



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB**  
**FACULDADE DE PLANALTINA – FUP/UnB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS**  
**PPGCIMA/FUP**

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE CARBONO (CARBON-DOTS)  
FUNCIONALIZADAS COM COBRE E COM ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-  
ÍNDIA (*SYZYGium AROMATICUM* L) E SEUS EFEITOS ANTIMICROBIANOS**

**LUANA MARIA MAGALHÃES DE SOUZA BRANDÃO**

**BRASÍLIA**

**2020**

LUANA MARIA MAGALHÃES DE SOUZA BRANDÃO

**Síntese de nanopartículas de carbono funcionalizadas com cobre e óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L) e seus efeitos antimicrobianos**

**Área de Concentração:** Ciência de Materiais Nanoestruturados

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência de Materiais pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade de Brasília, campus Planaltina (PPGCIMA/UnB)

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Marcelo Oliveira Rodrigues

BRASÍLIA

2020

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

BB817s Brandão, Luana Maria Magalhães de Souza  
Síntese de nanopartículas de carbono funcionalizadas com  
cobre e óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*  
L) e seus efeitos antimicrobianos / Luana Maria Magalhães  
de Souza Brandão; orientador Marcelo Oliveira Rodrigues.  
- Brasília, 2020.  
61 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciência de Materiais)  
-- Universidade de Brasília, 2020.

1. C-dots. 2. Atividade antibacteriana. 3. Concentração  
Inibitória Mínima. I. Rodrigues, Marcelo Oliveira, orient.  
II. Título.

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à Deus,  
família e amigos.  
Excelsior!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me conceder o dom de vida e a capacidade de crescer a cada dia, por me dar forças para continuar.

Aos meus pais, Carlos e Sebastiana, por todo suporte financeiro e psicológico. Por me incentivarem depositando em mim confiança e amor.

A dona Lúcia, minha amiga Thaynara e Sr. Dantas pelos 13 anos de companheirismo e suporte, com laços que vão além do sangue e explicações.

A todos os amigos e colegas dos laboratórios LIMA, LAQMOS e LITMO, pelo conhecimento, risadas e cafés. Cito aqui o Rogério, Carime, Michele, Eliane, Idio, Caroline, André e Jonathan pelo convívio que muitas vezes me deu forças a continuar.

As minhas amigas Catiússia, Clara e Cristiani, Fabiana e Gabrielly, pelos anos de amizade e ensinamentos, que me tornaram a pessoa que sou.

Aos meus amigos e meninas da dança, me ajudaram e tornaram esses anos mais leves.

Ao professor Dr. Guilherme Dotto Brand e professor Msc Daniel Oliveira, por estarem comigo nessa jornada, por me doar tempo e conhecimento.

Aos funcionários, professores e colegas do PPGCIMA pelo carinho, ensinamento e companheirismo durante esses dois anos. Cito em especial os professores Alex Fabiano e Ismael por todo auxílio durante essa jornada, e ao Aristides por toda competência e zelo em nos auxiliar como alunos, nos tratando com respeito e atenção.

A todas as pessoas envolvidas no meu processo de aprendizado na FCE/UnB, amigos, professores, técnicos e todos os outros, por me ajudarem a construir esse caminho de conhecimento.

Aos meus orientadores, Prof. Dra Izabel Cristina e prof. Dr. Marcelo Oliveira, pela oportunidade a mim confiada de continuar trabalhando com vocês por mais dois anos. Cresci como pessoa e como estudante.

À UnB e CAPES pela oportunidade de atingir um novo nível acadêmico, por terem contribuído em estrutura física e financeira.

E ao restante aqui não citados meu muito obrigad

## RESUMO

Os C-dots são nanopartículas a base de carbono e entre diversas aplicações, estes possuem atividade antimicrobiana. Atualmente, as infecções bacterianas representam um grande desafio para a saúde, com o aumento da resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos e nesse contexto os C-dots tornam-se excelentes candidatos como novos possíveis antimicrobianos. O objetivo desse trabalho foi realizar a síntese de nanopartículas de carbono (C-dots) funcionalizadas com cobre (Cu-NP) e com óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L) (OECr-NP), caracterizar quimicamente essas nanopartículas e testar seus efeitos antimicrobianos. A caracterização química das nanopartículas foi realizada através da determinação do potencial zeta, espectroscopia de fluorescência e FTIR. A avaliação da atividade antimicrobiana das nanopartículas foi realizada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) desses compostos em relação as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922. O potencial zeta das nanopartículas medido em pH 5,8 foi de -16,0, -16,9 e -18,0 mV. A carga negativa na superfície das nanopartículas as torna solúveis em meio aquoso e previne a agregação por repulsão eletrostática. Além disso, prevê a eficácia de internalização celular, visto que nanopartículas com grupos funcionais de superfície carregados favorecem interações eletrostáticas com as membranas celulares. Os espectros de fluorescência obtidos para C-dots e Cu-NP mostrou maior pico de emissão dentro do comprimento da luz azul. A presença de grupos funcionais foi avaliada por meio de FTIR e os principais grupos encontrados correspondem aos esperados nas nanopartículas de carbono, indicando a presença de C, H, O e N. Para as OECr-NP os valores de CIM foram de 1,019 a 1,168 mg/mL para *S. aureus* e 0,967 a 0,989 mg/mL para *E. coli*. Já para as Cu-NP, os valores de CIM foram de 1,121 a 1,124 mg/mL para *S. aureus* e de 0,987 a 1,019 mg/mL para *E. coli*, mostrando que as nanopartículas apresentaram atividade antimicrobiana moderada. **Conclusão:** Os resultados deste estudo demonstraram a possibilidade de utilização das nanopartículas de carbono associadas ao cobre e ao óleo essencial de cravo como agentes antimicrobianos.

**Palavras-chaves:** C-dots, atividade antibacteriana, Concentração Inibitória Mínima

## ABSTRACT

C-dots are carbon-based nanoparticles and among several applications, they have antimicrobial activity. Currently, bacterial infections represent a major health challenge, with increased bacterial resistance to antimicrobial agents and in this context C-dots become excellent candidates as new possible antimicrobials. The objective of this work was to perform the synthesis of carbon nanoparticles (C-dots) functionalized with copper (Cu-NP) and with essential oil of clove (*Syzygium aromaticum* L) (OECr-NP), chemically characterize these nanoparticles and test its antimicrobial effects. The chemical characterization of the nanoparticles was carried out by determining the zeta potential, fluorescence spectroscopy and FTIR. The evaluation of the antimicrobial activity of the nanoparticles was performed by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of these compounds in relation to the bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922. The zeta potential of the nanoparticles measured at pH 5.8 was -16.0, -16.9 and -18.0 Mv. The negative charge on the surface of the nanoparticles makes them soluble in an aqueous medium and prevents aggregation by electrostatic repulsion. In addition, it predicts the effectiveness of cell internalization, since nanoparticles with charged surface functional groups favor electrostatic interactions with cell membranes. The fluorescence spectra obtained for C-dots and Cu-NP showed the highest emission peak within the length of the blue light. The presence of functional groups was assessed using FTIR and the main groups found correspond to those expected in carbon nanoparticles, indicating the presence of C, H, O and N. For OECr-NP the MIC values were 1.019 to 1.168 mg/mL for *S. aureus* and 0.967 to 0.989 mg/mL for *E. coli*. For Cu-NP, MIC values ranged from 1.121 to 1.124 mg/mL for *S. aureus* and 0.987 to 1.019 mg/mL for *E. coli*, showing that the nanoparticles showed moderate antimicrobial activity. The results of this study demonstrated the possibility of using carbon nanoparticles associated with copper and clove essential oil as antimicrobial agents.

**Keywords:** C-dots, antibacterial activity, Minimum Inhibitory Concentration

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplos de estruturas biológicas variando escala de tamanho.....	2
Figura 2 – Esquematização dos tipos de síntese das nanopartículas de carbono classificados de acordo com o precursor.....	8
Figura 3 - Densidade de estados eletrônicos, variando em função do tamanho e diimensão.....	10
Figura 4 - C-dots na cubeta sob luz branca e luz UV (fluorescência); imagem fluorescente das células cancerígenas Hela com C-dots sob luz UV.....	11
Figura 5 – Esquema de etapas de descoberta, produção e testes de agentes farmacoterapêuticos.....	15
Figura 6 – Imagens das placas com <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> após tratamento por 24 horas com diferentes concentrações de C-dots (5, 25, 50, 75 e 100 µg/mL).....	18
Figura 7 – Diferentes mecanismos de atividade antimicrobiana apresentados por nanopartículas a partir da produção de Espécies Reativas de Oxigênio.....	19
Figura 8 - Síntese dos compostos contendo C-dots a partir do ácido cítrico.....	23
Figura 9 – Representação da placa de 96 poços (microdiluição).....	26
Figura 10 – A) Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier de C-dots; B) Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier de Cu-NPs...	28-20
Figura 11 – Espectro de Espectros de fluorescência obtidos a partir do espectrofluorímetro, sob comprimento de excitação variando de forma progressiva de 310 nm a 460 nm A)Espectro de emissão de C-dots; B)Espectro de emissão de Cu-NP.....	30-31



**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Tamanho, potencial zeta e condutividade das nanopartículas de carbono, das nanopartículas com cobre e das nanopartículas com óleo essencial de cravo .....	44
Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima das nanopartículas de carbono com óleo essencial de cravo-da-índia em cepas de <i>S. aureus</i> e <i>E.coli</i> .....	46
Tabela 3 – Concentração Inibitória Mínima das nanopartículas de carbono com cobre em cepas de <i>S. aureus</i> e <i>E.coli</i> .....	46

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C-dots: Carbon dots

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CIM<sub>50</sub>: Concentração Inibitória Mínima em 50%

*E.coli*: Escherichia coli

EDA: Etilenodiamina

FTIR: Fourier-transform infrared spectroscopy

IC: Intervalo de Confiança

INPI: Instituto Nacional de Propriedade Intelectual

N&N: Nanociência e Nanotecnologia

OMS: Organização Mundial de Saúde

*S. aureus*: *Staphylococcus aureus*

SWNTs: Single walled nanotube

UV-Vis: Espectroscopia do Ultravioleta na região do Visível

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	v
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Nanociência e Nanotecnologia (N&amp;N).....</i>	<i>1</i>
1.2 <i>Nanomedicina.....</i>	<i>1</i>
1.3 <i>Nanomateriais: fulereno, grafeno e carbon dot.....</i>	<i>3</i>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
2.1. <i>Objetivo Principal.....</i>	<i>5</i>
2.2. <i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>5</i>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>6</b>
3.1 <i>Nanomateriais.....</i>	<i>6</i>
3.1.1 <i>Nanopartículas de carbono.....</i>	<i>7</i>
3.2 <i>Síntese das nanopartículas de carbono.....</i>	<i>8</i>
3.3 <i>Propriedades e aplicações dos C-dots.....</i>	<i>9</i>
3.3.1 <i>C-dots como carreadores de fármacos.....</i>	<i>11</i>
3.4 <i>Resistência Antimicrobiana – um desafio mundial de saúde.....</i>	<i>14</i>
3.5 <i>Efeito antimicrobiano dos Carbon Dots.....</i>	<i>16</i>
3.6 <i>Microrganismos de importância clínica e a necessidade de novas terapias antimicrobianas.....</i>	<i>20</i>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
4.1. <i>Síntese das nanopartículas de carbono (C-dots), das nanopartículas de carbono com cobre (Cu-NP) e das nanopartículas de carbono com óleo essencial de cravo-da-índia (OECr-NP).....</i>	<i>23</i>
4.2. <i>Métodos de caracterização química das nanopartículas de carbono, nanopartículas de carbono com cobre (Cu-NP) e das nanopartículas de carbono com óleo essencial de cravo-da-índia (OECr-NP).....</i>	<i>24</i>
4.2.1. <i>Determinação de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....</i>	<i>24</i>

4.2.2.	<i>Determinação de espectroscopia de fluorescência</i> .....	25
4.2.3.	<i>Determinação do potencial zeta</i> .....	25
4.3.	<i>Avaliação da atividade antimicrobiana das nanopartículas de carbono com cobre (Cu-NP) e das nanopartículas de carbono com óleo essencial de cravo-da-índia (OECr-NP)</i> .....	25
4.3.1	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i> .....	25
5.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	28
5.1.	<i>Testes de caracterização química das nanopartículas (C-dots), das nanopartículas de carbono com cobre (Cu-NP) e das nanopartículas de carbono com óleo essencial de cravo-da-índia (OECr-NP)</i> .....	28
5.1.1.	<i>Espectroscopia na região do infravermelho – FTIR</i> .....	28
5.1.2.	<i>Espectro de fluorescência</i> .....	31
5.1.3.	<i>Potencial zeta</i> .....	33
5.2.	<i>Avaliação da atividade antimicrobiana das nanopartículas de carbono com cobre (Cu-NP) e das das nanopartículas de carbono com óleo essencial de cravo-da-índia (OECr-NP)</i> .....	34
6.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	37
7.	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	38
8.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	39
ANEXO 1	.....	49

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Nanociência e Nanotecnologia (N&N)

A nanotecnologia é a ciência aplicada a manipulação de materiais, onde pelo menos um de seus componentes está dimensionado a nanoescala. A síntese desses novos nanomateriais é de extrema relevância por possibilitar inúmeras aplicações. Devido a aquisição de novas propriedades físicas e químicas, já apresentando então inúmeras aplicações em diferentes áreas (BATISTA; PEPE, 2014).

Apresenta-se como um campo de atuação interdisciplinar, envolvendo a integração de áreas como a matemática, química, física, ciência de materiais, entre outras. Essa correlação de áreas afins, resulta em nanomateriais de diversas aplicações. Podendo variar desde cosméticos a medicamentos, materiais eletrônicos, entre outros (KOOPMANS; AGGELI, 2010).

A nanotecnologia busca descobrir novas finalidades e funções dos nanomateriais baseando-se nas características adquiridas que envolvem seu efeito quântico e de superfície. Enquanto a nanociência busca entender os comportamentos adquiridos em nanoestruturas (CALDEIRA et al., 2016).

Os avanços emergentes por estudos relacionados ao uso da nanotecnologia aplicada à aplicações médicas. A utilização de nanopartículas como nanocarreadores como delineamento de sistemas de entrega de fármacos com vista a tratamento local ou sistêmico, se revela de extrema importância, justificando assim a importância de novos estudos com variáveis aplicações (GARCIA, 2014).

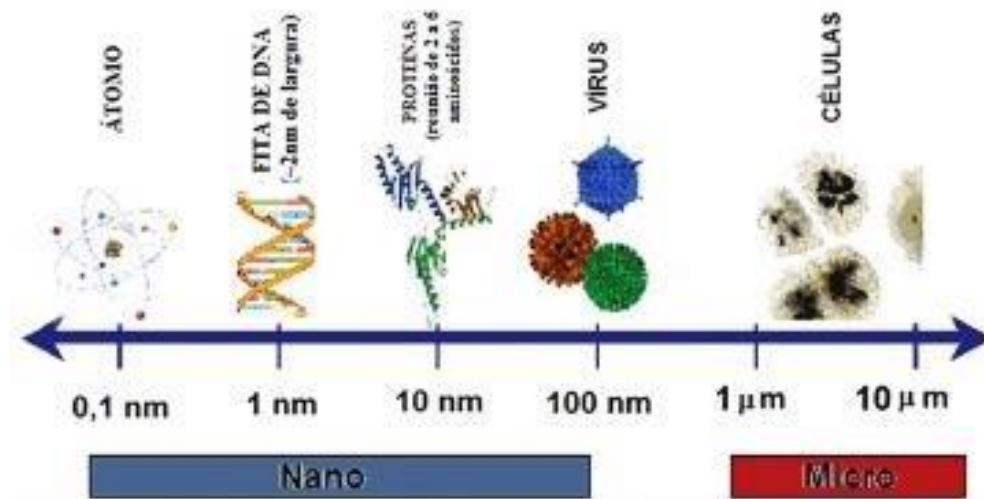
## 1.2 Nanomedicina

Os avanços tecnológicos a partir na nanociência e nanotecnologia revolucionaram o entendimento de modelos presentes na natureza. Por exemplo, flagelos de bactérias podem ser definidos em estrutura-função como nanomotores, conferindo a algumas espécies, capacidade de movimentos giratórios gerados por variação de fluxo de prótons. As estruturas biológicas com tamanhos nanométricos variáveis estão representadas na Figura 1.

As células são o quantum da biologia, a menor e mais fundamental unidade, pela qual todo o maquinário humano é capaz de existir. A célula é constitui-se por

agregados de nanoestruturas moleculares ativas. Então a nanomedicina surge para auxiliar no entendimento de mecanismos moleculares envolvendo nanoestruturas (WHITESIDES, 2005).

**Figura 1 - Exemplos de estruturas biológicas variando escala de tamanho**



SILVA, S. L. A.; VIANA, M. M.; MOHALLEM, N. D. S, 2009.

Assim, a Nanomedicina apresenta-se como um campo multidisciplinar que correlaciona a nanoengenharia e a nanotecnologia com a medicina. O uso de nanopartículas tornou possível aplicações médicas que vão desde diagnóstico *in vitro* ou *in vivo* a tratamento farmacológico (PELAZ et al., 2017).

Os estudos já realizados na área de medicamentos mostram que tamanho, forma e propriedade da superfície dos fármacos exercem influência nas interações biológicas, por exemplo, sobre a absorção celular, biodisponibilidade e atividade celular. Além destes aspectos, o delineamento da superfície dos fármacos é capaz de conferir maior afinidade e especificidade, e por consequência melhorias em tratamentos terapêuticos, o que auxilia nos processos e etapas farmacocinéticas e farmacodinâmicas (PETROS; DESIMONE, 2010).

A primeira geração de nanopartículas com alvo terapêutico foram os lipossomas conjugados com drogas (ZHANG et al., 2007). Os lipossomas são vesículas compostas por uma membrana lipídica bilateral, capazes de encapsular moléculas facilitando a sua absorção e distribuição em meio biológico.

Atualmente os avanços da N&N se baseiam no desenvolvimento de nanopartículas combinadas com mecanismos de entrega de fármacos que assim,

facilitam a atividade desses. Apresentando-se, então, como uma ferramenta para agregar uma medicina personalizada e sendo de grande interesse para a indústria farmacêutica. As nanopartículas associadas aos fármacos podem resultar em melhorias relacionadas a solubilidade de drogas pouco hidrossolúveis, aumento da estabilidade, modificação das etapas farmacocinéticas, frequência e dose, podendo diminuir os efeitos tóxicos dose-dependentes e aumentar a biocompatibilidade (KUMAR, 2010; ZHENG et al., 2019).

### **1.3 Nanomateriais: fulereno, grafeno e carbon dot**

Atualmente tem se observado um grande interesse no desenvolvimento de nanomateriais a base de carbono, elemento muito comum na natureza, presente em mais de um milhão de compostos. A maioria dos nanomateriais a base de carbono não são tóxicos e apresentam um forte apelo ambiental atraindo grande atenção, pois possuem diversas aplicações (ATABAEV, 2018; TADESSE et al., 2018).

Entre os nanomateriais a base de carbono, o fulereno foi o primeiro dessa classe a ser descoberto em 1985 (KROTO et al., 1985). Em 1991, lijima anunciou a descoberta do que ele chamou de estrutura de carbono finita constituída por tubos em forma de agulha e que hoje conhecemos como nanotubos de carbono. Em 2004, Novoselov et al. (2004) divulgaram a síntese do grafeno. O grafeno pode ser definido como um fino filme de átomos de carbono arranjados hexagonalmente em uma estrutura bidimensional (HONG et al., 2015).

Os C-dots, também conhecidos como pontos quânticos de carbono ou quantum dots de carbono, representam outra classe de nanomateriais a base de carbono e foram descobertos acidentalmente em 2004, durante a purificação de nanotubos de carbono (XU et al., 2004). C-dots são nanopartículas quase esféricas constituídas de carbono com tamanho inferior a 10 nm (ATABAEV, 2018; HONG et al., 2015).

Uma característica importante dos C-dots é a emissão de fluorescência. Nos métodos fotoluminescentes caracterizados pela fluorescência, a excitação da molécula é conduzida pela absorção de fótons. A molécula é inicialmente excitada e promovida para um estado eletrônico de maior energia, cujo retorno ao estado fundamental é acompanhado pela emissão de radiação eletromagnética. A fluorescência possui um tempo de vida extremamente curto. A fluorescência é emitida em comprimentos de onda maiores àqueles de excitação, deslocando-se entre 50 e

150 nm quando comparado ao comprimento de onda da luz usado para a excitação da molécula (LIU et al., 2018; HONG et al., 2015; SOTOMAYOR et al., 2008).

A emissão de fluorescência dos C-dots é dependente dos comprimentos de onda de excitação e o comprimento de onda do pico de emissão pode ser ajustado na luz visível de 400 a 750 nm. Os comprimentos de onda de emissão dos C-dots na faixa do ultravioleta até o infravermelho mudam em função do tamanho das partículas, sugerindo que o confinamento quântico é um importante contribuinte para a fluorescência dos C-dots (LIU et al., 2018; HONG et al., 2015).



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. *Objetivo Principal*

O objetivo principal desse trabalho foi realizar a síntese de nanopartículas de carbono (C-dots) funcionalizadas com cobre (Cu-NP) e com óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L) (OECr-NP), caracterizar quimicamente essas nanopartículas e testar seus efeitos antimicrobianos.

### 2.2. *Objetivos Específicos*

- Síntese das nanopartículas de carbono (C-dots)
- Funcionalização das nanopartículas de carbono (C-dots) com cobre (Cu-NP) e com óleo essencial de cravo-da-índia (OECr-NP)
- Caracterização química das nanopartículas de carbono (determinação do potencial zeta, espectroscopia de fluorescência e FTIR)
- Avaliação da atividade antimicrobiana das nanopartículas de carbono através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) desses compostos em relação as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Nanomateriais

Os materiais em escala nanométrica apresentam divergência quando comparados com o mesmo material em escala atômica. Propriedades físicas, químicas e biológicas são determinadas e controladas por mecanismos quânticos. As melhorias relacionadas a parte físico-química dos nanomateriais podem se dar em estrutura, forma e composição da superfície (BARKALINA et al., 2014).

Como já explicado, os nanomateriais tornam possível o uso de novas tecnologias em saúde na nanomedicina (KRANZ; EATON; MIZAIKOFF, 2011). Os nanomateriais além de contribuírem para a resolução de problemas tais como o transporte de moléculas biológicas, são biomarcadores tumorais com maior eficiência e também podem auxiliar no aperfeiçoamento do diagnóstico de doenças e tratamento terapêutico (DRAGOVIC et al., 2011).

Desta forma, os principais materiais utilizados na área médica são: 1) Nanomateriais metálicos: são utilizadas como biossensores, sistema de entrega de fármacos e diagnóstico. Possuem propriedades óticas, eletrônicas e catalíticas; 2) Nanomateriais magnéticos: representados por  $M^{2+}Fe_2O_4$ . A notação  $M^{2+}$  indica a presença de metais (Mn, Co, Zn, Fe). Podem ser usados no sistema de entrega de fármacos (*Drugs Delivery Systems*), agentes de contraste de ressonância magnética e terapia anticâncer; 3) Nanopartículas de carbono: apresentam diferentes características relevantes para áreas como a mecânica, eletrônica, óptica e química. A utilização desses materiais envolve biossensores, engenharia têxtil, sistemas de entrega de fármacos, entre tantos outros (CANCINO; MARANGONI; ZUCOLOTTI, 2014).

### 3.1.1 Nanopartículas de carbono

Nanopartículas de carbono, também chamadas de *Carbon Quantum Dots* constituem um exemplo de nanomaterial. Xu et al. (2004) relataram que, a partir do processo de eletroforese realizado para purificar nanotubos de carbono de parede simples (SWNTs), observou-se a presença de um material descrito como “nanopartículas fluorescente derivadas da mistura dos SWNTs”. Os autores verificaram que 10% da massa obtida em sua síntese de nanotubos de carbono eram uma mistura de nanopartículas luminescentes, compostas apenas por carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, o que hoje conhecemos como C-dots (ATABAEV, 2018; HONG et al., 2015).

Assim, a composição química dos C-dots é constituída de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio e a porcentagem de cada elemento varia dependendo do tipo de método e da matéria prima utilizada para produzir os C-dots (ATABAEV, 2018; HONG et al., 2015).

Nos C-dots, a fonte de carbono utilizada e o método de síntese exercem influência no tamanho e capacidade da superfície ser conjugada a outros elementos ou moléculas. E a passivação (ligação de outros elementos ou grupos funcionais à superfície da nanopartícula) com moléculas orgânicas pode resultar em partículas mais solúveis e fluorescentes (WANG et al., 2011).

Os C-dots apresentam melhorias relacionadas ao tamanho, forma, luminescência e por causa da superfície favorecem bioconjugações. Podem ser produzidos em larga escala e suas características permitem seu uso em bioimageamento, sistema de entrega de fármacos, sensores e ferramentas de diagnóstico (BAKER, 2010).

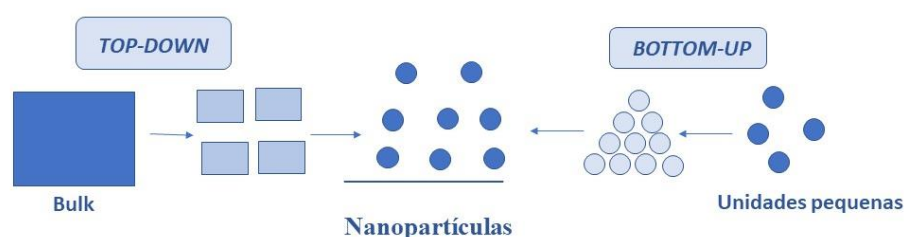
Além dessas amplas aplicações, acrescenta-se em comparação com os demais materiais, as vantagens apresentadas pelos carbon dots como baixa toxicidade, compatibilidade com o meio biológico, baixo custo de síntese e fáceis rotas sintéticas. A síntese de C-dots se subdivide em dois grandes grupos: *Top-down* e *Bottom-up* (LIM; SHEN; GAO, 2015).

### 3.2 Síntese das nanopartículas de carbono

Os métodos de síntese de nanopartículas de carbono podem ser classificados de acordo com a matéria precursora (Figura 2).

A primeira rota, chamada de *Top-down* é baseada na quebra de estruturas maiores de carbono (grafite, nanotubos de carbono). Enquanto a segunda, chamada de *Bottom-up*, fundamenta-se em técnicas de combustão, tratamento termal, micro-ondas, utilizando como fonte precursores moleculares como: citrato, carboidratos, polímeros de sílica, entre outros (TADESSE, et al., 2018).

**Figura 2 – Esquematização dos tipos de síntese das nanopartículas de carbono classificados de acordo com o precursor**



Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Os métodos *top-down* podem ser obtidos por meio de métodos físicos ou químicos. Os métodos físicos podem envolver técnicas como descarga de arco, ablação por laser, oxidação eletroquímica, oxidação química, entre outros. No entanto, os C-dots obtidos por esses métodos apresentam geralmente baixa fluorescência. Os exemplos de síntese química envolvem técnicas de síntese eletroquímica, reação envolvendo processos de combustão/hidrotermal/térmico/oxidação ácida (DINÇ, 2016; HIMAJA et al., 2014).

Por causa de todas os processos classificados e pela reprodutibilidade da síntese, reprodutibilidade, maior controle de reação e delineamento de produtos já previamente esperados, a técnica utilizada se baseou na rota sintética classificada

dentro do processo de *bottom-up*.

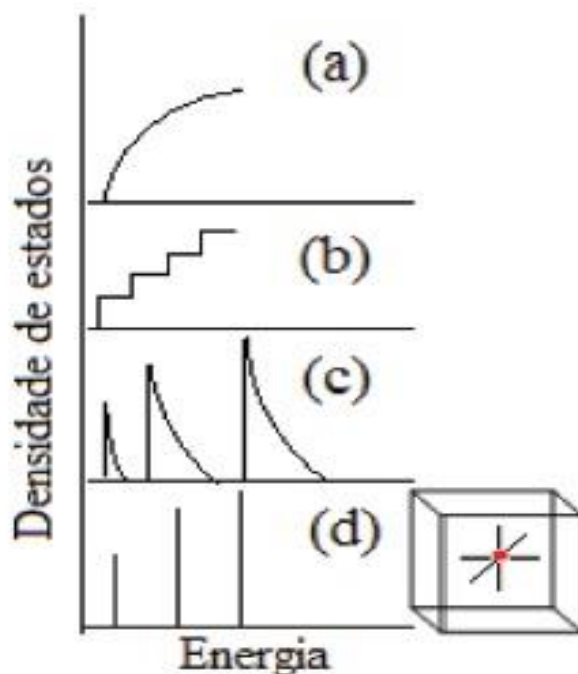
### 3.3 Propriedades e aplicações dos C-dots

As características apresentadas pelos C-dots variam em relação a forma, tamanho, superfície, composição, carga, hidrofiliabilidade e fatores estéricos. Essas propriedades são extremamente relevantes para aplicação biológica por meio da funcionalização da superfície com moléculas de interesse, possibilitando a entrega da formulação a sítios biológicos específicos. A mudança de superfície é capaz de resultar em maior solubilidade e por consequência melhor biocompatibilidade (TSOI et al., 2012)

Uma propriedade de interesse médico apresentada pelos *carbon dots* é a fluorescência, que varia de acordo com o tamanho apresentado pela nanopartícula. Os C-dots possuem tamanho inferior a 10 nm (FANG et al., 2011). O efeito fluorescente é observado a partir do momento que os elétrons do material excitado mudam para um nível eletrônico de maior energia e, estes ao retornarem para o estado fundamental emitem radiação eletromagnética. A emissão apresentada pelos C-dots depende da excitação. O pico de emissão pode ser aumentado para a região do visível (400 a 700 nm) a partir do aumento no comprimento de onda da excitação ou com a redução do tamanho da nanopartícula. Essa redução explicada a partir do confinamento quântico, onde os níveis energéticos apresentados são correspondentes ao tamanho do ponto quântico é uma das teorias aceitas para elucidar essa propriedade (SUN et al., 2006; LIU et al., 2018).

A fluorescência dos carbon dots é atribuído a efeitos quânticos das armadilhas. Os defeitos encontrados nas folhas de grafeno se assemelham estruturalmente aos encontrados nos C-dots, e por consequência se assume que possuem os mesmos mecanismos fotoluminescentes. O confinamento quântico é resultado da variação da densidade dos estados eletrônicos, posição e momento das partículas livres e confinadas. Com a diminuição do tamanho, a excitação eletrônica sofre deslocamento para regiões de maior energia, conforme mostrado na figura abaixo (SANDRI; KRIEGER; COSTA; SILVA; BECHTOLD; ZIMMERMANN, 2017).

Figura 3 – Densidade de estados eletrônicos em função do tamanho e da dimensão.



FONTE: SANDRI, 2017.

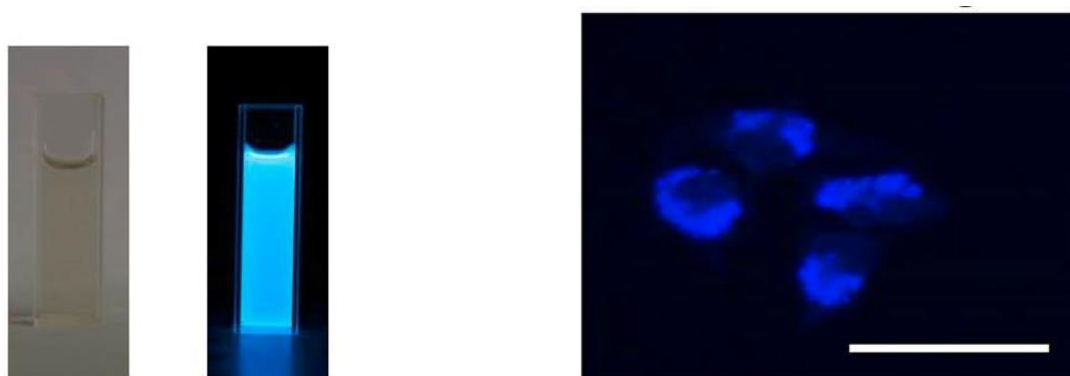
Entre as diversas possíveis aplicações dos C-dots, na área de saúde, têm sido estudado como fonte de bioimagem, como carreador de fármacos e como sensor químico e biológico. Os C-dots apresentam excelentes propriedades de fotoestabilidade e biocompatibilidade. Os C-dots mostram que são viáveis por empregarem rotas sintéticas simples e apresentarem estabilidade coloidal em longo prazo e baixa toxicidade ambiental e biológica. Com isso, a perspectiva da utilização desses nanomateriais compostos de carbono tem um forte apelo ambiental por representar um material que envolve a chamada tecnologia verde (VASIMALAI et al., 2018; HONG et al., 2015; LIU et al., 2018).

No estudo de Liu et al. (2011), os autores realizaram um teste com células cancerígenas de fígado humano, HepG-2 cultivadas com C-dots durante 24 horas. Como resultado, através de um microscópio confocal de varredura a laser, as células tornaram-se luminescentes com as cores azul, verde e vermelho, com 405 nm, 488 nm e 543 nm de comprimentos de onda de excitação, respectivamente. Isto confirma que os C-dots foram internalizados nas células por endocitose. Os C-dots exibiram baixa

toxicidade para as células mantendo a viabilidade de cerca de 100% para concentrações inferiores a  $240 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Isto sugere um grande potencial desses nanocompostos para aplicações biomédicas.

No estudo de Liu et al. (2018) foi reportado a síntese em um único passo de C-dots altamente luminescentes usando ácido fólico com precursor e o método de síntese hidrotérmico. Um dos aspectos importantes do sucesso da síntese dos C-dots é aumentar os rendimentos quânticos de fluorescência (QY) para aumentar a sua visibilidade nas células (Figura 4).

**Figura 4 - C-dots na cubeta sob luz branca e luz UV (fluorescência); imagem fluorescente das células cancerígenas Hela com C-dots sob luz UV**



Fonte: LIU et al., 2018.

### 3.3.1 C-dots como carreadores de fármacos

Os C-dots também possuem um grande potencial para o carregamento de fármacos. A entrega de medicamentos busca maximizar a biodisponibilidade deste em um local específico do corpo. A dosagem total de um medicamento assim como os efeitos secundários adversos podem ser simultaneamente reduzidos com a utilização de nanomateriais de carbono como veículos de entrega de fármacos para locais específicos em meio biológico..

O tamanho, a superfície e forma de nanopartículas influenciam a biodisponibilidade in vivo. Partículas com tamanho inferior a 5nm são eliminadas rapidamente por meio do extravasamento ou clearance renal (CHOI et al., 2007). E a remoção das nanopartículas envolve as células do Sistema Reticuloendotelial (RES)

e as células de Kupffer, localizadas no fígado. Já o acúmulo está relacionado com a adsorção de proteínas específicas à superfície da partícula. Processo conhecido como opsonização acontece quando opsoninas, como a imunoglobulina, atuam no reconhecimento de microrganismos ou partículas. Mecanismo relacionado ao RES e ao sistema complemento (GENG; DALHAIMER; CAI; TSAI; TEWARI; MINKO; DISCHER, 2007).

O tamanho da partícula também influencia na absorção, em diferentes processos celulares. Por exemplo: fagocitose, macropinocitose, endocitose mediada por caveolares e endocitose mediada por clatrina, e na biodistribuição. A forma também demonstra ter influência na interação célula – partícula, podendo ser inibida ou induzida, dependendo da forma geométrica que esta apresenta e, conseqüentemente também pode interferir na biodistribuição (GENG et al., 2007)

Os nanomateriais apresentam uma predisposição para se acumular dentro de tumores, assim a carga útil com as moléculas de droga pode ser especificamente entregue no tecido canceroso, deixando o tecido normal não afetado pela droga (HONG et al., 2015; LIU et al., 2018).

O acúmulo de nanopartículas apresentado pela vasculatura tumoral se mostra de maneira passiva e não seletiva. A explicação plausível para isso se deve a um mal desenvolvimento causado pelo comprometimento do sistema vascular, resultando em vazamento e possibilidade de acúmulo de macromoléculas, por consequência, a drenagem realizada pelo sistema linfático se torna ineficaz (FANG; NAKAMURA; MAEDA, 2011)

No estudo de Sun et al. (2008), o medicamento anticancerígeno doxorrubicina foi adsorvido nos C-dots contendo anticorpos conjugados. A droga foi seletivamente transportada para células cancerígenas e matou as células, mostrando que os C-dots podem ser eficientemente utilizados como carreadores seletivos de fármacos.

No estudo de Wang et al. (2015) os C-dots foram isolados de cerveja comercial e apresentaram tamanho de 2,5 nm. Os C-dots apresentaram excelente solubilidade e propriedades fluorescentes com rendimento quântico de fluorescência de 7,39% na excitação da luz UV (365 nm). A caracterização dos componentes mostrou que os C-dots continham 59,52% de carbono, 36,71% de oxigênio e 3,77% de nitrogênio. A citotoxicidade dos C-dots foi testada usando células humanas de câncer da mama MCF-7. A viabilidade celular foi mantida em concentrações de C-dots superiores a 12,5 mg/mL por 48 horas de incubação. Na maior concentração testada de 50 mg/mL a



viabilidade celular caiu para 68%, provavelmente porque a alta concentração de C-dots aumentou a pressão osmótica nas células, levando a desidratação e morte celular.

Os C-dots foram então conjugados com medicamento anticancerígeno doxorrubicina formando os C-dots-DOX para estudo da ação destes como carreadores de fármaco na terapia anticâncer. A atividade dos C-dots-DOX e da doxorrubicina livre foi avaliada através da incubação destes com as células humanas de câncer da mama MCF-7, nas concentrações de 0,02, 0,08, 0,32, 1,25, 5,00 e 20,00 mg/mL, por 48 horas. Não foram observadas diferenças de citotoxicidade dos C-dots-DOX e da doxorrubicina livre nas menores concentrações testadas. Porém conforme as concentrações aumentaram, a doxorrubicina livre mostrou muita citotoxicidade em comparação com os C-dots-DOX. A principal razão desse resultado é que a liberação da doxorrubicina dos C-dots-DOX aconteceu de forma lenta e gradual, gerando um aumento da viabilidade celular. A doxorrubicina é conhecida por seus efeitos colaterais como reações gastrintestinais e de pele. Como os C-dots-DOX tendem a se acumular mais nas células cancerígenas que nas células normais, os resultados do estudo sugerem que os dos C-dots-DOX podem reduzir os efeitos colaterais da doxorrubicina livre (WANG et al., 2015).

No estudo de Vasimalai et al. (2018) os C-dots produzidos a partir de pimenta do reino preta foram avaliados quanto a citotoxicidade em células humanas cancerígenas (LN-229) e em células humanas renais normais (HK-2). Os C-dots testados nas concentrações de 0,1 a 2,0 mg/mL mostraram maior entrada nas células cancerígenas quando comparado com as células normais. Os resultados mostraram que os C-dots nas maiores doses testadas inibiram a viabilidade celular das células em 24 horas apresentando maior toxicidade para as células cancerígenas em comparação com as células normais. Como controle foi sintetizado C-dots a partir do ácido cítrico e estes não mostraram toxicidade significativa para as células (cancerosas ou normais). Esses resultados evidenciaram que a presença de piperina nos C-dots produzidos a partir de pimenta do reino preta foram responsáveis pela citotoxicidade seletiva nas células cancerígenas.

Outra aplicação interessante dos C-dots é o seu uso como sensor químico. A presença de vários grupos funcionais na superfície dos C-dots (N, O, S, entre outros) facilita a ligação destes com os analitos de interesse (DEVI et al., 2018). A ligação de íons metálicos na superfície dos C-dots causa diminuição da fluorescência e assim os

C-dots podem ser utilizados para desenvolver sensores químicos para vários metais como: mercúrio, chumbo, cobre e cromo (DAS et al., 2017; KUMAR et al., 2017; MA et al., 2018; YAN et al., 2014).

Vários autores também descreveram o uso dos C-dots como sensor biológico, sendo possível a sua aplicação para a detecção de ácido fítico (GAO et al., 2015), glicose (SHI et al., 2011) e ácido ascórbico (LIU et al., 2016) e tiamina. No estudo de Dinç (2016) os C-dots extraídos de melão de beterraba açucareira foram usados como sensores biológicos para a detecção de riboflavina (vitamina B) e do antibiótico tetraciclina. Na detecção de riboflavina a energia de fluorescência (FRET) dos C-dots foi transferida para a riboflavina e foi obtida uma relação linear entre o decréscimo da FRET dos C-dots e aumento da concentração de riboflavina. A tetraciclina também decresceu a fluorescência dos C-dots e houve uma relação linear entre decréscimo de fluorescência dos C-dots e aumento da concentração de tetraciclina. Assim, a autora concluiu que os C-dots puderam ser utilizados com eficiência como sensores para a detecção de riboflavina (vitamina B) e do antibiótico tetraciclina.

### **3.4 Resistência Antimicrobiana – um desafio mundial de saúde**

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a falta de investimentos e inovação relacionada ao desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos juntamente com o surgimento de microrganismos resistentes representa sérios riscos à saúde, visto que atualmente a quantidade de fármacos sob estudo pré-clínico é de aproximadamente 60, dos quais 50 são antimicrobianos sintéticos e apenas 10 são de origem biológica (WHO, 2020).

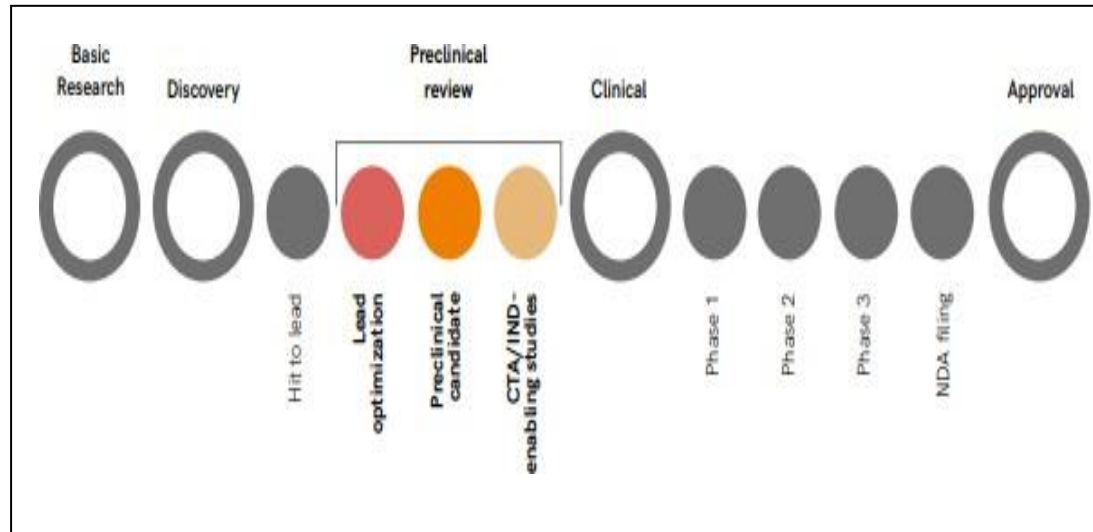
A resistência microbiana é a habilidade que o microrganismo possui de continuar íntegro mesmo na presença de níveis terapêuticos de determinado antimicrobiano. Essa resistência pode ser classificada em: intrínseca ou natural e adquirida. A resistência intrínseca resulta da mutação espontânea do material genético que confere alguma nova adaptação, permitindo que o organismo resista aos efeitos letais do agente antimicrobiano (as mutações podem ser substituições de base, mutações de deslocamento de quadros, deleções de material genético ou inserções de elementos de DNA). A resistência adquirida é aquela obtida por meio de mutação no DNA ou aquisição dos genes de resistência de outras bactérias, podendo ser por meio de conjugação, transdução ou transformação (ANVISA, 2012).

Em cima dessa problemática, visível a um contexto mundial, a OMS organizou em 2015 o Plano de Ação Global contra a resistência antimicrobiana, cujos objetivos se baseiam em: entender os mecanismos envolvidos no processo de resistência; reduzir novos casos de infecções; otimizar o uso de antimicrobianos e investir em estudos para a descoberta de novos agentes antimicrobianos, métodos de diagnóstico e vacinas.

O resultado desse problema de saúde pública vai desde efeitos negativos na terapia clínica até os altos custos do tratamento. O desfecho clínico causado por tratamentos ineficazes e tempo de internação prolongado é o aumento de casos de morbidade e mortalidade (WHO, 2019).

As fases já estabelecidas para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos são esquematizadas na Figura 5.

**Figura 5 – Esquema de etapas de descoberta, produção e testes de agentes farmacoterapêuticos:**



Fonte: WHO, 2019.

Cerca de 78,6% dos testes pré-clínicos em desenvolvimento estão centrados em indústrias farmacêuticas comerciais enquanto apenas 18,6% são desenvolvidos no meio acadêmico. E a distribuição geoespacial dos estudos são majoritariamente localizados na Europa, cerca de 45,5% e, na América do Norte com aproximadamente 35% (WHO, 2019).

A revisão de estudos de testes presentes na fase clínica feita pelo plano de ação contra a resistência antimicrobiana se mostrou ineficiente em números. Além de revelar que a maioria dos antibióticos na fase de teste é resultado de alterações de classes de antibióticos já existentes. Essas modificações são incapazes de solucionar problemas como a multirresistência, ou seja, patógenos apresentando mecanismos de resistência a várias classes de fármacos (WHO, 2017).

### **3.5 Efeito antimicrobiano dos Carbon Dots**

Conforme exposto anteriormente, as infecções bacterianas representam um grande desafio para a saúde, especialmente com o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos, exigindo o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos alternativos. Além do estado fotoexcitado que torna os C-dots nanomateriais fluorescentes, estes também realizam processos redox (reações de oxidação e redução). Tais processos redox foto induzidos tornam os C-dots excelentes candidatos como agentes antibacterianos (DONG et al., 2017; MOHAMAD et al., 2017; MOHAMMED et al., 2016).

No trabalho de Al-Jumaili et al. (2017), o estresse oxidativo das células foi o principal mecanismo de ação proposto para explicar a ação bactericida dos C- Dots. Esse estresse oxidativo das células é causado pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROS). Com a superprodução de EROS pelos C-dots, as células entram em um estresse oxidativo que provoca danos extensos nos componentes celulares. Assim o estresse oxidativo é tido como a chave para a atividade bactericida dos C-dots através da formação de EROS que levam a danos permanentes no DNA e morte celular.

No estudo de Mohamad et al. (2017) foram sintetizados C-dots com a superfície funcionalizada com o composto 2,2 etileno dióxido bis etilamina (EDA-C-dots) com rendimentos quânticos de fluorescência (QY) de 7,5, 17 e 27%. Os resultados do estudo revelaram de forma clara que a função antimicrobiana dos C-dots estava correlacionada com o QY. Assim os C-dots com maior QY demonstraram maior atividade antimicrobiana quando comparados com os C- Dots com menor QY. Os estados fotoexcitados dos C-dots formam processos redox que geram espécies reativas como oxigênio singleto e radicais hidroxila capazes de matar as bactérias. O

teste de atividade antimicrobiana com a bactéria gram positiva *Bacillus subtilis* que foi incubada por 3 horas com os EDA-C-dots com QY de 27% e na concentração de 15,8 mg/mL mostraram uma redução de  $10^6$  UFC/mL para  $10^2$  UFC. Quando o teste foi realizado nas mesmas condições, mas com incubação de 1 hora a redução da carga bacteriana foi menor de  $10^6$  UFC/mL para  $10^4$  UFC/mL, mostrando que o tempo de incubação também é um fator que influencia na atividade antimicrobiana dos C-dots.

No estudo de Dong et al. (2017), os C-dots inibiram o crescimento de *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* e o efeito inibitório foi dependente da concentração de C-dots utilizada. Com a concentração aumentando de 0,5 a 64  $\mu\text{g/mL}$ , os C-dots exibiram aumento da atividade inibitória sobre as bactérias testadas e a concentração dos C-dots que inibiu completamente o crescimento das bactérias *E. coli* e *B. subtilis* foi de 64  $\mu\text{g/mL}$ . Quando os C-dots foram combinados com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , foi observado um efeito antibacteriano sinérgico e a combinação de 10  $\mu\text{g/mL}$  de C-dots com 8,82 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , reduziu significativamente o número de células viáveis de *E. coli*.

No estudo de Thakur et al. (2018), os C-dots foram sintetizados usando goma arábica e então foram utilizados como um veículo carreador do antibiótico ciprofloxacina. A ciprofloxacina foi conjugada com os C-dots formando os Cipro-C-dots. No teste de citotoxicidade celular, os C-dots foram biocompatíveis com as células Vero e as células permaneceram viáveis em todas as concentrações testadas (13-80 mg/mL). A ciprofloxacina livre teve maior citotoxicidade para as células Vero que mostraram 79% de viabilidade na maior concentração testada de 1,2 mM. Já os Cipro-C-dots mostraram menor citotoxicidade para as células Vero em relação à ciprofloxacina livre. As células Vero mostraram 93% de sobrevivência no início do teste com os Cipro-C-dots na concentração de 80 mg/mL e a viabilidade celular foi reduzida para 84% no fim do teste. A diminuição da viabilidade celular ocorreu pela liberação controlada do antibiótico a partir dos C-dots para as células.

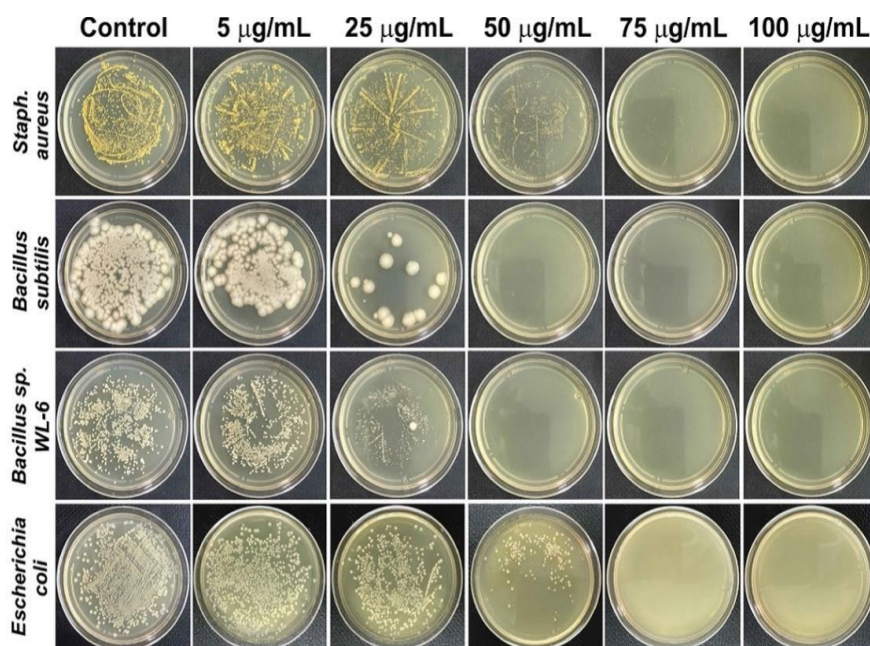
A atividade antimicrobiana dos C-dots, da ciprofloxacina livre e dos Cipro-C-dots foi realizada utilizando as bactérias gram positivas *B. subtilis* e *S. aureus* e as bactérias gram negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* através do método de difusão em poços nas placas de ágar Muller Hinton e a medida do halo de inibição. Os C-dots apresentaram a menor atividade antimicrobiana com halos de inibição de 11 a 14 mm para as bactérias testadas. A ciprofloxacina livre apresentou maior atividade antimicrobiana em relação aos C-dots com halos de inibição de 25 a 31 mm. Já os Cipro-C-dots

apresentaram a maior atividade antimicrobiana com halos de inibição de 25 a 33 mm. Os autores concluíram que os C-dots podem ser utilizados com um veículo carreador de antibióticos como a ciprofloxacina para atuar contra bactérias gram positivas e gram negativas (THAKUR et al., 2018).

No estudo de Jhonsi et al. (2018), os C-dots foram sintetizados a partir de tamarindo e sua atividade antimicrobiana foi testada contra *E. coli* e *C. albicans* usando o método de disco difusão. Os C-dots apresentaram atividade antimicrobiana com halos de inibição de 7-12 mm. E a biocompatibilidade dos C-Dots foi confirmada com um teste in vitro de citotoxicidade com células normais de mioblasto de rato (L6). A viabilidade celular não foi afetada nas maiores concentrações de C-dots testadas (200 µg/mL) por 48 horas.

No trabalho de Li et al. (2018) os C-dots foram sintetizados a partir de vitamina C e foram testados para atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *B. subtilis* e *E. coli*. A atividade antimicrobiana foi dependente da concentração dos C-dots (5, 25, 50, 75 e 100 µg/mL). Para a bactéria *B. subtilis* a concentração bactericida mínima foi de 50 µg/mL. Já para as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, as melhores concentrações bactericidas foram de 100 µg/mL, conforme pode ser visualizado na Figura 6.

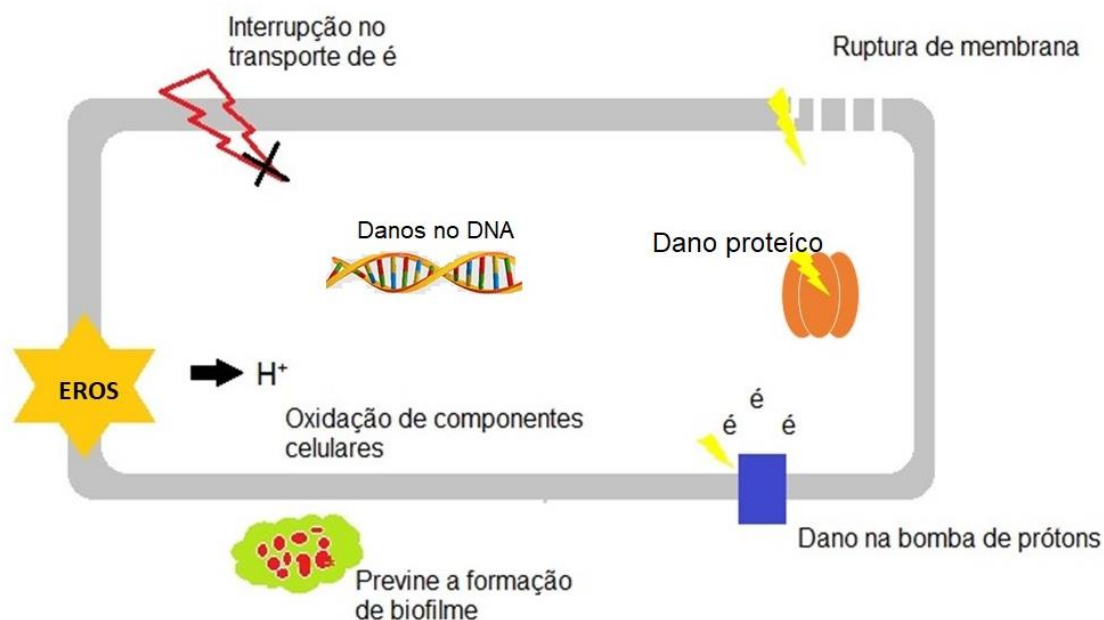
**Figura 6 – Imagens de placas com *S. aureus*, *B. subtilis*, *Bacillus sp.* WL-6 e *E. coli* após tratamento por 24 horas de C-dots (5, 25, 50, 75 e 100 µg/mL)**



FONTE: LI et al., 2018.

Awak et al. (2017) funcionalizaram nanopartículas de carbono com etilenodiamina (EDA). Os resultados do estudo revelaram que a função antimicrobiana dos C-dots-EDA estava correlacionada com o rendimento quântico de fluorescência (QY). Assim os C-dots com maior QY demonstraram maior atividade antimicrobiana quando comparados com os C-dots com menor QY. Os estados excitados dos C-dots formam processos redox que geram espécies reativas de oxigênio (oxigênio singlete e radicais hidroxila) capazes de matar as bactérias. A propriedade ótica apresentada pelos C-dots relacionada ao QY é diretamente afetada por processos de passivação da superfície das nanopartículas com moléculas orgânicas como o EDA, fornecendo a nanoformulação grupos amina que resultam aumento do efeito de fluorescência (LIU et al., 2016).

**Figura 7 – Diferentes mecanismos de atividade antimicrobiana apresentados por nanopartículas a partir da produção de Espécies Reativas de Oxigênio:**



Fonte adaptado de: BAPTISTA et al., 2018

A atividade antimicrobiana apresentada pelos C-dots baseia-se em mecanismos resultantes do processo estresse oxidativo como: a desestabilização da estrutura celular, geração de espécies reativas de oxigênio, fragmentação e condensação do DNA bacteriano e lise celular, resultando no extravasamento do conteúdo intracelular, conforme apresentado pela figura (BING et al., 2016).

### **3.6 Microrganismos de importância clínica e a necessidade de novas terapias antimicrobianas**

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcaceae, são bactérias Gram positivas, imóveis, agrupadas em massas irregulares ou cachos de uva, anaeróbias facultativas e catalase positivas. Os *Staphylococcus aureus* são coagulase positivos, beta-hemolíticos e fermentadores de manitol. Apesar de serem classificados como microrganismos mesófilos, demonstram crescimento em temperaturas entre 7,0 e 47,8°C (TORTORA, 2012).

*Staphylococcus aureus* é um importante agente etiológico de diversas infecções. Cerca de 30-40% da população humana porta *S. aureus* na orofaringe e na pele, este patógeno pode produzir infecções oportunistas em pacientes sob situações de risco, como no caso de internações hospitalares, procedimentos invasivos e imunossupressão. Nestes casos, esta bactéria pode causar diferentes processos infecciosos, desde uma infecção cutânea até uma infecção sistêmica grave (TORTORA, 2012).

A partir da década de 70, o *S. aureus* passou a ser um patógeno emergente nas infecções hospitalares, pois as cepas isoladas apresentavam resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (TOHIDPOUR et al., 2010). As cepas com este perfil de resistência foram denominadas de MRSA (*Methicillin Resistance Staphylococcus aureus*). Houve rápida disseminação das cepas MRSA nos ambientes hospitalares e estas se apresentaram sensível apenas aos glicopeptídeos vancomicina e teicoplanina, que são nefrotóxicos (ZUO et al., 2008). Nos últimos 10 anos, as cepas de MRSA, que eram restritas ao ambiente hospitalar, passaram a ser isoladas em pacientes com infecção de pele na comunidade, sem relato de internação nos últimos meses. Esta nova cepa foi denominada de CA-MRSA (*Community-associated MRSA*)



(BENOIT et al., 2008).

A bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) pertence à família *Enterobacteriaceae*. É um microrganismo anaeróbio facultativo, bacilo gram negativo, não forma esporos e possui flagelos peritríquios que possibilitam sua locomoção (RASHEED et al., 2014). A bactéria *E. coli* pode estar presente em todos os alimentos de origem vegetal ou animal, em especial os que não tenham sido processados. Segundo Alves (2012), principalmente, alimentos crus de origem animal, são contaminados frequentemente com bactérias *E. coli*. Estas também têm sido encontradas em águas e solos que tenham recebido contaminação fecal recente (ROVERI; MUNIZ, 2016).

Devido a essa frequência de contaminação, a *E. coli* é uma bactéria que facilmente entra em contato com seres humanos e animais, sendo considerada uma das principais bactérias que constituem a microbiota intestinal dos mesmos. Acredita-se que a maioria dos sorotipos de *E. coli* sejam desprovidos de fatores de virulência, não apresentando danos ao seu hospedeiro. Entretanto, alguns sorotipos adquiriram, durante seu processo evolutivo, diferentes conjuntos de genes que lhes proporcionaram a capacidade de ocasionarem doenças. Esses são denominados sorotipos de *E. coli* patogênicas (RASHEED et al., 2014).

Essa patogenicidade é manifestada por um mecanismo multifatorial e complexo que envolve vários fatores de virulência. A combinação desses fatores possui um papel decisivo para a patogenicidade da bactéria. Com base nestes fatores de virulência e nos mecanismos de ação e patogenicidade, essas bactérias foram classificadas nos seguintes patótipos: enteropatogênicos (EPEC), enterotoxigênicos (ETEC), enteroinvasivos (EIEC), enterohemorrágicos (EHEC), enteroagregativos (EAGGEC), uropatogênicos (UPEC) e meningite neonatal (MNEC) (GOMES; MARTINEZ, 2017).

A *E. coli* possui predisposição para transferência de genes de resistência devido à quantidade de suas cepas e a capacidade de sobrevivência dentro e fora do trato gastrointestinal dos homens e dos animais (GOMES; MARTINEZ, 2017). A resistência pode resultar em um aumento na virulência das cepas em decorrência da aquisição de novos genes (GONÇALVES; ANDREATTI FILHO, 2010). A resistência bacteriana apresentada pela *E. coli* faz dessa bactéria o principal patógeno responsável por infecções nosocomiais. A principal forma apresentada de resistência é a ESBL (Beta-lactamase de Espectro Extendido). O principal mecanismo de resistência está relacionado com a produção de betalactamases, enzimas que

hidrolisam os anéis  $\beta$ -lactâmicos das penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (REVISTA ESPAÑOLA DE QUIMIOTERAPIA, 2011).

Diante do cenário catastrófico envolvendo o crescente número de microrganismos com resistência antimicrobiana, aumenta-se a urgência no desenvolvimento de pesquisas associadas a descoberta de novas classes de antibióticos, novos alvos de ligação entre fármaco-sistema biológico ou novos mecanismos de ação (THEURETZBACHER, 2017).

Os avanços na nanomedicina em relação a aplicação farmacêutica baseiam-se nos estudos de nanomateriais com propriedades específicas e potencial bactericida, especialmente as nanopartículas metálicas (SOENEN et al., 2015) Os *Carbon dots* apresentam vantagens como tamanho, propriedade de funcionalização a outros grupos (hidroxil, carboxil, aminas), grande área de superfície, vários métodos de síntese e precursores de carbono, por exemplo: ácido cítrico, glicose, citrato de amônia, entre outros (ZHENG et al., 2014).

A ação antimicrobiana apresentada pelos C-dots é mediada especialmente pela carga da superfície, influenciando na capacidade da interação entre nanopartícula e membrana bacteriana. Nanopartículas com carga positiva não apresentam ação em células de mamíferos, contrário do apresentado por células bacterianas, ou seja, o desenvolvimento de nanopartículas de carbono apresenta especificidade em relação a sua estrutura-atividade. Assim, os C-dots apresentam-se como um excelente alvo para estudos envolvendo a nanotecnologia e a medicina (ANAND et al., 2019).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

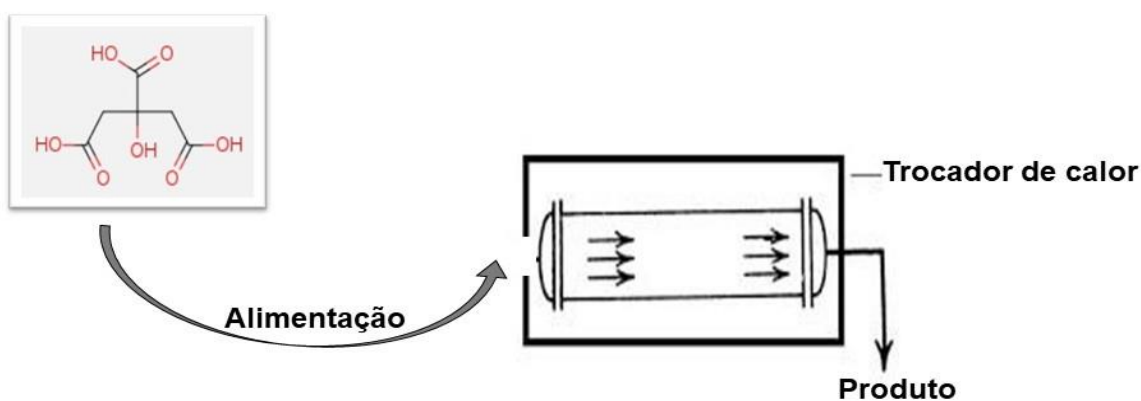
### 4.1. Síntese das nanopartículas de carbono (C-dots), das nanopartículas de carbono com cobre (Cu-NP) e das das nanopartículas de carbono com óleo essencial de cravo-da-índia (OECr-NP)

O processo de síntese das nanopartículas de carbono (C-dots) e suas diferentes aplicações foram submetidos e depositados no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) (**Anexo 1**). O processo de síntese das nanopartículas foi explicado de forma sucinta, respeitando os direitos conferidos aos inventores. A síntese das nanopartículas foi feita no Laboratório de Inorgânica de Materiais localizado no Instituto de Química da Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro (LIMA – UNB/IQ). As etapas de obtenção das nanopartículas foram divididas em:

- 1- Síntese das nanopartículas;
- 2- Purificação das nanopartículas;
- 3- Funcionalização das nanopartículas de carbono (C-dots) com cobre (Cu-NP) e com óleo essencial de cravo-da-índia (OECr-NP).

A fonte de carbono utilizada neste estudo foi o ácido cítrico e o esquema da síntese dos C-dots está apresentado na Figura 8.

**Figura 8 - Síntese dos carbon dots a partir do ácido cítrico.**



Fonte: próprio autor.

Em termos gerais os C-dots foram sintetizados a partir do ácido cítrico em reator mantendo pressão constante e temperatura entre 150 e 250°C, com tempo de reação de 2 h. O reator utilizado na síntese possibilitou pressão constante e estável, resultando num rendimento de síntese de aproximadamente 95%, com tempo de reação de 2 h.

Na etapa de síntese dos *carbon dots*, adicionou-se ao reator hidróxido de amônia, como fonte de nitrogênio. A etapa de purificação consistiu em centrifugação a 10.000 rpm e, posterior filtração da amostra para retirar da solução sais e partículas não nanométricas, através dos microfiltros de seringa com poros de 0,22µm.

Já o processo de alteração da superfície dos *carbon dots* por meio da passivação do cobre e do óleo essencial de cravo, ocorreu por meio da ligação entre os grupos funcionais pertencentes as nanopartículas com grupos funcionais do OECr e do Cu<sup>2+</sup>. A etapa de modificação da superfície foi feita usando métodos de agitação em temperatura constante e sistema de reator com fluxo contínuo e temperatura constante.

## **4.2. Métodos de caracterização química das nanopartículas de carbono, nanopartículas de carbono com cobre (Cu-NP) e das nanopartículas de carbono com óleo essencial de cravo-da-índia (OECr-NP)**

### **4.2.1. Determinação de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

Os espectros de FTIR dos materiais foram obtidos em um espectrômetro do Laboratório de Química Instrumental da Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília. As análises foram obtidas a partir das amostras sólidas. Estas foram diluídas em KBr previamente seco em estufa, na proporção de 1:10 (amostra: KBr, m/m) e maceradas com auxílio de gral e almofariz. E então analisaram-se as amostras pastilhadas de KBr no equipamento IRPrestige-21 (Shimadzu).

#### **4.2.2. Determinação de espectroscopia de fluorescência**

Os espectros de fluorescência foram obtidos a partir de soluções aquosas dos materiais ( $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm, usando-se um espectrômetro Fluorolog (Horiba) no Instituto de Química da Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, variando o espectro de emissão a partir da faixa de excitação em 310-500 nm, alterando em 10 e 10 nm.

#### **4.2.3. Determinação do potencial zeta**

Os potenciais zeta das amostras foram medidos em um Zetasizer nano ZS (Malvern Panalytical) no Laboratório de Química Instrumental da Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília, usando 2 mL de soluções aquosas ( $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), em célula capilar descartável (DTS1070), temperatura de  $25^\circ\text{C}$  e pH de 5,8. Analisou-se o tamanho e potencial zeta das amostras.

### **4.3. Avaliação da atividade antimicrobiana das nanopartículas de carbono com cobre (Cu-NP) e das nanopartículas de carbono com óleo essencial de cravo-da-índia (OECr-NP)**

Os testes de avaliação de atividade antimicrobiana das nanopartículas (Cu-NP e OECr-NP) foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Faculdade LS sob a supervisão do Prof. Msc. Daniel Oliveira Freire.

#### **4.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A determinação da CIM foi realizada de acordo com CLSI (2015). Os inóculos utilizados foram cepas de bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922. As cepas de cada bactéria foram semeadas em placas Petri estéreis contendo Ágar Mueller-Hinton e incubadas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h. O semeio das placas foi realizado pela técnica esgotamento em estrias para obter colônias isoladas.

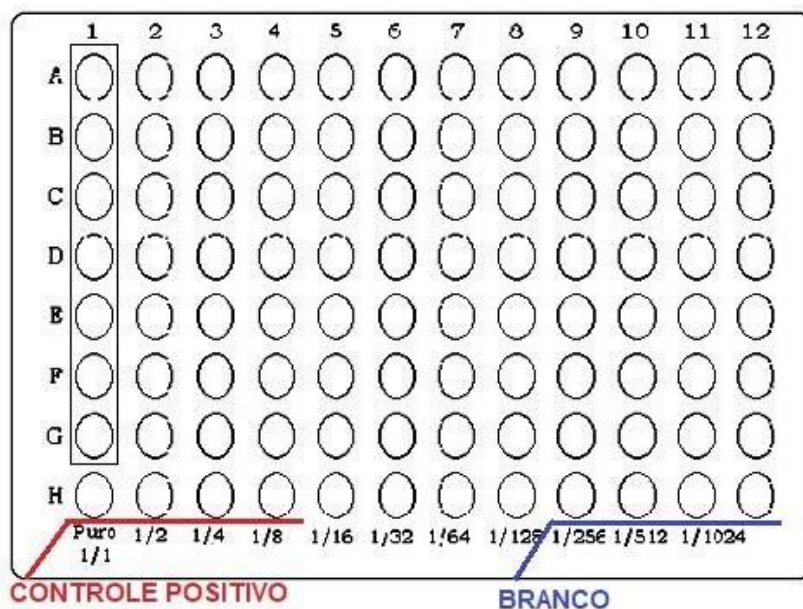
Após o crescimento dos microrganismos, fez-se a suspensão direta do crescimento microbiano em solução salina estéril a 0,85%, com turvação equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland ( $1,0 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$ ) sendo ajustada entre 0,08 – 0,10 de densidade óptica a 530 nm em espectrofotômetro. Foram realizadas diluições das

culturas na concentração de 0,5 na escala de Mc Farland na ordem de 1:150, resultando em uma concentração de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL.

A microdiluição das nanopartículas (Cu-NP e OECr-NP) foi realizada em em caldo Mueller-Hinton em placas de 96 poços, estéreis, descartáveis e de fundo chato. Essa técnica consiste em diluições seriadas das nanopartículas resultando em diferentes concentrações das amostras antimicrobianas nos poços. Após a microdiluição seriada das nanopartículas (Cu-NP e OECr-NP), o volume dos poços consistiu de 200  $\mu$ L, sendo 100  $\mu$ L das diferentes concentrações de nanopartículas e 100  $\mu$ L do inóculo na concentração de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL, que foi diluído e ficou com uma concentração final de bactérias de  $5,0 \times 10^5$  UFC/mL. Como controle positivo (com crescimento das bactérias) foi utilizado 20  $\mu$ L do inóculo na concentração de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL e 180  $\mu$ L de caldo Mueller-Hinton. Como controle negativo (inibição do crescimento das bactérias) foi utilizado 200  $\mu$ L de caldo Mueller-Hinton.

O método esquematizado na Figura 8 tem a finalidade de determinar a concentração necessária de amostra capaz de inibir 50% do crescimento microbiano, esse dado é chamado de Concentração Inibitória Mínima (CIM).

**Figura 9 – Representação da placa de 96 poços (microdiluição)**



Fonte: GAMBERO et al. (2004).

As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e para a determinação da CIM a leitura de turbidez de cada poço foi realizada através de um leitor de microplacas de

ELISA (marca Celer, modelo Polaris) no comprimento de onda de 630nm. Os valores de absorvância foram utilizados para a obtenção da porcentagem de inibição através da equação descrita abaixo:

**Equação 1: Determinação do valor da inibição do crescimento microbiano para análise estatística:**

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(abs \times 100)}{(abs \text{ controle positivo})} - 100$$

Ainda realizou-se o ajuste dos valores de absorvância de cada poço subtraindo os valores referentes a absorvância do caldo Mueller-Hinton e do poço vazio. Descontando então os interferentes na leitura das placas, visto que tanto a placa vazia quanto o meio de cultivo apresentaram valores de absorvância diferentes de zero.

Considerou-se então o valor de CIM como a menor concentração das nanopartículas (Cu-NP e OECr-NP) capazes de inibir 50% do crescimento microbiológico. A análise da inibição se deu através do programa estatístico Graphpad Prism versão 7, utilizado para estabelecer o valor da concentração inibitória mínima e o valor de correlação a 95%.

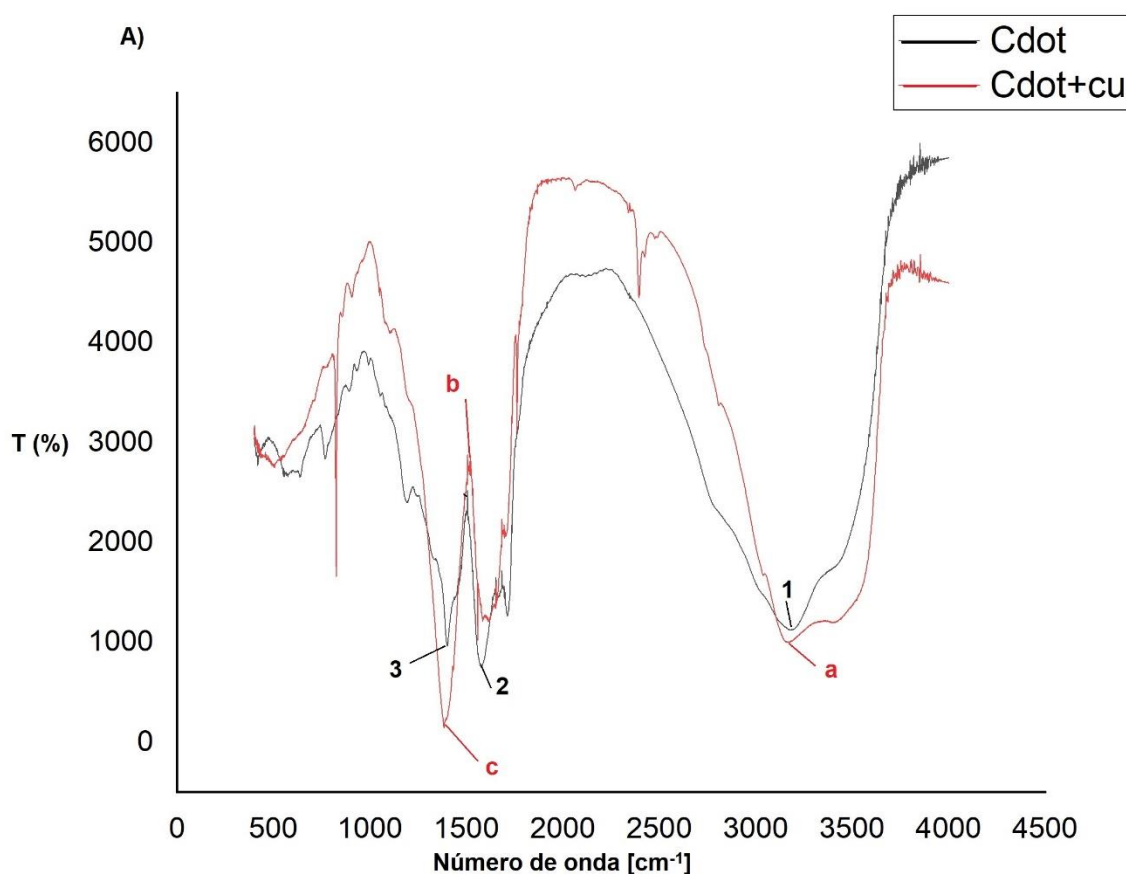
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Testes de caracterização química das nanopartículas (C-dots), das nanopartículas de carbono com cobre (Cu-NP) e das nanopartículas de carbono com óleo essencial de cravo-da-índia (OECr-NP)

#### 5.1.1. Espectroscopia na região do infravermelho – FTIR

A presença de grupos funcionais foi avaliada por meio de FTIR e os principais grupos encontrados correspondem aos esperados nas nanopartículas de carbono, indicando a presença de grupos funcionais (Figura 10).

**Figura 10– A) Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier de C-dots e Cu-NPs**

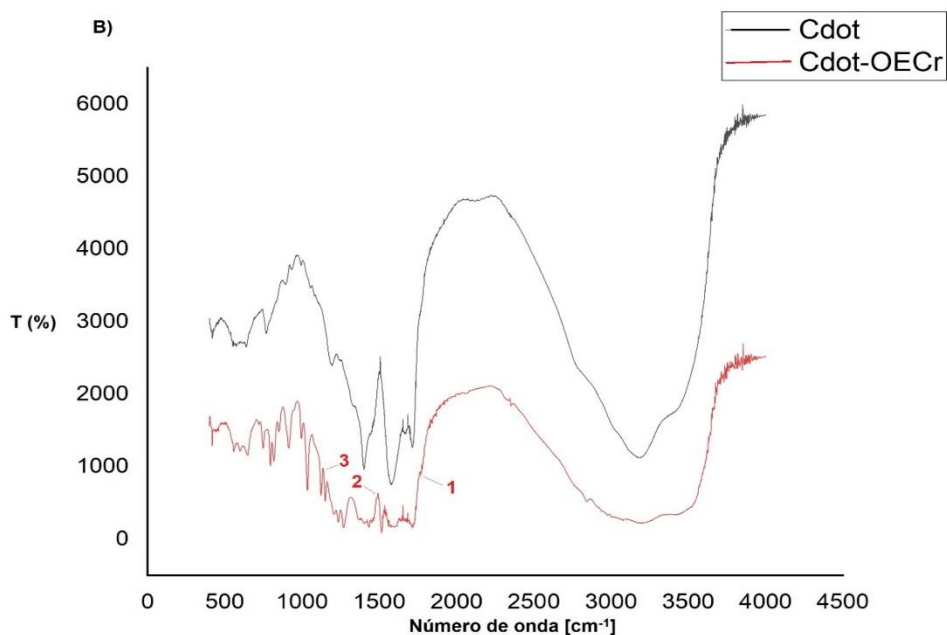




O espectro apresentado pelo C-dots apresenta movimentação por deformação ( $\sim 1340\text{ cm}^{-1}$ ) e estiramento ( $\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ ). O pico identificado como **1** ( $3187\text{ cm}^{-1}$ ) é característico de estiramento, de O-H, N-H, C-H que apresentam comprimento de 3650 a  $2600\text{ cm}^{-1}$  e faixa de leitura de banda entre  $3000$  e  $3200\text{ cm}^{-1}$ , indica a presença de dobramento amina. Já o pico **2** ( $1574\text{ cm}^{-1}$ ) é significativo para ligações duplas de C=O, C=N, C=C e N=O e vibração por estiramento. Possivelmente a ligação é de C=C, visto que a absorção não é intensa se comparada com picos de C=O. O pico correspondente a **3** ( $1392\text{ cm}^{-1}$ ) é de uma ligação simples entre C-C, C-O, C-N.

O espectro de emissão das Cu-NPs da figura 10 B), apresenta em sua maioria, picos paralelos quando comparado a figura A. No entanto em alguns picos apresenta o acréscimo de  $20\text{ cm}^{-1}$  ou diminuição de  $15\text{ cm}^{-1}$ . Também apresenta espectro com movimentação de deformação e estiramento, com semelhança no comprimento de onda representado. O pico **a** ( $1517\text{ cm}^{-1}$ ) pode ser referente a uma ligação N=O, o pico **b** ( $3167\text{ cm}^{-1}$ ) é das ligações O-H por estiramento, sinal de grupo carboxílico na superfície. Já o pico **c** em ( $1377\text{ cm}^{-1}$ ) indica provável ligação C-H, de grupo alifático.

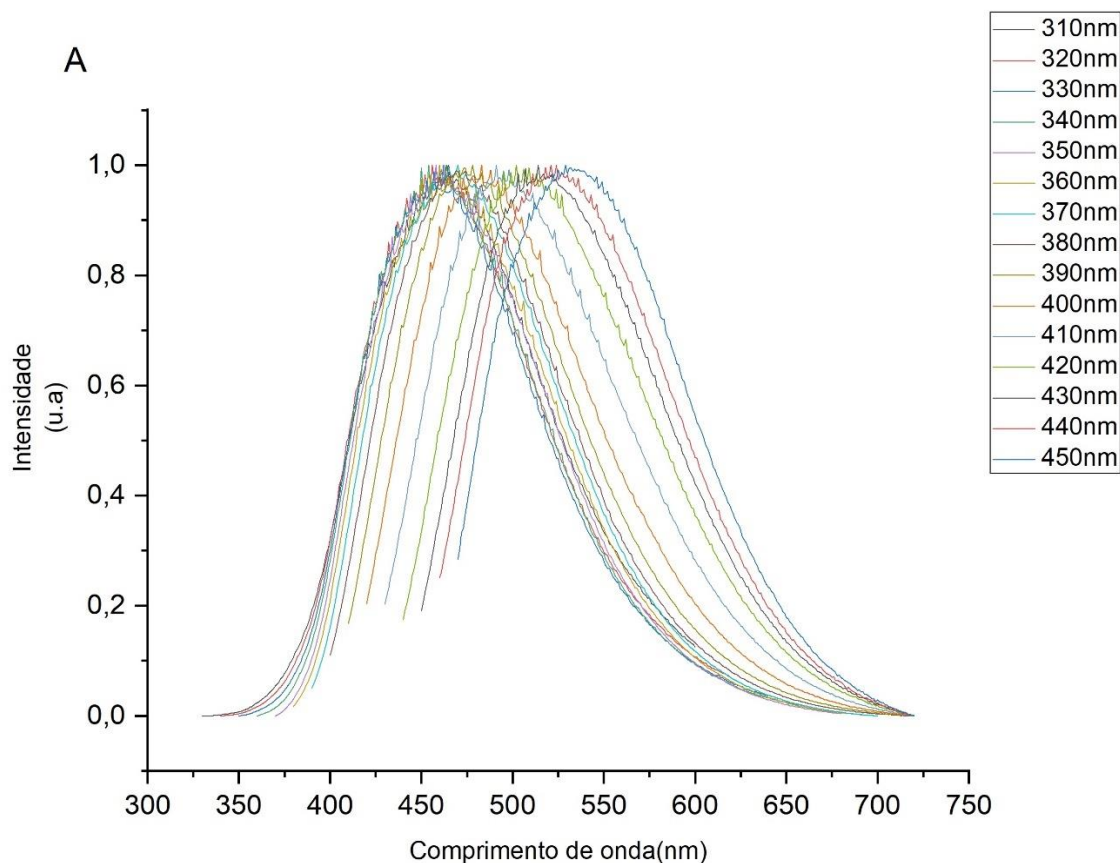
**Figura 10b –Espectro de FT-IR da amostra OECr-NP:**



A Figura 10b. apresentada logo abaixo, indica o espectro de infravermelho das OECr-NP. É possível identificar ligação C-H no pico **1** ( 2800 cm<sup>-1</sup>) por estiramento e anel aromático -O-C, por estiramento correspondendo ao pico **3** (1141cm<sup>-1</sup>). Já o pico identificado por **2** no valor de 1500 cm<sup>-1</sup> corresponde a ligação C=C do grupo aromático com modo de vibração de estiramento. Essa vibração corresponde ao eugenol, presente em grande quantidade no óleo essencial de cravo-da-índia e com ação antisséptica (MARCHESE et al., 2017).

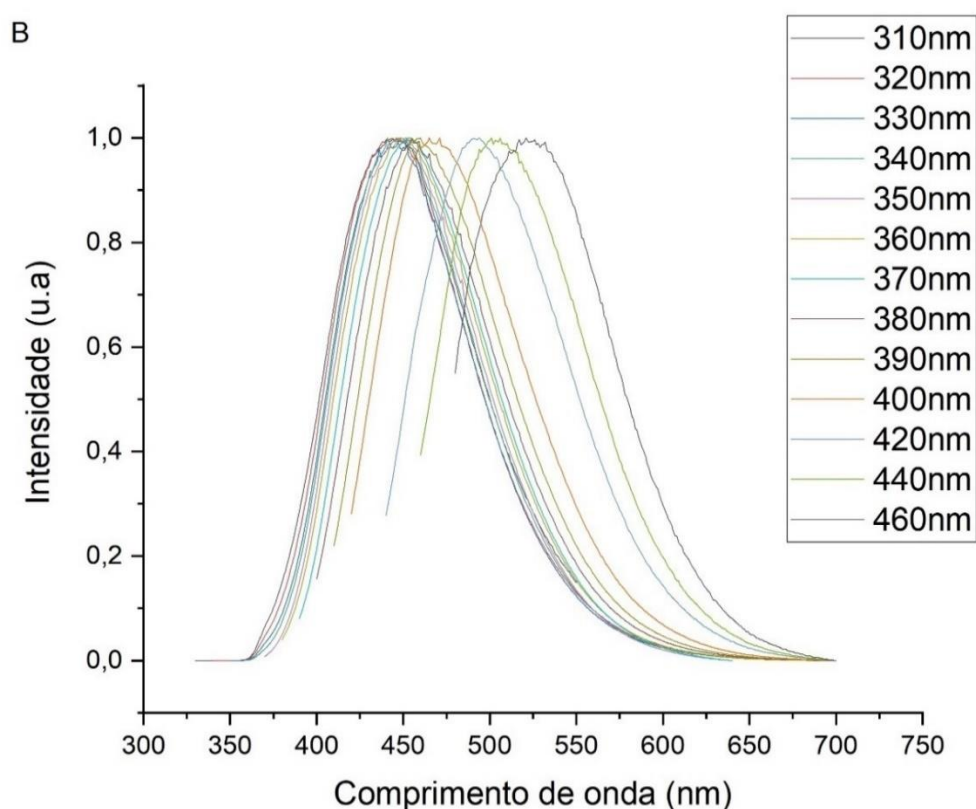
### 5.1.2. Espectro de fluorescência

**Figura 9 - Espectros de fluorescência obtidos a partir do espectrofluorimetro, sob comprimento de excitação variando de forma progressiva de 310 nm a 460 nm. A) Espectro de emissão de C-dots; B) Espectro de emissão de Cu-NPs:**



Os espectros de fluorescência obtidos para as nanopartículas de carbono (C-dots) e nanopartículas de carbono com cobre (Cu-NP) estão apresentados na Figura 9. A análise foi normalizada para facilitar a observação do deslocamento do comprimento para o vermelho. A amostra de C-dots excitada em 310 nm emitiu maior pico em 462 nm dentro do comprimento da luz no azul e a emissão do Cu-NP quando excitado em 310 nm foi em 454 nm também dentro do comprimento do azul. A variação do comprimento máximo de emissão, em diferentes comprimentos de excitação na amostra de C-dots foi de 10 nm. Enquanto na amostra de Cu-NP observou-se uma variação de emissão em 12 nm. O espectro de emissão

apresentado na amostra de C-dots foi de 462 a 396 nm e na amostra de de Cu-NP foi de 453 a 380 nm. E por meio da visualização é possível verificar que os perfis de emissão dependem do comprimento de excitação. Ambos os espectros de emissão observados nas duas amostras apresentaram sobreposição mesmo em excitações diferentes, indicando a presença de cromóforos diferentes. Na maioria das nanopartículas de carbono a fluorescência mais intensa é na região do violeta e azul (YANG et al., 2013), sendo compatível com os resultados encontrados nesse trabalho.



Embora os mecanismos luminescentes dos C-dots não sejam totalmente compreendidos, estes mecanismos provavelmente se devem ao efeito quântico, aos estados de superfície e a recombinação do par elétron-buraco (TUERHONG; XU; YIN, 2017). Bao et al. (2011) descobriram que C-dots preparados em seu estudo tinham diferentes graus de oxidação. Os C-dots com baixo grau de oxidação exibiram uma emissão de fluorescência na cor azul, enquanto os C-dots com alto grau de oxidação emitiram uma fluorescência na cor verde, assim, foi possível concluir que os estados de superfície influenciam em suas propriedades luminescentes. Os resultados

apresentados das amostras fluorescência no comprimento de onda da luz azul, conferem a amostra baixo grau de oxidação, explicação para atividade antimicrobiana moderada, conforme explicado mais a frente.

### 5.1.3. Potencial zeta

A Tabela 1 apresenta o resultado das análises obtidas por meio do equipamento Zetasizer que determinou os parâmetros de tamanho, potencial zeta e condutividade das nanopartículas de carbono associadas com cobre, por meio do espalhamento dinâmico da luz,

**Tabela 1 - Tamanho, potencial zeta e condutividade das nanopartículas de carbono com cobre (Cu-NP) em três leituras:**

<b>Cu-NP</b>	<b>Tamanho (r.nm)</b>	<b>Potencial zeta (mV)</b>	<b>Condutividade (mS/cm)</b>
<b>1</b>	319,8	-16,0	0,0733
<b>2</b>	367,5	-16,9	0,0742
<b>3</b>	343,9	-18,0	0,0730
<b>Desvio Padrão</b>	19,473	0,817	0,00051

O potencial zeta determina principalmente a carga superficial de estruturas químicas. Verificou-se que o potencial zeta medido em pH 5,8 foi de -16,0, -16,9 e -18,0 mV, mostrando a presença de carga negativa na superfície das nanopartículas. Potenciais negativos indicam a presença de grupos funcionais oxigenados na superfície. Esta carga negativa torna as nanopartículas solúveis em meio aquoso e previne a agregação por repulsão eletrostática. Além disso, prevê a eficácia de internalização celular, visto que nanopartículas com grupos funcionais de superfície carregados favorecem interações eletrostáticas com as membranas celulares (VERMA; STELLACCI, 2010).

O Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering – DLS*), é a técnica comumente utilizada para determinar o tamanho, se baseia na medição de nanopartículas suspensas em movimento browniano aleatório, alterando o índice de

refração. Os valores obtidos pela variação são convertidos em tamanho e distribuição de tamanho, por meio da equação de Stokes-Einsten. (HOO; STAROSTIN; WEST; MECARTNEY, 2008)

No estudo de Bing et al. (2016), baseado numa série de experimentos bioquímicos e de caracterização, os autores reportaram que os C-dots sem carga não tem efeitos bactericidas enquanto os C-dots carregados positiva ou negativamente podem induzir a apoptose das bactérias. No trabalho de Chatterjee et al. (2014), os autores estudaram o mecanismo de morte celular de *E. coli* provocado por nanopartículas de cobre (CuNPs). A membrana celular de *E. coli* foi despolarizada pelo tratamento com as CuNPs e o grau de despolarização dependeu da concentração das NPs utilizadas. O potencial normal da membrana de *E. coli* foi de -184,5 mV e diminuiu para - 105 e - 75 mV quando tratado com 3,0 e 7,5 mg/mL de CuNPs. Assim, um dos mecanismos de ação bactericida das CuNPs foi a a dissipação do potencial da membrana celular, levando a formação de filamentos celulares. Filamentação é definido como um crescimento anômalo das bactérias que continuam a alongar-se com múltiplas cópias de cromossomos, não ocorrendo a divisão celular.

## **5.2. Avaliação da atividade antimicrobiana das nanopartículas de carbono com cobre (Cu-NP) e das das nanopartículas de carbono com óleo essencial de cravo-da-índia (OECr-NP)**

Os resultados dos testes de avaliação antimicrobiana das nanopartículas de carbono com óleo essencial de cravo-da-índia (OECr-NP) e das nanopartículas de carbono com cobre (Cu-NP) estão apresentados nas Tabelas 3 e 4. A menor concentração apresentada pela nanopartícula capaz de produzir uma inibição do crescimento bacteriano em 50% foi denominada como concentração inibitória mínima (CIM<sub>50%</sub>). O parâmetro estatístico utilizado para avaliação da atividade antimicrobiana foi o IC<sub>95%</sub>, que significa o intervalo de confiança.

**Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima das nanopartículas de carbono com óleo essencial de cravo-da-índia (OECr-NP) em cepas de *S. aureus* e *E.coli***

	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
<b>CIM<sub>50%</sub> (mg/L)</b>	1,168	1,019	0,988	0,967
<b>IC<sub>95%</sub></b>	0,813-1,466	0,889-1,148	0,935-1,040	0,917-1,017
<b>R<sup>2</sup></b>	0,942	0,963	0,972	0,978

**Tabela 3 – Concentração Inibitória Mínima das nanopartículas de carbono com cobre (Cu-NP) em cepas de *S. aureus* e *E.coli***

	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
<b>CIM<sub>50%</sub> (mg/L)</b>	1,124	1,121	0,987	1,019
<b>IC<sub>95%</sub></b>	0,813-1,466	0,889-1,148	0,935-1,040	0,917-1,017
<b>R<sup>2</sup></b>	0,955	0,973	0,940	0,979

O estudo apresentado por Aligiannis et al. (2001) classificou a ação antimicrobiana de acordo com os valores de CIM. Os resultados de CIM < 0,5 mg/mL significam excelentes agentes inibidores da atividade antimicrobiana. Já valores de CIM entre 0,6 a 1,5 mg/mL possuem ação moderada, enquanto amostras com inibição acima de 1,6 mg/mL apresentam fraca atividade antimicrobiana. O presente estudo apresentou para as OECr-NP valor de inibição de 1,019 a 1,168 mg/mL para *S. aureus* e 0,967 a 0,989 mg/mL para *E. coli*. Já para as Cu-NP, os valores obtidos para inibição de *S. aureus* foram de 1,121 a 1,124 mg/mL e para *E. coli* os valores foram de 0,987 a 1,019 mg/mL, mostrando então que ambas as nanopartículas apresentaram atividade antimicrobiana moderada. Ambos os testes de atividade antimicrobiana foram estatisticamente significativos e reprodutivos, levando-se em conta o valor de correlação (R<sup>2</sup>) acima de 0,9.

As CIMs apresentadas nas Tabelas 3 e 4 apresentaram variação de acordo com a bactéria testada. Os valores de CIM para a bactéria gram-positiva *S. aureus* foram levemente maiores do que os valores de CIM apresentados para a bactéria gram-negativa *E. coli*, podendo-se inferir que os valores de inibição obtidos variam devido a diferença de estrutura morfológica entre os microrganismos.

A nanopartícula de carbono associada com óleo essencial de cravo teve ação inibitória moderada tanto para microrganismos gram negativos quanto gram positivos. No presente estudo o óleo essencial de cravo foi utilizado na concentração de 3% v/v para ser passivado com os C-dots, resultando nas Cu-NP. O estudo desenvolvido por Lima et al. (2017) baseou-se no ensaio biológico de um filme de PVC associado com óleo essencial de cravo (OECr). O inóculo testado de *E.coli* foi adicionado ao filme com OECr e colocado em estufa a 37°C por 24 h. Os resultados mostraram que o OECr a 15% incorporado no filme de PVC teve efeito bactericida sobre a bactéria *E.coli*.

No estudo de Raffi et al. (2010) foi observado em microscopia eletrônica de varredura que a interação das nanopartículas de cobre com *E. coli* resultou na formação de cavidades nas parede celular dessas bactérias. A propriedade antibacteriana das nanopartículas de cobre foi atribuída principalmente à adesão das nanopartículas de cobre nas bactérias por causa de suas cargas elétricas opostas, resultando em uma redução de reação na parede celular bacteriana. A superfície da bactéria *E. coli* é composta por grupos hidroxílicos nas estruturas dos lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular. Dessa forma, a partir da liberação de nanopartículas de cobre, íons  $2^+$  se ligam ao -OH e aos LPS. Chatterjee et al. (2014) também estudaram o mecanismo de morte celular de *E. coli* provocado por nanopartículas de cobre (Cu-NPs). As Cu-NPs causaram múltiplos efeitos tóxicos nas células de *E. coli* como geração de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e degradação do DNA.

Chatterjee et al. (2012) analisou a atividade antimicrobiana oferecida pela nanopartícula de cobre sintetizada a partir da redução do cloreto de cobre ( $\text{CuCl}_2$ ). Os valores apresentando da inibição de crescimento para *E. Coli* foi de  $3,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e, para *S. Aureus*, valor de  $4,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Dessa forma, os resultados confirmam um nanomaterial com capacidade de utilização para processos de esterilização e como um substituinte de antibacterianos já utilizados, visto que esse nanomaterial apresentou concentrações menores quando comparadas com antimicrobianos já padronizadas.



## 6. CONCLUSÃO

No presente trabalho os C-dots foram sintetizados com êxito a partir de uma técnica inovadora e foram submetidos a passivação com elementos químicos (cobre, Cu-NP) e moléculas orgânicas complexas (óleo essencial de cravo-da-índia, OECr-NP). Os estudos de caracterização química mostraram que a carga negativa na superfície das nanopartículas as tornaram solúveis em meio aquoso, além de prevenir a agregação por repulsão eletrostática. Os espectros de fluorescência obtidos para C-dots e Cu-NP mostraram maior fluorescência no comprimento da luz azul. A análise feita através do Espectro de FTIR indicou a presença de grupos funcionais, os principais esperados nas nanopartículas de carbono. A principal aplicação proposta para as nanopartículas nesse trabalho foi avaliação da sua atividade antimicrobiana. Para as OECr-NP os valores de CIM foram de 1,019 a 1,168 mg/mL para *S. aureus* e 0,967 a 0,989 mg/mL para *E. coli*. Já para as Cu-NP, os valores de CIM foram de 1,121 a 1,124 mg/mL para *S. aureus* e de 0,987 a 1,019 mg/mL para *E. coli*, mostrando que as nanopartículas apresentaram atividade antimicrobiana moderada. Através da avaliação de atividade antimicrobiana de cepas de diferentes classificações variando sua estrutura mostrou resultados significativos que não representam variação estatística significativa, é possível acrescentar expectativas de uso para a nanopartícula em questão com amplo espectro de ação. Não apresentando limitações relacionadas ao possível mecanismo de ação e suas futuras aplicações. Assim, os resultados deste estudo demonstraram a possibilidade de utilização das nanopartículas de carbono associadas ao cobre e ao óleo essencial de cravo como agentes antimicrobianos para uso biológico e ambiental.

## 7. PERSPECTIVAS

Para que as nanopartículas de carbono associadas ao cobre e ao óleo essencial de cravo possam ser utilizadas como agentes antimicrobianos existe a necessidade de estudos complementares como:

- A realização de estudos relativos à citotoxicidade
- Determinação da CIM para outras cepas ATCC
- Realização de novos testes de caracterização como: potencial zeta correlacionado ao pH, Uv- vis.
- Desenvolvimento de outras aplicações como testes com aplicação agropecuária, visto que a é usual a utilização de cobre por produtores de carne, justificada por sua ação herbicida, fungicida, inseticida.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 9, p.4168-4170, 2001.

AL-JUMAILI, A.; ALANCHERRY, S.; BAZAKA, K.; JACOB, M. V. Review on the antimicrobial properties of carbon nanostructures. **Materials**, v.10, n. 1066, p. 2-26. 2017.

ALVES, A. R. **Doenças alimentares de origem bacteriana**. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.

ANAND, A.; UNNIKRISSHANNAN, B.; WEI, S-C.; CHOU, C. P.; ZHANG, LI-ZHI; H., CHIH, C. Graphene oxide and carbon dots as broad-spectrum antimicrobial agents – a minireview. **Nanoscale Horizons**, v. 4, n. 1, p.117-137, 2019.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Relatório do monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil**: Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango. 1.ed. Brasília, 2012. 171 p.

ATABAEV, T. Doped Carbon Dots for Sensing and Bioimaging Applications: A Minireview. **Nanomaterials**, v. 8, n. 5, p.342-352, 2018.

AWAK, M. M. A.; WANG, P.; WANG, S.; TANG, Y.; SUN, Y-P.; YANG, L. Correlation of carbon dots' light-activated antimicrobial activities and fluorescence quantum yield. **Rsc Advances**, v. 7, n. 48, p.30177-30184, 2017.

BAKER, S. N.; BAKER, G. A. Luminescent Carbon Nanodots: emergent nanolights. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 38, p.6726-6744, 2010.

BAO, L., et al. Electrochemical Tuning of Luminescent Carbon Nanodots: From Preparation to Luminescence Mechanism. **Advanced Materials**, v. 23, p. 5801–5806, 2011.

BARKALINA, N. et al. Nanotechnology in reproductive medicine: Emerging applications of nanomaterials. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 10, n. 5, p. e921–e938, 2014.

BATISTA, Ariane de Jesus Sousa; PEPE, Vera Lúcia Edais. Os desafios da nanotecnologia para a vigilância sanitária de medicamentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S.L.], v. 19, n. 7, p. 2105-2114, jul. 2014.

BENOIT, S. R. Community strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* as potential cause of healthcare-associated infections, Uruguay, 2002-2004. **Emerging Infectious Diseases**. v.14, n.8. p. 1216-1222, 2008.

BING, W.; SUN, H.; YAN, Z.; REN, J.; QU, X. Programmed bacteria death induced by Carbon Dots with different surface charge. **Small**, v. 12, n. 34, p. 4713-4718, 2016.

CALDEIRA, A. et al. Nanotecnologia: inovação para a competitividade na cadeia produtiva têxtil brasileira. **Revista Eletrônica de Estratégia & Negócios**, v. 8, n. 3, p.146-171, 2016.

CANCINO, J.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTTO, V. Nanotechnology in medicine: concepts and concerns. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 521–526, 2014.

CHATTERJEE, A. K. et al. A simple robust method for synthesis of metallic copper nanoparticles of high antibacterial potency against E. coli. **Nanotechnology**, v. 23, n. 8, 2012.

CHATTERJEE, A. K.; CHAKRABORTY, R.; BASU, T. Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 25, n. 13, p.135101- 135113, 2014.

CHOI, Hak Soo; LIU, Wenhao; MISRA, Preeti; TANAKA, Eiichi; ZIMMER, John P; IPE, Binil Itty; BAWENDI, Mounji G; FRANGIONI, John V. Renal clearance of quantum dots. **Nature Biotechnology**, [S.L.], v. 25, n. 10, p. 1165-1170, 23 set. 2007.

CHRISCHON, D. **Nanotubos magnéticos sintetizados por eletrodeposição em alumina anódica porosa**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Tenth Edition. CLSI document M07-A10, Wayne, Pennsylvania, USA, 2015.

DAS, P.; GANGULY, S.; BOSE, M.; MONDAL, S.; DAS, A. K.; BANERJEE, S.; DAS, N. C. A simplistic approach to green future with eco-friendly luminescent carbon dots and their application to fluorescent nanosensor turn-off probe for selective sensing of copper ions. **Materials Science and Engineering**, v.75, p. 1456–1464, 2017.

DEVI, P.; THAKUR, A.; BHARDWAJ, S. K.; SAINI, S.; RAJPUT, P.; KUMAR, P. Metal ion sensing, and light activated antimicrobial activity of *Aloe vera* derived carbon dots. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 29, p. 17254–17261, 2018.

DINÇ, S. A simple and green extraction of carbon dots from sugar beet molasses: Biosensor applications. **Sugar Industry**, v. 141, n. 9, p. 560–564, 2016.

DONG, X.; AWAK, M.; TOMLINSON, N.; TANG, Y.; SUN, Y.; YANG, L. Antibacterial effects of carbon dots in combination with other antimicrobial reagents. **Plos One**, v. 12, n. 9, p.1-16, 2017.

DRAGOVIC, R. A. et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 7, n. 6, p.780-788, 2011.

FANG, Y.; GUO, S.; LI, D.; ZHU, C.; REN, W.; DONG, S.; WANG, E. Easy synthesis and imaging applications of cross-linked green fluorescent hollow carbon nanoparticles. **Acs Nano**, v. 6, n. 1, p.400- 409, 2011.

FANG, Jun; NAKAMURA, Hideaki; MAEDA, Hiroshi. The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 63, n. 3, p. 136-151, mar. 2011.

GAO, Z.; WANG, L.; SU, R.; HUANG, R.; QI, W., HE, Z. A carbon dot- based “off–on” fluorescent probe for highly selective and sensitive detection of phytic acid. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 70, p. 232–238, 2015.

GARCIA, Fabrício de Melo. Nanomedicine and therapy of lung diseases. **Einstein (São Paulo)**, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 531-533, dez. 2014.

**Global action plan on antimicrobial resistance.** Geneva: World Health Organization. 2015.

GOMES, D. S.; MARTINEZ, A. C. **Colibacilose aviária em frangos de corte: revisão de literatura.** 2017, Umuarama. **Anais...** Umuarama: II Simpósio Produção Sustentável e Saúde Animal, 2017.

GONÇALVES, G. A. M.; ANDREATTI FILHO, R.L. Susceptibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frango industrial (*Gallus gallus Domesticus Linnaeus*, 1758) com colibacilose. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.4, p.715-718, 2010.

HIMAJA, A. L.; KARTHIK, P. S.; SREEDHAR, B.; SINGH, S. P. Synthesis of carbon dots from kitchen waste: Conversion of waste to value added product. **Journal of Fluorescence**, v. 24, p. 1767–1773, 2014.

HONG, G.; DIAO, S.; ANTARIS, A. L.; DAI, H. Therapy carbon nanomaterials for biological imaging and nanomedicinal. **Chemical Reviews**, v. 115, p 10816–10906, 2015.

HOO, Christopher M.; STAROSTIN, Natasha; WEST, Paul; MECARTNEY, Martha L.. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. **Journal Of Nanoparticle Research**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 89-96, 20 jun. 2008.

IIJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **354**, 56–58 (1991).

JHONSI, M. A. et al. Antimicrobial activity, cytotoxicity and DNA binding studies of carbon dots **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 196, p.295–302., 2018.

KOOPMANS, R. J.; AGGELI, A. Nanobiotechnology - quo vadis? **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 327–334, 2010.

KRANZ, C.; EATON, D. C.; MIZAIKOFF, B. Analytical challenges in nanomedicine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 7, p. 2309–2311, 2011.

KROTO, H. W., HEATH, J. R., O'BRIEN, S. C., CURL, R. F., SMALLEY, R. E. C60: Buckminsterfullerene. *Nature*, v. 318, n. 6042, p. 162-163, 1985.

KUMAR, A.; CHOWDHURY, A.R.; LAHA, D.; MAHTO, T. K.; KARMAKAR, P.; SAHU, S. K. Green synthesis of carbon dots from *Ocimum sanctum* for effective fluorescent sensing of Pb<sup>2+</sup> ions and live cell imaging. **Sensors and Actuators B Chemical**, v. 242, p. 679–686. 2017.

KUMAR, C. S. S. R. Nanotechnology tools in pharmaceutical R&D. **Materials Today**, v. 12, p.24-30, 2010.

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

LIMA, M. S. D. de et al. Avaliação do efeito antimicrobiano do óleo essencial de cravo em filmes de poli (cloreto de vinila). **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 2, n. 7, p. 294-298, 2017.

LIU, C.; ZHANG, P.; TIAN, F.; LI, W.; LI, F.; LIU, W. One-step synthesis of surface passivated carbon nanodots by microwave assisted pyrolysis for enhanced multicolor photoluminescence and bioimaging. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, p. 13163-13167, 2011.

LIU, H.; LI, Z.; SUN, Y.; GENG, X.; HU, Y.; MENG, H.; GE, J.; QU, L. Synthesis of luminescent Carbon Dots with ultrahigh quantum yield and inherent folate receptor-positive cancer cell targetability. **Scientific Reports**, v. 1086, n. 8, p.1-8, 2018.

LIU, Y.; WANG, P.; FERNANDO, K. A. S.; LECROY, G. E.; MAIMAITI, H.; HARRUFF-MILLER, B. A.; LEWIS, W. K.; BUNKER, C. E.; HOU, Z.; SUN, Y. Enhanced fluorescence properties of carbon dots in polymer films. **Journal of Materials Chemistry**, v. 4, n. 29, p.6967-6974, 2016.

MA, Y.; CHEN, Y.; LIU, J.; HAN, Y.; MA, S.; CHEN, X. Ratiometric fluorescent detection of chromium (VI) in real samples based on dual emissive carbon dots. **Talanta**, v. 185, p. 249–257, 2018.

MARCHESE, A.; BARBIERI, R.; COPPO, E.; ORHAN, I. E.; DAGLIA, M.; NABAVI, S. F.; IZADI, M.; ABDOLLAHI, M.; NABAVI, S. M.; AJAMI, M. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: a mechanistic viewpoint. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 6, p.668-689, 2017.

MOHAMAD, M. et al. Correlation of Carbon Dots' light-activated antimicrobial activities and fluorescence quantum yield. **RSC Advances**, v. 7, n. 48, p. 30177–30184, 2017.

MOHAMMED, J. et al. Visible-light-activated bactericidal functions of Carbon Quantum Dots. **ACS Applied Materials Interfaces**, v. 8, n. 17, p. 10761–10766. 2016.

NOVOSELOV, K. S.; GEIM, A.K.; MOROZOV, S.V.; JIANG, D.; ZHANG, Y.;



DUBONOS, S.V.; GRIGORIEVA, I.V.; FIRSOV, A. A. Electric field effect in atomically thin carbon films. **Science**, v. 306, p. 666–669, 2004.

PELAZ, B. et al. Diverse Applications of Nanomedicine. **ACS Nano**, v. 11, n. 3, p. 2313–2381, 2017.

PETROS, R. A.; DESIMONE, J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 8, p. 615–627, 2010.

RAFFI, M.; MEHRWAN, S.; BHATTI, T. M.; AKHTER, J. I.; HAMEED, A.; YAWAR, W.; HASAN, M.; MASOOD, U. I. Investigations into the antibacterial behavior of copper nanoparticles against *Escherichia coli*. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 1, p.75-80, 2010.

RASHEED, M. U.; THAJUDDIN, N.; AHAMED, P.; TEKLEMARIAM, Z.; JAMIL, K. Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 4, p.341-346, 2014.

REVISTA ESPAÑOLA DE QUIMIOTERAPIA: **Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE)**. Espanha: Dialnet, v. 24, n. 2, 2011. Disponível em:  
<<http://scientific.thomsonreuters.com/cgi-bin/jrnlst/jlresults.cgi?PC=D&mode=print&Page=1>>.

ROVERI, V.; MUNIZ, C. C. Contaminação microbiológica por *Escherichia coli*: estudo preliminar, no canal de drenagem urbana da Av. Lourival Verdeiro do Amaral – São Vicente/SP. **Revista Eletrônica de Divulgação Científica da Faculdade Don Domênico**, p.1-9, 2016.

SANDRI, Crislaine; KRIEGER, Maria Victória; COSTA, Wallison Chaves; SILVA, Arleide Rosa da; BECHTOLD, Ivan Helmuth; ZIMMERMANN, Lizandra Maria. Pontos quânticos ambientalmente amigáveis: destaque para o óxido de zinco. **Química Nova**,

[S.L.], p. 1215-1227, 29 ago. 2017.

SHI, W.; WANG, Q.; LONG, Y.; CHENG, Z.; CHEN, S.; ZHENG, H.; HUANG, Y. Carbon nanodots as peroxidase mimetics and their applications to glucose detection. **Chemical Communications**, v. 47, p. 6695–6697, 2011.

SILVA, S. L. A.; VIANA, M. M.; MOHALLEM, N. D. S. Afinal, o que é Nanociência e Nanotecnologia? Uma Abordagem para o Ensino Médio. **Química Nova na Escola**, v. 31, n. 3, p. 172–178, 2009.

SOENEN, S. J. et al. (Intra)cellular stability of inorganic nanoparticles: Effects on cytotoxicity, particle functionality, and biomedical applications. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 5, p. 2109–2135, 2015.

SOTOMAYOR, M. D. P. T. et al. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1755–1774, 2008.

SUN, X. M.; LIU, Z.; WELSHER, K.; ROBINSON, J. T.; GOODWIN, A.; ZARIC, S.; DAI, H. J. Nano-Graphene Oxide for cellular imaging and drug delivery. **Nano Research**, v. 1, p. 203–212, 2008.

SUN, Y-P.; ZHOU, B.; LIN, Y.; WANG, W.; FERNANDO, K. S.; PATHAK, P.; MEZIANI, M. J.; HARRUFF, B. A.; WANG, X.; WANG, H. Quantum-Sized Carbon Dots for bright and colorful photoluminescence. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 24, p.7756-7757, 2006.

TADESSE, A; RAMADEVID, D.R; HAGOSA, M.; BATTUD, G.R.; BASAVIAH, K. Facile green synthesis of fluorescent carbon quantum dots from citrus lemon juice for live cell imaging. **Asian Journal of Nanoscience and Materials**, v. 1, n, 1, p. 36-46. 2018.

THAKUR, M.; PANDEY, S.; MEWADA, A.; PATIL, V.; KHADE, M.; GOSHI, E.; SHARON, M. Antibiotic conjugated fluorescent carbon dots as a theranostic agent for

controlled drug release, bioimaging, and enhanced antimicrobial activity. **Journal of Drug Delivery**; p. 1-9, 2014.

THEURETZBACHER, U. Antibiotic innovation for future public health needs. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 10, p.713-717, 2017.

TORTORA, G. J. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TOHIDPOUR, A. *et al.* Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 142-145, 2010.

TSOI, K. M.; DAI, Q.; ALMAN, B. A.; CHAN, W. C. W. Are Quantum Dots toxic? exploring the discrepancy between cell culture and animal studies. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 3, p. 662-671, 2012.

TUERHONG, M.; XU, Y.; YIN X. Review on Carbon Dots and their applications. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 45, p. 139–150, 2017.

VASIMALAI, N. *et al.* Green synthesis of fluorescent carbon dots from spices for in vitro imaging and tumour cell growth inhibition. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 9, p. 530–544, 2018.

VERMA, A.; STELLACCI, F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. **Small**, v. 6, n. 1, p. 12–21, 2010.

WANG, Z.; LIAO, H.; WU, H.; WANG, B.; ZHAO, H.; TAN, M. Fluorescent carbon dots from beer for breast cancer cell imaging and drug delivery. **Analytical Methods**, v. 7, p. 8911-8917, 2015.

WANG, Y.; ANILKUMAR, P.; CAO, L.; LIU, J.; LUO, P. G.; TACKETT, K. N.; SAHU, S.; WANG, P.; WANG, X.; SUN, Y. Carbon dots of different composition and surface functionalization: cytotoxicity issues relevant to fluorescence cell imaging. **Experimental Biology and Medicine**, v. 236, n. 11, p.1231-1238, 2011.

WHITESIDES, G. M. Nanoscience, nanotechnology, and chemistry. **Small**, v. 1, n. 2, p. 172–179, 2005.

WHO, **Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis**. Geneva: World Health Organization; 2017.

WHO, **Antibacterial agents in preclinical development: an open access database**. Geneva: World Health Organization; 2019.

WHO. Lack of new antibiotics threatens global efforts to contain drug-resistant infections.

Site eletrônico: < <https://www.who.int/news-room/detail/17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections>>

Acesso em : 27/02/20

XU, X.; RAY, R.; GU, Y.; PLOEHN, H. J.; GEARHEART, L.; RAKER, K.; SCRIVENS, W. A. Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled Carbon Nanotube fragments. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, p. 12736-12737, 2004.

YAN, F.; ZOU, Y.; WANG, M.; MU, X.; YANG, N.; CHEN, L. Highly photoluminescent carbon dots-based fluorescent chemosensors for sensitive and selective detection of mercury ions and application of imaging in living cells. **Sensors and Actuators B Chemical**, v. 192, p. 488–495, 2014.

YANG, Z. et al. Controllable synthesis of fluorescent carbon and their detection application as nanoprobos. **Nano-Micro Letters**, v. 5, n. 4, p. 247-259, 2013.

ZHANG, L. et al. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 83, n. 5, p.761-769, 2007.

ZHENG, X. T.; ANANTHANARAYANAN, A.; LUO, K. Q.; CHEN, P. Glowing graphene

Quantum Dots and Carbon Dots: properties, syntheses, and biological applications. **Small**, v. 11, n. 14, p.1620-1636, 2014.

ZHENG, Z.; GENG, W.; XU, Zhe; G., DONG-SHENG. Macrocyclic amphiphiles for drug delivery. **Israel Journal of Chemistry**, v. 59, n. 10, p.913-927, 2019.

ZUO, G.; WANG, G.; ZHAO, Y.; XU, G.; HAO, X.; HAN, J.; ZHAO, Q. Screening of Chinese medicinal plants for inhibition against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 287-290, 2008.

**ANEXO 1**

31/01/2020 870200015153  
15:50

29409181912385048

## Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 002179 6

### Dados do Depositante (71)

---

#### Depositante 1 de 2

**Nome ou Razão Social:** FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 00038174000143

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** CENTRO DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO -  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, CAMPUS UNIVERSITÁRIO DARCY  
RIBEIRO, EDIFÍCIO CDT, ASA NORTE

**Cidade:** Brasília

**Estado:** DF

**CEP:** 70904-970

**País:** Brasil

**Telefone:** (61)3107-4100/4137

**Fax:**

**Email:** nupitec@cdt.unb.br