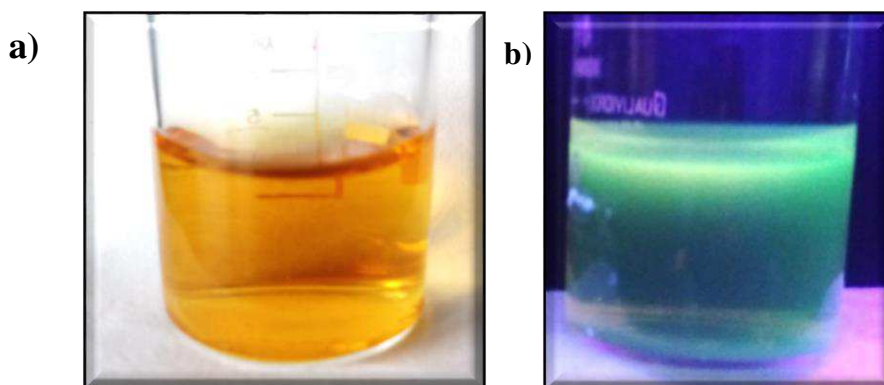
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste tópico serão apresentados os resultados obtidos com as diferentes técnicas de caracterização e respectivas discussões sobre a morfologia, estrutura e química superficial das nanopartículas de carbono preparadas a partir da celulose de algodão, antes e após a funcionalização com o peptídeo ecPis-4s. Em adição, serão apresentados os resultados de algumas potenciais aplicações do material obtido como a atividade biológica para diferentes microrganismos patógenos e atividade antioxidante.

4.1 Caracterização dos *carbon dots*.

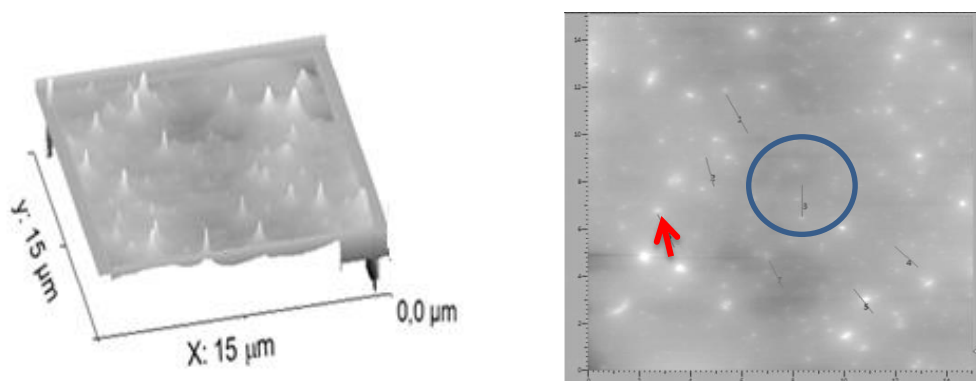
Uma das características mais fascinantes dos CDs são suas propriedades ópticas, principalmente as propriedades fotoluminescentes. Dessa forma, a primeira evidência da obtenção de carbon dots é a observação dessa propriedade após a incidência de radiação UV sobre a suspensão aquosa das nanopartículas. Na Figura 14 encontram-se as imagens digitais obtidas para as suspensões de CDs sob a luz ambiente e luz UV (λ de emissão máxima de 360 nm). Enquanto a suspensão de CDs apresenta-se com coloração amarelo-amarronzada sob luz ambiente, sob a luz UV observa-se a emissão da suspensão na região verde do espectro eletromagnético.

Figura 14- Imagens digitais das soluções (a) Luz ambiente (b) luz UV ($\lambda_{\text{máx}}=365$ nm).



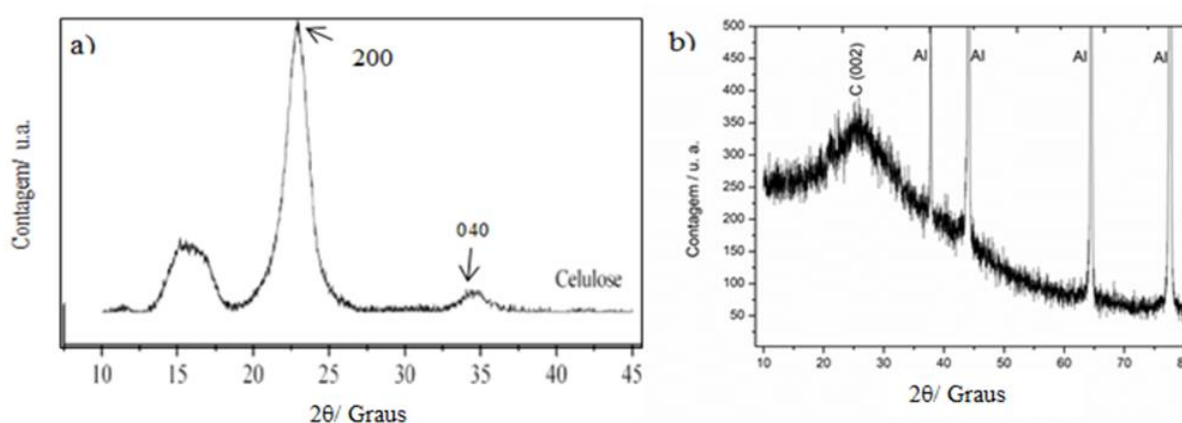
Uma vez verificada a propriedade óptica típica dos CDs, imagens de Microscopia de Força Atômica (MFA) foram obtidas (Figura 15). Pode ser observada uma alta concentração de pontos com diâmetros que variam desde 200 nm (seta vermelha, típica de aglomerados de nanopartículas de CDs) até partículas com diâmetros inferiores a 50 nm (região circundada em azul). A partir de várias medidas de altura das partículas menores foi obtido um tamanho médio de aproximadamente 4 nm.

Figura 15- Imagens de microscopia de força atômica da solução de *carbon dots*.



A caracterização da estrutura cristalina do CDs foi feita usando dados de difração de raios-X. Na Figura 16 são mostrados os difratogramas de raios-X para as amostras de celulose de algodão e CDs. O difratograma de raios-X da amostra de algodão é típico de celulose, com picos bem definidos em $22,5^\circ$ (200) e $34,5^\circ$ (040) 2θ (SUGIYAMA, VUONG e CHANZY, 1991). Após as reações de desidratação e oxidação, a estrutura cristalina da celulose não é mais observada e um difratograma típico de material de carbono não cristalino é obtido (Figura16 (b)) Os picos intensos observados no difratograma são do porta amostra de alumínio.

Figura 16- Difratogramas de raios-X obtidos para as amostra de celulose de algodão antes(a) e após as rações de desidratação/oxidação, (b) CDs.

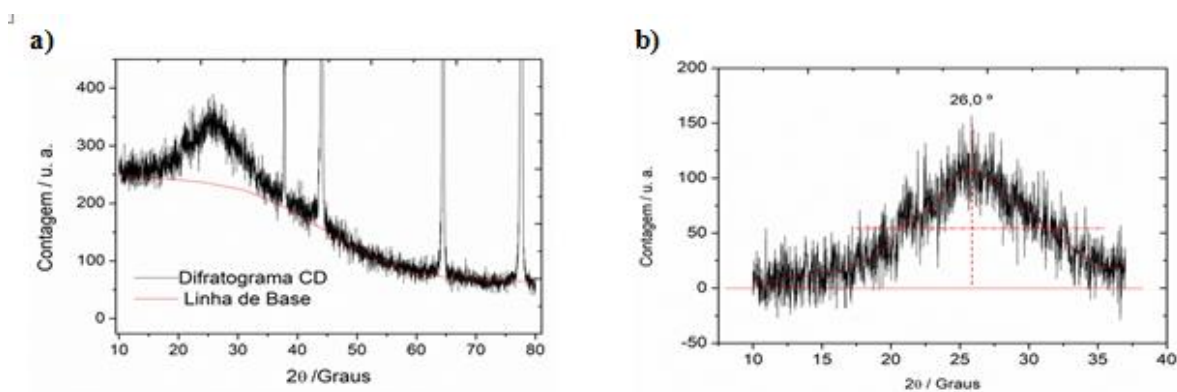


No difratograma da amostra de CDs, pode ser observado um pico em 26° 2θ , correspondente ao plano [002] de material com ordenamento grafítico. A baixa intensidade e a largura deste pico sugerem tanto a presença de material não cristalino como também a presença de cristalitos muito pequenos. Assim, foi estimado o tamanho de cristalito usando a equação de Scherrer para partículas esféricas (Equação 4).

$$B = \frac{0,94 \times \lambda}{\beta \times \cos \theta} \quad (4)$$

Em que B é o tamanho médio dos cristalitos, β é a largura à meia altura do pico de difração, em radianos, θ é o ângulo de Bragg e λ o comprimento de onda da radiação X. Detalhes da obtenção dos parâmetros da equação podem ser observados na Figura 17 (a) e Figura 17(b).

Figura 17- Detalhes da manipulação dos dados de difração de raios-X para obtenção dos parâmetros β e θ da Equação 4.1 para determinação do tamanho do cristalito dos CDs. a) linha de base e b) posições onde foram obtidos os valores de β e θ .



A média de tamanho dos cristalitos, obtida com a Equação 4, foi de 0,80 nm. Este resultado sugere a presença de nanoestruturas de carbono cristalinas ou com núcleo (do inglês *core*) cristalino, uma vez que o tamanho médio das partículas obtidas neste trabalho utilizando o MFA foi de 4 nm. Em adição, medidas usando Microscopia Eletrônica de Transmissão de alta resolução mostraram um tamanho médio de 2,7 nm para esta metodologia experimental de obtenção de CDs (ALVES, CASTRO, *et al.*, 2016). De fato, os resultados obtidos em outros trabalhos mostram tanto a presença de estruturas cristalinas quanto não cristalinas (ARAÚJO, OLIVEIRA, *et al.*, 2016).

Durante a síntese dessas nanopartículas, ocorreu um conjunto de reações que levaram a formação das nanoestruturas de carbono. Na reação com ácido sulfúrico ocorre, entre outras reações, a desidratação do carboidrato, que leva à aromatização/carbonização do precursor. Já na reação com HNO_3 , o material carbonoso sofre um forte ataque oxidativo que leva à fragmentação da estrutura, com inserção de grupos oxigenados na superfície dos fragmentos, formando nanopartículas de CDs altamente hidrofílicas (ALVES, CASTRO, *et*

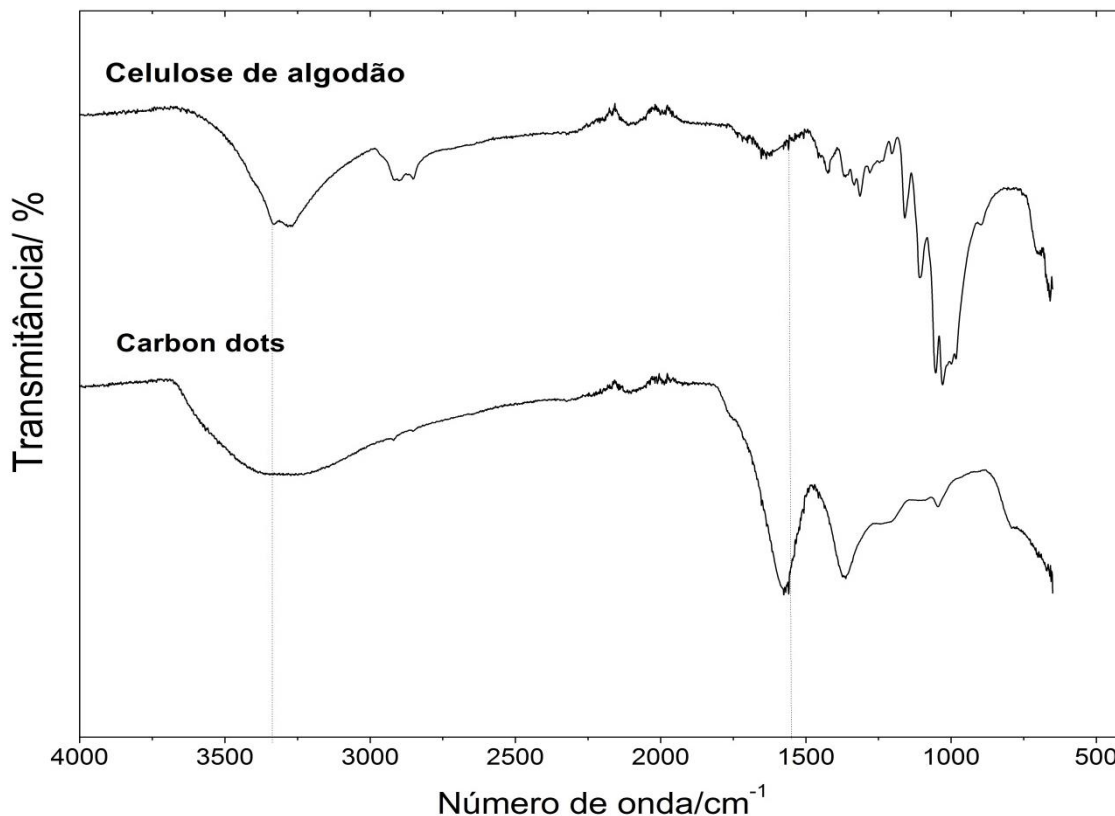
al., 2016). Na Tabela 3, os resultados da composição elementar, obtidos a partir de Espectroscopia Dispersiva de Raios-X mostram uma concentração relativa na amostra.

Tabela 3- Composição elementar relativa entre C, N e O obtido para a amostra de CDs.

Elemento	Composição elementar relativa / % em massa
Carbono	37
Nitrogênio	12
Oxigênio	51

Na Figura 18(a) é mostrado o espectro de absorção no Infravermelho da celulose de algodão. A banda em 3390 cm^{-1} é atribuída à vibração de estiramento O-H, as bandas centradas em 2900 e 1431 cm^{-1} características do estiramento C-H e deformação de grupos -CH₂, respectivamente. Já as bandas na região de 1100 cm^{-1} são atribuídas à estrutura sacarídea (presença de grupos funcionais aldeídos e cetonas). A Figura 18(b) mostra o desaparecimento das bandas típicas da celulose, em especial da estrutura sacarídea, após os tratamentos ácidos. Pode ser observada também a banda de O-H ($\sim 3300\text{ cm}^{-1}$) alargada. Este perfil sugere a presença de ligações de hidrogênio e é típica de ácidos carboxílicos. Observam-se ainda duas bandas mais intensas, uma centrada em 1560 cm^{-1} e outra em 1362 cm^{-1} . Apesar de centrada em 1560 cm^{-1} , a primeira banda alarga-se entre 1500 e 1850 cm^{-1} . O alargamento nessa região sugere uma sobreposição de bandas que é característica de uma superfície complexa, com a presença de diferentes grupos funcionais carbonílicos além, é claro, da absorção de estruturas aromáticas. A presença de um ombro em 1730 cm^{-1} pode ser atribuída à presença de grupos funcionais carboxílicos. Além disso, devido ao uso de HNO₃ na preparação dos CDs, é esperada a presença de grande quantidade de grupos nitro (-NO₂), além da presença de grupos funcionais éter, que são comuns em reações de desidratação da celulose (SOUZA, MESQUITA, *et al.*, 2016). Esses dois grupos funcionais podem ser os responsáveis pelas absorções ao redor de 1362 e 1050 cm^{-1} .

Figura 18- a) Espectros FTIR para celulose de algodão e b) CDs obtidos a partir da desidratação/oxidação deste material.



Após a análise qualitativa realizada por meio da técnica de FTIR, os grupos funcionais foram quantificados a partir de titulação ácido-base, uma vez que muitos grupos funcionais, principalmente os oxigenados (carboxílicos e fenólicos), apresentam acidez de Brønsted. Para essa caracterização quantitativa foi utilizada a titulação potenciométrica e os valores de constante de acidez e concentração foram obtidos após o tratamento dos dados por um método não linear. Esta metodologia é necessária, pois a curva de titulação não apresenta as típicas inflexões devido à heterogeneidade da superfície e às baixas concentrações relativas (MESQUITA, MARTELLI e GORGULHO, 2006) (GORGULHO, MESQUITA, *et al.*, 2008). Na Figura 19 são mostradas as curvas de titulação obtidas para a solução de HCl e HCl + CDs. Pôde ser verificada na titulação da amostra de CDs a diminuição da inclinação e definição no ponto de equivalência sugerindo a presença de grupos funcionais ácidos com diferentes forças. Como esperado, a curva não apresenta as típicas inflexões observadas nas titulações como, por exemplo, as de ácidos inorgânicos polipróticos. Na Tabela 4 são mostrados os resultados obtidos após o tratamento dos dados usando a resolução da equação 1 relatada anteriormente.

De acordo com esses dados, o total de grupos funcionais ácidos é igual a 4,55 mmol/g de *carbon dots*. Em geral, nos materiais de carbono, os pK_a 's entre 2,0 e 6,0 são tipicamente atribuídos a grupos carboxílicos enquanto os pK_a 's entre 6 e 8 são atribuídos a grupos ácidos formados pela hidrólise de ésteres cíclicos (grupos lactona) em meio ácido ou base, pK_a 's maiores que 9 são atribuídos a grupos fenólicos (GORGULHO, MESQUITA, *et al.*, 2008). Uma vez que 2,73 mmol/g, ou seja, aproximadamente 60% tem pK_a correspondente a grupos carboxílicos. Assim, conclui-se que esses grupos são os principais responsáveis pelo potencial zeta de -50,5 mV.

Figura 19- Curvas de titulação potenciométrica obtidas para a solução de HCl e HCl+CDs.

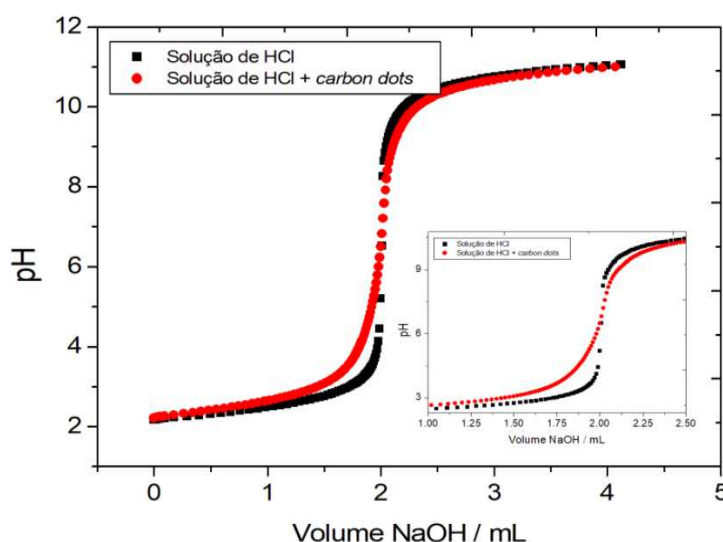


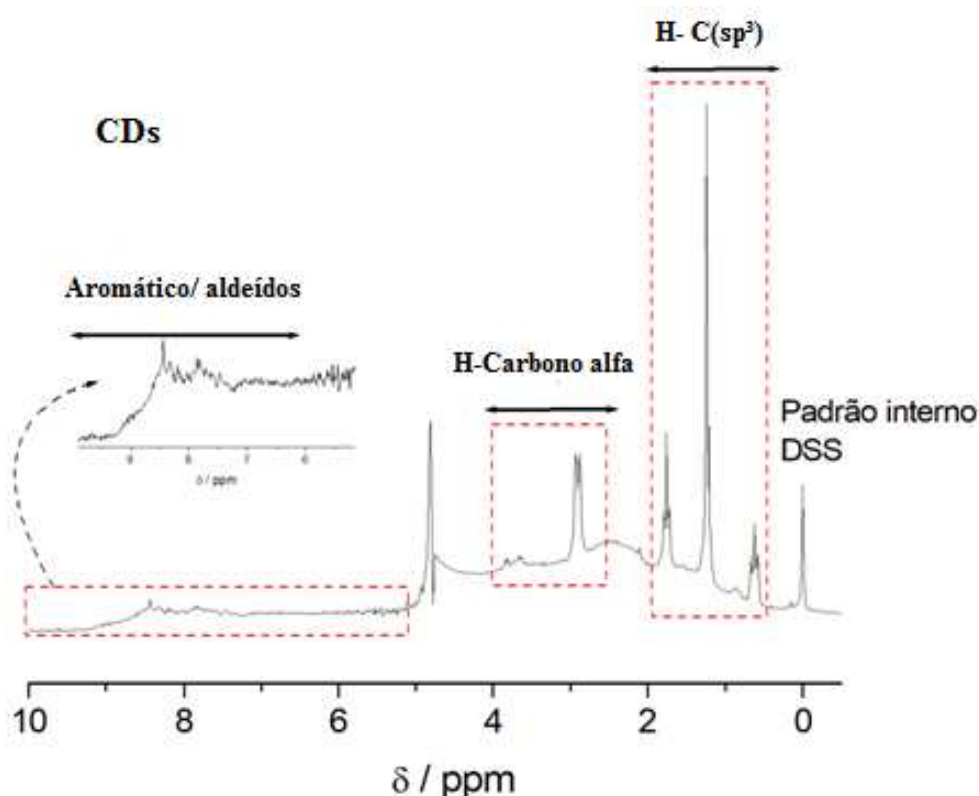
Tabela 4- Propriedades ácido-base, o logaritmo da constante de acidez (pK_a) com a respectiva quantidade de grupos dos grupos funcionais ácidos, dos *carbon dots* derivados celulose.

pK_a	Concentração dos grupos funcionais (mmol/g)
4.2	1,78
5.7	0,95
7.2	0,40
9.0	0,14
Total	4.55

O espectro de RMN de 1H mostrado na Figura 20 revela a presença de sinais característicos de diversos grupos funcionais. A região entre 0,5 e 3 ppm está associada a prótons ligados a carbonos sp^3 , a região entre 3 e 4 ppm, a prótons ligados a carbonos α ou a grupos hidroxila, éter e/ou carbonílico (HC-CO), e entre 6 e 10 ppm, aos prótons aromáticos ou ligados a carbonos sp^2 e prótons aldeídicos (DEA e KARAK, 2013). No geral os

resultados obtidos entre as diferentes técnicas de caracterização são complementares e mostram que os CDs obtidos apresenta uma estrutura complexa composta por diferentes grupos funcionais, principalmente oxigenados.

Figura 20- RMN ^1H obtidos para os carbon dots preparados a partir de celulose de algodão utilizando o padrão DSS (10 mM) e amostras suspensas em uma mistura de $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10, v/v).

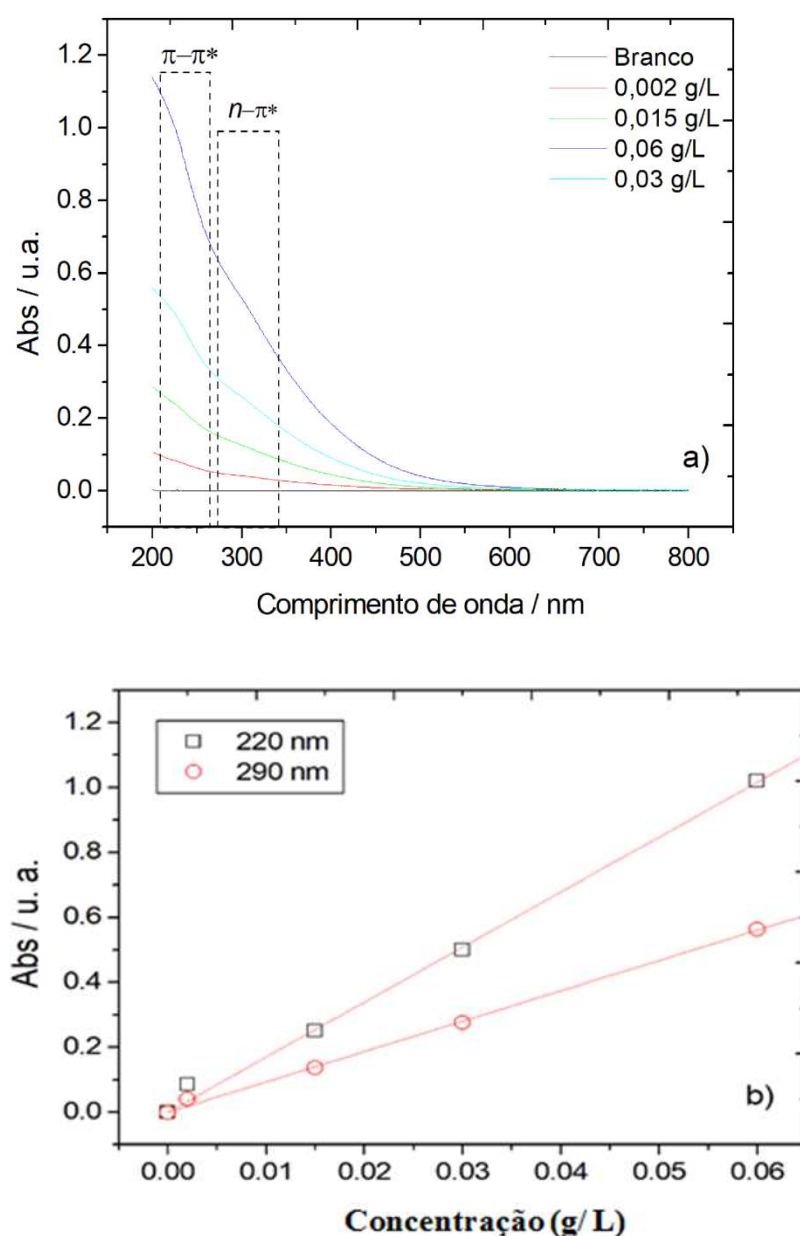


As propriedades ópticas dos CDs foram caracterizadas por espectroscopia de fotoluminescência e absorção na região do UV-vis. Em geral, devido à heterogeneidade da química superficial e à diversidade no tamanho das partículas, as propriedades ópticas dos *carbon dots* são complexas (DAS, BANDYOPADHYAY e PRAMANIK, 2018). Porém, vários trabalhos relatados anteriormente, como o de (SOUZA, MESQUITA, *et al.*, 2016) mostram que os CDs absorvem em uma ampla faixa de comprimento de onda que se estende desde a região visível até a região ultravioleta do espectro eletromagnético.

Na Figura 21(a) pode-se observar no espectro UV-vis dos CDs uma inflexão em torno de 300 nm, que foi atribuído às transições $n \rightarrow \pi^*$ do cromóforo (parte da molécula responsável pela absorção da luz) carbonilas ($\text{C}=\text{O}$) de diferentes grupos funcionais distribuídos pela estrutura dos CDs, além de uma forte absorção em torno de 250 nm devido à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ característica de $\text{C}=\text{C}$ de aromáticos. A absorvidade ou coeficiente de extinção é característica de uma substância em um dado meio para um comprimento de onda

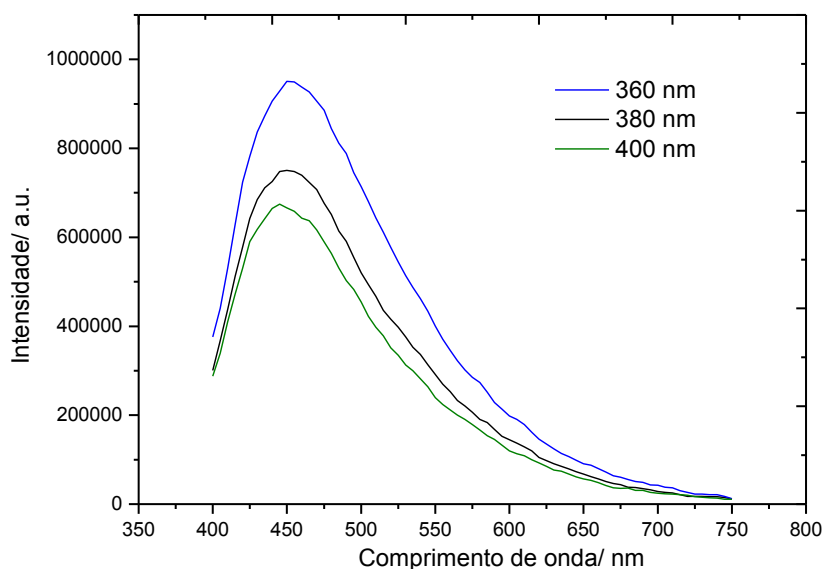
(λ) específico, ou seja, é a indicação da quantidade de luz absorvida em um dado comprimento de onda. Neste trabalho a absortividade (ϵ) apresentou um valor de $9,3 \pm 0,2$ e $16,9 \pm 0,4 \text{ L g}^{-1} \text{cm}^{-1}$ em $\lambda = 290$ e 220 nm , respectivamente. Estes valores foram obtidos a partir do coeficiente angular das retas representadas na Figura 21(b). Apesar de pouco explorada, a boa capacidade de absorção de radiação UV aliada a sua relativa baixa toxicidade, torna os CDs potenciais em aplicações que necessitam de barreiras para este tipo de radiação (FENG, ZHAO, *et al.*, 2017).

Figura 21-a) Espectros UV-vis dos CDs com diferentes concentrações (b) Absorbâncias nos comprimentos de onda de 220 e 290 nm.



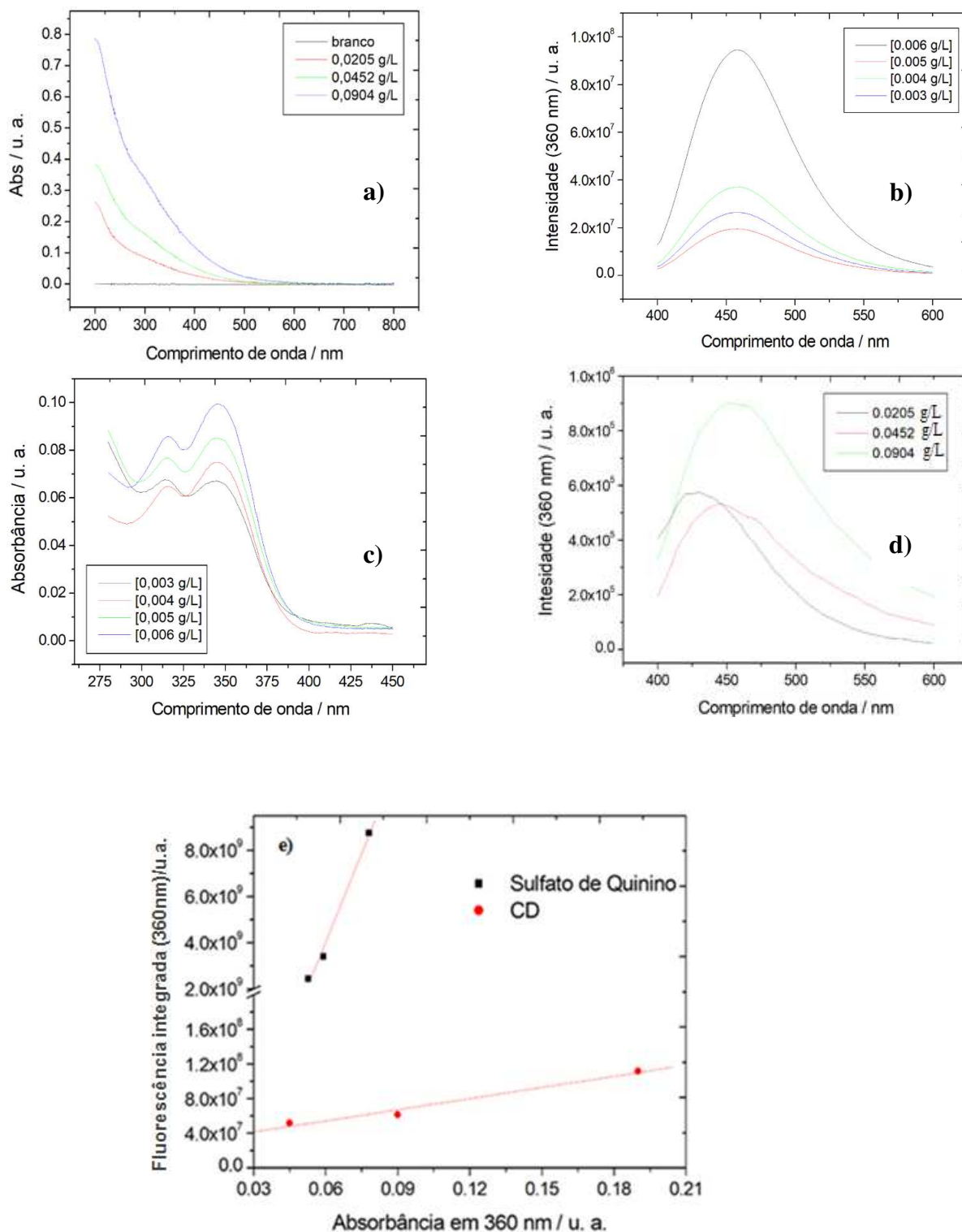
A fluorescência dos *carbon dots* é a propriedade que tem atraído o interesse dos pesquisadores ao redor do mundo. Segundo a literatura (BAKER e BAKER, 2010) a fluorescência mais intensa e mais útil é encontrada em compostos contendo grupos aromáticos funcionais com transições ($\pi \rightarrow \pi^*$), mas, para os *carbon dots*, acredita-se que a emissão de fótons ocorre principalmente devido à heterogeneidade dos grupos funcionais na superfície dos CDs. A presença destes grupos introduz estados de aprisionamento, ou seja, “armadilhas”. Enfim, a heterogeneidade de tamanho e diversidade de grupos funcionais justificam o deslocamento do pico de emissão (Figura 22).

Figura 22- Efeito da excitação no comprimento de onda na usando soluções de CDs na concentração de 3,95 g/ L.



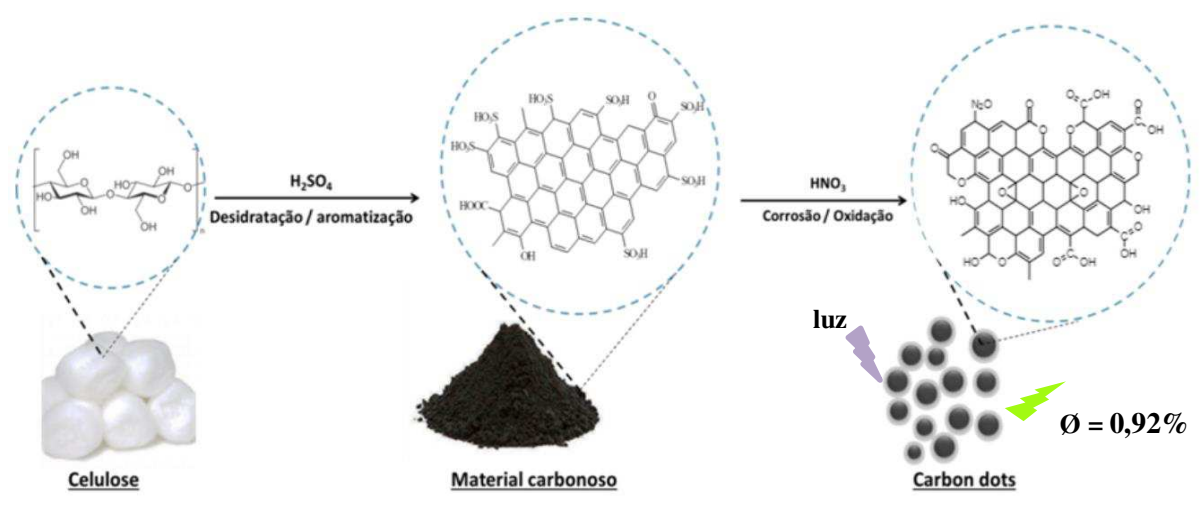
Neste trabalho o rendimento quântico (ϕ), ou seja, a eficiência de fluorescência foi calculada a partir dos dados obtidos de absorvância e fluorescência integrada das amostras de CDs após excitação em 360 nm como descrito na seção 4.3.2. O padrão utilizado para o cálculo foi o sulfato de quinino em solução de ácido sulfúrico que apresenta um rendimento quântico igual a 54% segundo (RURACK, 2011). Na Figura 23 em (a) e (b) podem ser visualizados os espectros obtidos para o padrão de sulfato de quinino, enquanto os resultados mostrados em (c) e (d) foram obtidos para a solução de CDs. A partir da regressão linear das curvas mostradas na Figura 23 (e) usando a equação 3 o rendimento quântico obtido foi de 0,92 %.

Figura 23- Espectros de absorção no UV-vis (a) obtidos para o sulfato de quinino em diferentes concentrações e (b) para os CDs. Espectros UV-vis (c) de fluorescência, com excitação em 360 nm em diferentes concentrações para o sulfato de quinino e (d) obtido para os CDs em diferentes concentrações (e) Curvas de fluorescência integrada versus absorbância em 360 nm usado na estimativa do rendimento quântico.



Na Figura 24 é mostrada uma representação da síntese e dos CDs de celulose de algodão. Após síntese, e a partir dos resultados das caracterizações realizadas, os CDs obtidos apresentaram tamanhos inferiores a 10 nm, uma alta concentração de grupos funcionais ácidos (total de grupos funcionais ácidos – 4,55 mmol/g), especialmente carboxílicos, e baixo rendimento quântico de fluorescência.

Figura 24- Esquema simplificado da reação de síntese dos CDs.



4.2 Modificações químicas e funcionalização dos *carbon dots*.

Após as caracterizações quantitativas e qualitativas dos grupos funcionais oxigenados, foi possível realizar a funcionalização destes *carbon dots* por meio de ligações covalentes, ou seja, ligações amídicas. A associação dessas nanopartículas de carbono com o peptídeo antibacteriano apresenta inúmeras vantagens, uma vez que possibilita o desenvolvimento de (bio)nanoestruturas com propriedades multifuncionais (COSTA, CARVALHO, *et al.*, 2011).

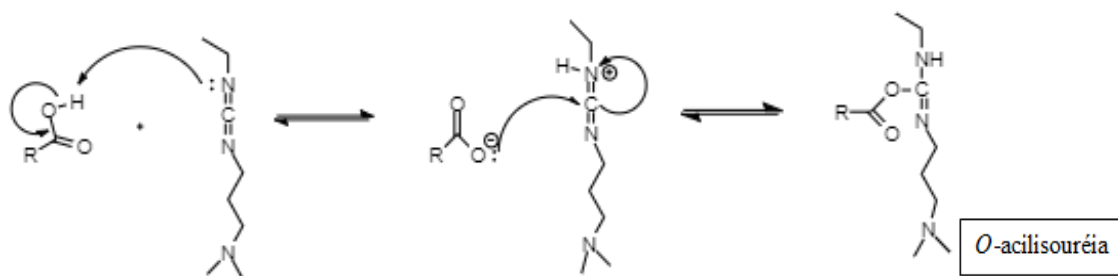
A modificação química da superfície dos CDs foi realizada por meio de uma ligação covalente com o peptídeo ecPis-4s baseado no método descrito por Torres e colaboradores (funcionalização de nanopartículas de alumina) (TORRES, BRAGA, *et al.*, 2018). Nessa modificação, foi usado um método alternativo ao método de imobilização química de peptídeos por meio da formação de ligações amídicas com os grupos funcionais, principalmente carboxílicos, presentes na superfície das nanopartículas de CDs

Primeiramente, os grupos funcionais oxigenados foram ativados via reação com EDAC. O EDAC é uma carbodiimida solúvel em água, usado comumente como um agente

de ativação de carboxila para o acoplamento de aminas primárias. Ele tem sido usado na síntese de peptídeos, reticulação de proteínas com ácidos nucleicos e preparação de bioconjugados, além disso, é frequentemente usado em combinação com *N*-hidroxisuccinimida para a imobilização de biomoléculas (SHEEHAN, CRUICKSHANK e BOSHART, 1961) (NAKAJIMA e IKADA, 1995).

Na reação com os *carbon dots*, foi sugerido que, primeiramente, os hidrogênios de grupos carboxílicos fossem abstraídos pelos pares de elétrons não ligantes do nitrogênio mais reativo na molécula do EDAC, formando carboxilatos, que posteriormente atacam o carbono da carbodiimida originando a *O*-acilisouréia, um intermediário bastante reativo. (Figura 25).

Figura 25- Representação de formação do intermediário *O*-acilisouréia, sendo R= cadeia carbônica pertencente ao CDs.



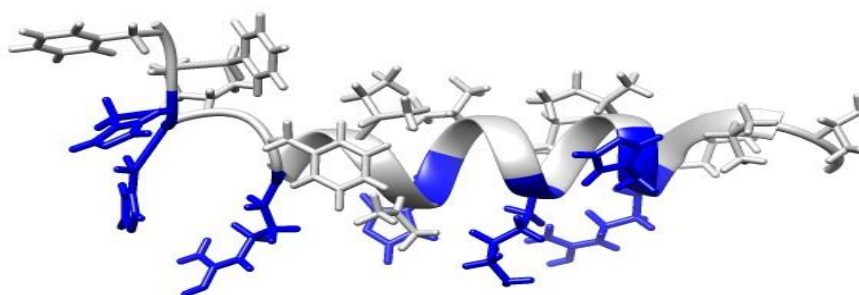
Em seguida, foi adicionado ao meio reacional o reagente acetato etil-2-ciano-2-(hidroxiimino), denominado neste trabalho como oxima. Esse reagente é um sólido branco solúvel em muitos solventes comuns na síntese de peptídeos, como o diclorometano ou a *N,N*'dimetilformamida. Ele é utilizado como aditivo para as reações com carbodiimidas, pois ele atua como um reagente neutralizante para a basicidade ou nucleofilicidade dos compostos contendo carbodiimidas devido à sua acidez (pK_a 4,60), já que é capaz de inibir as reações laterais indesejadas catalisadas por bases, em particular as polimerizações (SUBIRÓS-FUNOSAS, PROHENS e BARBA, 2009). Em comparação com os reagentes amplamente utilizados em síntese de peptídeos como os derivados de benzotriazol como 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) e 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt), a oxima apresenta como vantagem o fato de não ser explosiva, por apresentar uma decomposição térmica lenta ao ser aquecida, além de apresentar facilidade no manuseio e uma eficiência superior no acoplamento (EL-FAHAM, AL MARHOON, *et al.*, 2013).

Na reação, acredita-se que o carbono carbonílico do intermediário *O*-acilisouréia sofre um ataque nucleofílico realizado pelos pares de elétrons disponíveis do oxigênio da

4.3 Caracterizações dos CDs funcionalizados

Com intuito de verificar o sucesso da funcionalização dos *carbon dots*, foi realizada primeiramente as caracterizações qualitativas. Os CDs funcionalizados foram denominados neste trabalho como CD@ecPis-4s. A primeira evidência do sucesso da funcionalização foi obtida a partir de medidas de potencial zeta. Como já discutido anteriormente, a presença de grupos funcionais ácidos, tais como -COOH faz com que o potencial zeta das nanopartículas de carbono seja de -50 mV. Após a reação com o peptídeo, o qual apresenta um potencial zeta de $+16,9$ mV, o potencial zeta dos CD@ecPis-4s passa para $-23,4$ mV. A origem positiva do potencial zeta do peptídeo está relacionada ao caráter catiônico nos resíduos de aminoácidos como arginina (R), lisina (K) e histidina (H) destacados em azul na Figura 28, que apresentam grupos funcionais guanidina (R), amino (K) e anel imidazólico (H), que encontram predominantemente protonados em pH menor que 6,0.

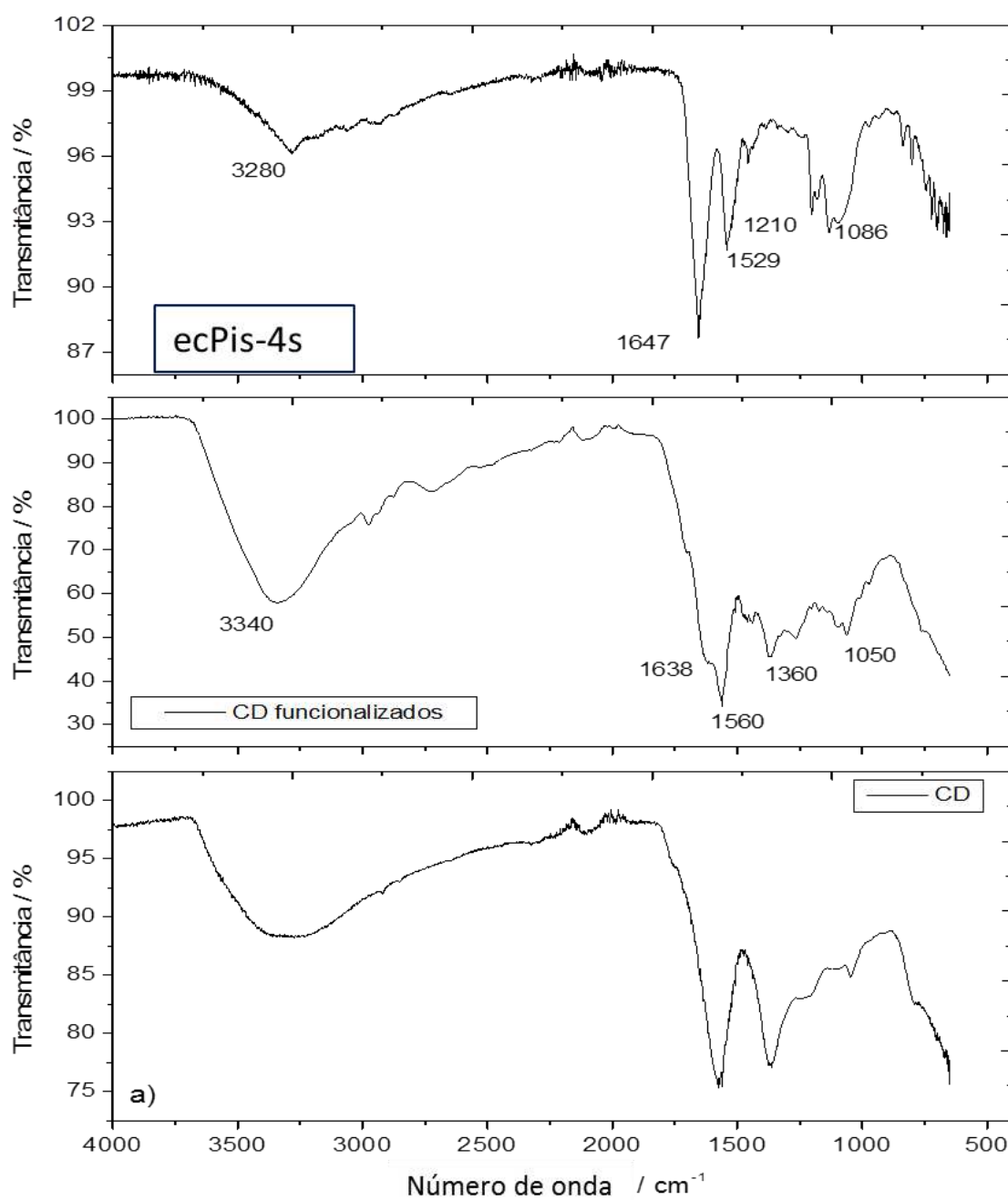
Figura 28- Resíduos de aminoácidos positivos presentes no ecPis-4s.



A Figura 29 (a) mostra os espectros na região do infravermelho obtidos para os CDs, CD@ecPis-4s e o peptídeo ecPis-4s. No espectro do peptídeo podem ser verificadas típicas bandas de amida I (vibração de deformação axial de carbonila C=O) e amida II (vibração de deformação angular simétrica de N-H) em 1647 e 1529 cm^{-1} , respectivamente. Entre 1200 e 1080 cm^{-1} , além da deformação axial de grupos C-O , as absorções decorrentes de C-N características de amins alifáticas como no resíduo de glicina (G). Já no espectro da mistura covalente, pode ser verificada a presença de bandas tanto do ecPis-4s quanto do CD. Pode ser destacado, por exemplo, as absorções em 1360 e 1050 cm^{-1} . A primeira, presente somente no espectro do CD e a segunda muito mais intensa no espectro do peptídeo. A presença do grupo funcional amida, grupo funcional responsável pela ligação da biomolécula na superfície dos CDs, é claramente observada no espectro por meio das absorções em 1638 e 1560 cm^{-1} . Em adição, a evidência da funcionalização pode ser indiretamente relacionada ao estreitamento da absorção em 3340 cm^{-1} , a qual sugere uma diminuição das ligações de

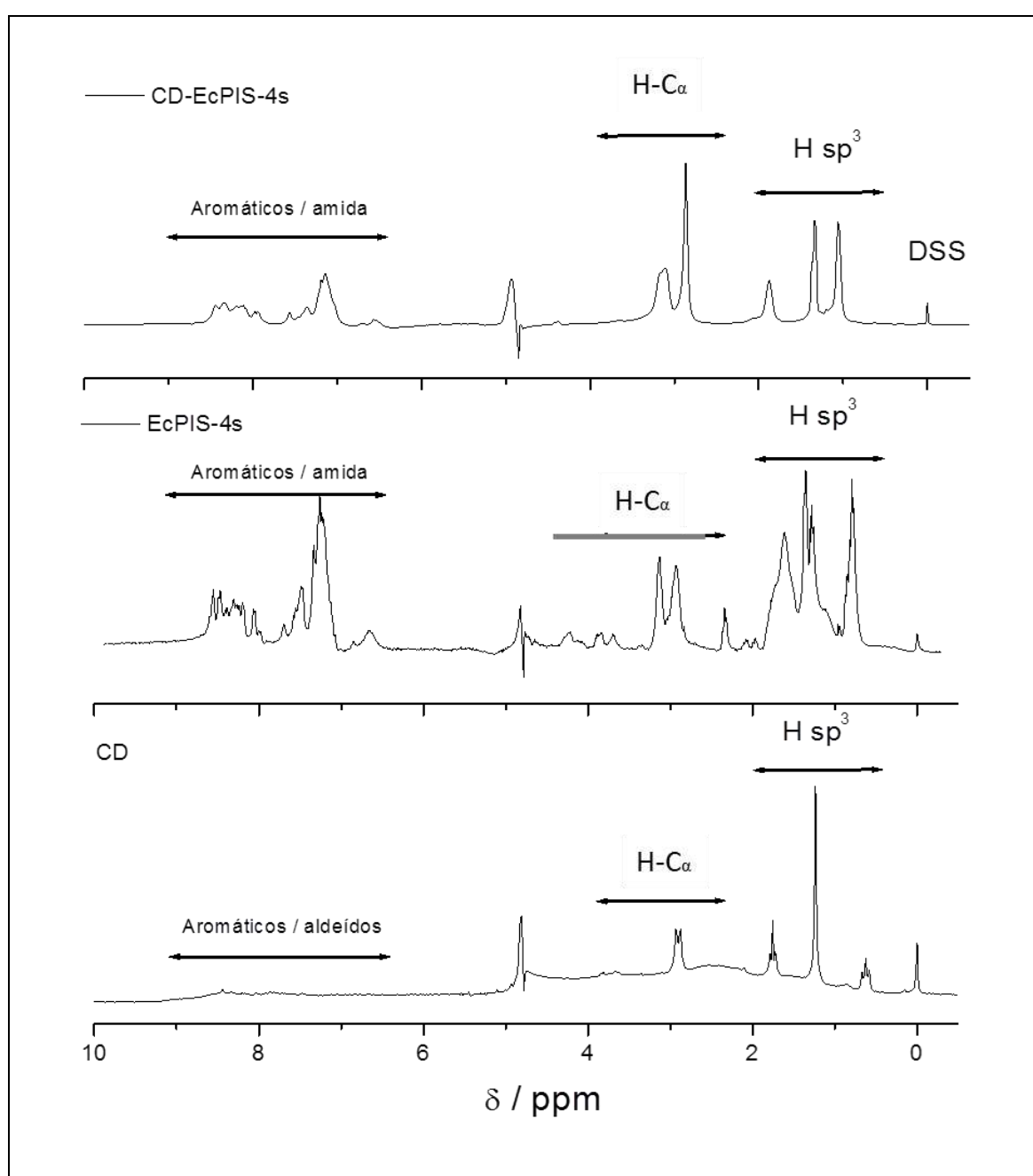
hidrogênio na amostra de CD após a funcionalização, indicando a diminuição de grupos funcionais tais como hidroxila e principalmente carboxila.

Figura 29- Espectro no infravermelho dos CDs, do CDs + Peptídeo (CD funcionalizados), peptídeo ecPis-4s.



A funcionalização dos CDs foi também analisada usando ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H). Os espectros obtidos para as três amostras são mostrados na Figura 30.

Figura 30- Espectros RMN ^1H obtidos para os, *carbon dots* funcionalizados (CDs-(ecPis-4s) , peptídeo ecPis-4s, *carbon dots* (CDs). Sendo hidrogênios de carbonos sp^3 ($\text{H-C}(\text{sp}^3)$) e hidrogênios ligados a carbonos alfa ($\text{H-C}\alpha$).



O espectro da amostra do ecPis-4s mostra os típicos sinais observados em outros trabalhos. Souza (2019) relata a dificuldade da análise dos sinais do peptídeo, devido ao grande número de prótons por resíduos de aminoácido causando a sobreposição de sinais de ressonância ^1H em uma dada faixa de frequência, sendo necessária a utilização de espectros de correlação bi ou tridimensionais. Com relação aos hidrogênios de carbonos sp^3 podemos citar os grupos metila e isoleucina, os hidrogênios ligados a carbonos α presentes, entre outros, em resíduos de lisina, serina e histidina e os H aromáticos estão presentes nas estruturas do triptofano e histidina. Neste trabalho a utilização da técnica de RMN unidimensional foi utilizada para analisar comparativamente os sinais correspondentes das amostras. No geral, os sinais visualizados no peptídeo foram também observados no espectro dos CDs funcionalizados confirmando assim, a presença dessa estrutura molecular na superfície dos nanomateriais.

Para quantificar os grupos funcionais ácidos das amostras de peptídeo e do CDs funcionalizados foram realizadas titulações potenciométrica. O resultados dessas análises após o tratamento dos dados pode ser visualizado nas Tabela 5 e 6. Para o peptídeo, as propriedades ácido-base esperadas são aquelas relacionadas aos grupos terminais da cadeia, ou seja, $-\text{COOH}$ e $-\text{NH}_2$. Alguns grupos funcionais das cadeias laterais também podem apresentar essas propriedades. O peptídeo ecPis-4s apresenta 22 resíduos de aminoácidos e o resíduo de histidina pode ser o responsável pelo pK_a ao redor de 6 e os três resíduos de lisina (K) pelo pK_a ao redor de 9. O grupo terminal carboxílico tipicamente apresenta pK_a próximo a 2 e, portanto, não pode ser caracterizado no experimento. De fato, os grupos funcionais $-\text{NH}_2$ presentes na lisina que confere sua origem catiônica do ecPis-4s. No geral, não se observam diferenças significativas nas propriedades ácidas dos CDs (Tabela 5) e CDs funcionalizados (Tabela 6). De fato, o consumo de parte dos grupos funcionais ácidos superficiais do CD, por exemplo carboxila, é compensada pelo aparecimento do mesmo grupo funcional na terminação da cadeia da biomolécula.

Tabela 5- Propriedades ácido-base obtidas por meio da titulação potenciométrica da amostra de peptídeo ecPIS- 4s.

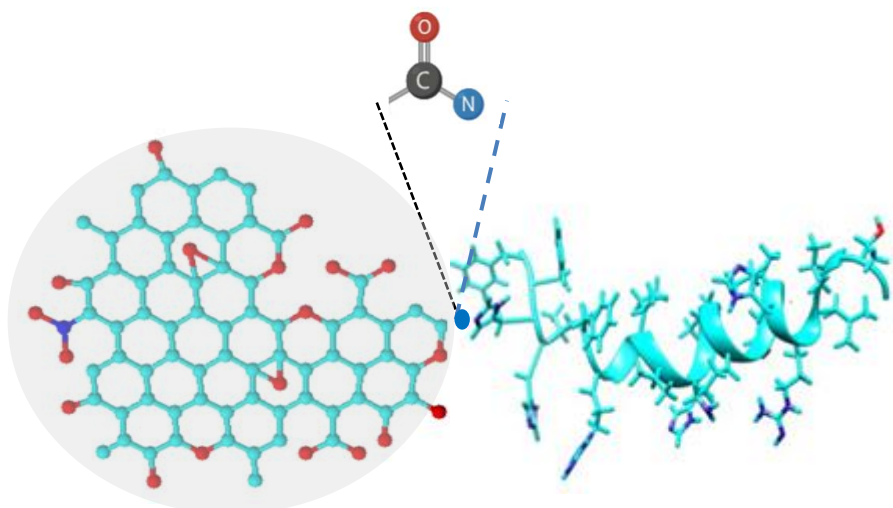
pK_a's	Volume de equivalência (10⁻³) / mL	Sítios /mmol/g
***	1,16	***
5,62	1,29	0,679
6,81	1,39	0,501
9,55	1,82	2,230
Total		3,41

Tabela6- Propriedades ácido-base do amostra de CD funcionalizada com ecPis-4s.

pK_a's	Volume de equivalência (10⁻³) /mL	Sítios /mmol/g
***	0,42	***
3,42	1,34	2,86
5,12	1,60	0,812
6,86	1,73	0,405
8,17	1,74	0,0176
8,94	2,08	1,063
Total		5,16

Na Figura 31 é mostrada uma representação da estrutura tridimensional dos CDs após a funcionalização com o peptídeo ecPis-4s e formação da ligação amídica.

Figura 31-Representação estrutural dos CDs funcionalizados.

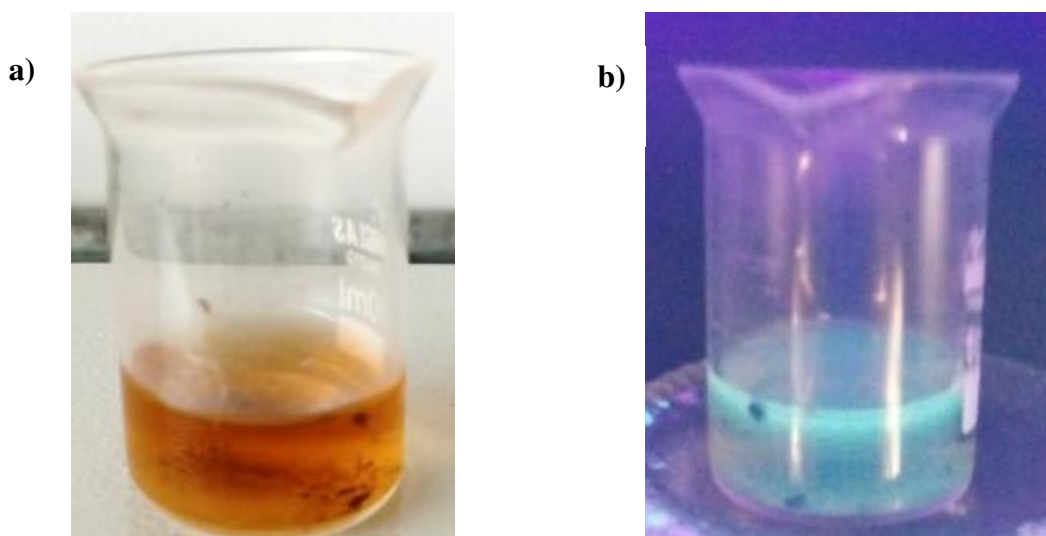


4.4 Efeitos da funcionalização nas propriedades ópticas dos CDs.

A funcionalização de carbon dots é uma das principais estratégias para alterar as propriedades ópticas e eletrônicas dos nanomateriais de carbono, portanto, a modificação dos CDs com o peptídeo pode alterar tanto os espectros de absorção na região do UV-vis quanto os espectros de fluorescência. Uma vez que a funcionalização é utilizada para ajustar e aumentar a energia das emissões devido à introdução de grupos funcionais que induz estados de aprisionamento, ou seja, armadilhas emissivas deslocando a banda de emissão para um maior comprimento de onda (KARFA, DE e MADHURI, 2018).

Assim, como em *carbon dots* puros, a suspensão dos CDs funcionalizados apresentou as mesmas características, ou seja, coloração amarelo-amarronzada sob a luz ambiente e emissão brilhante na região verde do espectro eletromagnético sob luz UV (Figura 32).

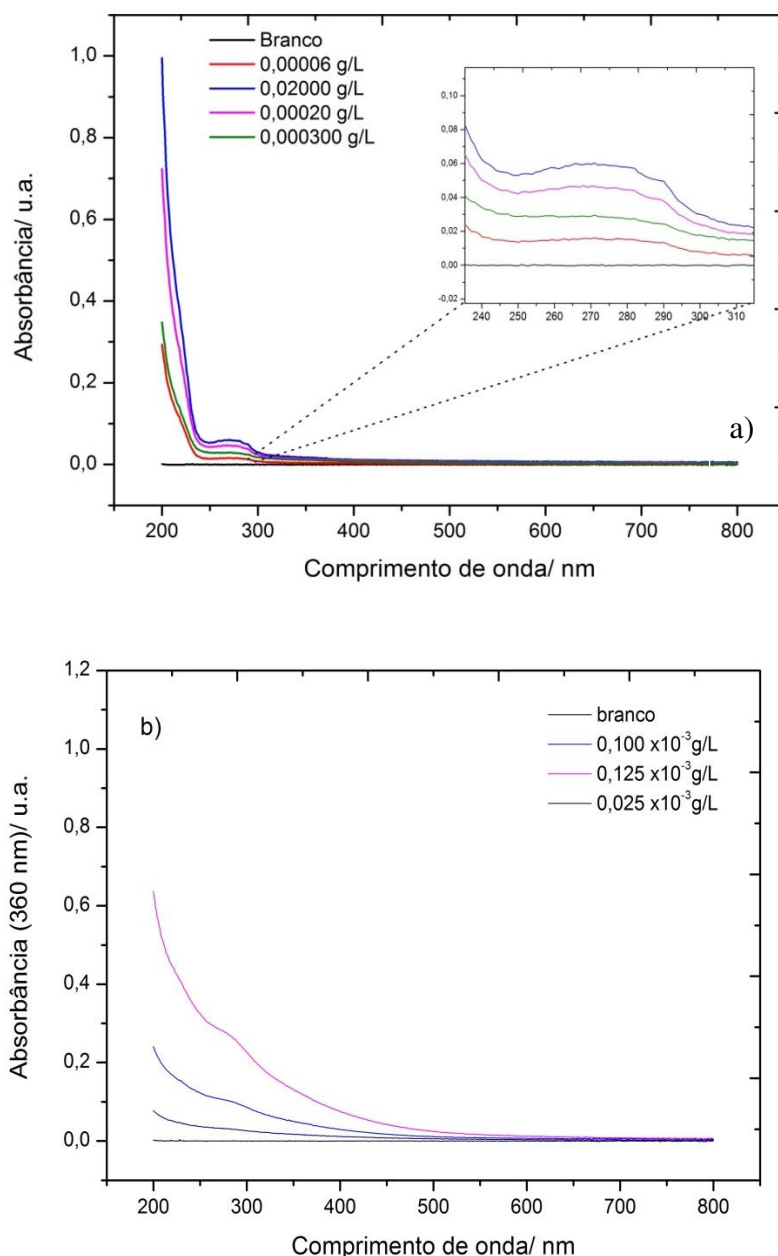
Figura 32- Imagens de fotografia digital da solução de CDs funcionalizados, a) sob luz natural e em b) sob a luz UV.



Na Figura 33 (a) pode ser observado o espectro do peptídeo ecPis-4s e a presença de uma banda em torno de 290 nm. Os cromóforos responsáveis por essa absorbância seriam principalmente, os C=O e NH-R da ligação peptídica apesar de haver contribuições de grupos aromáticos como os presentes nos resíduos de fenilalanina e triptofano. O valor da absortividade molar em 290 nm obtido é de $1,14 \pm 0,68 \text{ L.g}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Já na figura 33 (b) pode-se verificar que o espectro dos CDs funcionalizados é semelhante ao dos *carbon dots* não funcionalizados (Figura 23 (c)), pois a absorção dos grupos funcionais do peptídeo é baixa quando comparada à dos CDs. Porém pode ser observado um aumento na

região de 290 nm típica da estrutura do peptídeo. Neste comprimento de onda o valor da absortividade dos CDs é de $9,3 \pm 0,2 \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Nos CDs funcionalizados o valor aumenta para $10,9 \pm 2,3 \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (ANEXO II) devido à presença do ecPis-4s ancorado na superfície dos nanomateriais.

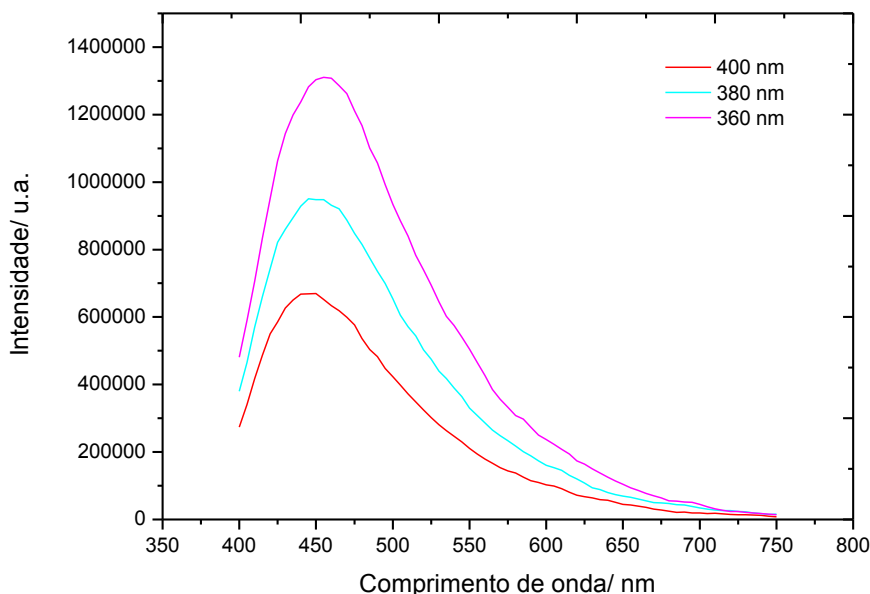
Figura 33- Espectro de absorção na região do UV-vis a) Peptídeo e b) CDs funcionalizados.



Após a funcionalização com o peptídeo os CDs apresentaram uma maior heterogeneidade de grupos funcionais na superfície e esse efeito pode ser visualizado na Figura 34, em que o espectro de fluorescência realizado no comprimento de onda de excitação

de 360 nm para concentração igual a $1,39 \times 10^{-5}$ g/L apresentou deslocamento do pico de emissão.

Figura 34- Efeito da excitação em 360-400 nm no comprimento de onda na solução de CDs funcionalizados com concentração de $1,39 \times 10^{-5}$ g/L.

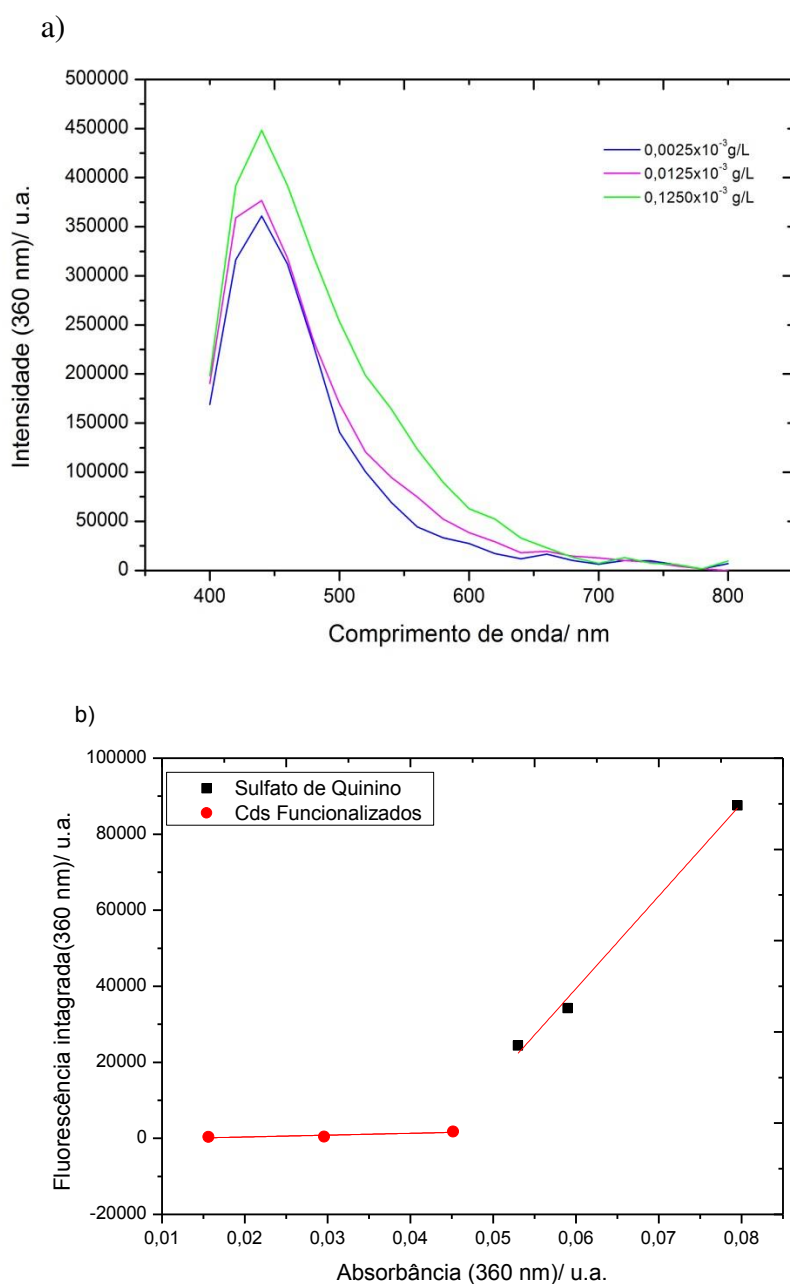


O rendimento quântico obtido para os CDs funcionalizados foi de 1,06%. O que revela um aumento no valor quando comparado ao CDs puro ($\phi = 0,92\%$). Acredita-se que esse aumento está relacionado à conjugação dos CDs com o peptídeo, uma vez que há uma introdução de novos grupos cromóforos como os grupos funcionais amidas na superfície dos *carbon dots*. No entanto, ainda é muito difícil explicar como essa funcionalização muda a estrutura e o mecanismo de fotoluminescência dos CDs, uma vez que muitos pesquisadores divergem sobre a estrutura intrínseca responsável pela fluorescência dessas nanopartículas. Geralmente, os CDs são compostos de um núcleo de carbono com hibridização em sp^2 e domínios de superfície contendo grupos funcionais, sendo esses domínios os principais responsáveis pela fluorescência dos CDs. Entre as opiniões atuais está o efeito de confinamento quântico das estruturas conjugadas podem ser usados para explicar as várias características de fluorescência, que são determinadas pelo núcleo de carbono. Enquanto as características de fluorescência seriam determinadas pela hibridização da cadeia carbônica e dos grupos químicos conectados simultaneamente (CHEN, LIU, *et al.*, 2019).

Logo, apesar de discreto o aumento no rendimento quântico mostra que a eficiência da fluorescência dos CDs não foi prejudicada com a funcionalização. A Figura 35

(a) mostra os espectros de fluorescência dos CDs funcionalizados com excitação em 360 nm, e (b) gráfico obtido para o cálculo de rendimento quântico a partir do padrão sulfato de quinino (Figura 23 (a) e (b)) e absorvância em 360 nm (Figura 33(b)) versus integração da área do espectro de fluorescência do espectro de CDs funcionalizados.

Figura 35- (a) Espectro de fluorescência de CDs funcionalizados com excitação em 360 nm. (b) gráfico de absorvância (360 nm) x fluorescência integrada da solução de CDs funcionalizados e usado no cálculo do rendimento quântico.



4.5 Dicroísmo Circular

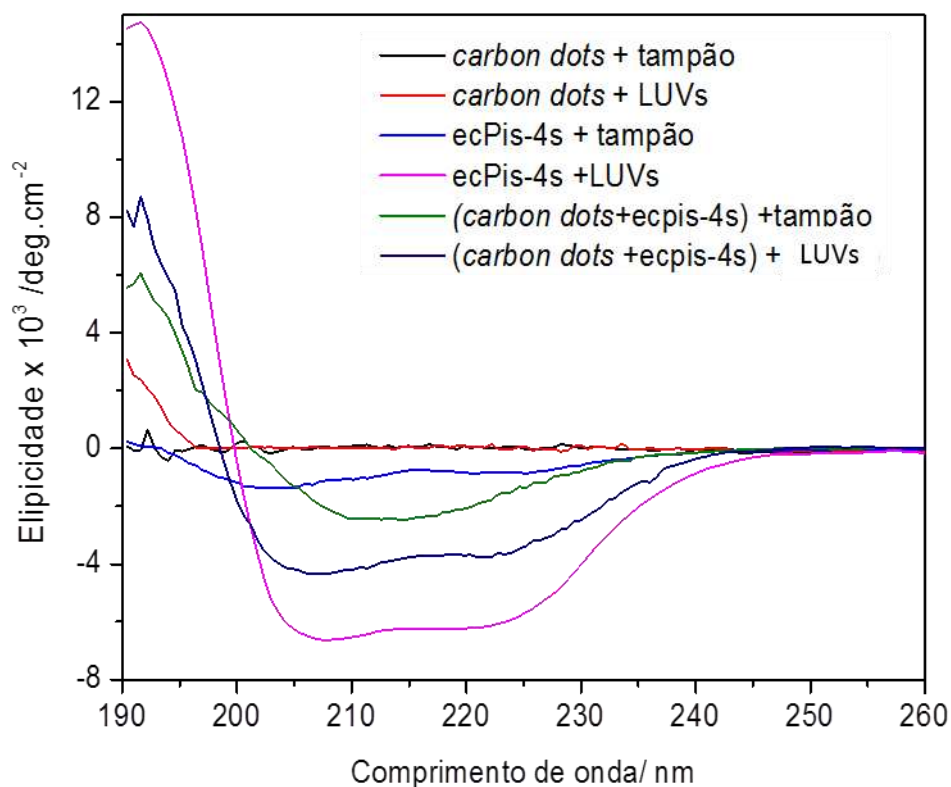
A técnica de dicroísmo circular baseia-se na absorção preferencial de um dos componentes da luz circularmente polarizada por cromóforos de uma determinada amostra opticamente ativas. Em geral, é uma técnica valiosa para se estudar a formação de estrutura secundária de macromoléculas, já que as macromoléculas são compostas por muitos centros quirais que são opticamente ativos e interagem com a luz incidente alterando sua polarização. Essa técnica apresenta duas componentes de igual magnitude uma em sentido anti-horário e outra no sentido horário, sendo que a diferença de absorbância dessas componentes circulares, denominada elipticidade (θ), pode assumir valores positivos ou negativos dependendo de qual componente da luz é preferencialmente absorvida (KELLY, JESS e PRICE, 2005). Embora possam haver contribuições de grupos aromáticos, os cromóforos de maior importância nos estudos por dicroísmo de peptídeos é a carbonila (C=O) e amida (-CONH) da ligação peptídica. A intensidade das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ (190 nm) e $n \rightarrow \pi^*$ (220 nm) dependem dos ângulos de rotação ϕ (ângulo formado entre o carbono α e o nitrogênio da amida) e ψ (ângulo formado entre carbono α e carbono carbonílico), que estão relacionados à conformação exibida pela biomolécula (VERLY, 2010). Neste sentido, a espectroscopia de dicroísmo é sensível aos ângulos ϕ e ψ das ligações peptídicas e, conseqüentemente, e ao arranjo conformacional.

Com o intuito de mimetizar membranas bacterianas, foram utilizados os fosfolipídeos 1-palmitoil-2-oleilfosfatidilcolina (POPC) e 1-palmitoil-2-oleilfosfatidilglicerol (POPG) para a preparação das vesículas lipídicas de características aniônicas, ou seja, vesículas unilamelares grandes (LUV) (EPAND, SAVAGE e EPAND, 2007) (EPAND e EPAND, 2010). Os ensaios realizados por Souza (2019) revelam que o peptídeo ecPis-4s em água apresentou uma tendência a uma estrutura helicoidal, e os dados obtidos nos experimentos realizados em solução tampão Tris-HCl e em meios vesiculares (LUV) revelaram que, em solução tampão Tris-HCl, o peptídeo ecPis-4s apresenta uma tendência a uma conformação secundária não totalmente definida, assim como em meio aquoso, podendo estar em um equilíbrio conformacional desenovelado-hélice. Quando na presença de vesículas fosfolipídicas, tanto zwitteriônicas quanto aniônicas, o peptídeo adquire uma conformação característica de uma estrutura alfa-helicoidal (SOUZA, 2019).

Os estudos conformacionais por dicroísmo circular dos *carbon dots*, e *carbon dots* funcionalizados com o peptídeo ecPis-4s mostraram o comportamento conformacional dessas partículas em LUV e tampão Tris-HCl a 10 mM (pH 8,5). O que permitiu analisar a estrutura

secundária adquirida por cadeias peptídicas em ambientes variados (Figura 36). Verificou-se que tanto *carbon dots* o quanto *carbon dots* com ecPis-4s não apresentam uma conformação definida em meio aquoso contendo a solução tampão. Contudo, na presença de vesículas de POPC:POPG (3:1) (LUVs) tanto o peptídeo (ecPis-4s) quanto *carbon dots* funcionalizados com o peptídeo (CDs - ecpis-4s) apresentaram uma tendência a conformação helicoidal, que pode ser atribuída à presença de duas bandas negativas intensas em $\lambda_{\text{máx}} = 208 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{máx}} = 225 \text{ nm}$, e um pico positivo em torno de $\lambda_{\text{máx}} = 195 \text{ nm}$.

Figura 36 -Estudos conformacionais por Dicroísmo circular para o ecPis-4s e os *carbon dots* e *carbon dots* funcionalizados com o peptídeo (*carbon dots* + ecPis-4s).



Devido a isso, pode-se afirmar que os resultados obtidos para os CDs funcionalizados em LUV, apresentaram uma curva característica de conformações em hélice, sugerindo que ocorre uma interação desse nanomaterial funcionalizado com as membranas aniônicas.

4.6 Ensaios de atividade antibacteriana

Com intuito de verificar a atividade antibacteriana dos CDs, do peptídeo e do CDs funcionalizados, foram realizados ensaios dessa atividade contra cepas das bactérias Gram-negativas *E. coli* e Gram-positiva *S. aureus*.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) são bactérias gram-positivas da família *Micrococcaceae*. Existem pelo menos 200 estirpes diferentes de *S. aureus*, e dentro do gênero *Staphylococcus* é a espécie de maior interesse médico, visto que é responsável por uma variedade de infecções. Em razão disso, é considerado um importante patógeno humano e um problema de saúde pública (CASSETTARI, STRABELLI e MEDEIROS, 2005). A *Escherichia coli* (*E. coli*) é uma bactéria Gram-negativa da família *Enterobacteriaceae*. Dentre as bactérias Gram-negativas, a espécie é a causadora mais comum de infecções, sendo responsáveis por elevados índices de morbidade e altos custos financeiros em tratamentos para pacientes tanto no sistema público como privados de saúde (VOGT e DIPPOLD, 2005).

Para avaliar a atividade antimicrobiana do peptídeo, dos CDs e dos CDs funcionalizados contra as bactérias *S. aureus*, e *E. coli*, foram realizados bioensaios *in vitro* pelo método de microdiluição em placa. O peptídeo apresentou atividade antibacteriana para cepas de *E.coli* para concentrações superiores a 0,08 g/L e CDs funcionalizados apresentaram inibição na concentração 0,169 g/L. Já os *carbon dots* também apresentaram atividade em 0,169 g/L. Devido ao fato dos CDs terem sido analisados em uma concentração maior pode-se verificar atividade na concentração de 0,339 g/L.

Em cepas *S. aureus* a amostra de peptídeo inibiu o crescimento a partir da concentração de 0,01056 g/L, Já a amostra de CDs funcionalizados inibiu o crescimento a partir das concentrações 0,00528 g/L. Porém, para os CDs em concentrações iguais a 0,339 g/L não houve inibição do crescimento. Portanto, acredita-se que ação antibactericida dos CDs foi aumentada após a funcionalização com o peptídeo ecPis-4s.

Além disso, os CDs funcionalizados apresentaram um perfil de inibição do crescimento bacteriano muito semelhante ao do peptídeo, logo as alterações realizadas na porção *N*-terminal da cadeia peptídica por meio da ligação amídicas com os CDs não afetaram a atividade bacteriana dessas moléculas, devido ao fato dos CDs funcionalizados mostrarem atividade tanto para cepas de *E. coli* e *S. Aureus*. Por conseguinte, pode-se afirmar que os CDs funcionalizados podem interagir tanto com uma bactéria Gram-positiva quanto Gram-negativa. A Tabela 7 mostra os valores da mínima concentração inibitória (MIC) das amostras

de peptídeo, CDs funcionalizados com peptídeo e CDs para as cepas de *E.coli* e *S.aureus*, respectivamente.

Tabela 7- Valores de MIC das amostras

Microrganismo	MIC (g/L)		
	Peptídeo ecPis-4s	CDs Funcionalizados	CDs
<i>E.coli</i>	0,0845	0,169	0,169
<i>S. aureus</i>	0,0105	0,005	N.D

*ND-Não determinado

Todavia, o mecanismo de interação dos CDs funcionalizados com a membrana fosfolipídica das bactérias deve ser melhor elucidado, mas pode-se concluir que os CDs funcionalizados com peptídeo ecPis-4s apresentaram maior atividade antibacteriana que os CDs puros.

4.7 Atividade antioxidante

Os peptídeos antioxidantes têm despertado grande interesse de pesquisadores devido às suas potenciais aplicações no desenvolvimento de alimentos promotores da saúde e na manutenção da qualidade e segurança dos produtos alimentícios e seu consequente uso pela indústria alimentícia. Apesar do potencial, são diversos os desafios, como alto custo de produção, baixo rendimento e bioatividade (TADESSE e EMIRE, 2020). A capacidade oxidante dessas moléculas está relacionada à hidrofobicidade, peso molecular e composição e sequência de aminoácidos (ZOU, HE, *et al.*, 2016). Em relação à composição, a presença de aminoácidos hidrofóbicos, como prolina, triptofano, fenilalanina e valina apresentaram propriedades antioxidantes (KETNAWA, WICKRAMATHILAKA e LICEAGA, 2018).

A ação de um antioxidante pode ser determinada pelo mecanismo de sequestro de radicais livres em solução. O método de sequestro do radical livre DPPH[•] é utilizado para quantificar a atividade antioxidante total dos extratos estudados. O radical DPPH[•] é um cromóforo estável, com um pico de absorção no comprimento de onda de 517 nm, em meio alcoólico, apresentando solução de coloração violeta intensa. Quando em contato com os componentes presentes nas soluções teste, o DPPH[•] sofre redução e é possível observar uma mudança da coloração da solução original para amarela, proporcional à concentração da substância com potencial antioxidante (OLIVEIRA, 2015).

A avaliação da atividade captadora de radical é obtida pela porcentagem de inibição, conforme a equação 5.

$$\% \text{ de Inibição} = [(\text{Abs. do controle} - \text{Abs. da amostra}) / \text{Abs. do controle}] \times 100 \quad (5)$$

A quantificação da atividade antioxidante das amostras é realizada pelo mecanismo de sequestro dos radicais DPPH• em solução. Todavia, a atividade antioxidante é expressa em porcentagem de redução de DPPH• e resultados devem ser apresentados em concentração efetiva (maior que 50% (EC50)) que é a concentração mínima de antioxidante necessária pra reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH• em um intervalo de tempo (OLIVEIRA, 2015). A Tabela 8 apresenta os valores obtidos na atividade de eliminação do radical DPPH• para as amostras de peptídeo, CDs e CDs funcionalizados.

Tabela 8- Resultado da Inibição de DPPH dado em porcentagem

Concentração das amostras (g/L)	Redução de DPPH (%)		
	Peptídeo	CDs	CDs funcionalizados
0,169	9,2	10,6	9,9
0,085	12,2	11,9	13,1
0,042	9,5	10,0	6,4
0,021	13,9	9,9	6,6
0,011	8,7	8,8	8,2
0,005	12,0	8,7	8,3

Os resultados obtidos para o ensaio da atividade antioxidante das amostras de peptídeo, CDs e CDs funcionalizados não apresentaram valores consideráveis para o cálculo de (EC50), em outras palavras, os valores obtidos foram menor que 50% para o intervalo de tempo igual a 30 minutos e nas concentrações usadas. Apesar do resultado negativo para a atividade antioxidante em radicais DPPH•, acredita-se que o aumento das concentrações dos *carbon dots* pode resultar em uma atividade antioxidante considerável. Alguns autores como Zhang e colaboradores mostraram em seus estudos que uma diminuição significativa na concentração de DPPH• ocorre com o aumento na concentração de pontos de carbono (ZHANG, ZENG e WEI, 2017). Neste trabalho optamos por usar nanopartículas com alta concentração de grupos funcionais oxigenados, especialmente carboxílicos, ou seja, CDs muito oxidados para a reação com grupos ecPis-4s amino-terminais. A princípio, essa opção teve um impacto negativo na atividade antioxidante dos materiais. Em relação ao peptídeo, apesar da presença de resíduos de aminoácidos com potencial para atuar como agentes oxidantes, outras variáveis como conformação e sequência são decisivas para uma ação efetiva (TADESSE e EMIRE, 2020).

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho os *carbon dots* foram preparados a partir de um método fácil, rápido e barato baseados em reações de desidratação e oxidação ácida de celulose de algodão, o qual permite a reprodução em larga escala. Como esperado, os CDs obtidos apresentaram alta concentração de grupos funcionais oxigenados que posteriormente foram ativados por meio da reação com o EDAC e a oxima para a formação da ligação covalente entre o peptídeo antimicrobiano ecPis-4s e o CDs por meio de ligações amídicas. O sucesso da funcionalização foi confirmado por diversas técnicas incluindo, FTIR, RMN ^1H , DRX, potencial zeta, EDS, AFM, UV-vis. Os resultados da espectroscopia eletrônica de absorção e emissão mostraram que a funcionalização não altera as propriedades ópticas, ou seja, absortividade molar e rendimento de fluorescência quântica, dos CDs. Além disso, o peptídeo ligado covalentemente mantém sua capacidade de se estruturar na conformação de alfa hélice, na presença de um ambiente mimético de membrana. Apesar das nanoestruturas funcionalizadas não apresentarem atividade antioxidante, a avaliação da atividade antimicrobiana do CDs funcionalizados em cepas de *E.coli* e *S.aureus*, revelaram o potencial antibacteriano dessa estrutura em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, sendo mais ativa em cepas *S.aureus* (Gram-positiva) que o peptídeo livre. No geral, os resultados apresentados aqui podem contribuir para o desenvolvimento de novos protocolos para funcionalização de CDs com diferentes (bio)moléculas, em especial aquelas com características funcionais similares aos do peptídeo.

Do ponto de vista tecnológico, o material desenvolvido aqui (ou ideia) apresenta potencial para o desenvolvimento futuro de suspensões antissépticas, forma de gel ou líquido spray, para desinfecção das mãos, pele, objetos e superfícies em geral.

Dentre as perspectivas futuras, destaca-se:

- I) A funcionalização, com peptídeos antimicrobianos, de *carbon dots* com rendimento quântico de fluorescência mais elevado;
- II) Avaliação das propriedades antimicrobianas sob radiação UV-vis, e realizar análises de microscopia confocal e imagens de fluorescência *in vivo* e *in vitro*;
- III) Usar os CDs funcionalizados para o desenvolvimento e avaliação das propriedades mecânicas, ópticas, antimicrobianas e antioxidantes de nanocompósitos com diferentes biopolímeros (quitosana, amido, etc) para as mais diversas aplicações, incluindo embalagens ativas para conservação de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOU, P. *et al.* Advances in engineering local drug delivery systems for cancer immunotherapy. **Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 12, n. 5, 2020. ISSN 16366.
- ADLHART *et al.* Surface modifications for antimicrobial effects in the healthcare setting: a critical overview. **The Journal of Hospital Infection**, v. 99, n. 3, p. 239-249, Jul 2018.
- ALVES, D.; PEREIRA, M. O. Mini-review: Antimicrobial peptides and enzymes as promising candidates to functionalize biomaterial surfaces. **The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 30, n. 4, p. 483-499, 2014.
- ALVES, L. A. *et al.* Characterization of acid functional groups of carbon dots by nonlinear regression data fitting of potentiometric titration curves. **Applied Surface Science**, v. 370, p. 486-495, 2016.
- ANVISA. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**. M7-A6. [S.l.], p. Sexta Edição. 2003.
- ARAÚJO, C. *et al.* Hybrid heterostructures based on hematite and highly hydrophilic carbon dots with photocatalytic activity. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 182, p. 204-212, set. 2016.
- ARAÚJO, T. C. *et al.* Hybrid heterostructures based on hematite and highly hydrophilic carbon dots with photocatalytic activity. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 182, p. 204-212, 2016.
- BAE, Y.; MYUNG, ; BARD, A. J. Electrochemistry and Electrogenated. **NANO LETTERS**, v. 4, n. 6, p. 1153-1161, abr. 2004.
- BAKER, S. N.; BAKER, G. A. Luminescent Carbon Nanodots: Emergent Nanolights. **Angewandte Chemie**, v. 49, p. 6726 – 6744, 2010.
- BAKER, S. N.; BAKER, G. A. Luminescent Carbon Nanodots: Emergent Nanolights. **Angewandte Chemie International Edition**, , Weinheim, v. 49, n. 38, p. 6726–6744., 2010.
- BERGER, N. F. *et al.* Solution and solid state conformational preferences of a family of cyclic disulphide bridged tetrapeptides. **Biopolymers**, 2016.
- BISWARO, L. S. E. A. Antimicrobial Peptides and Nanotechnology, Recent Advances and Challenges. **Frontiers in Microbiology**, 2018.
- BOURLINOS, A. B. *et al.* Gd(III)-doped carbon dots as a dual fluorescent-MRI probe. **Journal of Materials Chemistry**, 2012.
- BROGDEN, N. K.; BROGDEN, K. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 3, p. 217-225, 2011.

- CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. Staphylococcus aureus bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality ? **Braz J Infect Dis**, v. 9, , p. 6 - 70, 2005.
- CAYUELA, *et al.* Semiconductor and carbon-based fluorescent nanodots: the need for consistency. **Chem. Commun.**, 2016. 52, 1311--1326.
- CHAN, W. C.; WHITE, P. D. Fmoc solid phase peptide synthesis. **Oxford University Press**, 2000.
- CHAUDHARI, A. *et al.* A novel covalent approach to bio-conjugate silver coated single walled carbon nanotubes with antimicrobial peptide. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, p. 58, 2016.
- CHEKINI, M. *et al.* Chiral Carbon Dots Synthesized on Cellulose Nanocrystals. **Advanced Optical Materials**, n. 1901911, 2019.
- CHEN, B. B. *et al.* Fluorescent carbon dots functionalization. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 270, p. 165-190, 2019.
- COLE, A. *et al.* Characterization of a fish antimicrobial peptide: gene expression, subcellular localization, and spectrum of activity. **Antimicrob Agents Chemothe**, v. 44, p. 2039–2045, 2000.
- COSTA, F. *et al.* Imobilização covalente de peptídeos antimicrobianos (AMPs) em superfícies de biomateriais. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 4, p. 1431-1440, 2011.
- DAS , R. D.; BANDYOPADHYAY, ; PRAMANIK, P. Carbon quantum dots from natural resource: A review. **Materials Today Chemistry**, v. 8, p. 96-109, mar. 2018.
- DEA , B.; KARAK,. A green and facile approach for the synthesis of water soluble fluorescent carbon dots from banana juice. **RSC Advanced**, v. 3, p. 8286-8290, 2013.
- DONG, X. *et al.* Carbon Dots as Potent Antimicrobial Agents. **Theranostics**, v. 10, n. 2, p. 671-686, 2020.
- EL-FAHAM, *et al.* OxymaPure/DIC: An Efficient Reagent for the Synthesis of a Novel Series of 4-[2-(2-Acetylaminophenyl)-2-oxo-acetyl amino] Benzoyl Amino Acid Ester Derivatives. **Molecules** , v. 18, n. 12, p. 14747-14759, 2013.
- EPAND, R. F.; SAVAGE, P. B.; EPAND, R. Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1768, n. 10, p. 2500-2509, 2007.
- EPAND, R. M.; EPAND, R. F. Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents. **Journal of Peptide Science**, v. 15, n. 5, p. 298-305, 2010.

- FENG, X. *et al.* Use of carbon dots to enhance UV-blocking of transparent nanocellulose films. **Carbohydrate Polymers**, v. 161, p. 253-260, 2017.
- GONÇALVES, *et al.* Hg(II) sensing based on functionalized carbon dots obtained by direct laser ablation. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 145, n. 2, p. 702–707, 2010.
- GORGULHO, H. F. *et al.* Characterization of the surface chemistry of carbon materials by potentiometric titrations and temperature-programmed desorption. **CARBON**, v. 46, p. 1544–1555, 2008.
- HANCOCK, R. The role of antimicrobial peptides in animal. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 16, p. 8856-8861, 2000.
- HANCOCK, R. E.; SAHL, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551, 2006.
- HASAN; CRAWFORD; IVANOVA. Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials. **Trends Biotechnol**, n. 5, p. 295-304., 2013.
- HU, S.-L. *et al.* One-step synthesis of fluorescent carbon nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry**, 2009.
- HUANG¹, C. *et al.* Application of paramagnetic graphene quantum dots as a platform for simultaneous dual-modality bioimaging and tumor-targeted drug delivery. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 4, p. 651-664, 2014.
- IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p. 56–58, 1991.
- KARFA, P.; DE, S. M.; MADHURI, R. S. Functionalization of carbon nanostructure. **Comprehensive Nanoscience and Nanotechnology**, p. 123-144, 2018.
- KELLY, M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomic**, v. 1751, n. 2, p. 119-139, 2005.
- KETNAWA, S.; WICKRAMATHILAKA, M.; LICEAGA, A. M. Changes on antioxidant activity of microwave-treated protein hydrolysates after simulated gastrointestinal digestion: Purification and identification. **Food Chemistry**, v. 254, p. 36-46, 2018.
- KROTO, *et al.* C₆₀: Buckminsterfullerene. **Nature**, v. 318, p. 162-163, 1985.
- LI, H. *et al.* Water-Soluble Fluorescent Carbon Quantum Dots and Photocatalyst. **Angew. Chem. Int**, 2010.
- LI, Q. *et al.* Photoluminescent Carbon Dots as Biocompatible Nanoprobes for Targeting Cancer Cells. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, p. 12062–12068, 2010.
- LIN, J.-S. *et al.* A carbon dot based theranostic platform for dual-modal imaging and free radical scavenging. **Nanoscale**, v. 11, p. 20917–20931, 2019.

- LIU, S. *et al.* Amino-functionalized Green Fluorescent Carbon Dots as Surface Energy Transfer Biosensors for Hyaluronidase, **Nanoscale**, v. 15, 6836-6842 2015.
- MANSOUR, S. C.; PENA, O. M.; HANCOCK R.E. Peptide IDR-1018: modulating the immune system and targeting bacterial biofilms to treat antibiotic-resistant bacterial infections. **Trends in immunology**, v. 35, n. 9, p. 443-450, 2014.
- MELA, I.; KAMINSKI, C. F. Os nano-veículos dão nova vida aos antimicrobianos existentes. **Emerg Top Life Sci**, v. 4, n. 6, p. 555–566, dezembro 2020.
- MESQUITA, P. D.; MARTELLI, P. B.; GORGULHO, D. F. Characterization of Copper Adsorption on Oxidized Activated Carbon. **Journal Braz. Chem. Soc.**, v. 17, n. 6, p. 1133-1143, 2006.
- MOON, R. *et al.* Revisão de nanomateriais de celulose: estrutura, propriedades e nanocompósitos.. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 7, p. 3941, 2011.
- MUNIR, M. *et al.* Recent Advances in Nanotechnology-Aided Materials in Combating Microbial Resistance and Functioning as Antibiotics Substitutes. **International Journal of Nanomedicine** , v. 15, p. 7329-7358, Oct 2 2020.
- NAKAJIMA, ; IKADA,. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. **Bioconjugate Chem.**, v. 6, p. 123–130, 1995.
- NAMDARI, ; NEGAHDARIB, ; EATEMADI,. Synthesis, properties and biomedical applications of carbon-based. **Biomedicine & Pharmacotherapy.**, 2017.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger: **Princípios de bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH": estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s , v. 17, p. 36-44, 2015.
- PENG, H.; TRAVAS-SEJDIC, Simple Aqueous Solution Route to Luminescent. **Journal of Materials Chemistry**, 2009.
- PEREIRA, F. V. *et al.* BIONANOCOMPÓSITOS PREPARADOS POR INCORPORAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE EM POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS POR MEIO DE EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE, AUTOMONTAGEM OU ELETROFIAÇÃO. **Química Nova**, v. 37, p. 1209-1219, 2014.
- PINTO, T. D. S. *et al.* Layer-by-layer self-assembly for carbon dots/chitosan-based multilayer: Morphology, thickness and molecular interactions. **Materials Chemistry and Physics**, v. 186, p. 81- 89, 2016.

- PINTO, T. D. S. *et al.* Self-assembled hybrid nanocomposite films of carbon dots and hydrolyzed collagen. **Materials Chemistry and Physics**, n. 230, p. 44–53, 2019.
- PIRSAHEB, M. *et al.* Functionalized fluorescent carbon nanostructures for targeted imaging of cancer cells: a review. **Microchim Acta**, v. 186, p. 231, 2019.
- RAJU, S. *et al.* Piscidin, Fish Antimicrobial Peptide: Structure, Classification, Properties, Mechanism, Gene Regulation and Therapeutical Importance. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 27, p. 91–107, 2020.
- RURACK, K. Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report). **Pure Appl. Chem.**, v. 83, n. 12, p. 2213–2228, 2011.
- SAHU, et al. Simple one-step synthesis of highly luminescent carbon dots from orange juice : application as excellent bio-imaging agents. **Chemical Communications**, p. 8835–8837, 2012.
- SANCHEZ, A. Food Quality and Safety. **Bioactive peptides: A review**, v. 1, n. 1, p. 29-46, 2017.
- SHARMA, S.; SINGH, R.; RANA, S. Bioactive peptides: a review. **Int J Bioautomation**, v. 15, n. 4, p. 223-250, 2011.
- SHEEHAN, J.; CRUICKSHANK, P.; BOSHART, Notes- A Convenient Synthesis of Water-Soluble Carbodiimides. **J. Org. Chem.**, v. 26, n. 7, p. 2525–2528, 1961.
- SHEN, *et al.* Synthesis of Cellulose-Based Carbon Dots for Bioimaging. **Chemistry Select**, 2016. 1314 – 1317.
- SILVA, E. D. J. C. G.; GONÇALVES, H. M. R. Analytical and bioanalytical applications of carbon dots. **Trends in Analytical Chemistry**, Porto, Portugal, v. 30, n. 8, p. 1327–1336, abr. 2011.
- SOFI, S. A. *et al.* A Comprehensive Review on Antimicrobial Packaging and its Use in Food Packaging. **Current Nutrition & Food Science**, v. 14, n. 4 (8), p. 305-312, 2018.
- SOUZA, D. *et al.* Luminescent carbon dots obtained from cellulose. **Materials Chemistry and Physics**, v. 203, p. 148-155, 2018.
- SOUZA, D. R. *et al.* Cellulose nanocrystals: A versatile precursor for the preparation of different carbon structures and luminescent carbon dots. **Industrial Crops and Products**, n. 93, p. 121-128, 2016.
- SOUZA, R. D. **ANÁLISE CONFORMACIONAL E ESTUDOS DO MODO DE INTERAÇÃO DO PEPTÍDEO BIOATIVO ecPis-4S EM MEIOS MIMÉTICOS DE MEMBRANA**. Dissertação de mestrado em Química, UFVJM, Dimantina-MG 2019. Disponível em: <<http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/2041>>. Acesso em: 20 ago. 2019.

- SOUZA, R. D. S. *et al.* Luminescent carbon dots obtained from cellulose. **Materials Chemistry and Physics**, v. 203, p. 148-155, 2016.
- SUBIRÓS-FUNOSAS ; PROHENS ; BARBA. Oxyma: An Efficient Additive for Peptide Synthesis to Replace the Benzotriazole-Based HOBt and HOAt with a Lower Risk of Explosion. **Chem. Eur. J.**, v. 15, p. 9394 – 9403, 2009.
- SUGIYAMA, J.; VUONG, ; CHANZY,. Electron Diffraction Study on the Two Crystalline Phases Occurring in Native Cellulose from an Algal Cell Wall. **Macromolecules**, v. 24, p. 4168- 4175 , 1991.
- SUN, et al. Insight into the effect of particle size distribution differences on the antibacterial activity of carbon dots. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 584, p. 505–519, 2021.
- SUN, Y.-P. *et al.* Quantum-Sized Carbon Dots for Bright and Colorful Photoluminescence. **American Chemical Society**, 2006.
- TADESSE, S. A.; EMIRE, S. A. Production and processing of antioxidant bioactive peptides: A driving force for the functional food market. **Heliyon**, v. 6, n. 8, 2020.
- TORRES, L. M. F. C. *et al.* Nanobiostructure of fibrous-like alumina functionalized with an analog of the BP100 peptide: Synthesis, characterization and biological applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 163, p. 275-283, 2018.
- TUERHONG, M.; XU,Y ; XUE-BO.Y., Review on Carbon Dots and Their Applications. **CHINESE Journal of Analytical Chemistry**, Tianjin, 45, n. 1, 2017. 139-150.
- VALE, B. R. C. *et al.* Effect of the molecular structure of surface ligands on water-soluble CdTe quantum dots. **Química Nova**, 38, 2015.
- VERLY, R. M. **Peptídeos antimicrobianos: síntese, ensaios biológicos, estudos termodinâmicos e análise estrutural por RMN em meios biomiméticos**. Tese de Doutorado- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2010.
- VOGT, R.; DIPPOLD, L. Escherichia coli O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef, Junho–Julho 2002. **Public Health Rep.**, v. 120, n. 2, p. 174–178, 2005.
- WANG, X.,*et al.* Bandgap-Like Strong Fluorescence in Functionalized Carbon Nanoparticles. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 31, p. 5310–5314, 2010.
- WANG, Y.; HU, A. Carbon quantum dots: Synthesis, properties and applications. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 2, n. 34, p. 6921-6939, 14 set. 2014. ISSN 10.1039/c4tc00988f.
- WANG¹, C. *et al.* Synthesis of cellulose-derived carbon dots using acidic ionic liquid as a catalyst and its application for detection of Hg²⁺. **Journal of Materials Science**, v. 51, n. 2, p. 861-867, 2016.

- XU, X. *et al.* Electrophoretic Analysis and Purification of Fluorescent Single-Walled. **American Chemical Society**, p. 126, 12736-12737, 2004.
- YANG, Y. *et al.* iRGD-decorated red shift carbon nanodots for tumor targeting fluorescence imaging. **Journal of colloid and interface Science**, 2017. ISSN S002-9797.
- YUAN¹, F. *et al.* Engineering triangular carbon quantum dots with unprecedented narrow bandwidth emission for multicolored LEDs. **Nature Communications**, v. 9, p. 2249, 2018.
- ZHANG, W.; ZENG, Z.; WEI, J. Electrochemical Study of DPPH Radical Scavenging for Evaluating the Antioxidant Capacity of Carbon Nanodots. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 121, n. 34, p. 18635-18642, 2017.
- ZHANG¹, Z. *et al.* Graphene quantum dots: an emerging material for energy-related applications and beyond. **Energy Environ. Sci.**, v. 5, p. 8869-8890, 2012.
- ZHOU, L. *et al.* Biofunctionalization of microgroove titanium surfaces with an antimicrobial peptide to enhance their bactericidal activity and cytocompatibility. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 128, p. 552-560, 2015.
- ZHU, *et al.* The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymerdots): Current state and future perspective. **Nano Research**, v. 8, n. 2, p. 355–381, 2015.
- ZHU, H. *et al.* Microwave synthesis of fluorescent carbon nanoparticles with electrochemiluminescence properties. **This journal is c The Royal Society of Chemistry Chem. Commun**, v. 34, p. 5118–5120, 2009.
- ZHUANG, Z. *et al.* Three new piscidins from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): Phylogeny, expression and functional characterization. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 66, p. 240-253, 2017.
- ZOU, T. B. *et al.* The Structure-Activity Relationship of the Antioxidant Peptides from Natural Proteins. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 72, 2016.

ANEXOS

ANEXO I- Aminoácidos do peptídeo ecPis-4s e suas respectivas estruturas

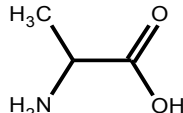
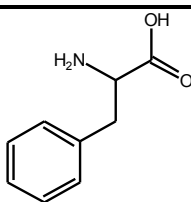
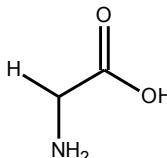
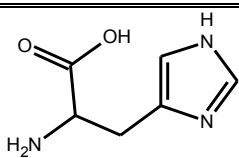
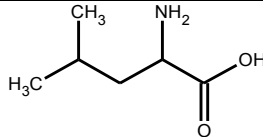
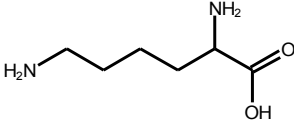
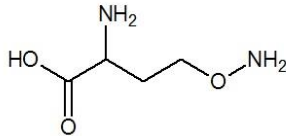
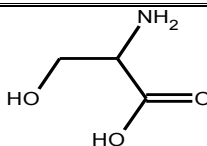
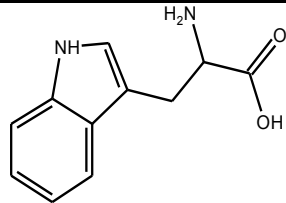
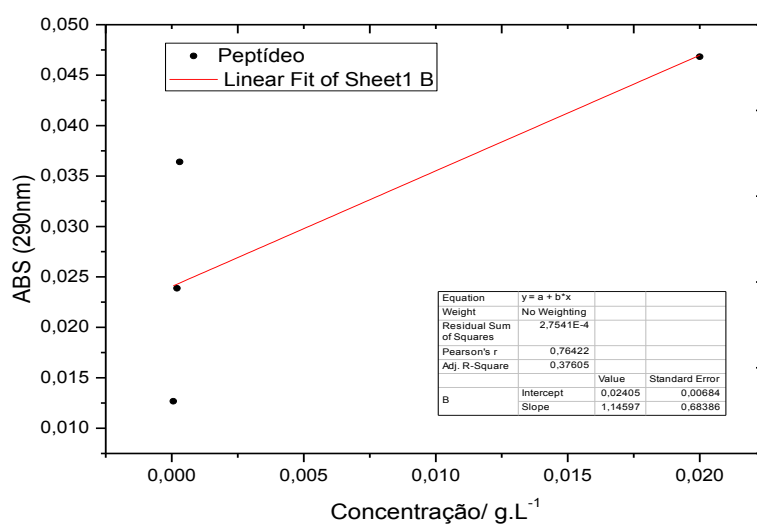
Alanina	A	
Fenilalanina	F	
Glicina	G	
Histidina	H	
Isoleucina	I	
Lisina	K	
Glutamina	Q	
Serina	S	
Triptofano	W	

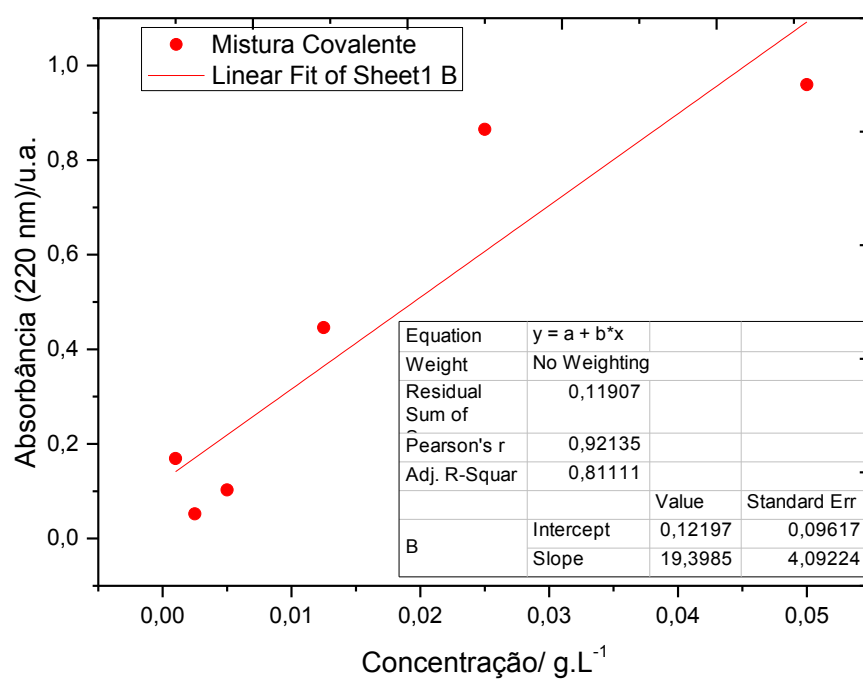
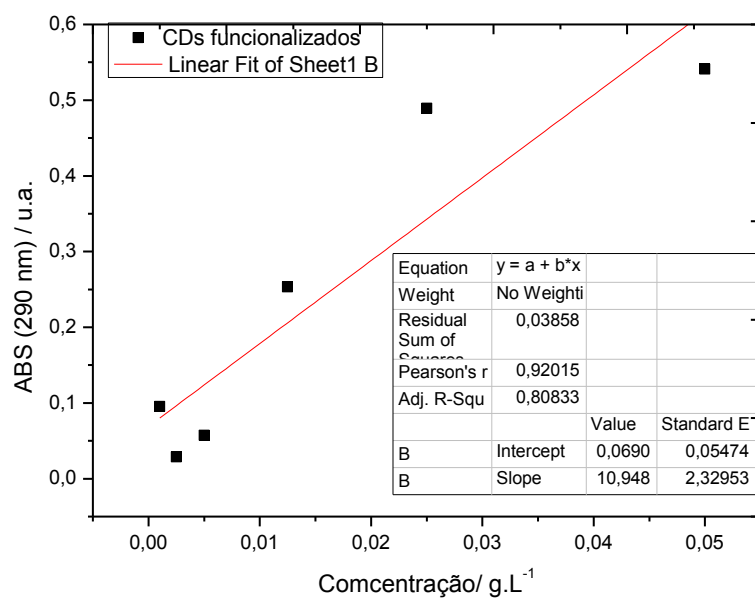
Tabela 2- Resíduos de aminoácidos do peptídeo ecPis-4s e suas respectivas massa molar

Aminoácido	Símbolo de 3 letras	Símbolo de 1 letras	Massa molar (g.mol ⁻¹)
Alanina	Ala	A	311,3
Fenilalanina	Phe	F	387,4
Glicina	Gly	G	297,3
Histidina	His	H	619,7
Isoleucina	Ile	I	353,4
Lisina	Lys	K	468,5
Glutamina	Gln	Q	610,7
Arginina	Arg	R	648,8
Serina	Ser	S	383,4
Triptofano	Trp	W	526,6

Fonte: Souza, 2019 (Adaptado)

Anexo II- Cálculo absortividade peptídeo e dos CDs funcionalizados





Anexo III- Gráfico de fluorescência integrada x Absorbância usado no cálculo do rendimento quântico.

