

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

MARIA LUIZA FERREIRA VICENTE

Nanopartículas de fuligem isoladas agindo como uma fonte eficiente de  
oxigênio singleto: efeitos da agregação molecular e sua estrutura  
energética

São Carlos  
2022



MARIA LUIZA FERREIRA VICENTE

Nanopartículas de fuligem isoladas agindo como uma fonte eficiente de oxigênio singlete: efeitos da agregação molecular e sua estrutura energética

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências.

Área de concentração: Física Biomolecular  
Orientador: Prof. Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães

versão corrigida  
(versão original na unidade que aloja o programa)

São Carlos  
2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Vicente, Maria Luiza Ferreira

Nanopartículas de fuligem isoladas agindo como uma fonte eficiente de oxigênio singlete: efeitos da agregação molecular e sua estrutura energética / Maria Luiza Ferreira Vicente; orientador Francisco Eduardo Gontijo Guimarães - versão corrigida -- São Carlos, 2022.

93 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2022.

1. Black carbon. 2. Oxigênio singlete. 3. Conversão ascendente do fóton. I. Gontijo Guimarães, Francisco Eduardo, orient. II. Título.

Ao meu esposo, minha família e meus amigos, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo período de elaboração deste trabalho.



## AGRADECIMENTOS

Devo iniciar meus agradecimentos com meus pais, Sabrina e Marcos, que me incentivaram a fazer aquilo que eu gosto, mesmo sendo uma jornada difícil, nunca deixaram de acreditar que eu seria capaz de conquistar aquilo que queria. Agradeço a minha irmã, Maria Helena, por sempre me elogiar e acreditar na importância do meu trabalho. Agradeço também aos meus familiares, que de cada um, um pouco, me ajudaram a seguir em frente nos dias difíceis.

Agradeço aos meus amigos de longa data, que permaneceram comigo após tantos anos. As seis meninas que conheci no ensino médio, Ana Carolina, Ariadne, Suelen, Nayara, Nathália e Isabela, que sempre torcem por mim e evoluem junto, me dando inspiração para seguir. As minhas amigas Giulia e Gabriela, que escutaram tantos lamentos, e mais sabem de mim do que eu mesma, nunca me deixando acreditar que eu era menos do que realmente sou. Aos meus amigos Ivan, Thainá, Douglas Sudré, Ana, Douglas Gomes e Daniel, que me ajudaram a criar memórias felizes ao meio das turbulências. Por fim, mas com certeza não menos importante, agradeço aos meus amigos da “35”, Camilla Costa, Raphael, Camila Antunes, Lorraine, Maria Julia, Gabriel e em especial Johan, Camila de Paula e Gian, por compreenderem as dificuldades e me aconselharem nos momentos de desesperança.

Ao meu orientador, Prof. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães, por acreditar no meu potencial e me creditar durante toda a caminhada, me passando uma parte de seus conhecimentos, me motivando a continuar na ciência e me tornar uma cientista de sucesso. A Prof. Cristina Kurachi e ao Dr. Dirceu Voletti por tantos conselhos para a vida acadêmica.

Aos colaboradores Prof. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, Dra. Nathália Villa, em especial Dra. Mariana Matera Veras da Faculdade de Medicina de São Paulo, por não pouparem esforços para a realização deste trabalho e o sucesso de nossa parceria.

Ao grupo de Biofotônica por todos os recursos empregados para minha jornada. As empresas de fomento com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – bolsas nº 2013/07276-1 e 2014/50857-8), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - bolsa nº 465360/2014-9) e do Laboratório Experimental de Poluição do Ar da FMUSP em conjunto com o

projeto "MCTIC/CNPq/FNDCT/MS/SCTIE/Decit nº 07/2020 - Pesquisa para o enfrentamento da COVID-19, suas consequências e outras síndromes respiratórias agudas graves". Embora tenham sido anos de tormenta para a ciência no Brasil, esses pesquisadores me ensinaram que ela é de fato importante, mesmo que a sociedade nos desacredite, devemos continuar lutando para o bem de todos, assim como foi na pandemia da COVID-19, sem nós, os cientistas, os progressos para o fim desta não aconteceria.

Agradeço a Deus, por incansavelmente me ensinar que este é o meu caminho, que eu devo ser persistente e resiliente, embora eu tenha duvidado muitas vezes, mas tudo é no tempo dEle.

E por fim, ao meu marido Natã, por continuar acreditando em mim mais do que eu mesma, sendo minha base para que eu possa perseguir meu sonho, sem poupar esforços para me ajudar, seja academicamente (me ensinando química), durante o dia a dia, me trazendo conforto e segurança e durante os momentos de turbulência, não me deixando desistir e vibrando comigo a cada vitória.





## RESUMO

VICENTE, MARIA LUIZA FERREIRA. **Nanopartículas de fuligem isoladas agindo como uma fonte eficiente de oxigênio singleto:** efeito da agregação molecular e sua estrutura energética. 2022. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

O oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) é uma espécie reativa gerada através da transferência de energia dos estados tripletos de fotossensibilizadores. Nesta pesquisa, mostrou-se que nanopartículas de fuligem (do inglês - *Black Carbon* - BC) são uma fonte eficiente de  $^1\text{O}_2$  dado rendimento quântico dependente da densidade de estados agregados. O material de fuligem foi coletado por filtragem do ar da cidade de São Paulo, obtido diretamente do escapamento de ônibus e do pulmão humano. Sua morfologia foi analisada por Dispersão Dinâmica de Luz e Microscopias Eletrônicas. As partículas de BC foram monodispersas em uma solução aquosa alcalina. Utilizou-se da microscopia confocal para caracterizá-las espectroscopicamente, componentes de absorção e espalhamento de um (1P) e dois (2P) fótons. As partículas de BC suspensas são centros espalhadores eficientes. Usando o expoente de Ångström = 1, determinamos pela primeira vez a absorção que se estende do ultravioleta ao infravermelho próximo e seus estados eletrônicos moleculares de agregados de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). A absorção por 1P nos domínios de baixas energias remete-se as transições ópticas em agregados moleculares estáveis de HPAs do tipo J. Por outro lado, a absorção em altas energias está relacionada aos agregados moleculares do tipo H, sendo extremamente seletivos para absorção de 2P. Os agregados moleculares e seu arranjo espacial favorecem a formação de estados tripletos e guiam-nos para superfície gerando oxigênio singleto com 34% de eficiência na superfície da BC, em meio aquoso. A alta densidade molecular e o rebombeio por conversão ascendente do fóton promovem a migração do estado excitado dando ao espectro de emissão de fluorescência um perfil com pico no vermelho. As características citadas são comuns entre as nanopartículas de BC estudadas, o que permite sua identificação inequívoca em tecidos humanos e no ambiente.

Palavras-chave: *Black carbon*. Oxigênio singleto. Conversão ascendente do fóton.



## ABSTRACT

VICENTE, MARIA LUIZA FERREIRA. **Isolated soot nanoparticles acting as an efficient source of singlet oxygen:** effect of molecular aggregation and its energetic structure. 2022. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

Singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) is a reactive species generated through the transfer of energy from the triplet states of photosensitizers. In this research, it was shown that black carbon nanoparticles (BC) are an efficient source of  $^1\text{O}_2$  given quantum yield dependent on the density of aggregated states. The soot material was collected by air filtration of the city of São Paulo, obtained directly from the exhaust of buses and the human lung. Its morphology was analyzed by Dynamic Light Scattering and Electronic Microscopies. The BC particles were monodispersed in an alkaline aqueous solution. Confocal microscopy was used to characterize them spectroscopically, absorption and scattering components of one (1P) and two (2P) photons. Suspended BC particles are efficient spreader centers. Using the exponent of Ångström = 1, we determined for the first time the absorption extending from ultraviolet to near-infrared and its molecular electronic states of polycyclic aromatic hydrocarbon aggregates (PAHs). The absorption by 1P in the domains of low energies refers to the optical transitions in stable molecular aggregates of PAHs of type J. On the other hand, absorption in high energies is related to molecular aggregates of type H, being extremely selective for absorption of 2P. The molecular aggregates and their spatial arrangement favor the formation of triplet states and guide them to the surface generating singlet oxygen with 34% efficiency on the surface of BC, in an aqueous medium. The high molecular density and upward conversion repumping of the photon promote the migration of the excited state giving the fluorescence emission spectrum a peak profile in the red. The characteristics mentioned are common among the BC nanoparticles studied, which allows their unequivocal identification in human tissues and the environment.

Keywords: Black carbon. Singlet oxygen. Photon up conversion.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Rota de migração das Black Carbons e seus possíveis impactos ambientais, desde a origem até serem transportadas para meios aquáticos..... 25
- Figura 2 - Clusterização provoca emissão. Esquema de como a dependência do tamanho do agregado pode levar moléculas que não emitiam luz até a emissão no azul e posteriormente no infravermelho..... 29
- Figura 3 - a) Diagrama de Jablosnki com estados vibracionais indicando a molécula doadora (Donor) círculo azul e a aceptora (Acceptor) círculo amarelo no processo de aniquilação do tripleto. As moléculas doadoras absorvem no vermelho (comprimentos de onda menos energético) e no fim do processo uma molécula aceptora emite no azul (comprimento de onda mais energético). Fonte: elaborada pelo autor. b) Esquema do processo de transferência de Dexter que ocorre entre as moléculas doadoras e aceptoras na transferência pelo tripleto (TTET) e na aniquilação do tripleto de uma das moléculas aceptoras (TTA). ..... 30
- Figura 4 - Impactador virtual de Harvard em cascata. Um fluído preenche toda a extensão do impactador e pela densidade e tamanho das partículas estas depositam-se em estágios diferentes no caminho, as PM 2,5 são recolhidas no último filtro pois não param em nenhum estágio. .... 34
- Figura 5 - Esquema da metodologia de dispersão das partículas de Black Carbon dos filtros FP e LP em solução aquosa alcalina (0,1 M NaOH). Os filtros de polipropileno são cortados em pequenos filetes e adicionados a um microtubo de 1,5 ml contendo 1 ml de NaOH 0,1M, neste estágio o aglomerado é fortemente ligado. Após 30 min de banho ultrassônico, as nanopartículas desaglomeram-se de forma monodispersa. .... 36
- Figura 6 - Escala de parâmetro de tamanho em relação a Lei de potência para o espalhamento da luz de partículas aerossóis para 785 nm e 1550 nm, onde  $\alpha = 2\pi r/\lambda$ . .... 39
- Figura 7 - Esquema de representação de uma gota da solução a ser visualizada no microscópio óptico de fluorescência confocal em cima de um substrato hidrofílico. A gota tem bordas menos perpendiculares e o efeito Marangoni das partículas está representado pelas setas azul escuras em seu interior. A região em roxo representa a região de alta concentração de partículas menores de 200 nm. O plano focal utilizado para a visualização é o plano do substrato e as regiões são as indicadas na imagem, borda da gota e centro. O passo da varredura é horizontal e inicia sempre da esquerda para a direita. Setas pretas dentro da região pontilhada em branco..... 42
- Figura 8 - Perfil de transmissão da luz transversal a uma nanopartícula de BC. Pontos de máxima e mínima intensidade utilizados na equação 5. .... 43
- Figura 9 - Varredura de excitação da DEP da esquerda para a direita, seta vermelha superior e, varredura de prova, seta vermelha inferior. Os pixels estão

representados por círculos azuis e a DEP por círculos pretos. A sombra projetada em torno da DEP representa a fotodegradação das moléculas de ABDA.....45

Figura 10 - a) Mecanismo de reação da molécula de ABDA em contato com oxigênio singleto. b) Gráfico obtido através dos pontos do perfil transversal de uma única nanopartícula após a segunda passagem do laser, o esquema indica a aleatoriedade da difusão do oxigênio molecular. ....46

Figura 11 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de filtros de fuligem A: coletadas do ar, B: removidas de um pulmão humano, com formas arredondadas e regulares. As barras de tamanho de 200 nm possibilitaram a análise de tamanho. ....50

Figura 12 - Gráficos de distribuição de tamanho das subunidades nanométricas da fuligem a partir das análises de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos a) filtros de Ar (FP) e b) filtros de partículas retiradas do pulmão (LP). Histogramas e suas distribuições normais com tamanhos médios de 40 nm para FNP (a) e 90 nm para LNP (b). ....51

Figura 13 - Espectroscopia por energia dispersiva realizada na região circulada de um filtro de fuligem recolhida do ar utilizando microscópio eletrônica de varredura e seu espectro indicando os principais elementos que compõe a região circulada, principalmente carbono e oxigênio, com os valores de porcentagem de átomos de 90% de carbono e 9,5% de oxigênio. ....52

Figura 14 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das partículas de FNP retiradas do filtro através da metodologia explicada na seção metodologia deste trabalho, em solução aquosa alcalina (NaOH 0,1 M). Imagens da sua formação molecular, forma de "cebola". ....54

Figura 15 - Imagem de microscopia eletrônica de transmissão da região de coleta dos dados de EDX, plotados no gráfico abaixo indicando aproximadamente 90% de carbono (C), e 7% de oxigênio (O). A presença do cobre (Cu) é devido a grade de microscopia em que a amostra foi lida e o sódio (Na) e cloro (Cl), são devido a solução alcalina em que foram dispersas. ....55

Figura 16 - Gráficos de distribuição de tamanho através de medidas feitas no DLS de A. amostra de FNP em meio aquoso alcalino; B. amostra de DEP em Milli-Q.; C. amostra de LNP em meio aquoso alcalino. Para A. e B. temos os ajustes de log-normais que determinam o pico e o tamanho médio das partículas suspensas na amostra. Para C. o valor dos picos e dos desvios médios foram dados diretamente pelo software Zetasizer®. ....57

Figura 17 - Imagens de microscopia óptica de fluorescência confocal com excitação de 2 photons em A. 860 nm, FNPs diluídas em NaOH, após serem removidas dos filtros e B. 800 nm, 0,02 mg/ml DEPs diluídas em Milli-Q. A barra de tamanho é igual para ambos os campos de visão das duas imagens.....59

- Figura 18 - A) Espectros de emissão de fluorescência do pixel contendo FNP por excitação de 2 fótons (760 nm – 1000 nm) das amostras de FNP dispersas em NaOH 0,1 M. Espectros de emissão da região sem FNP, incluindo segundo harmônico de amostras inorgânicas e emissão da fluorescência da matéria orgânica com excitação de 2 fótons (760 nm – 1000 nm). B) Diagrama cromático CIE 1931 com os pontos referentes aos espectros apresentados na figura A, ponto de luz branca e linha de emissão de corpo negro..... 61
- Figura 19 - Gráfico de decaimento da fluorescência por tempo da FNP. Os pontos em rosa retratam a normalização do número de fótons contados em relação ao tempo. O índice de referência (IRF) está representado por uma linha preta. .... 65
- Figura 20 - A. Profundidades ópticas medida das nanopartículas em suspensão em meio aquoso alcalino, com pH 13,0, gráfico linear com cinco curvas, as curvas experimentais, 1P (1 fóton) medida no espectrofotômetro UV-vis (círculos não preenchidos em preto), 2P (2 fótons) medida nas imagens de transmissão na microscopia confocal (círculos não preenchidos em vinho com ajuste), a curva teórica de espalhamento (S) ajustada a partir de  $\lambda$  acima de 800 nm (linha cinza), as curvas de absorbância (A e 2PA), resultado da curva Total menos curva de dispersão, para 1P (A – círculos azuis não preenchidos) e 2P (2PA – círculos vermelhos não preenchidos com ajuste). B. Imagem de transmissão por excitação de 2P em 700 nm, perfil transversal de uma FNP isolada e gráfico do perfil indicando os pontos das intensidades  $I_0$  e  $I_t$  a serem utilizadas na equação VI. Contribuições da absorção e espalhamento para a medida estão preenchidos no perfil Gaussiano. .... 68
- Figura 21 - A. Gráfico em escala Log-Log com as curvas de absorção A e 2PA do gráfico A da figura. O ruído dos medidas é representado a partir da cor cinza e o espectro de fluorescência da excitação de dois fótons é realocado para cima dos estados de absorbância, a curva rosa. Contribuições teóricas do ajuste com estados de Absorbância em sigma H-J-Agregados (roxo), H-Agregados (verde) e J-agregados (laranja). B. Esquema representando a densidade de estados da curva A com as contribuições teóricas dos estados de agregação. As setas em vermelho representam a energia de absorção por dois fótons, as setas coloridas arredondas o caminho da migração e a seta reta em laranja, o decaimento da fluorescência após a migração. Os estados singletos (tracinhos cinza) possibilitam uma migração horizontal (área abrangida pelo colchete azul) e uma migração vertical (área abrangida pelo colchete laranja)..... 70
- Figura 22 - Gráfico de intensidade de emissão e Transmissão por distância dos perfis traçados ao entorno das DEPs em a) imagem de transmissão com excitação por 1P em 405 nm (curva cinza); b) imagem de fluorescência com excitação por 1P em 405 nm (curva azul); c) imagem de fluorescência com excitação por 2P em 800nm (curva roxa). .... 73
- Figura 23 - Esquema resumindo as interações fotofísicas a nível de agregação molecular de uma nanopartícula de BC através da absorção de 1P (azul)



e 2P (vinho). 1. Múltiplo espalhamento; 2. Transferência de energia pelo estado tripleto até a borda da nanopartícula; 3. Transferência pelo estado singlete até a emissão na região do vermelho; 4. Transferência pelo estado tripleto até a aniquilação do tripleto e repump, para emissão em comprimentos de onda mais energéticos (phonto up-conversion). Os bastões coloridos representam os agregados moleculares que partem de agregados de moléculas menores com agregação H e vão tendo sua massa atômica aumentada nas extremidades, agora, com agregação do tipo J.....76

Figura 24 - a) Imagem Espectral do pulmão humano e b) do bulbo olfatório de um rato, BC em vermelho na imagem. c) Imagem no modo Canal com sobreposição dos canais nas faixas de comprimento de onda azul ao verde e outra, no vermelho, além da luz transmitida, BC aparece colocalizada com a emissão em vermelho em regiões escuras. d) Espectro de emissão das regiões marcadas nas imagens, azul: autofluorescência dos tecidos; verde: hemácias; vermelho: BC no bulbo olfatório e roxo, BC no pulmão; tracejado: espectro de referência da FNP.....78

Figura 25 - a) Gráfico de tempo de vida de fluorescência com os ajustes de decaimento exponencial para as amostras de FNP em filtro (quadrados pretos); BC em bulbo olfatório (triângulos vermelhos); Hemácias em bulbo olfatório (círculos laranja); autofluorescência de tecidos (quadrados verdes). b) Imagem do bulbo olfatório de um rato após a análise de tempo de vida médio para cada pixel, cores mais frias indicam menor tempo de vida e cores mais quentes, maior tempo de vida. ....79

Figura 26 - a) Imagem controle Espectral do bulbo olfatório de um rato, à esquerda, e imagem Canal transmitida da mesma região. Não há a presença de partículas de BC. b) Imagem Espectral da mesma região que a controle, agora, de um animal que inalou a partícula de BC, é possível visualizar a presença das partículas em vermelho em abundância. ....80

Figura 27 - a) Imagem Espectral da meninge e b) do linfonodo, partícula de BC em vermelho nas imagens. b) e e) Espectros de emissão das regiões marcadas nas imagens, verde: autofluorescência dos tecidos; azul: hemácias; vermelho: partículas de BC; c) e f) Imagens no modo Canal da luz transmitida, partícula de BC aparece colocalizada com a imagem Espectral como pontos escuros. ....82

Figura 28 - a) Imagem Espectral do Bulbo olfatório humano, partícula de BC em vermelho no centro da imagem. b) Espectro de emissão das regiões marcadas na imagem c) verde: autofluorescência dos tecidos; azul: hemácias; vermelho: partículas de BC. ....84



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
1P	do inglês – 1 <i>photon</i>
2P	do inglês – 2 <i>photons</i>
ABDA	9,10-Anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid
AF	Autofluorescência
BC	do inglês – <i>Black carbon</i>
BO	Bulbo olfatório
DBC	do inglês – <i>Dissolved Black carbon</i>
DEP	do inglês – <i>Diesel Exhaust Particles</i>
DLS	do inglês – <i>Dynamic Light Scattering</i>
EDS	do inglês – <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i>
EDX	do inglês – <i>Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy</i>
FP	do inglês – <i>Airborn filter particles</i>
FNP	do inglês – <i>Airborn filter nanoparticles</i>
HPA	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
LIF	do inglês – <i>Laser induced fluorescence</i>
LP	do inglês – <i>Lung particles</i>
LNP	do inglês – <i>Lung nanoparticles</i>
NP	Nanopartículas
PDI	do inglês – <i>Polidispersive Index</i>
PU	Pulmão
SEM-FEG	do inglês – <i>Field Emission Gun – Scanning Electron Microscopy</i>
OM	do inglês – <i>Organic matter</i>
TEM	do inglês – <i>Transmission Electronic Microscopy</i>



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	Fundamentação Teórica	29
2.1	Ciência dos agregados:	29
3	OBJETIVOS	31
4	METODOLOGIA	33
4.1	Coleta de partículas	33
4.1.1	Partículas <i>ex-situ</i> recolhidas de um pulmão (do inglês – <i>Lung Particles</i> - LP)	33
4.1.2	Partículas <i>ex-situ</i> recolhidas da atmosfera (do inglês - <i>Airborne filter particles</i> – FP)	34
4.1.3	Partículas <i>ex-situ</i> de Diesel (do inglês - <i>Diesel exhaust particles</i> - DEP)	35
4.2	Dispersão de nanopartículas em meio aquoso	35
4.3	Preparação da amostra e medidas de espalhamento de luz dinâmico (do inglês – <i>Dynamic Light Scattering</i> - DLS)	37
4.4	Microscopias Eletrônicas	37
4.4.1	Microscopia eletrônica de varredura com canhão de elétrons por emissão de campo (do inglês – <i>Field Emission Gun – Scanning Electron Microscopy</i> – SEM-FEG) e espectroscopia por energia dispersiva (do inglês – <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i> – EDS)	37
4.4.2	Microscopia eletrônica de transmissão (do inglês – <i>Transmission Electron Microscopy</i> – TEM) e espectroscopia por energia dispersiva de raios-x (do inglês – <i>Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy</i> – EDX)	38
4.5	Medidas de absorvância de 1 fóton	38
4.5.1	Medidas de profundidade óptica – espectrofotômetro	38
4.5.2	Ajustes de espalhamento – Mie	39
4.6	Microscopia óptica de fluorescência confocal	40
4.6.1	Imagens e análise em meio aquoso	41
4.6.2	Emissão de fluorescência e absorção por transmissão óptica com excitação de 2P de uma única partícula	42
4.6.3	Imagem de tempo de vida de fluorescência (FLIM)	43
4.6.4	Quantificação da geração de oxigênio singlete pelas DBCs	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
5.1	Análises Morfológicas	49

5.1.1	Microscopias Eletrônicas	49
5.1.1.1	FEG-SEM/ EDS	49
5.1.1.2	TEM/ EDX	53
5.1.2	Espalhamento Dinâmico de Luz (do inglês – <i>Dynamic Light Scattering</i> – DLS)	56
5.1.3	Microscopia óptica de fluorescência confocal – visualização	58
5.2	Caracterização óptica das nanopartículas de poluição	59
5.2.1	Espectros de fluorescência por excitação de 2 fótons	60
5.2.2	Tempo de vida de fluorescência	64
5.2.3	Espectros de profundidade óptica de 1 e 2 fótons – espalhamento e absorção	66
5.3	Rendimento quântico da geração de oxigênio singlete por uma única nanopartícula dissolvida (DBC)	71
5.4	Estrutura energética de escada e migração de estados excitados ao longo do volume das partículas e BC	74
5.5	Visualização e identificação em tecidos	76
6	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS	87







## 1 INTRODUÇÃO

Partículas de aerossóis de poluição (*Particula Matter* - PM), geradas principalmente pela queima incompleta de combustíveis fósseis como Diesel e gasolina, estão inseridas na classe dos chamados *Black Carbons* (BC).<sup>1-3</sup> Semelhantes a estas, em relação a tamanho e geração, temos as *Brown Carbons* (brC), partículas advindas da queima de carvão natural, biomassa, incêndios florestais e queimas não controladas.<sup>3</sup> Por conta de sua propriedade aerossol, combinado ao seu pequeno tamanho (nanômetros até micrometros), são capazes de disseminar-se na atmosfera e serem facilmente inaláveis, podendo alcançar os brônquios e alvéolos e serem levadas pela corrente sanguínea a outros tecidos biológicos, como a placenta.<sup>4-5</sup> Ao serem inaladas, as nanopartículas podem provocar reações oxidativas, inibição de enzimas e outras reações inflamatórias, além de possuírem correlações de incidência com doenças respiratórias e cardiovasculares.<sup>6-10</sup> Para além do que se foi descoberto, seu tamanho assemelha-se muito a outras nanopartículas de poluição que foram encontradas no cérebro humano.<sup>11</sup>

Segundo a CETESB<sup>12</sup>, partículas inaláveis ultrafinas menores que 2,5 micrômetros (PM 2,5), estão presentes no ar na cidade de São Paulo e região metropolitana. A principal fonte de emissão são os veículos que circulam nas cidades. Ainda hoje, o monitoramento dessas partículas é falho, e em muitas regiões do Brasil, as PMs 2,5 não fazem parte dos parâmetros de qualidade do ar<sup>13</sup>. Saldiva e seus colaboradores, em 2012, já haviam monitorado 6 capitais brasileiras, foram elas, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Curitiba, Recife e Porto Alegre. Nessa pesquisa foi constatado que em quase todas as capitais, os índices anuais de concentração de PM 2,5 são maiores que os indicados pela *World Health Organization* (WHO) ( $<10 \mu\text{g m}^{-3}$ ), exceto Curitiba e Recife, dentro da concentração de PM 2,5 encontrou-se mais de 20% de BC em todas as cidades, valor expressivo que justifica sua presença em diversas regiões do Brasil.<sup>14-15</sup> Não apenas no Brasil, mas em muitos outros países, foram feitos estudos semelhantes para mostrar a presença de BC em suas áreas urbanas e rurais, a fim de mostrar a importância de seu monitoramento e estudo, principalmente a China e

Índia que possuem hoje, uma das maiores concentrações anuais desta componente.<sup>15-18</sup>

### **Disseminação e locais de estudo das PMs:**

Relatadas em locais distantes dos centros urbanos onde foram geradas, destacam-se como componentes de gotículas de aerossóis e depositam-se em diferentes ambientes.<sup>19-20</sup> As modificações antropogênicas, causadas pela presença dessas partículas, são inúmeras. Podemos citar o depósito destas em regiões estuarinas, as regiões de transição que contém uma grande quantidade de matérias orgânicas depositadas, e que, ao suspenderem-se, podem ser uma via de carga para as partículas de BC.<sup>21-23</sup> A toxicidade de nanotubos estruturados de carbono à microbiota e a fauna da região é um indicativo de que as partículas de BC, por se assemelharem-se muito a estas, também seriam tóxicas.<sup>24</sup> As regiões estuarinas também são uma via para o transporte das nanopartículas aos mares, e por conta disso, as partículas de BC foram encontradas em vírus e bactérias na baía de Halong, do Vietnã (Figura 1).<sup>25</sup>

É possível que as partículas de BC encontrem-se nas regiões amazônicas e por possuírem um tamanho entre 40 nm a 50 nm, podem ser responsáveis pela condensação de gotas na atmosfera, principalmente em ambientes florestais com bastante umidade.<sup>26</sup> A alta concentração de núcleos condensadores de nuvens (do inglês – *cloud condensation nuclei* - CCN) leva a formação de gotículas menores que suprimem a formação de chuva por convecção rasa, aumentando o espalhamento da luz solar, desbalanceado o equilíbrio energético na atmosfera.<sup>27</sup>

Partindo da suscetibilidade de encontrá-las em praticamente todo lugar, formas mais precisas para sua identificação na atmosfera, em amostras biológicas e ambientais, vêm sendo amplamente investigadas, para que assim revelem suas rotas de disseminação e possíveis efeitos toxicológicos.<sup>28</sup>

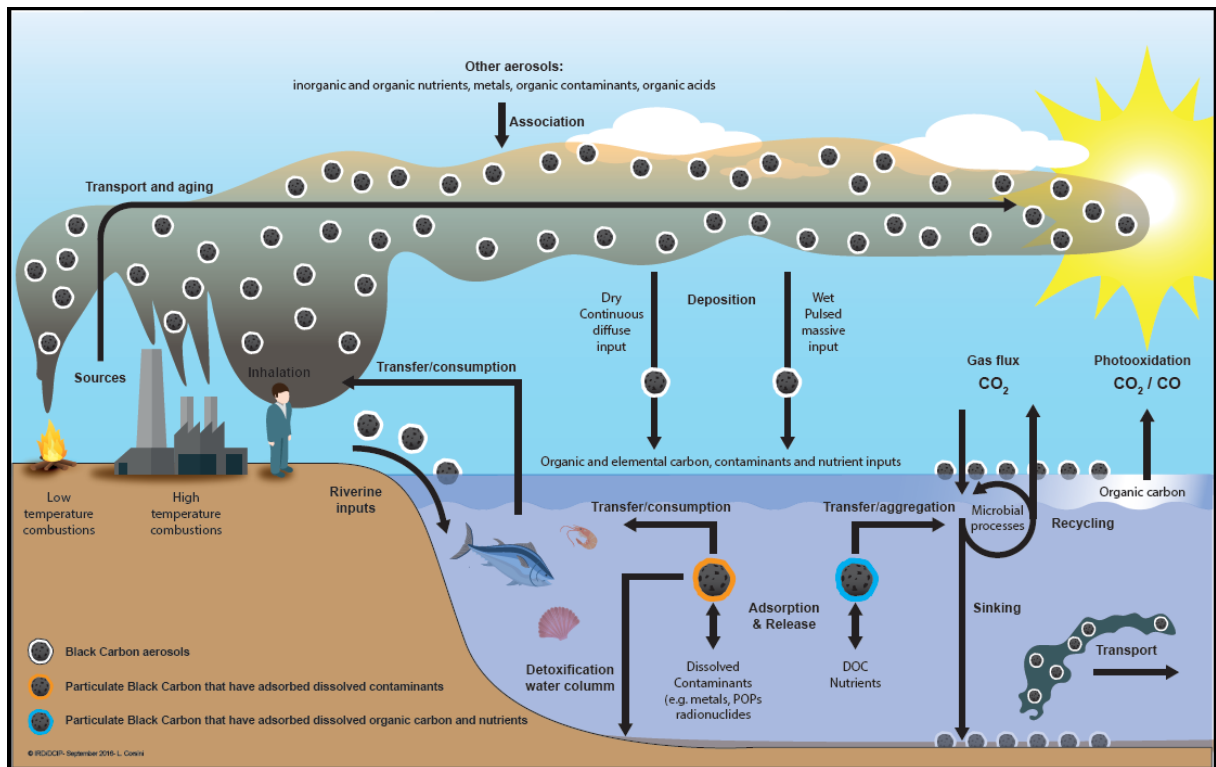


Figura 1 - Rota de migração das Black Carbons e seus possíveis impactos ambientais, desde a origem até serem transportadas para meios aquáticos.

Fonte: IRD<sup>29</sup>

### Formas de identificação das BCs:

Utilizar das propriedades ópticas para identificação das partículas de poluição de carbono, é uma ideia bastante disseminada, principalmente quando se trata de identificá-las como gotículas de aerossóis 30-32. Por serem núcleos espalhadores de luz com baixo poder absorptivo, dificultam as medidas feitas com técnicas convencionais e necessitam de ajustes teóricos para remover a contribuição do espalhamento. Na Tabela 1 estão citadas algumas técnicas de medidas diretas utilizadas para medir as partículas coletadas em filtros.

Tabela 1: Métodos diretos de medir absorção das partículas.

Método	Referências
Partículas coletadas em filtros	
Placa de Integração	Lin et al. 1973; Horvath 1997
Sanduíche de integração	Clarke et al. 1987

*Tabela 1 - Métodos diretos de medir absorção das partículas.*

<b>Método</b>	<b>Referências</b>
Elatalômetro	Hansen et al. 1984; Weingartner et al. 2003
Fotômetro de absorção de partículas de fuligem (do inglês – <i>Particle soot absorption photometer</i> - PSAP)	Weiss and Waggoner 1984; Bond et al. 1999
Fotometria de absorção multi-ângulo (do inglês - <i>Multi-angle absorption photometry</i> – MAAP)	Petzold et al. 2005
Esfera integradora	Fischer 1970; Heintzenberg and Meszaros 1985; Hitzinger 1996

*Fonte: BOND; BERGSTROM<sup>33</sup>*

Neste trabalho, utilizamos das partículas coletadas em filtros de polietileno e vidro, da atmosfera e do pulmão humano, para caracterizar a absorção e, para sanar os problemas em relação ao espalhamento, desenvolvemos uma metodologia para suspensão das partículas em monodispersões nanométricas, em pH alcalino. Com essa metodologia, foi possível atrelar uma medida direta (espectrofotômetro e transmissão do laser de 2 fótons), a aproximações de espalhamento Mie típicos do tamanho e da “idade” das partículas coletadas.

Outra forma de identificação óptica encontrada é a de emissão de fluorescência. Descobriu-se recentemente que, quando excitada com um laser multifótons, as partículas de BC possuem uma autofluorescência que não está relacionada com sua incandescência.<sup>34-35</sup> Ao serem iluminadas com um laser a baixa fluência, emitem radiação em todo comprimento de onda visível e passam a ser identificadas em tecidos humanos e em amostras ambientais. Por ser uma nova área para investigação, não está estabelecido um padrão de identificação e para a extensão da técnica *in vivo*. É por esse motivo que neste trabalho estamos desenvolvendo a técnica para identificação com um microscópio óptico de

fluorescência confocal invertido, utilizando um laser de excitação por 2 fótons. Acredita-se que a extensa caracterização óptica das partículas feitas, levou a uma impressão digital destas em tecidos e meios aquosos, além de contraprovas relacionadas às suas características ópticas de formação de agregação molecular.

### **Formação molecular das partículas de BC:**

A formação molecular das partículas de BC já é muito bem definida. Moléculas chamadas de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA), formadas exclusivamente de carbono, com no mínimo 2 grupamentos aromáticos, foram identificadas como principal precursor das nanopartículas de BC.<sup>16, 36</sup> Sua formação ocorre dentro da “chama”, no processo de combustão através da adição de acetileno e abstração de hidrogênio (HACA).<sup>37</sup> As moléculas de HPA são consideradas cancerígenas quando avaliadas individualmente, e sua caracterização óptica já é bem definida, utilizada inclusive, para verificar quais moléculas estariam presentes na fase gasosa da formação da fuligem utilizando a técnica de fluorescência induzida a laser (do inglês – *Laser Induced Fluorescence* – LIF).<sup>38-39</sup>

Neste trabalho, destaca-se o estudo da agregação das moléculas de HPA, forma primária das partículas de fuligem. Entender seu nível de densidade molecular e as formas dos arranjos de agregação é crucial quando se trata de caracterizar ações foto físicas.<sup>40-41</sup> Por isso, espera-se que as características ópticas das partículas de BC revelem-se diferentes das características individuais das moléculas que as compõe, principalmente referente aos efeitos toxicológicos por mecanismos fotodinâmicos. É de conhecimento recente que agregados moleculares podem ser utilizados como geradores de oxigênio singleto quando excitados em comprimentos de onda no visível ao infravermelho.<sup>42-43</sup> Coube as resoluções deste trabalho investigar a capacidade de geração dessas espécies reativas de oxigênio.

### **Ação Fotodinâmica e a Geração de Oxigênio Singleto em ambientes aquáticos:**

A ação fotodinâmica é um processo do estado tripleto onde moléculas cromóforas fotossensibilizadoras produzem espécies reativas de oxigênio (ROS)

como o oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) altamente reativo, capazes de matar células humanas e inativar vírus e microrganismos, ao serem irradiadas com luz na presença do oxigênio molecular. Fotossensibilizadores são moléculas capazes de ter uma taxa alta de geração de estados tripletos ao serem excitadas pela luz, porém, outros materiais com essa mesma propriedade, como agregados moleculares, também podem gerar essas espécies pelo mesmo mecanismo.<sup>44-45</sup> Ao serem propositivos, são molécula/arranjos utilizados para o tratamento de doenças como alguns cânceres e na inativação de microrganismos em infecções bacterianas,<sup>46-48</sup> mas no meio ambiente, essa ação pode ocorrer sem nenhuma proposição.

Diversas maneiras de quantificar a geração de  $^1\text{O}_2$  em meios aquáticos por micropoluentes já foram desenvolvidas, mas não há uma distinção de classe entre matéria orgânica, partículas de BC, microplásticos e outras nanopartículas. A quantificação se baseia apenas na ação das moléculas cromóforas dissolvidas de qualquer material de composição orgânica, e não leva em consideração a forma de agregação molecular.<sup>49-50</sup>

Recentemente, estudos mais detalhados da ação fotodinâmica das partículas de BC foram desenvolvidos pelos autores Zhao e Meng, 2021. Determinou-se a ação fotodinâmica das *Dissolved Black Carbons* (DBC) quando iluminadas no espectro visível por um longo período. Utilizando partículas comerciais de *Black Carbon*, descobriram-se ações fotodegradantes e geração de espécies reativas de oxigênio através de medidas de absorção e fluorescência por 1 fóton.<sup>50-51</sup>

No presente trabalho, utilizam-se de partículas geradas em um ônibus, simulou-se as DBCs, e foi desenvolvida uma nova forma de quantificar a geração de oxigênio singleto por uma única nanopartícula utilizando da microscopia óptica de fluorescência confocal e excitação no espectro visível.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Ciência dos agregados:

Quando cientistas tentam estudar um sistema macroscópico, tendem a reconstruí-lo a partir dos estudos e caracterizações de seus menores componentes, em sua maioria, as moléculas que os compõem (microscópicos). A associação de duas ou mais moléculas até tamanhos de microns é chamada de mesoscópica e tende a ser negligenciada, mas, principalmente para cromóforos, essas interações moleculares modificam muitas propriedades fotofísicas e fotoquímicas das moléculas individuais. A agregação molecular pode levar a supressão da fluorescência, aumento da fluorescência, e modificações nos estados de absorção como a Clusterização que provocam emissão (do inglês – *Clusterization-Trigged Emission* – CTE) (Figura 2). Essa propriedade parte do princípio de que ao aumentar o tamanho da clusterização (agregação de moléculas), diminui-se o intervalo entre as bandas das moléculas que os compõem, levando a emissão para o visível e até para o infravermelho próximo. Essa dependência foi relatada através de observações experimentais e não há uma explicação firmada.<sup>42-43, 52-54</sup>

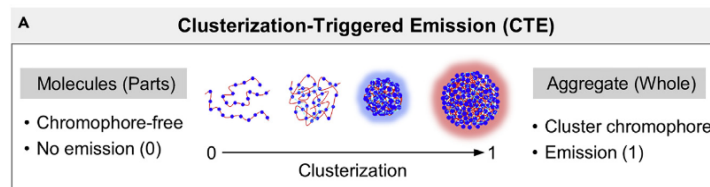


Figura 2 - Clusterização provoca emissão. Esquema de como a dependência do tamanho do agregado pode levar moléculas que não emitiam luz até a emissão no azul e posteriormente no infravermelho.

Fonte: Adaptado de TU<sup>43</sup>

Outra consequência da agregação molecular é a conversão ascendente do fóton (do inglês - *photon upconversion*), que pode ser explicado pela alta densidade molecular. Estas, passam a transferir a energia absorvida, tanto pelos estados singletos, como pelos estados tripletos (Doadoras para Aceptoras) (Figura 3). Essa alta transferência pelos estados tripletos pode ocasionar a aniquilação do elétron de uma molécula no estado tripleto, acerca de outra que está a menos de 1 nm de distância na mesma condição inicial. Após a aniquilação, há a passagem de um elétron para a

molécula não aniquilada, que acende ao estado singlete S1 excitado, com um intervalo de energia entre os estados 2 vezes maior, resultando assim, na emissão em comprimentos de onda mais energéticos que aquele da excitação. Esse processo está esquematizado na Figura 3 no diagrama de Jablonski adaptado com os estados vibracionais e a transferência de Dexter dos elétrons de duas moléculas inicialmente no estado tripleto excitado. <sup>55-56</sup>

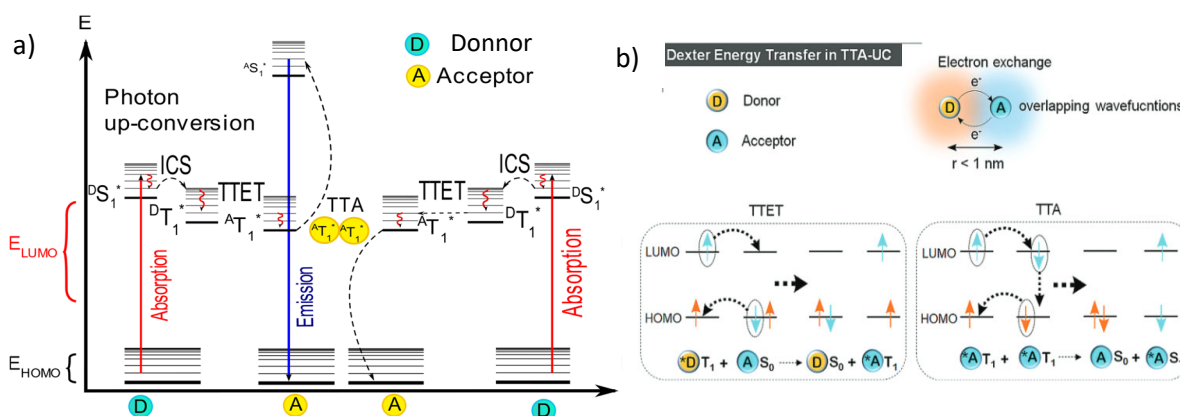


Figura 3 - a) Diagrama de Jablonski com estados vibracionais indicando a molécula doadora (Donor) círculo azul e a aceptora (Acceptor) círculo amarelo no processo de aniquilação do tripleto. As moléculas doadoras absorvem no vermelho (comprimentos de onda menos energético) e no fim do processo uma molécula aceptora emite no azul (comprimento de onda mais energético). Fonte: elaborada pelo autor. b) Esquema do processo de transferência de Dexter que ocorre entre as moléculas doadoras e aceptoras na transferência pelo tripleto (TTET) e na aniquilação do tripleto de uma das moléculas aceptoras (TTA).

Fonte: Adaptada de TU et al. <sup>43</sup>

Neste trabalho, por enfatizar as partículas de BC como agregados moleculares de alta densidade, essas fundamentações teóricas foram muito importantes para embasar as explicações das ações foto físicas e fotoquímicas observadas.



### 3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é identificar nanopartículas de BC em tecidos humanos, principalmente em regiões do cérebro e vias de entrega e excreção do corpo, para poder mapear sua ação no corpo humano. Para alcançar esse objetivo, foram traçadas alguns outros ao longo da pesquisa, o primeiro, foi de caracterizar morfologicamente partículas de poluição recolhidas da atmosfera quanto a sua monodispersão, formato, tamanho e composição molecular. Em seguida, caracterizou-se a emissão de fluorescência quando excitada por 2 fótons, no espectro visível, a fim de gerar uma impressão digital de identificação das nanopartículas.

Para explicar os efeitos observados na emissão de fluorescência, foi aplicada uma nova metodologia de dispersão atrelada a um ajuste Mie do espalhamento na caracterização do real espectro de absorção por 1 e 2 fótons, deconvolucionando as contribuições dos estados de absorção em relação ao tipo de agregado no volume da partícula. Descobriu-se uma alta população de estados tripletos excitados, levando a considerar a geração de oxigênio singleto pelos agregados e foi calculada indiretamente o rendimento quântico para uma nanopartícula de forma isolada. Por fim, concluiu-se o sucesso através das imagens de tecidos humanos e sua identificação.



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Coleta de partículas

As metodologias de coleta a seguir foram realizadas pelas pesquisadoras Nathalia Villa dos Santos e Mariana Matera Veras na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no Laboratório de Patologia Ambiental. Ambas as coletas nos foram enviadas pelos Correios em filtros de polipropileno, celulose e vidro, e manipulados por nós no Laboratório de Biofotônica.

#### 4.1.1 Partículas *ex-situ* recolhidas de um pulmão (do inglês – *Lung Particles - LP*)

Tecidos frescos de pulmão humano foram obtidos no Serviço de Verificação Pós-Morte da cidade de São Paulo (do inglês - *Post-Mortem Verification Service - SVO*). Em uma rotina de SVO, um parente (do inglês - *next-of-kin - NOK*) reivindicou o corpo. Um entrevistador treinado convidou o NOK para participar do estudo. Após a aceitação, o parente foi convidado para uma sala privada onde foi assinado um termo de consentimento informado autorizando a coleta de amostras de tecido. Os critérios de inclusão foram: idade igual ou superior a 18 anos, ter residido na região metropolitana de São Paulo por pelo menos 3 meses, ter uma proximidade relativa para fornecer informações confiáveis e completas durante a entrevista, e a ausência de alterações macroscópicas dos pulmões. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo (número 2013/21728).

As amostras de tecido do pulmão (2 amostras do lobo superior) foram colocadas separadamente em sacos limpos de polietileno e mantidas a – 80 °C antes do transporte para o Instituto de Pesquisa de Energia Nuclear (IPEN-CNEN/SP). Os tecidos foram enxaguados com água purificada para remover o sangue, posteriormente, foram homogeneizados. As amostras foram liofilizadas até seu peso constante. As amostras secas foram moídas em pó fino e colocadas em frascos de polietileno, que foram armazenados em uma geladeira.<sup>57</sup>

Para as partículas pulmonares coletadas, foram utilizadas amostras de tecido, aproximadamente 0,5 g de cada amostra (peso seco). Para a dissolução ácida da amostra, foram adicionados 10 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e peróxido de hidrogênio,

sob aquecimento de 80 °C. A solução foi evaporada cuidadosamente para perto da secura (liofilização). Este procedimento foi repetido até a dissolução completa da amostra. A solução final foi preenchida com HNO<sub>3</sub> 3 mol/L e filtrada em um sistema Millipore para obter as partículas utilizando um filtro de vidro para coleta.

#### 4.1.2 Partículas *ex-situ* recolhidas da atmosfera (do inglês - *Airborne filter particles – FP*)

Foram utilizados impactadores em cascata microambientais de Harvard (Figura 4)<sup>58</sup> projetados sob medida para coletar amostras diretamente da atmosfera (do inglês - Airborne filter particles – FP) com finas frações de tamanho ( $\leq 2,5 \mu\text{m}$  de diâmetro aerodinâmico, PM 2,5) colocado a uma altura de 1,5 m do chão. Para cada período amostral, o impactador funcionou continuamente por 24 h a uma vazão constante de 5 - 7,5 L/min, o que corresponde a um volume amostral total de 7,2 - 10,8 m<sup>3</sup>.

O material coletado foi retido em membranas filtrantes com poros de tamanho de 0,22  $\mu\text{m}$ , e 47 mm de diâmetro (celulose Millipore GSWP04700 e hidrofóbicos politetrafluoretileno Vials MFPTE-4722).

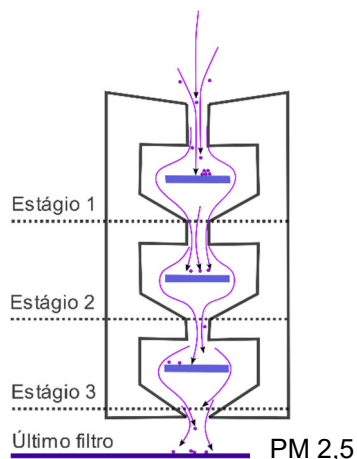


Figura 4 - Impactador virtual de Harvard em cascata. Um fluido preenche toda a extensão do impactador e pela densidade e tamanho das partículas estas depositam-se em estágios diferentes no caminho, as PM 2,5 são recolhidas no último filtro pois não param em nenhum estágio.

Fonte: Adaptada de DEMOKRITOU et al.<sup>5</sup>

#### **4.1.3 Partículas ex-situ de Diesel (do inglês - *Diesel exhaust particles* - DEP)**

As Partículas ex-situ de Diesel (do inglês - Diesel exhaust particles - DEP) foram coletadas de um motor diesel utilizando um retentor de partículas, um filtro bimetálico que cria um campo capaz de segurar a matéria particulada emitida do escapamento. O veículo escolhido foi um ônibus Volkswagen modelo 2004 com motor MWM x-10 de 6 cilindros. O ônibus é propriedade de uma empresa privada e circula ao redor de Campo Belo, em São Paulo, Brasil, se deslocando aproximadamente 100 a 150 km/dia. O retentor de partículas ficou ligado ao escapamento por 1 semana. O DEP foi coletado em entre setembro/outubro de 2015.<sup>7</sup> A amostra que recebemos estava em pó em um frasco de plástico sem vedação, cedida pelo grupo do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LIM-05), Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo 455, São Paulo, Brasil.

#### **4.2 Dispersão de nanopartículas em meio aquoso**

Os filtros que continham as partículas retidas da atmosfera e as removidas de um pulmão macerado (FP e LP) foram imersos em 1 mL de meio aquoso alcalino (NaOH 0,1 M, pH 13) e colocados em um aparelho de banho ultrassônico de 150W de potência por 30 min a 30°C para que os aglomerados fossem separados dos filtros, em seguida, as nanopartículas (pequenos agregados) foram separadas de seus aglomerados pela ação físico-química do meio aquoso alcalino, possível desprotonação das hidroxilas ao seu entorno (Figura 5).<sup>59-60</sup>

Após um intervalo noturno de 18 horas, o filtro é removido e as partículas são agitadas para serem dispersas no meio a ser estudado. As nanopartículas serão chamadas de FNP para as dispersas do filtro FP e LNP para as dispersas do filtro de LP.

As partículas de DEP foram pesadas e adicionadas 1 mg em 1 ml do meio aquoso alcalino (NaOH 0,1 M, pH 13), colocadas em um aparelho de banho ultrassônico de 150 W de potência por 30 min a 30°C, modelo CTA do Brasil ® D 40-

X(E), assim, além da separação física das nanopartículas dos aglomerados, também ocorre a repulsão iônica da desprotonação das hidroxilas na superfície das nanopartículas.

Diferente da amostra anterior que teve contato com ativos da atmosfera, os grupos hidroxila provavelmente encontraram-se em menor quantidade resultando em uma pior separação das nanopartículas.<sup>61</sup> Com estas partículas, também foram preparadas soluções de dispersão em pH ~ 7, o mesmo procedimento foi realizado utilizando água Milli-Q. A força iônica e o pH são fortes influenciadores no arranjo da fuligem, pois as interações partícula-partícula tendem a ser muito fortes por conta de sua hidrofobicidade e da presença de grupamentos químicos contendo oxigênio em sua superfície.<sup>62</sup>

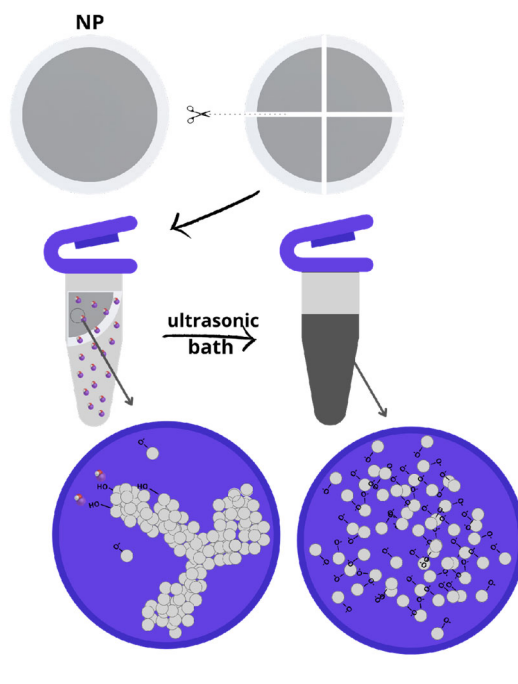


Figura 5 - Esquema da metodologia de dispersão das partículas de Black Carbon dos filtros FP e LP em solução aquosa alcalina (0,1 M NaOH). Os filtros de polipropileno são cortados em pequenos filetes e adicionados a um microtubo de 1,5 ml contendo 1 ml de NaOH 0,1M, neste estágio o aglomerado é fortemente ligado. Após 30 min de banho ultrassônico, as nanopartículas desaglomeram-se de forma monodispersa.

Fonte: Elaborada pela autora.

### 4.3 Preparação da amostra e medidas de espalhamento de luz dinâmico (do inglês – *Dynamic Light Scattering* - DLS)

As soluções preparadas contendo LNP, DEP e FNP foram centrifugadas a 15870 g por 10 min e 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi coletado e diluído 20 vezes nos meios aquosos correspondentes para cada amostra. Alíquotas de 12  $\mu\text{L}$  foram medidas utilizando-se o dispositivo *Zeta Sizer  $\mu\text{V}$  - Malvern®*, ângulo de leitura de 90° e laser de 635 nm, com resultados da média de 12 corridas por amostra. Os parâmetros de entrada do aparelho como a absorção = 0,8, foi correspondente a medida de absorbância em 635 nm utilizando o espectrofotômetro (antes da exclusão da contribuição do espalhamento) e o índice de refração = 1,4, foi retirado da literatura e recalculado para o comprimento de onda do aparelho usando a equação <sup>163</sup>

$$RI(\lambda) = R(\lambda) - im(\lambda)i = \frac{c}{\lambda} T - im(\lambda)i \quad (1)$$

$R(\lambda)$  é o índice de refração de interesse a ser calculado, T é o período da velocidade de fase de propagação da onda no meio, c a velocidade da luz e  $(\lambda)$  o comprimento de onda de interesse.

O aparelho retornou distribuições log-normais de intensidade em função do tamanho após o cálculo da função de correlação (g), além do índice de polidispersão da amostra (do inglês - *polydispersity index* - PDI). Com esses dados, foi possível determinar a qualidade da metodologia de suspensão das subunidades da fuligem.<sup>64</sup>

### 4.4 Microscopias Eletrônicas

#### 4.4.1 Microscopia eletrônica de varredura com canhão de elétrons por emissão de campo (do inglês – *Field Emission Gun – Scanning Electron Microscopy* – SEM-FEG) e espectroscopia por energia dispersiva (do inglês – *Energy Dispersive Spectroscopy* – EDS)

Foi utilizado o Microscópio eletrônico de varredura ZEISS modelo SIGMA equipado com canhão de elétrons por emissão de campo (SEM-FEG). O sistema de análise química qualitativa e quantitativa OXFORD para detecção de elementos entre Boro e Urânio do Laboratório Multiusuária do Instituto de Física de São Carlos –

Universidade de São Paulo. Os filtros foram diretamente colocados sob um aparador para a leitura da amostra no microscópio e depositou-se pó de cobre para realização da medida.

Para análise da distribuição de tamanho, realizou-se um processamento de imagem utilizando o software ImageJ®, com uma amostragem de 60 tamanhos por imagem, os resultados estão plotados nos histogramas com suas distribuições normais.

#### **4.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão (do inglês – *Transmission Electron Microscopy* – TEM) e espectroscopia por energia dispersiva de raios-x (do inglês – *Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy* – EDX)**

As imagens e análises foram realizadas utilizando o microscópio Marca JEOL – modelo JEM2100 LaB6 – 200 kV do Laboratório Multiusuário do Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo.

As amostras foram preparadas a partir da solução de nanopartículas monodispersas em meio aquoso alcalino, no caso, as FNPs. Dilui-se a solução estoque em 50 vezes e pingou-se uma gota na grade própria para o microscópio, a grade secou a 37 °C em uma estufa, de um dia para o outro.

### **4.5 Medidas de absorvância de 1 fóton**

#### **4.5.1 Medidas de profundidade óptica – espectrofotômetro**

As medidas de profundidade óptica  $\tau$  foram feitas utilizando o espectrofotômetro Thermo Scientific™ Multiskan™ GO (intervalo de comprimento de onda – 300 nm – 900 nm, resolução - 1 nm, placa multipoços com 96 poços, volume – 100  $\mu$ L da amostra de FNP em NaOH 0,1 M, área da superfície - 0,33 cm<sup>2</sup>). Os softwares de leitura dos aparelhos citados acima retornam dados de absorvância A por comprimento de onda, portanto, foi necessário fazer uma mudança de base do logarítmica para utilizar os dados como profundidade óptica (equação 2).



$$\tau = \ln 10 A \quad (2)$$

Para as amostras contendo FNP retiradas dos filtros de coleta em meio aquoso alcalino, optou-se pelo leitor de microplacas para realizar a medida do espectro por conta do baixo volume necessário de amostra para que houvesse uma boa leitura. A concentração de FNP (N) foi calculada após as medidas de absorção utilizando a equação 3 junto com, o valor de  $\tau$  em 638 nm (escolha arbitrária), o parâmetro  $l$  (caminho óptico calculado pela altura do volume do líquido no poço) e  $\sigma_{638\text{nm}}$  (atenuação das contribuições da absorção e espalhamento de  $10^{-11} \text{ cm}^2$ ).<sup>63</sup>

$$\tau = Nl\sigma \quad (3)$$

#### 4.5.2 Ajustes de espalhamento – Mie

Para construir o espectro de absorção apenas com a contribuição dos estados absorptivos das FNPs, removeu-se a contribuição do espalhamento através do ajuste da curva nos dados da medida após serem plotados como profundidade óptica.

Para que as aproximações fossem coerentes, os seguintes parâmetros e argumentos foram utilizados:

1. Com os tamanhos hidrodinâmicos das FNPs variando entre 70 nm ~ 200 nm de forma monodispersa, podemos inferir um espalhamento do tipo mie ( $n > 4$ ; equação 4).<sup>30, 65</sup> Assim como mostrado na Figura 6, o parâmetro de tamanho entre 0.1 e 10, caso das nanopartículas de BC, está relacionado ao espalhamento Mie em 785 nm.

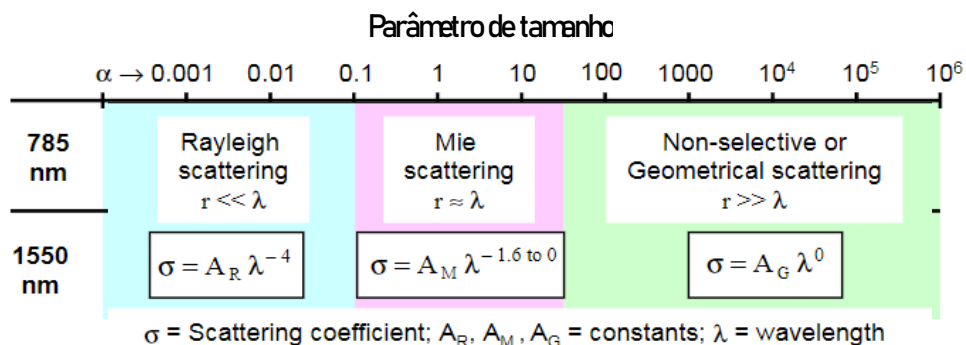


Figura 6 - Escala de parâmetro de tamanho em relação a Lei de potência para o espalhamento da luz de partículas aerossóis para 785 nm e 1550 nm, onde  $\alpha = 2\pi r/\lambda$ .

Fonte: Adaptada de KIM, I. I.<sup>67</sup>

2. No infravermelho próximo há uma queda brusca na densidade de estados absorptivos, pode-se aproximar a contribuição para zero.<sup>40, 66</sup> Embora artigos recentes determinem que novas contribuições no infravermelho são expressivas para BC, neste trabalho, usamos apenas as contribuições geométricas das nanopartículas para analisar seus estados de absorção.<sup>28</sup>

$$\sigma_s = A_M \lambda^{-n}, \quad n [0; 1,6] \quad (4)$$

Utilizando-se do software OringLab® determinou-se as curvas de espalhamento  $\sigma_s$  respeitando a equação 4<sup>67</sup>, ajustadas pelos pontos do infravermelho próximo, com os parâmetros de amplitude  $A_M$  e índice  $n$  livres. Nessa região do infravermelho entre 800 nm e 900 nm é dominada pelo espalhamento, uma vez que a absorção molecular tem muito pouca contribuição. A subtração da curva de espalhamento resultou na curva de estados absorptivos reais para 1 fóton, com delimitação inferior sob o ruído da medida de linha de base. Além disso, utilizou-se de ajustes Gaussianos para determinar 3 curvas compositoras da absorção real, escolhidas para representar a contribuição da forma de agregação molecular ao espectro.

#### 4.6 Microscopia óptica de fluorescência confocal

O microscópio óptico de fluorescência confocal modelo Zeiss® LSM 780, invertido, pertence ao Laboratório Multiusuário do Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo. O microscópio é equipado com laser de excitação por 2 fótons (2P) *Ti: Safira* (Chameleon Vision II, Coherent Inc., Santa Clara, Canadá) sintonizável, para emissão em 690-1050 nm, pulsado, de 80 MHz (largura do pulso de 100 fs) e com o laser de Diodo: 405 nm para excitação por 1 fóton (1P).

Para as medidas realizadas neste trabalho, foi utilizada uma objetiva de 63x; 1,4 NA; wd = 0,2 mm (água), detectores GaAsP de alta sensibilidade, capazes de gerar imagens no modo Espectral e a leitura pixel-por-pixel da emissão em 400-700 nm com resolução lateral de 200 nm. O sinal recebido é dividido em 32 canais com 9nm de resolução (32 fotomultiplicadoras) previamente calibrados, impedindo a falsa contribuição de uma faixa de emissão na leitura. Também foi utilizado o detector NDD - *Non-Descanned Detector* operando nos modos de reflexão e transmissão e a leitura no modo Canal, onde uma fotomultiplicadora recebe toda informação de um intervalo de aquisição através de filtros ópticos - Ch1 (405 nm – 450 nm).

As medidas de tempo de vida de fluorescência também foram feitas no microscópio óptico de fluorescência confocal após serem igualmente excitadas pelo laser de 2 fótons em conjunto com dois detectores de avalanche para espectroscopia e imagem de tempo de vida da fluorescência (*Fluorescence-lifetime imaging microscopy* - FLIM) com resolução temporal de 75 ps.

#### **4.6.1 Imagens e análise em meio aquoso**

A amostra de FNP em meio aquoso alcalino foi posta em forma de gota em uma lamínula de vidro hidrofílica de 0,15 mm de espessura (pré-preparada comercialmente), por conta do tamanho das nanopartículas, foi possível visualizar a chegada e deposição destas na borda da gota influenciadas pelo efeito Marangoni, proporcionando imagens com maior dispersão das partículas de BC e a separação de outras partículas maiores, como no caso das amostras dispersadas dos filtros de FP (Figura 7).<sup>68</sup> As lâminas de tecido vieram pré-preparadas do Laboratório de Patologia Ambiental.

A iluminação ocorreu com uso do laser de *Ti:Sapphire* de 2 fótons nos comprimentos de onda sintonizáveis de 750 nm a 1050 nm, com uma fluência do laser de 0,04 J/cm<sup>2</sup> a fim de não gerar incandescência ou efeitos de pinça óptica, transposição da amostra pelo plano.<sup>32</sup> Os detectores utilizados foram o GaAsP para imagens Espectrais e Canal, e para as lâminas de tecido, foi utilizado também o detector NDD. O pós-tratamento da imagem foi realizado com o programa Zen®.

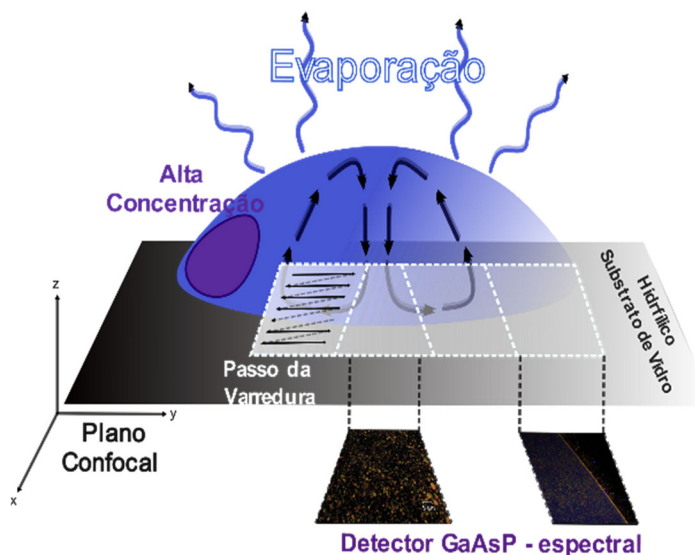


Figura 7 - Esquema de representação de uma gota da solução a ser visualizada no microscópio óptico de fluorescência confocal em cima de um substrato hidrofílico. A gota tem bordas menos perpendiculares e o efeito Marangoni das partículas está representado pelas setas azul escuras em seu interior. A região em roxo representa a região de alta concentração de partículas menores de 200 nm. O plano focal utilizado para a visualização é o plano do substrato e as regiões são as indicadas na imagem, borda da gota e centro. O passo da varredura é horizontal e inicia sempre da esquerda para a direita. Setas pretas dentro da região pontilhada em branco.

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.6.2 Emissão de fluorescência e absorção por transmissão óptica com excitação de 2P de uma única partícula

Ainda da amostra de FNP em meio aquoso alcalino e para as lâminas de tecido, foram recolhidos pontos de emissão espectral por pixel de três partículas diferentes para cada comprimento de onda de excitação e feita uma média desses valores para o espectro. Com esses pontos foi utilizado o software gráfico OriginLab® para plotar o perfil espectral de emissão de fluorescência das partículas de BC em um intervalo de 400 nm a 800 nm. Além disso, observou-se a emissão de fluorescência de matéria orgânica presente no meio de algumas amostras por conta da forma da coleta, segundos harmônicos de partículas inorgânicas presentes nestas mesmas amostras, autofluorescência de células em tecidos. Utilizando do aplicativo *Chromaticity*

*Diagram*, foi feito o Diagrama de Cromaticidade de 1931 para comparação destes espectros com o espectro de luz branca.

Medidas de transmissão pixel-por-pixel possibilitaram o cálculo do perfil de profundidade óptica e posteriormente de absorbância de dois fótons pelas nanopartículas de BC. Utilizou-se os pontos referentes aos perfis transmissão traçados ao entorno das FNP's monodispersas nas imagens de cada comprimento de onda de excitação (Figura 88) e, utilizando da equação 5 foi possível plotar os dados.

$$\tau = \ln \frac{I_0}{I_t} \quad (5)$$

O ajuste da curva de espalhamento também foi feito para os dados de absorção de 2 fótons, assim como na seção 4.5.2. Agora, o comprimento de onda rege o espalhamento, mas, a absorção resultante é equivalente a energia dos dois fótons que chegam simultaneamente na amostra ( $\lambda/2$ ).

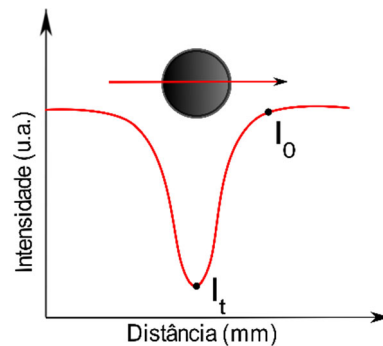


Figura 8 - Perfil de transmissão da luz transversal a uma nanopartícula de BC. Pontos de máxima e mínima intensidade utilizados na equação 5.

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.6.3 Imagem de tempo de vida de fluorescência (FLIM)

As imagens de tempo de vida de fluorescência (FLIM) utilizam dos lasers de excitação e do sistema óptico do microscópio que direciona a luz para dois detectores TCSPC de avalanche SPAD (acrônimo do inglês *single-photon avalanche diode*). Em cada um deles é colocado um filtro óptico de modo que apenas a fluorescência de uma região espectral específica seja adquirida em cada um dos detectores.<sup>69</sup>

Como os tecidos têm autofluorescência máxima na região espectral entre 400-500 nm, um dos detectores é fixado nesta região, enquanto na outra, foi utilizado um filtro óptico que permite a passagem de banda de 600-700 nm, com o objetivo de coletar a autofluorescência predominante das partículas de BC, exclusivamente. Cada pixel da imagem teve seu tempo de decaimento aferido e foi utilizado o software PicoQuant SymphoTime Analyses®. Através do histograma de contagem de fótons, foi feita a deconvolução do decaimento da intensidade de fluorescência com o comportamento descrito na equação 6, onde  $N$  é o número de decaimentos temporais considerados, cada um com tempo de decaimento característico  $\tau_i$ , para cada um na taxa de decaimento de fluorescência  $\tau$ . Para as partículas de BC, foi ajustado ao decaimento medido uma IRF (índice de referência), que considera a subida da fluorescência logo após o pulso do laser e um decaimento exponencial duplo, ou seja,  $N=2$  (equação 7), que aproxima um decaimento rápido não-radiativo e outro longo, devido ao decaimento rápido dos estados excitados das moléculas em consideração como nas formas livre e de interação com outras no agregado. Na equação 7,  $a_i$  é a amplitude de cada componente exponencial.

$$\frac{dn(t)}{dt} = -\frac{1}{\tau}n(t) \quad (6)$$

$$f(t) = \sum_{i=1}^N a_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (7)$$

Foi calculado por meio da equação 8 o tempo de decaimento médio para cada pixel ( $\tau_m$ ), a imagem foi produzida com cores falsas onde cores mais azuladas mostram tempos de decaimento mais curtos, enquanto cores mais avermelhadas exibem tempos mais longos.

$$\tau_m = \frac{\sum_{i=1}^N a_i \tau_i^2}{\sum_{i=1}^N a_i \tau_i} \quad (8)$$

#### 4.6.4 Quantificação da geração de oxigênio singleto pelas DBCs

O experimento foi realizado no microscópio óptico de fluorescência confocal, uma gota da amostra de DEP a uma concentração de 0,02 mg/ml juntamente com um indicador fluorescente de oxigênio singleto a uma concentração de 200  $\mu\text{M}$ , ambas as soluções estoque em Milli-Q, foi iluminada com o laser de Diodo, excitando a amostra em 405 nm, com uma fluência de 0,4  $\text{J}/\text{cm}^2$  e pixels de 0,133  $\mu\text{m}$ . Após a excitação pontual das DEPs, obteve-se a prova das reações fotoquímicas ocorridas com a segunda passagem do laser na mesma região. (Figura 99) O espectro de emissão de fluorescência em 430 nm foi retido do perfil transversal traçado digitalmente no software Zen® detectado no modo Canal.

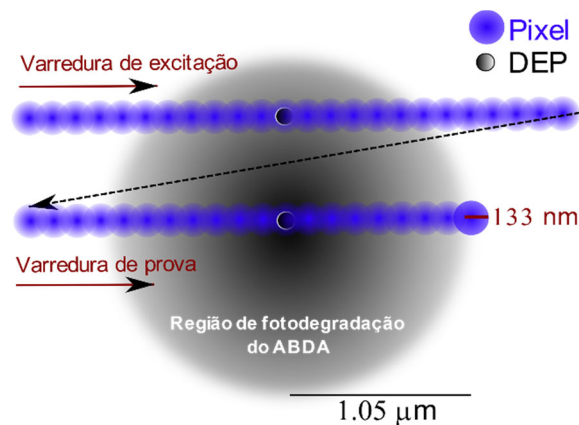


Figura 9 - Varredura de excitação da DEP da esquerda para a direita, seta vermelha superior e, varredura de prova, seta vermelha inferior. Os pixels estão representados por círculos azuis e a DEP por círculos pretos. A sombra projetada em torno da DEP representa a fotodegradação das moléculas de ABDA.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para quantificar a geração de  $^1\text{O}_2$  pela partícula em razão da quantidade de fótons absorvida por esta na passagem do laser, rendimento quântico de oxigênio singleto (*do inglês – singlet oxygen quantum yield –  $\Phi_{\Delta NP}$* ), utilizou-se a ausência de fluorescência de um indicador de  $^1\text{O}_2$ .

$$\Phi_{\Delta NP} = \frac{\# \text{ molecules of } ^1\text{O}_2 \text{ formed}}{\# \text{ photons absorbed by NP}} \quad (9)$$

A molécula de 9,10-Anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid (ABDA) perde sua capacidade absorptiva neste comprimento de onda por conta da modificação do grupo aromático no centro da cadeia que ocorre na presença do  $^1\text{O}_2$  reativo (Figura 10 - a).

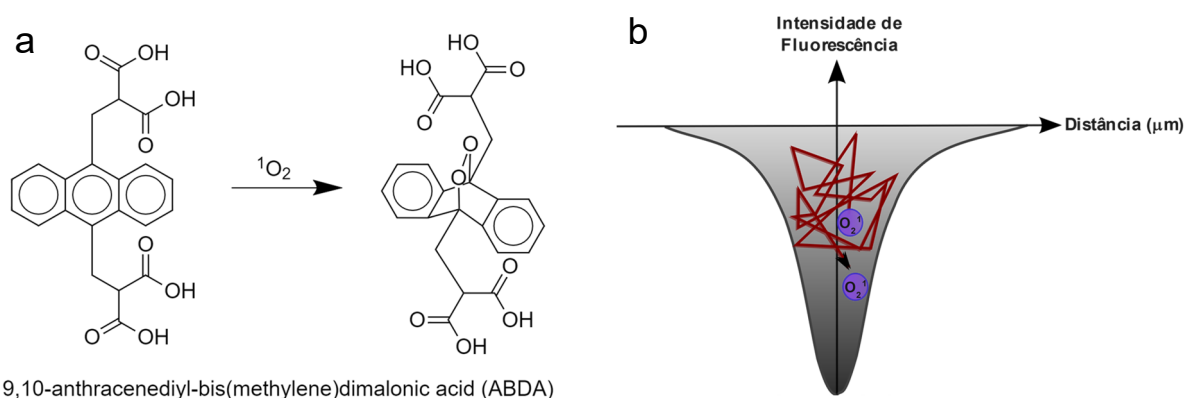


Figura 10 - a) Mecanismo de reação da molécula de ABDA em contato com oxigênio singleto. b) Gráfico obtido através dos pontos do perfil transversal de uma única nanopartícula após a segunda passagem do laser, o esquema indica a aleatoriedade da difusão do oxigênio molecular.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para determinação dos parâmetros necessários para medida indireta de  $\Phi_{\Delta NP}$  utilizamos o software OriginLab®. O espectro de emissão de fluorescência do indicador é uma Gaussiana “invertida”, ou seja, o decaimento da fluorescência no entorno das DEPs indica a presença de moléculas fotodegradadas pela presença do  $^1\text{O}_2$ . Estimando 1:1 a concentração de ABDA fotodegradado e  $^1\text{O}_2$  gerado e utilizando a concentração de ABDA na amostra (200  $\mu\text{M}$ ) juntamente com a meia altura do ajuste gaussiano do espectro  $2\sigma = 2,1 \mu\text{m}$ , foi possível determinar quantas moléculas foram geradas após a passagem do laser. O tamanho da molécula de ABDA é de 75 Å (Figura 10 – b).

O tempo de varredura da imagem foi de 1,27  $\mu\text{s}$  por pixel, com pixels do tamanho de 0,133  $\mu\text{m}$  de diâmetro, contando com 512 pixels em cada eixo, x e y. Ao relacionar o tempo de varredura com a velocidade de difusão do oxigênio em um meio aquoso (coeficiente de difusão do oxigênio em água  $\sim 4 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ ), a proporção de 1:1 pode ser declarada como verdadeira já que o tempo de difusão do oxigênio para percorrer o raio da Gaussiana de 1,05  $\mu\text{m}$  é maior que o tempo de varredura da



imagem da primeira para a segunda passagem do laser (650,24  $\mu$ s), portanto, é possível acompanhar a ação do oxigênio desde a acepção energética que excita a molécula para o estado tripleto, até a interação molecular com o indicador em sua vizinhança.

Outros parâmetros necessários para a determinação da eficiência quântica são o número de fótons absorvidos pela DEP no tempo de passagem do laser. Utilizou-se da potência do laser de 405 nm previamente medida de 93  $\mu$ W, a energia do fóton de 405 nm de 3,06 eV, o tempo de exposição de 1,27  $\mu$ s e a porcentagem de absorção da luz pela DEP calculada através da remoção da contribuição do espalhamento da luz neste comprimento de onda que foi determinada neste trabalho pela correção da medida de profundidade óptica para a absorção real ( $FNP_{abs(405\text{ nm})} \sim 2\%$ ).

#### **4.6.5 Tecidos Humanos e de Camundongos**

Para a visualização das nanopartículas de BC de tecidos humanos e camundongos expostos a poluição, as metodologias foram realizadas no Laboratório de Patologia Experimental e Ambiental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelas pesquisadoras, Mariana Matera Veras e Dunia Waked, ambas as metodologias estão nas referências citadas neste parágrafo.<sup>57, 70</sup>

Os tecidos recebidos em lâminas de vidro foram coletados do pulmão humano (região arbitrária), meninge humana, linfonodo ilo pulmonar e bulbo olfatório. Os tecidos coletados dos camundongos foram das regiões do pulmão e bulbo olfatório, tanto para aqueles expostos as partículas de BC quanto do grupo controle, que não foram expostos. Utilizou-se da metodologia de visualização da seção 4.6.1 para a identificação nos tecidos.



## **5 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **5.1 Análises Morfológicas**

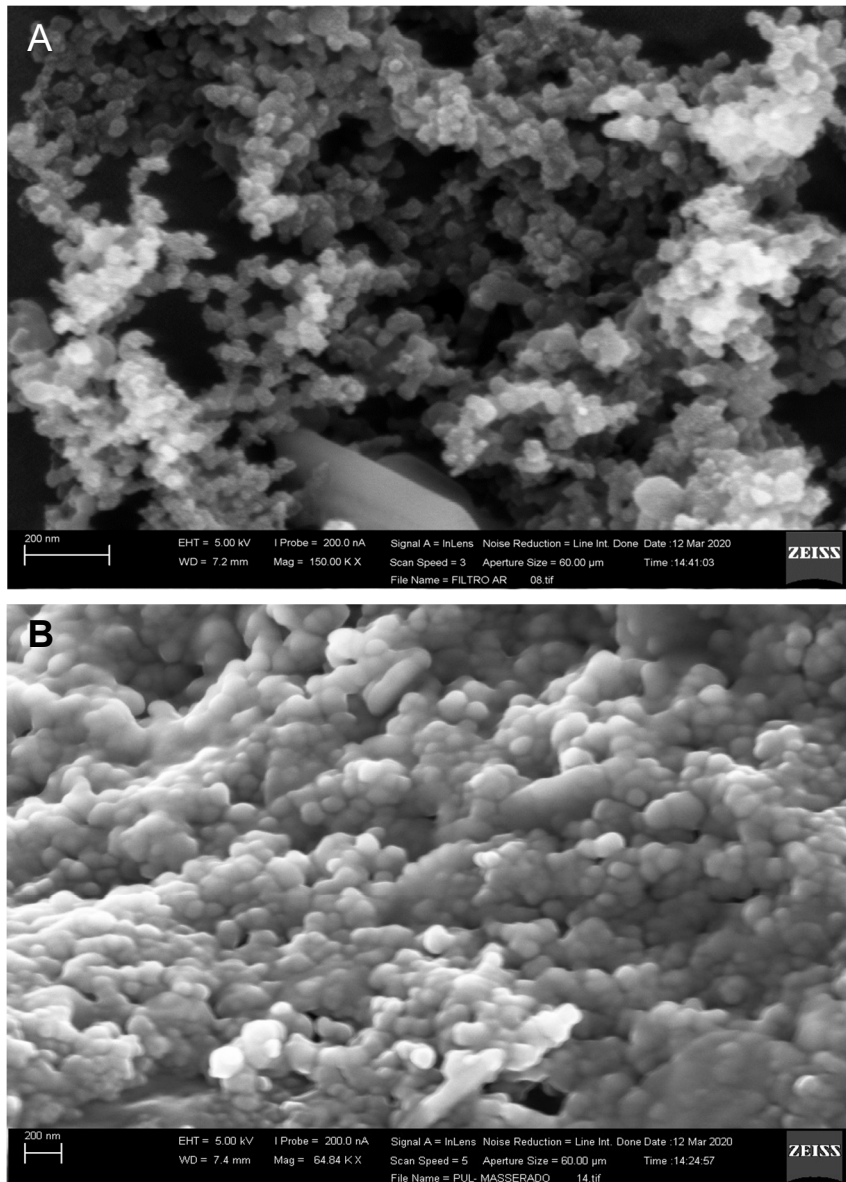
Para alcançar os objetivos deste trabalho, inicialmente foi realizada uma caracterização morfológica das amostras cedidas. A partir de seus locais de coleta, é possível inferir que a FNP, LNP e DEP são propensas a diferentes modificações moleculares, portanto, analisá-las, é retratar as partículas que afetam diretamente a saúde humana e ambiental. As FNPs e LNPs são de maior interesse, já que a FNP foi coletada diretamente da atmosfera e portanto, seriam o retrato daquela que seria inalada, a LNP é a mimetização da partícula após ser inalada e/ou ingerida pelo ser humano. Por conta de suas metodologias de coleta, são mais difíceis de serem suspensas em meio aquoso, é daí que partiu nossa metodologia em meio aquoso alcalino. Para máxima suspensão das partículas coletadas da atmosfera e do pulmão humano, o aumento de pH atrelado a força física dos banhos ultrassônicos, possibilitou a maior dispersão das subunidades nanométricas das partículas genuínas de fuligem. Portanto, para alcançar o máximo aproveitamento das amostras para medir a profundidade óptica e fazer imagens e espectros na microscopia óptica de fluorescência confocal de suas subunidades, analisamos previamente a morfologia das amostras a serem medidas, comparando assim seu formato, tamanho e composição química antes e depois da remoção dos filtros. Além disso, a monodispersão das subunidades é importante para as futuras análises ópticas e por isso, este critério foi levado em consideração para escolha final das amostras.

#### **5.1.1 Microscopias Eletrônicas**

##### **5.1.1.1 FEG-SEM/ EDS**

As imagens de FEG-SEM (Figura 11) possibilitaram a comparação dos tamanhos e dos formatos das FNPs e LNPs. Para ambas as imagens, a forma das

subunidades de fuligem é nitidamente arredondada e regular, portanto, não há diferença em relação ao formato superficial, independente do lugar coletado.



*Figura 11 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de filtros de fuligem A: coletadas do ar, B: removidas de um pulmão humano, com formas arredondadas e regulares. As barras de tamanho de 200 nm possibilitaram a análise de tamanho.*

*Fonte: Elaborada pela autora.*

A distribuição normal (Figura 12) dos tamanhos das partículas coletadas da atmosfera (FNPs) tem um diâmetro médio de 40 nm com um desvio padrão de 10 nm, já para as LNPs temos um diâmetro médio de 90 nm com um desvio padrão de 20 nm. Embora os valores de tamanho médio sejam estatisticamente equivalentes,

vemos que há a presença de partículas maiores no pulmão, que não aparecem nos filtros contendo FNP. Não se sabe ao certo a causa desta diferença, mas por se tratar de partículas advindas de um pulmão humano, a probabilidade de partículas mais “antigas” ou até mesmo de um *coating* adicionado por processos de defesa do corpo humano.

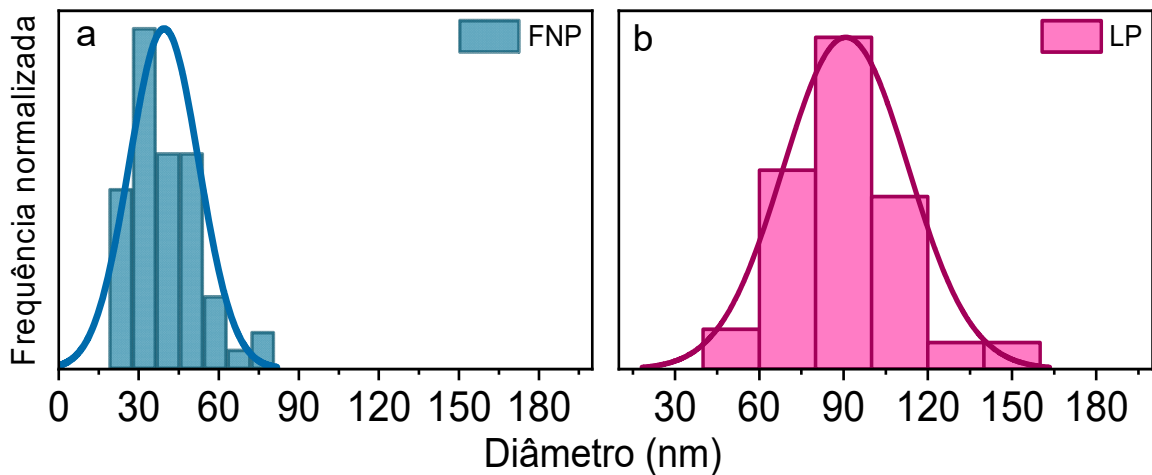
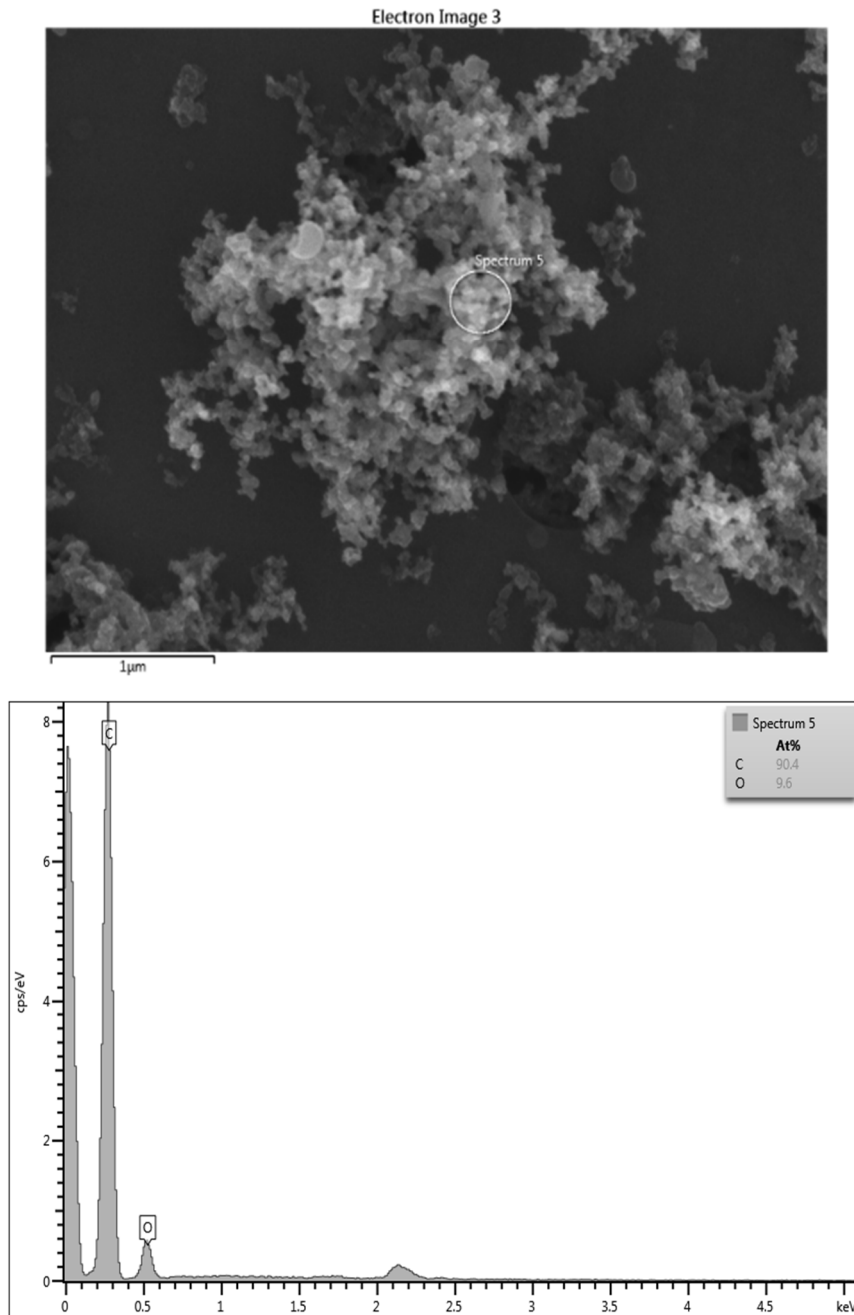


Figura 12 - Gráficos de distribuição de tamanho das subunidades nanométricas da fuligem a partir das análises de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos a) filtros de Ar (FP) e b) filtros de partículas retiradas do pulmão (LP). Histogramas e suas distribuições normais com tamanhos médios de 40 nm para FNP (a) e 90 nm para LNP (b).

Fonte: Elaborada pela autora.

O espectro da região circulada na imagem da Figura 13 que contém a amostra de FP, exibe os valores de 90,4% de átomos de carbono e 9,6% de átomos de oxigênio, estes valores corroboram com os mostrados na literatura.<sup>59</sup> É importante ressaltar que o resultado não apresenta compostos metálicos porque estes possivelmente foram removidos pelo fluído na metodologia de coleta, mas para o prosseguimento deste trabalho, caracterizar partículas nanométricas de fuligem, este não é um problema. Outro fator de não aparecimento de metais é devido a resolução da técnica utilizada, que pode não ter captado os metais e contaminantes presentes nas coletas do filtro de ar, o FP.



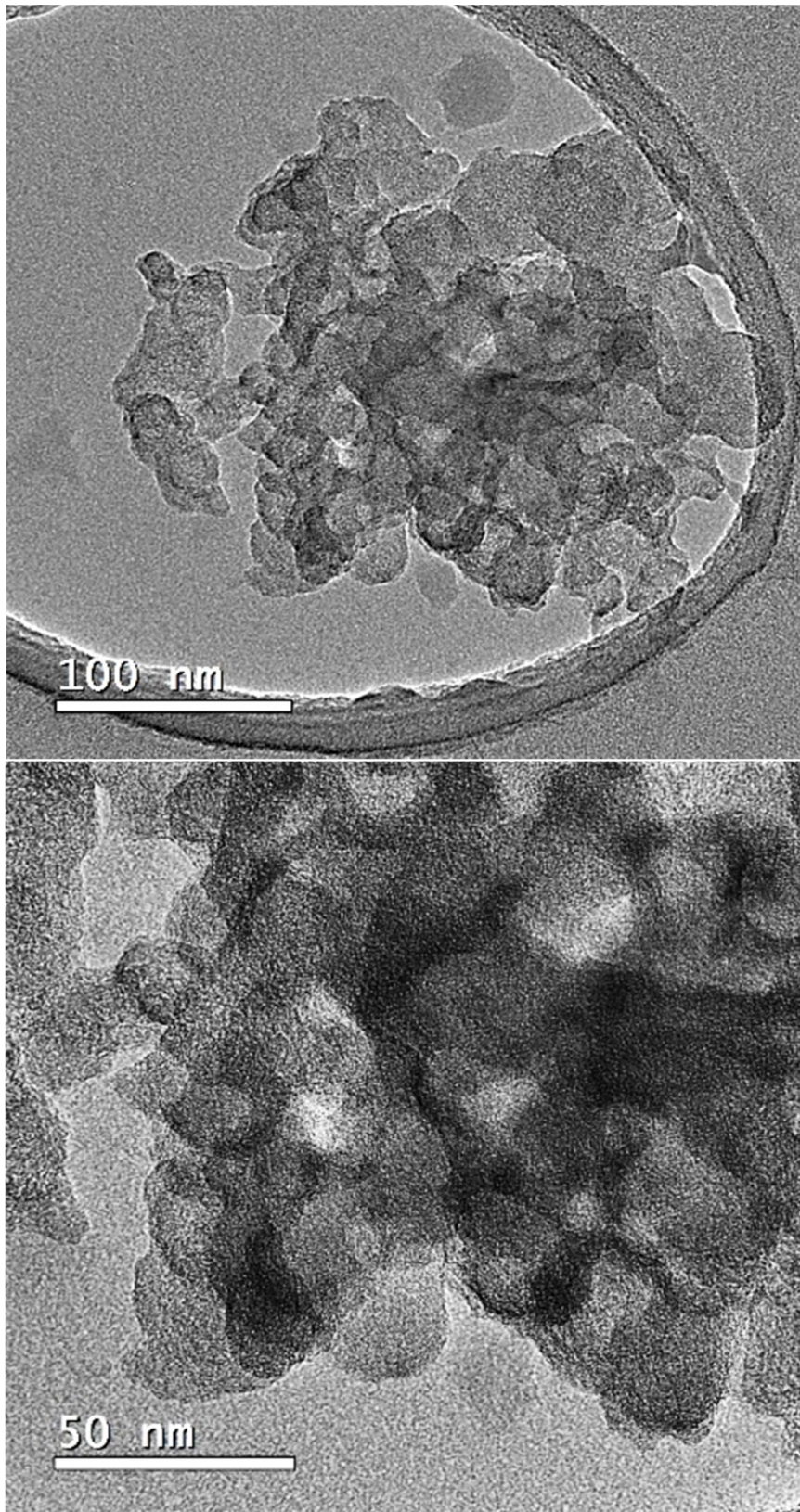
*Figura 13 - Espectroscopia por energia dispersiva realizada na região circulada de um filtro de fuligem recolhida do ar utilizando microscópio eletrônica de varredura e seu espectro indicando os principais elementos que compõe a região circulada, principalmente carbono e oxigênio, com os valores de porcentagem de átomos de 90% de carbono e 9,5% de oxigênio.*

*Fonte: Elaborada pela autora.*

Finalizada a caracterização morfológica das partículas de FNP e LNP diretamente nos filtros, seguiu-se para as análises após sua dispersão em meio aquoso alcalino.

### 5.1.1.2 TEM/ EDX

As imagens de TEM foram realizadas apenas para FNPs já que, para as LNPs, após a remoção do filtro, uma pequena quantidade foi removida. Devido a metodologia de preparação da amostra para microscopia, não foi possível retratar a dispersão das unidades nanométricas. Na Figura 14 as regiões mais escuras da imagem retratam a deposição das partículas umas por cima das outras, por conta da secagem da gota, uma otimização da concentração deverá ser feita para sanar esse problema. Neste caso, técnicas de análise de imagem para distribuição de tamanho não foram aplicadas, cabendo apenas a comparação pela barra de tamanho. É possível afirmar que o tamanho foi mantido quando comparamos com o tamanho médio de 40 nm na Figura 12. Com uma densidade molecular entre  $1,4 \text{ g/cm}^3$  e  $1,8 \text{ g/cm}^3$ <sup>71-73</sup> o que resulta em uma distância entre as moléculas de  $3,7 \text{ \AA}$ , deveria-se observar uma alta densidade de moléculas, semelhante a formação de uma cebola, com várias camadas sobrepostas, assim como na literatura, mas a resolução do microscópio não foi suficiente para tal observação.<sup>41, 74</sup> Não há a identificação de nenhum padrão nas imagens abaixo, portanto, não descartaremos esta formação molecular daqui para frente, já que está amplamente caracterizada na literatura.

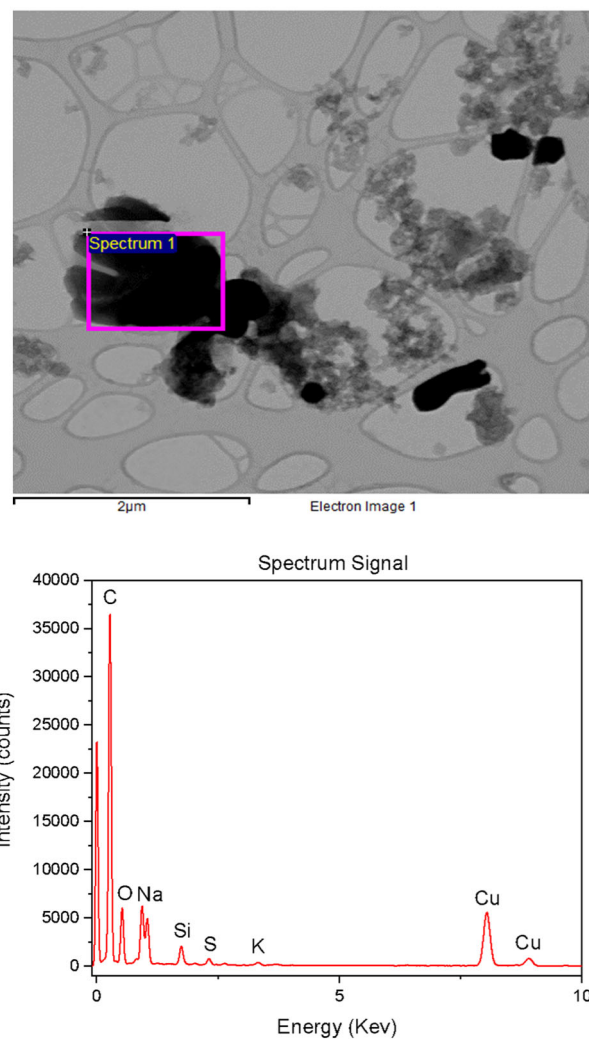


*Figura 14 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das partículas de FNP retiradas do filtro através da metodologia explicada na seção metodologia deste trabalho, em solução aquosa alcalina (NaOH 0,1 M). Imagens da sua formação molecular, forma de "cebola".*

*Fonte: Elaborada pela autora.*



O espectro da medida de EDX mostrado na Figura 15 apresenta a composição química das FNPs e comprova que não houve alteração significativa ao serem comparados os valores de porcentagem de átomos antes e depois da remoção dos filtros. Como é possível ver na Tabela 2, há 90,0% de átomos de carbono e 6,6% de átomos de oxigênio. Não foram encontrados metais, os outros valores da tabela 2 tornam-se irrelevantes em comparação com porcentagem de carbono e oxigênio e, os valores para Na e Cl devem ser ignorados pois representam o soluto. Podemos afirmar que nossa metodologia não alterou morfologicamente as partículas, e através das medidas de DLS, veremos que o objetivo de as monodispersar em subunidades nanométricas foi cumprido.



*Figura 15 - Imagem de microscopia eletrônica de transmissão da região de coleta dos dados de EDX, plotados no gráfico abaixo indicando aproximadamente 90% de carbono (C), e 7% de oxigênio (O). A presença do cobre (Cu) é devido a grade de microscopia em que a amostra foi lida e o sódio (Na) e cloro (Cl), são devido a solução alcalina em que foram dispersas.*

*Fonte: Elaborada pela autora.*

Tabela 2 - Tabela elaborada pelo Software Oxford Instrumentes® contendo os elementos encontrados no "spectrum 1" da figura 15, em porcentagem de átomos.

Elemento	C	O	Na	Si	P	S	Cl	K	Ca	Fe	Total
%Átomos	89,96	6,58	1,88	0,89	0,08	0,33	0,09	0,12	0,05	0,02	100

Fonte: Elaborada pela autora.

### 5.1.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (do inglês – *Dynamic Light Scattering – DLS*)

O Espalhamento Dinâmico de Luz é uma das principais técnicas utilizadas para a caracterização de nanopartículas, através destas medidas observou-se o tamanho e a qualidade da monodispersão das subunidades em meio aquoso. A monodispersão da amostra é dada pelo Índice de Poli-Dispersão (do inglês – *Polidispersion Index - PDI*) que varia de 0,1 a 1, e quanto mais próximo a 0,1, mais monodisperso.

Para estas medidas utilizamos das amostras de FNPs, LNPs e inserimos as DEPs dispersas em meio aquoso neutro, no caso, apenas Milli-Q. A escolha das amostras retrata a necessidade da caracterização morfológica crucial para os próximos passos. Quando dissolvida em água, a DEP passa a ser inserida na classe das *Dissolved Black Carbons* (DBC), classe esta, que caracteriza as ações das partículas em meio aquosos. A escolha das amostras em cada análise óptica leva em consideração a monodispersão, o meio em que a monodispersão ocorre, e o tamanho dessa subunidade nanométrica, é por conta disso que as medidas de DLS comparam as amostras de FNP e LNP em solução aquosa alcalina e DEP em Milli-Q.

No gráfico a) da Figura 16 vê-se que o tamanho hidrodinâmico dado pelo pico da distribuição LogNormal para as FNPs é de 130 nm com um sigma de 40 nm, com um PDI da medida de 0,146. O tamanho hidrodinâmico de uma partícula é maior do que o seu tamanho seco, como nas imagens de microscopias eletrônicas, portanto, podemos argumentar que estamos trabalhando com 2 a 3 subunidades de partículas de BC.

Para as LNPs, gráfico b da Figura 16, temos dois picos na distribuição de tamanho e uma medida com um PDI de 0,334, indicando que não houve uma monodispersão. Apenas o valor do primeiro pico de 80 nm com um desvio padrão de 20 nm (dados diretos da medida) é equivalente ao tamanho de uma subunidade medida na amostra da imagem feita no SEM-FEG, o segundo pico tem um tamanho hidrodinâmico médio de 200 nm com um desvio padrão de 50 nm. Embora tenha tido um melhor efeito na dispersão das unidades de BCs (menores tamanhos), não obtivemos uma monodispersão, o que prejudica a caracterização óptica da amostra no que dirá respeito a absorção e fluorescência de 1 fóton.

Com um PDI de 0,153 o pico do tamanho hidrodinâmico das nanopartículas de DEP foi de 200 nm com um  $\sigma$  de 90 nm (gráfico c, Figura 16). Esses valores mostraram que a metodologia em solução aquosa alcalina é mais eficaz do que em Milli-Q, mas ambas podem ser eficazes quando trata-se de caracterizar opticamente unidades nanométricas de BC. Para que as propriedades ópticas dos agregados moleculares das subunidades de BC sejam evidenciadas, é necessário trabalhar com partículas de tamanhos nanométricos.

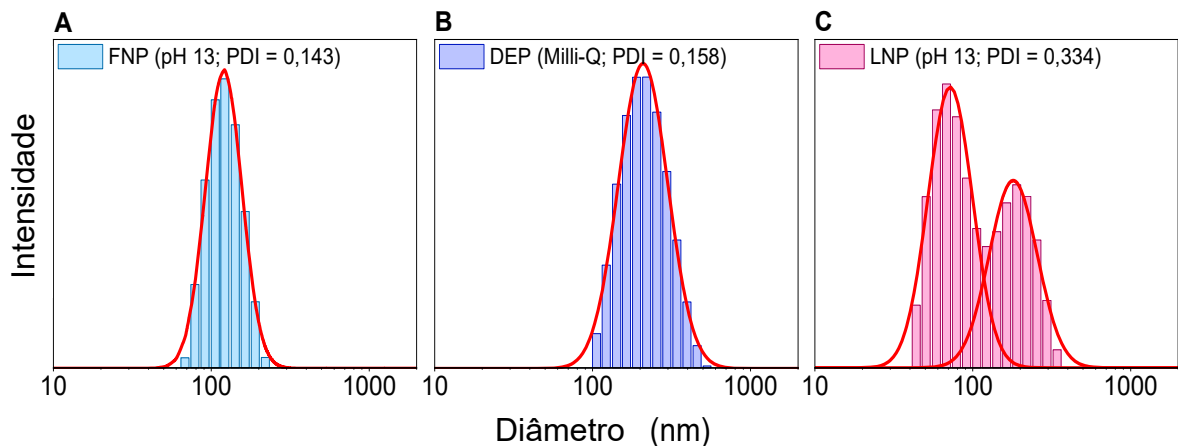


Figura 16 - Gráficos de distribuição de tamanho através de medidas feitas no DLS de A. amostra de FNP em meio aquoso alcalino; B. amostra de DEP em Milli-Q.; C. amostra de LNP em meio aquoso alcalino. Para A. e B. temos os ajustes de log-normais que determinam o pico e o tamanho médio das partículas suspensas na amostra. Para C. o valor dos picos e dos desvios médios foram dados diretamente pelo software Zetasizer®.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nas posteriores análises, a monodispersão é fundamental para que os resultados de absorção óptica sejam ajustados.

### 5.1.3 Microscopia óptica de fluorescência confocal – visualização

Embora não seja uma técnica comumente utilizada para análises morfológicas, esta subseção foi adicionada por ser capaz de analisar a monodispersão das partículas quando depositadas em cima de uma lamínula, condição ideal para os futuros experimentos. Devido a autofluorescência das partículas de BC quando excitadas por 2 fótons, foi possível observar amostras de FNP e DEP com uma resolução de até 200 nm de diâmetro. Pode-se ver na Figura 17 – A., que a baixa concentração de FNP na solução foi ideal para preencher a lamínula ao se depositarem e não haver superposição, dando ênfase a monodispersão já observada nas medidas de DLS. Para as partículas de DEP em Milli-Q, Figura 17 - B., o retrato observado no microscópio é diferente daquele presente nas medidas de DLS.

Partículas aglomeradas com tamanhos que ultrapassam 1  $\mu\text{m}$  mostram que estas estão muito mais suscetíveis a aglomerarem-se em um meio aquoso com pH mais baixo e de maior concentração, portanto, trabalhar com concentrações mais baixas e buscar exemplares menores em outras regiões possibilitará as análises. As propriedades ópticas posteriormente analisadas através desta técnica, principalmente ao que se trata de suas características foto físicas com excitação por um laser de 2 fótons e medidas de geração de espécies reativas com excitação por 1 fóton, serão aplicadas em amostras de FNP e DEP respectivamente. Nossos resultados morfológicos caracterizam as melhores amostras para cada medida. Iniciaremos com os espectros de emissão de fluorescência por 2 fótons, absorção por 1 e 2 fótons das partículas de FNP.

Estas, que retratam a cena das partículas inaladas pelos humanos, das partículas depositadas em mares e rios, serão completamente caracterizadas opticamente para posterior identificação em amostras de tecidos biológicos e ambientais. Por fim, por conta de sua maior concentração e viabilização, utilizaremos a DEP em meio aquoso neutro para quantificar a geração de oxigênio singleto pelas partículas de BC quando excitadas por um laser de 1 fóton no range visível.

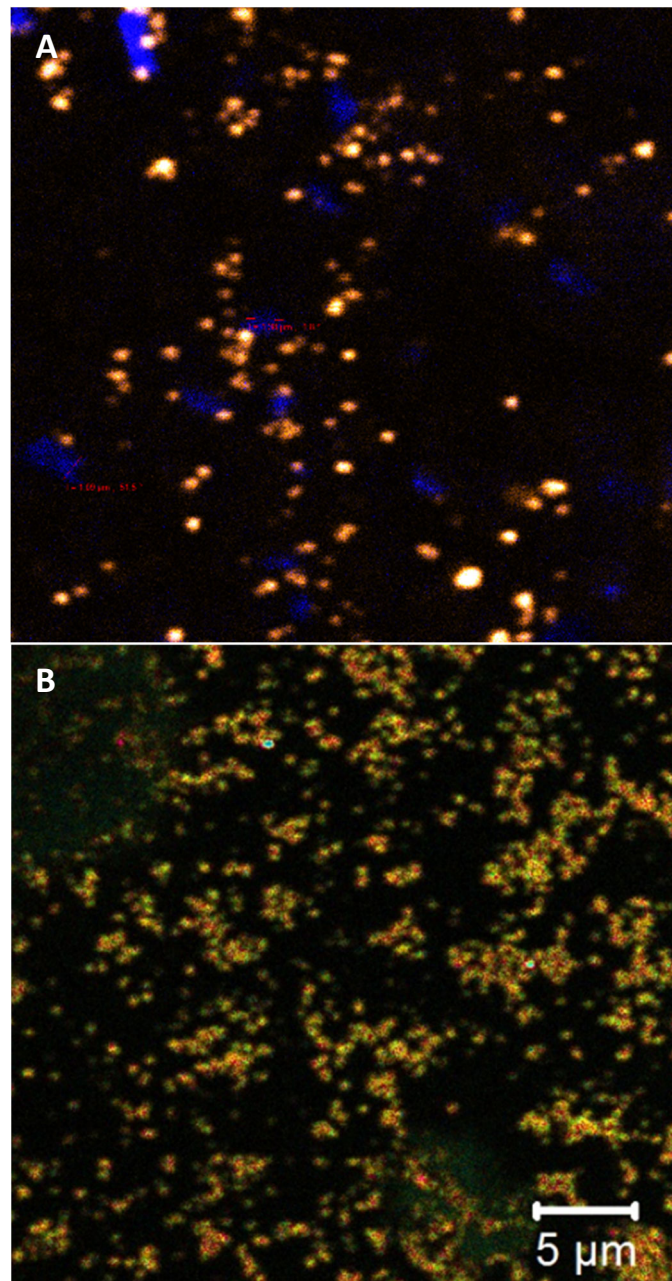


Figura 17 - Imagens de microscopia óptica de fluorescência confocal com excitação de 2 photons em A. 860 nm, FNPs diluídas em NaOH, após serem removidas dos filtros e B. 800 nm, 0,02 mg/ml DEPs diluídas em Milli-Q. A barra de tamanho é igual para ambos os campos de visão das duas imagens.

Fonte: Elaborada pela autora.

## 5.2 Caracterização óptica das nanopartículas de poluição

Para explicar os resultados experimentais desta seção, não trataremos as *Black Carbons* como corpos negros capazes de incandescer, e tão menos daremos ênfase as propriedades de emissão das moléculas que as compõe de forma individual. As

nanopartículas serão tratadas como um agregado de alta densidade molecular, e seus estados de absorção e emissão partirão desta visão de análise.

### **5.2.1 Espectros de fluorescência por excitação de 2 fótons**

Os espectros de emissão de fluorescência por excitação de 2 fótons de uma partícula de BC nanométrica foram obtidos utilizando o microscópio óptico de fluorescência confocal com resolução lateral de 200 nm (pixels de 0,133  $\mu\text{m}$ ). A amostra de FNP em solução aquosa alcalina foi escolhida para esta análise porque as FNPs não se aglomeram ao se depositarem em cima da lamínula, facilitando a caracterização de uma nanopartícula individualmente. Além do mais, essas partículas foram genuinamente retiradas da atmosfera, retratando com maior precisão aquelas que seriam encontradas no meio ambiente e em tecidos humanos após serem inaladas. As informações de um pixel foram recolhidas pelos canais GaAsP para construção de um espectro de emissão para cada comprimento de onda de excitação do range sintonizável, como mostrado na Figura 18.

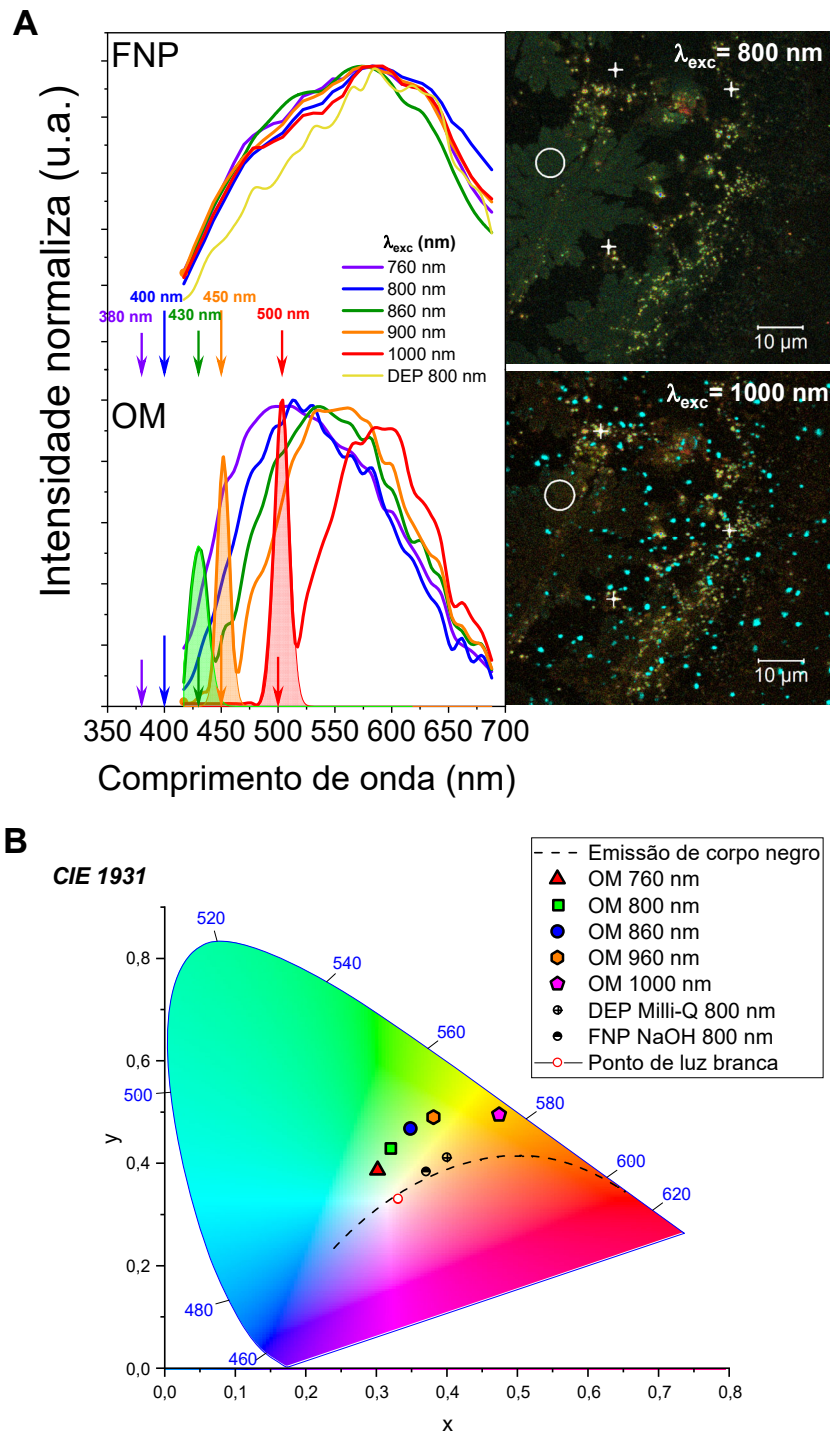


Figura 18 - A) Espectros de emissão de fluorescência do pixel contendo FNP por excitação de 2 fótons (760 nm – 1000 nm) das amostras de FNP dispersas em NaOH 0,1 M. Espectros de emissão da região sem FNP, incluindo segundo harmônico de amostras inorgânicas e emissão da fluorescência da matéria orgânica com excitação de 2 fótons (760 nm – 1000 nm). B) Diagrama cromático CIE 1931 com os pontos referentes aos espectros apresentados na figura A, ponto de luz branca e linha de emissão de corpo negro.

Fonte: Elaborada pela autora.

Destes espectros tiram-se algumas observações e conclusões:

- I. A largura da emissão abrange todo o espectro visível, com um pico em 650 nm (gráfico A - FNP, Figura 18). Diferente da emissividade de uma luz branca, como retratado em algumas literaturas, o espectro não tem a emissão equivalente em todos os comprimentos de onda, dando uma coloração laranja-avermelhada. Pode-se também descartar a emissão devido a incandescência, baseado nos argumentos de baixo valor de fluência do laser;  $0,04\text{J}/\text{cm}^2$  e, posteriormente mostrado, no curto tempo de vida de fluorescência, tanto quanto o intervalo entre os pulsos de excitação;
- II. O espectro de emissão de fluorescência não se desloca independentemente do comprimento de onda utilizado para excitação, não há aumento de fluorescência local, mas há um deslocamento para o vermelho na emissão de fluorescência das partículas de DEP aglomeradas em tamanhos maiores de  $1\ \mu\text{m}$ , mostrados na subseção 5.1.3 (gráfico A - FNP Figura 18);

Maiores estudos acerca da absorção por 2 fótons serão mostrados nas próximas seções. Daqui, supomos uma explicação para esse tipo de emissão: A emissão de fluorescência é distinta das emissões individuais das moléculas que compõe as BCs, estas resumem-se a sinais no Ultravioleta próximo, mas, partindo do princípio de agregação molecular, podemos pensar na emissão acionada por uma clusterização CTE.

- III. Há a presença de conversão ascendente do fóton, fenômeno caracterizado pela emissão de fluorescência em regiões mais energéticas do que aquela em que a amostrada foi excitada (gráfico A - FNP Figura 18). Foi possível determinar a energia de excitação que estava chegando à amostra através dos segundos harmônicos obtidos da medida de materiais inorgânicos que também foram coletados pelo filtro nas sintonizações do laser acima de 850 nm (gráfico A - OM Figura 18).
- IV. As características do espectro de fluorescência presentes nos itens I. e II. geraram uma assinatura óptica das BCs que nos tornam capazes de diferenciá-las da matéria orgânica (do inglês – *Organic Matter* - OM) também coletadas



no filtro da atmosfera. Estas, emitem em todo espectro visível, mas, com picos de emissão distintos para cada energia de excitação (gráfico A - OM Figura 18) (novamente a energia de excitação está indicada pelo segundo harmônico, emissão dos componentes inorgânicos da amostra);

Embora as OMs também possuam emissão de fluorescência em todo o espectro visível, nota-se um deslocamento para o vermelho proporcional ao comprimento de onda de excitação, quanto menor a energia de excitação, mais o pico de emissão descola-se para a direita. Também é possível notar que o fenômeno de conversão ascendente do fóton não ocorre como nas partículas de BC. O gráfico de CIE 1931 (gráfico B, Figura 18) evidencia a diferença dos espectros, é importante notar que para FNP ou DEP não temos a emissão de uma luz branca, evidenciado pelo ponto vermelho sem preenchimento na imagem, além disso, os pontos diferem-se dos espectros de matéria orgânica.

A principal vantagem desta caracterização é a identificação inequívoca das partículas de BC em amostras ambientais e em tecidos humanos, objetivo central deste trabalho. Explicar a emissão de fluorescência de uma unidade partículas de BC isolada pode auxiliar no entendimento da emissão de aglomerados de diferentes tamanhos quando tratamos da emissão acionada por clusterização de agregados moleculares, quanto maior o aglomerado, maior será a emissão no infravermelho próximo.

Em amostras ambientes é de suma importância poder diferenciá-las de ácidos húmicos e fúlvicos, também em grande abundância no meio ambiente. A conversão ascendente do fóton é o fator chave para essa diferenciação, outra propriedade advinda da agregação molecular de alta densidade das partículas de BC.

Poucos trabalhos apresentam a caracterização de emissão de fluorescência por excitação de dois fótons e embora os resultados sejam semelhantes, neste trabalho é dado o enfoque em processos foto físicos de agregados moleculares e não como uma luz branca, mas sim como um deslocamento para o vermelho da emissão através da clusterização, como já explicado na fundamentação teórica deste trabalho.

Os resultados experimentais desta seção deixam lacunas para uma explicação mais aprofundada dos efeitos fotofísicos de uma partícula isolada de BC, por isso, os estudos da absorção de 1 e 2 fótons foi realizado, a fim de complementar as análises experimentais de fluorescência.

### 5.2.2 Tempo de vida de fluorescência

Ao estudar a emissão de luz pelas partículas de BC, muitos trabalhos dão ênfase a emissividade térmica, fazendo as medidas em uma região da chama à queima controlada, onde estas estão em sua fase de formação, mas ainda não maduras. Por conta destes resultados, sua emissão é comumente caracterizada como incandescente, tratam-nas como um corpo negro altamente absorptivo e emissivo.<sup>32, 75-77</sup> Outra ênfase dada a emissão de luz pelas nanopartículas de BC é a chamada emissão de Luz Branca, afirmando que emitem em todos os comprimentos de onda e que somados, resultam em uma emissão unificada de luz branca.<sup>34</sup>

O espectro de emissão de luz obtido na fase experimental deste trabalho não advém da emissividade térmica e/ou incandescência, mas sim da emissão de fluorescência ocorrida por conta dos processos foto físicos de um agregado de alta densidade molecular. Para esta argumentação, além da baixa fluência do laser utilizada, medidas de tempo de vida de fluorescência das partículas de BC serão usadas como prova.

Como é possível observar no gráfico de decaimento da fluorescência em relação ao tempo (Figura 19), o tempo de vida de fluorescência das FNPs está em torno 0,3 ns. Além de muito curto, não corroborando com uma emissão longa como da incandescência, é inferior ao tempo entre os pulsos do laser de 80MHz. Portanto, é possível dizer que não houve aquecimento das nanopartículas a ponto de manifestarem emissividade térmica.

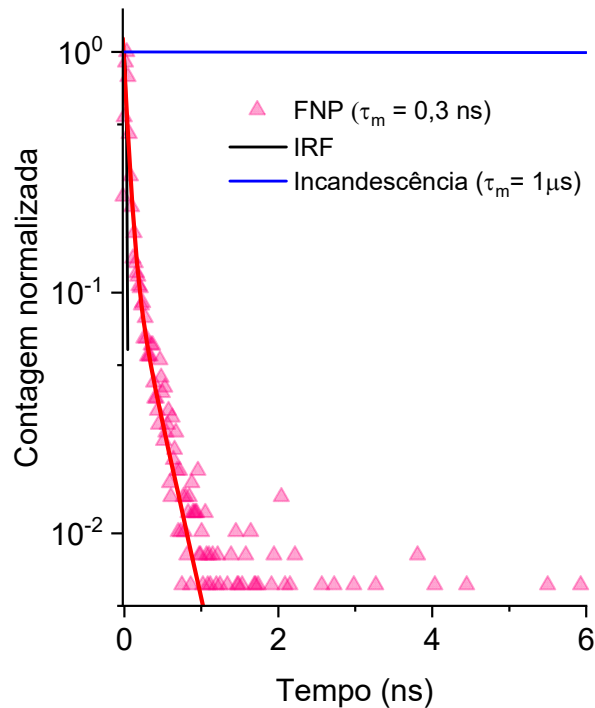


Figura 19 - Gráfico de decaimento da fluorescência por tempo da FNP. Os pontos em rosa retratam a normalização do número de fótons contados em relação ao tempo. O índice de referência (IRF) está representado por uma linha preta.

Fonte: Elaborada pela autora.

Foram calculadas as quantidades de calor absorvidas pelas FNPs para cada pulso individualmente (equação 10), onde  $E_{FNP}$  é a energia absorvida pela partícula individual de BC,  $m$  sua massa e  $C_s$  o calor específico.

$$\Delta T = \frac{E_{FNP}}{m C_s} \quad (10)$$

Como o tempo de vida de fluorescência é menor que o tempo entre os pulsos, assume-se que o calor teria se dissipado mais rápido do que a próxima excitação. Para este cálculo, utilizou-se da potência de 1mW do pulso do laser de 800 nm e a capacidade de absorção de dois fótons do material (essa medida foi feita neste trabalho e será posteriormente mostrada) para determinar a energia  $E_{FNP}$  absorvida. O calor específico da nanopartícula  $C_s$  foi retirado da literatura, levando em consideração sua maturidade e densidade molecular. Por fim, resultamos num aumento de 153 K da temperatura no local. Como o calor específico da partícula é muito pequeno, 0,72 J/gK<sup>78</sup>, conclui-se que ela perde todo o calor entre um pulso e outro. Essa temperatura não caracteriza uma emissão de incandescência do material.

O tempo de vida de fluorescência também pode ser aplicado como uma prova da identificação das partículas em tecidos, principalmente de tecidos contendo hemácias aparentes, esse resultado será mostrado na última subseção.

### 5.2.3 Espectros de profundidade óptica de 1 e 2 fótons – espalhamento e absorção

O estudo desta seção apresenta algo inédito. Parte-se do princípio de que as nanopartículas de BC são esferas/centros espalhadores de luz, seu *cross-section* está intrinsicamente atrelado ao índice de refração e ao momento de dipolo, e não apenas ao tamanho ou forma geométrica desta nanopartícula. Os dados das medidas de absorvância para 1 fóton do UV-Vívisível-IR foram plotados como profundidades ópticas ( $\tau$ ; equação 3), O termo em y engloba tanto as informações da luz absorvida quanto da luz espalhada, por isso são maiores do que 1. (círculos pretos não preenchidos no gráfico A da Figura 20)

Corroborando com o tamanho médio determinado nas medidas de DLS das FNPs, as curvas de espalhamento devem respeitar a equação 4 com  $n < 4$  (regime de espalhamento Mie) quando monodispersas em pH alcalino (curva cinza clara do gráfico A da Figura 20). Ao subtrair o espalhamento da medida de absorvância, foram revelados os estados absorptivos reais das nanopartículas, estados estes que podem ser interpretados a nível molecular (círculos azuis não preenchidos no gráfico A da Figura 20). As nanopartículas de fuligem absorvem em todo o espectro visível, absorvendo também em comprimentos de onda do UV próximo e do Infravermelho próximo. Acredita-se de que os responsáveis pelos estados absorptivos no UV próximo sejam as moléculas de HPAs, tanto no agregado, quanto, possivelmente dispersas na solução.

Os perfis traçados nas imagens de transmissão da luz pela excitação por 2 fótons geraram os pontos de profundidade óptica de 700 nm – 1050 nm (círculos vinhos abertos no gráfico A da Figura 20). Estes pontos representam a contribuição da absorção e do espalhamento da luz por uma única nanopartícula isolada e foi calculado a partir dos perfis de transmissão para cada comprimento de onda de excitação (Figura 20 - B). É notável que a curva segue a tendência da curva de

espalhamento esboçada para o espalhamento Mie, curva cinza do gráfico B da Figura 20, visto que o espalhamento da luz está intrinsicamente ligado ao comprimento da onda e ao tratar de seu estado absorptivo, trataremos da energia que foi absorvida pelas moléculas que no caso abaixo, será o dobro de  $h\nu$ , já que dois fótons chegam simultaneamente na amostra. Levando toda discussão cima em consideração, a curva que mostra os estados de absorção reais para a excitação por dois fótons após a subtração do espalhamento, foi transladada para a esquerda, correspondendo aos comprimentos de onda com o dobro da energia daquele do laser (círculos não preenchidos vermelhos, gráfico A da Figura 20). É possível ver na curva originada após a subtração uma nítida diferença dos estados de absorção em relação a 1 fóton, nesta curva, as contribuições de absorção decrescem drasticamente em torno dos comprimentos de onda de 400 nm e 450 nm, mostrando até mesmo uma afinidade da absorção de 2 fótons nesses dois comprimentos de onda. Acredita-se que nessa faixa, os responsáveis pela absorção da luz sejam os agregados moleculares. Discutiremos a seguir a relação destes estados a nível molecular.

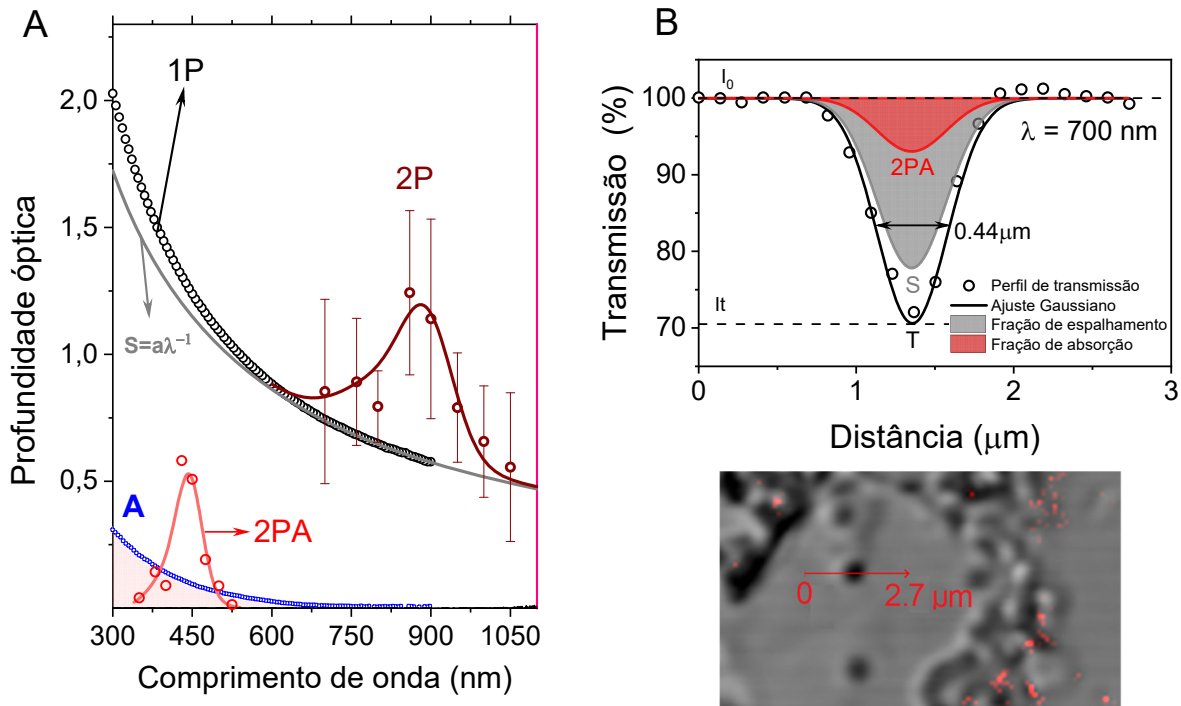


Figura 20 - A. Profundidades ópticas medida das nanopartículas em suspensão em meio aquoso alcalino, com pH 13,0, gráfico linear com cinco curvas, as curvas experimentais, 1P (1 fóton) medida no espectrofotômetro UV-vis (círculos não preenchidos em preto), 2P (2 fótons) medida nas imagens de transmissão na microscopia confocal (círculos não preenchidos em vinho com ajuste), a curva teórica de espalhamento (S) ajustada a partir de  $\lambda$  acima de 800 nm (linha cinza), as curvas de absorbância (A e 2PA), resultado da curva Total menos curva de dispersão, para 1P (A – círculos azuis não preenchidos) e 2P (2PA – círculos vermelhos não preenchidos com ajuste). B. Imagem de transmissão por excitação de 2P em 700 nm, perfil transversal de uma FNP isolada e gráfico do perfil indicando os pontos das intensidades  $I_0$  e  $I_t$  a serem utilizadas na equação VI. Contribuições da absorção e espalhamento para a medida estão preenchidos no perfil Gaussiano.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para explicar a questão das emissões de fluorescência deslocadas para o vermelho, olhou-se mais a fundo para os espectros de absorção. Primeiramente, o gráfico com as curvas de absorção foi modificado para escala log-log, para que assim, suas contribuições fossem mais aparentes. O gráfico da Figura 21 - A mostra as curvas de absorção e a proposta deconvolução da curva de 1 fóton; Observam-se três contribuições para esta curva, três Gaussianas que partem do Ultra-violeta mas se deslocam para o vermelho, a primeira na região do Ultra-violeta (área pintada em roxo), outra na região do visível (área pintada em verde) e outra na região do vermelho/infra-vermelho próximo (área pintada em laranja). A primeira Gaussiana

delimita a contribuição da absorção da luz pelas moléculas de HPA na solução, a segunda expressa a absorção da luz pelos agregados do tipo H, tipicamente presentes em regiões mais energéticas dos espectros de absorção. Para esta região, é importante analisar a curva de absorção por 2 fótons e correlacionar uma afinidade e quase exclusividade da absorção da luz nesta região. A terceira região é dominada pelos agregados J, geralmente representando a absorção de espectros de absorção mais ao vermelho, possivelmente, na borda do volume das nanopartículas de BC.

A alta densidade molecular que forma as partículas de BC, de 1,4-1,8 g/cm<sup>3</sup>, permite a migração da energia entre as moléculas, diminuindo os intervalos de banda inversamente ao aumento tamanho do conjunto de agregados. O esquema da Figura 21 - B, desenha o possível caminho da migração após a absorção da luz na excitação por dois fótons. Em primeira instância, a migração pelos estados singleto na direção horizontal é priorizada na região com domínio de agregados H, enquanto ela ocorre, perdas de energia acontecem através dos estados vibracionais das moléculas e a ressonância entre esses estados vibracionais permite seu acontecimento. Quando as moléculas passam a ficar mais longe umas das outras, e agregam-se preferencialmente em estados J, a migração vertical é posta a frente, mas não é tão provável de ocorrer quanto a migração horizontal, privilegiando o decaimento da fluorescência em estados de energia mais baixos.

Sumarizando esta seção, colocamos a prova a eficiência da medida de absorção das nanopartículas em solução para 1P e isolada para 2P, além disso, determinamos os estados absorptivos reais de cada forma de excitação, através de ajustes gráficos como a retirada da curva de espalhamento dos valores experimentais. Analisamos as curvas finais em relação aos possíveis arranjos de agregação molecular e buscamos explicar a emissão de fluorescência em relação aos seus estados absorptivos. Em resumo, podemos observar o comportamento da curva de emissão de fluorescência e separá-la em três regiões.

Como mostrado no gráfico da

Figura 21 - A, a região indicada como 1 retrata a subida da curva, e quando sobreposta a curva de absorção pode ser correlacionada aos agregados H, onde

prevalece a migração da energia entre os estados singletos e estados tripletos. A subida do espectro na região 2 tem menor inclinação, caminhando para um ponto de inflexão. Essa diminuição pode ser indicada tanto pela presença de agregados J quanto pela escassez no número de moléculas; Aqui, prevalece o decaimento da fluorescência, mas também, diminuem-se os números de estados indicando o fim dos estados de absorção.

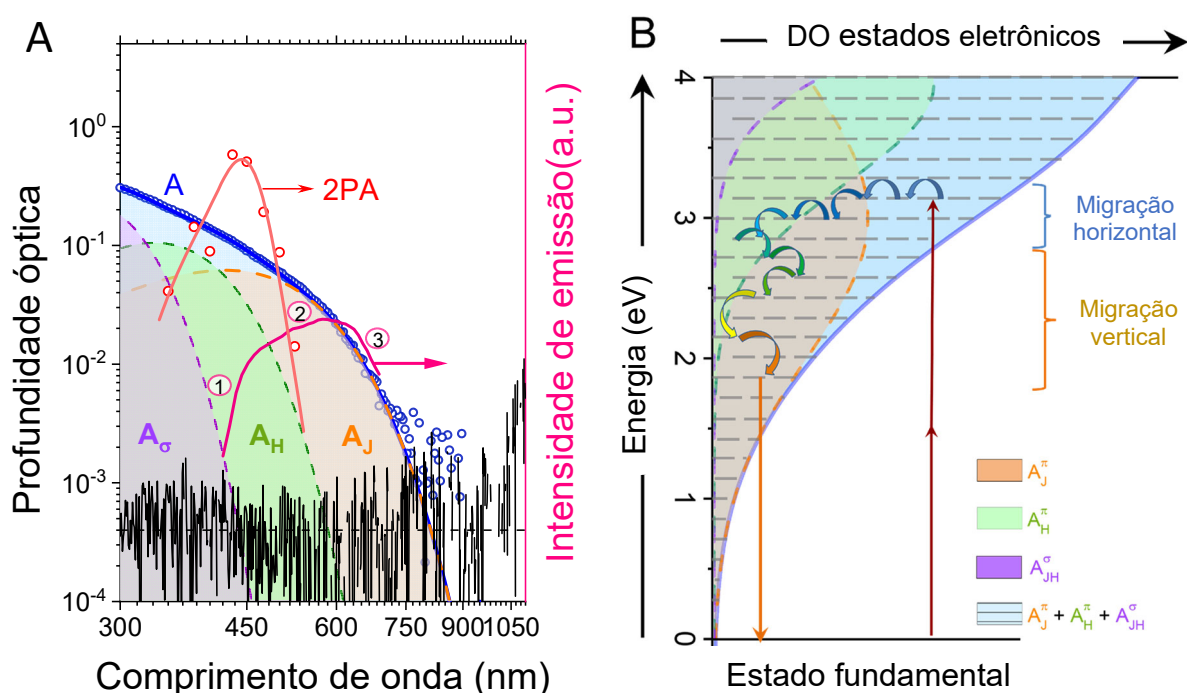


Figura 21 - A. Gráfico em escala Log-Log com as curvas de absorção A e 2PA do gráfico A da figura. O ruído dos medidas é representado a partir da cor cinza e o espectro de fluorescência da excitação de dois fótons é realocado para cima dos estados de absorbância, a curva rosa. Contribuições teóricas do ajuste com estados de Absorbância em sigma H-J-Agregados (roxo), H-Agregados (verde) e J-agregados (laranja). B. Esquema representando a densidade de estados da curva A com as contribuições teóricas dos estados de agregação. As setas em vermelho representam a energia de absorção por dois fótons, as setas coloridas arredondas o caminho da migração e a seta reta em laranja, o decaimento da fluorescência após a migração. Os estados singletos (tracinhos cinza) possibilitam uma migração horizontal (área abrangida pelo colchete azul) e uma migração vertical (área abrangida pelo colchete laranja).

Fonte: Elaborada pela autora.



### 5.3 Rendimento quântico da geração de oxigênio singleto por uma única nanopartícula dissolvida (DBC)

Uma das formas de quantificar a geração de oxigênio singleto por um fotossensibilizador, é utilizar de uma molécula sonda ou indicadora de  $^1\text{O}_2$ . Como descrito na seção metodologia, utilizamos da molécula de ABDA para realizar nossas medidas, em conjunto com a DEP, utilizando do laser de 1 fóton de Diodo em 405 nm, para excitar as nanopartículas de BC e a molécula indicadora ao mesmo tempo. O ajuste Gaussiano dos pontos recolhidos no perfil transversal foi plotado no gráfico da Figura 22.

A curva em azul advém dos pontos do perfil transversal de emissão do ABDA e para indicar espacialmente onde estariam as DEPs, o mesmo perfil foi traçado no modo transmissão (linha em cinza). Posteriormente, uma troca do laser foi acionada para que a partícula daquela região emitisse (excitação por 2P em 800 nm) indicando mais uma vez a sua localização espacial, e a sua largura horizontal (linha roxa).

A sobreposição das curvas no gráfico é proposital, primeiro, para que através da comparação das curvas de transmissão e intensidade de fluorescência por excitação de 1P seja mostrada a localização da partícula e das moléculas de ABDA que sofreram supressão na fluorescência. Embora a resolução de cada medida seja diferente, confocal para a fluorescência e não confocal para a transmissão, pode-se comparar o tamanho da largura dessas Gaussianas, comprovando assim, que a diminuição da intensidade de fluorescência do ABDA não se deve a presença de uma partícula naquela região e sim do seu efeito fotodinâmico nas moléculas ao seu entorno. Explicando mais detalhadamente, caso a nanopartícula tivesse  $1,05\ \mu\text{m}$  de raio, o perfil de intensidade de fluorescência seria o mesmo, mas nada poderíamos afirmar sobre as moléculas de ABDA que foram afetadas pelo  $^1\text{O}_2$ . Como o perfil de transmissão possui a largura da Gaussiana menor do que a largura de ajuste de intensidade de emissão do ABDA, pode-se afirmar que há moléculas afetadas pela geração de  $^1\text{O}_2$ . É importante salientar que aqui, não vemos a contribuição das partículas na imagem b da Figura 22, e sim, somente a fluorescência do ABDA. Uma

comparação das resoluções nos permite inferir que ali, a partícula removeu a fluorescência do ABDA através da ação fotodinâmica.

O perfil de emissão de fluorescência por 2P é responsável por determinar o verdadeiro raio da nanopartícula de poluição daquela região, a resolução pela excitação de 2P é coerente com a resolução confocal,<sup>69, 79</sup> portanto, temos uma diferença de quase 10x no diâmetro da nanopartícula (0,27  $\mu\text{m}$ ) e da região que não emite (2,1  $\mu\text{m}$ ) sendo assim, pode-se finalmente utilizar do número de moléculas de ABDA presentes na região de ausência de fluorescência para o perfil Gaussiano em roxo.

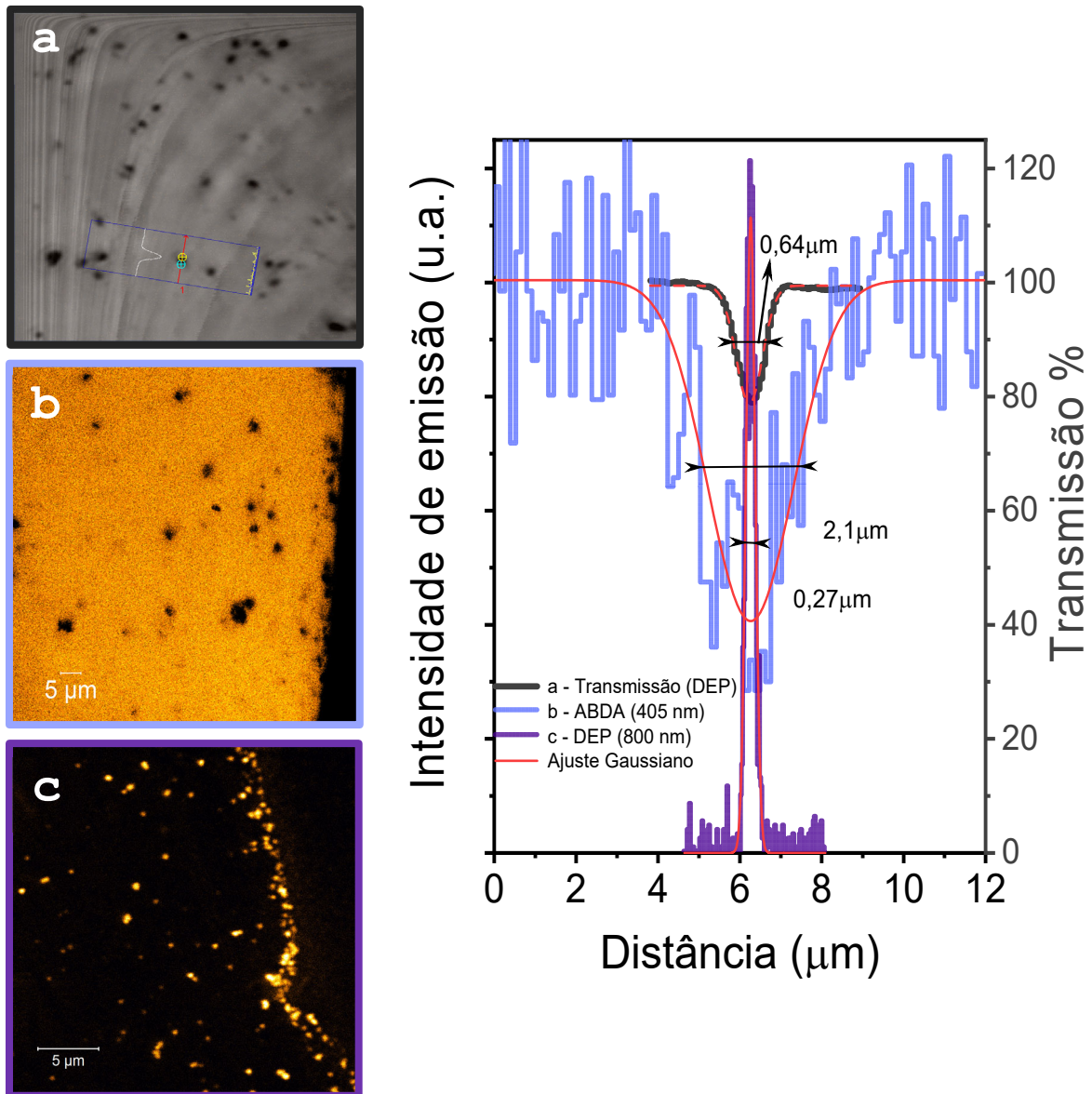


Figura 22 - Gráfico de intensidade de emissão e Transmissão por distância dos perfis traçados ao entorno das DEPs em a) imagem de transmissão com excitação por 1P em 405 nm (curva cinza); b) imagem de fluorescência com excitação por 1P em 405 nm (curva azul); c) imagem de fluorescência com excitação por 2P em 800nm (curva roxa).

Fonte: Elaborada pela autora.

A equação 9 da seção metodologia nos retornou um valor de 35% de eficiência na geração de oxigênio singleto por uma única nanopartícula de BC. Esse valor, corrobora com o anteriormente encontrado por Li e seus colaboradores em solução aquosa.<sup>50</sup>

Mostrar que apenas uma DEP pode gerar oxigênio singleto quando iluminado em um comprimento de onda visível exclui a possibilidade de a interação da luz

acontecer por outros fatores do meio como, moléculas de HPA, absorvedores da fuligem coletada e até mesmo outras partículas que foram coletadas do meio. Acredita-se no sucesso dessa metodologia de quantificação, pois além de chegar em um valor parecido com aquele já medido, o microscópio confocal possibilita a visualização temporal do acontecimento.

#### **5.4 Estrutura energética de escada e migração de estados excitados ao longo do volume das partículas e BC**

As possíveis vias de interação da luz com as nanopartículas de BC após a absorção por 1 ou 2 fótons estão resumidas na Figura 23. Tratando-as como agregados moleculares de alta densidade, os caminhos 1, 2, 3 e 4 resumem os resultados obtidos nas seções anteriores.

O caminho 1 é o mais provável, o múltiplo espalhamento da luz. Sendo estas partículas grandes centros espalhadores, tratamo-las ao longo deste trabalho com um fator de potência = 1 para seu fator de espalhamento, assim como já mostrado na literatura para partículas de fuligem com tamanhos de 200 nm de diâmetro. Nossos resultados mostram ~ 70% de espalhamento quando em comprimentos de onda mais energéticos, onde a densidade de estados de absorção tende a ser mais densos.

O caminho 2, ilustra a passagem dos elétrons pelos estados tripleto excitados das moléculas, a migração resulta na geração de oxigênio singleto na borda da nanopartícula, em meio aquoso. A alta densidade molecular possibilita a transferência de energia por este estado excitado, com a sobreposição dos estados vibracionais das moléculas que os compõe. As moléculas de HPA são conhecidamente geradoras de  $^1\text{O}_2$  quando excitadas em comprimentos de onda no ultravioleta. O arranjo de agregados possibilita não só a absorção no visível como, a transição do estado tripleto excitado. Com o resultado de 34% de rendimento quântico de geração de  $^1\text{O}_2$  mostramos um novo caminho que possibilita a moléculas fotossensibilizadoras, agora, absorverem em comprimentos de onda menos energéticos.

Em 3, a migração ocorre pelo estado excitado singleto, resultando na diminuição da banda de excitação através das moléculas no corpo da nanopartícula, e finalmente na emissão próxima do vermelho. Os dados de absorção por 1P são

essenciais para essa demonstração. A linha que acompanha a diminuição dos estados de absorção no infra-vermelho próximo, também acompanha a diminuição da emissão de fluorescência. Enquanto haviam dúvidas acerca da emissão de fluorescência em relação a incandescência dessa partícula, a excitação por 2P mostra a seletividade dos agregados do tipo H (bastonetes azuis na Figura 23), resultando assim, na maior entrega de energia ao sistema que passa a migrar nesta região e a decair em regiões mais próximas a borda da partícula de BC. A borda pode ser correlacionada tanto a moléculas com um número maior de anéis, quanto a agregados do tipo J e conseqüentemente a diminuição dos estados de absorção. (Bastonetes rosas na Figura 23)

O último caminho, e menos provável de ocorrer, é a migração pelo estado excitado tripleto que gera a aniquilação do tripleto através da transferência de Dexter, resultando em uma emissão em comprimentos de onda mais energéticos que o de excitação, o chamado *photon up-conversion*. Para que esta ocorra, a população de estados tripletos deve ser altíssima, além da condição de sobreposição de estados vibracionais neste estado excitado. Um indicador da geração de  $^1O_2$  e um diferenciador de espectros de outras partículas da natureza.

O resumo dos efeitos foto físicos e fotoquímicos que ocorrem nestas nanopartículas estão esquematizados na Figura 23, e podemos dizer que, com êxito, pudemos decifrar o caminho da energia que foi absorvida pelas moléculas que as compõe.

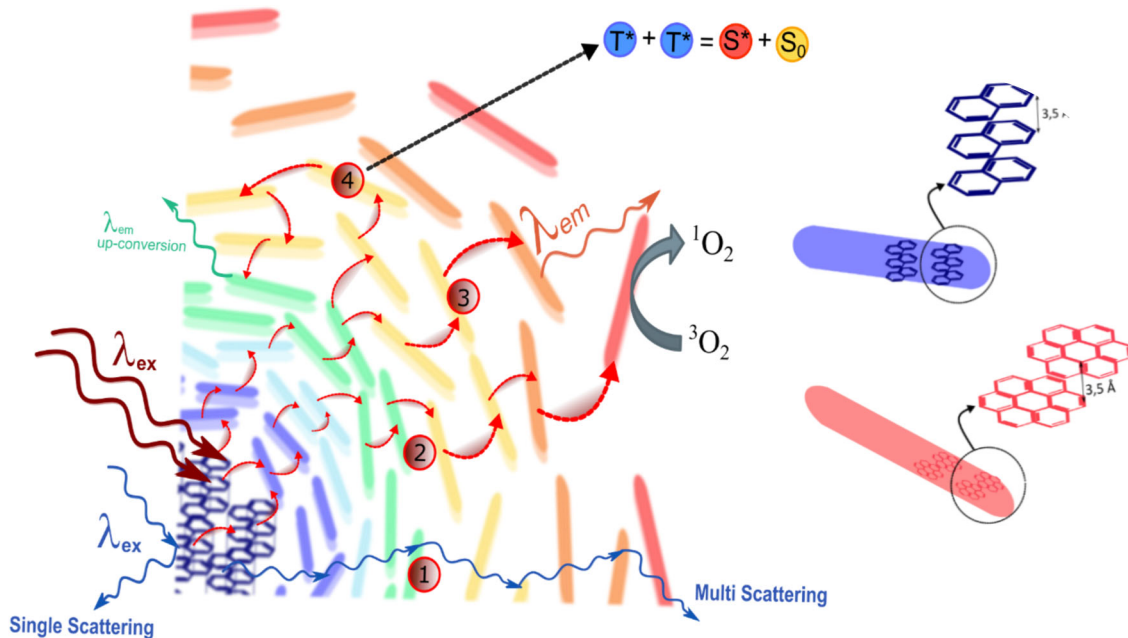


Figura 23 - Esquema resumindo as interações fotofísicas a nível de agregação molecular de uma nanopartícula de BC através da absorção de 1P (azul) e 2P (vinho). 1. Múltiplo espalhamento; 2. Transferência de energia pelo estado tripleto até a borda da nanopartícula; 3. Transferência pelo estado singleto até a emissão na região do vermelho; 4. Transferência pelo estado tripleto até a aniquilação do tripleto e repump, para emissão em comprimentos de onda mais energéticos (photon up-conversion). Os bastões coloridos representam os agregados moleculares que partem de agregados de moléculas menores com agregação H e vão tendo sua massa atômica aumentada nas extremidades, agora, com agregação do tipo J.

Fonte: Elaborada pela autora.

## 5.5 Visualização e identificação em tecidos

A aplicação principal para toda caracterização óptica feita neste trabalho resultou em uma forma inequívoca de identificar as nanopartículas de poluição em tecidos. As imagens abaixo mostrarão tecidos de ratos que inalaram partículas de BC durante 6 meses e tecidos de humanos adultos não fumantes. A concentração diária de partículas BC inalada pelos ratos é a mesma de um adulto em média. Utilizamos do microscópio óptico de fluorescência confocal para fazer imagens Espectrais, Canal incluindo transmissão, e imagens de tempo de vida de fluorescência das lâminas de tecido. Assim como já explicado na seção metodologia.

A imagem espectral é a primeira a ser feita em todas as lâminas, como podemos ver na Figura 24 abaixo de uma região de um pulmão humano e uma de um bulbo olfatório de rato, as cores falsas das imagens representando a contribuição do espectro de cada pixel em RGB, indicando a presença das partículas de BC quando fluorescem no laranja - avermelhado como as FNPs caracterizadas anteriormente (curva tracejada) ou mantém seu espectro com uma pequena mudança para o vermelho, atrelado a consequência de um maior aglomerado de partículas (curva roxa). A autofluorescência das células aparece em verde (curva azul na Figura 24), e as hemácias tendem a ter mais contribuição do laranja (curva verde na Figura 24), mas possuem sua cor esverdeada. Para melhorar a identificação, a análise pixel a pixel do espectro de emissão das regiões de interesse são feitas, e assim como mostrado no gráfico da Figura 24, é possível diferenciar os espectros da autofluorescência dos tecidos, das hemácias e das partículas de BC.

Uma forma de comprovar essa identificação é fazendo uma imagem da mesma região no modo Canal, onde podemos identificar a fluorescência no espectro vermelho 650 – 700 nm em conjunto com a região mais escura na transmissão, assim como observamos nas análises de absorção de 2P, e os espectros característicos de emissão na imagem anterior (Figura 24).

Outra forma de comprovação após a análise da imagem espectral são as imagens de tempo de vida de fluorescência. O espectro das hemácias é semelhante aos das partículas de BC mas o tempo de vida de fluorescência das partículas de BC em tecidos é caracteristicamente mais curto do que os das células de sangue ou dos tecidos, mesmo diferenciando-se um pouco da referência, FNPs monodispersas. É possível ver todas essas informações na Figura 25, a imagem de um bulbo olfatório de rato, que foi exposto as partículas de poluição recolhidas da atmosfera, foi analisada tanto pela emissão de fluorescência das regiões com partículas quanto através de medidas de FLIM. (gráfico da Figura 25)

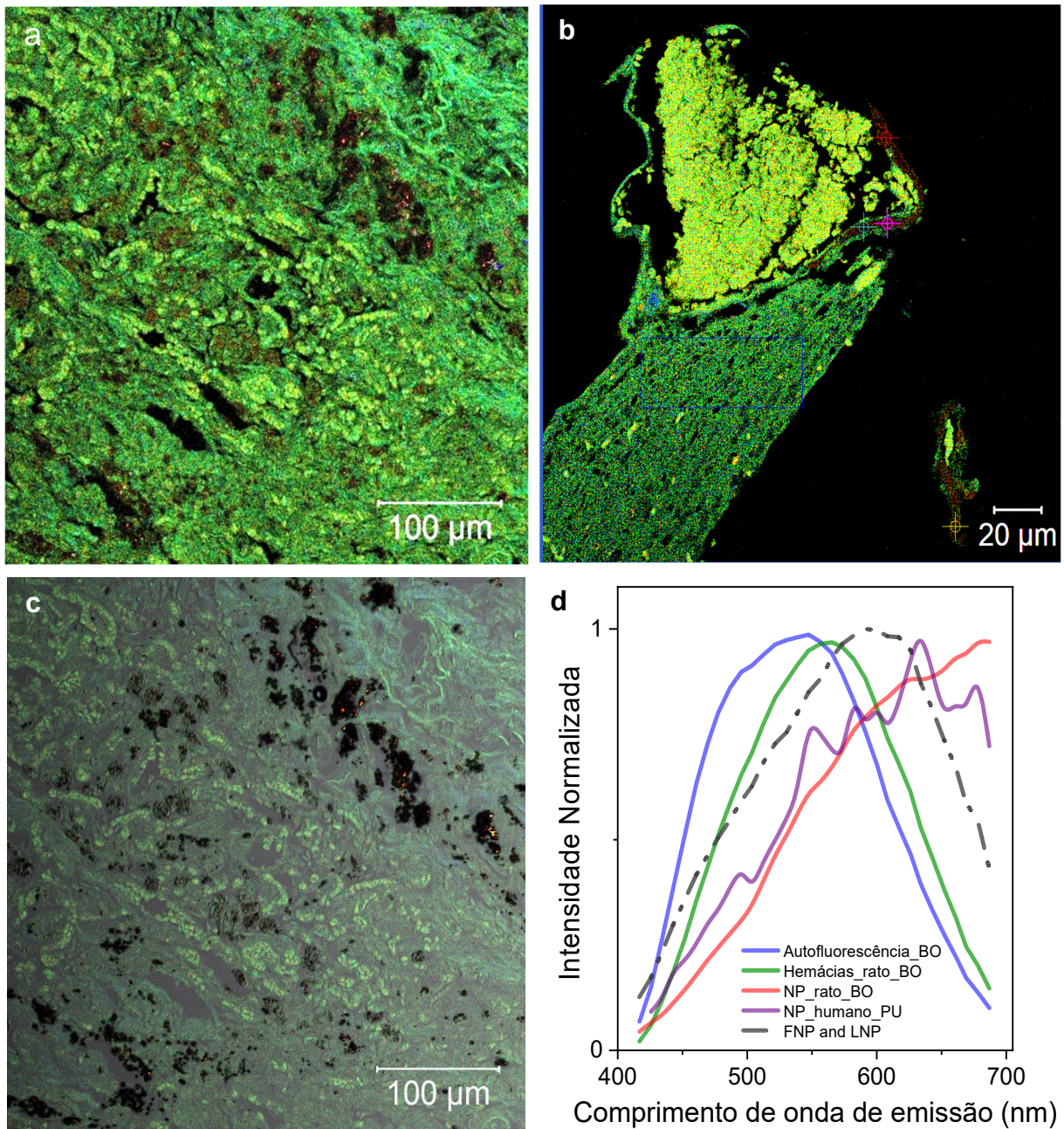


Figura 24 - a) Imagem Espectral do pulmão humano e b) do bulbo olfatório de um rato, BC em vermelho na imagem. c) Imagem no modo Canal com sopesoção dos canais nas faixas de comprimento de onda azul ao verde e outa, no vermelho, além da luz transmitida, BC aparece colocalizada com a emissão em vermelho em regiões escuras. d) Espectro de emissão das regiões marcadas nas imagens, azul: autofluorescência dos tecidos; verde: hemácias; vermelho: BC no bulbo olfatório e roxo, BC no pulmão; tracejado: espectro de referência da FNP.

Fonte: Elaborada pela autora.



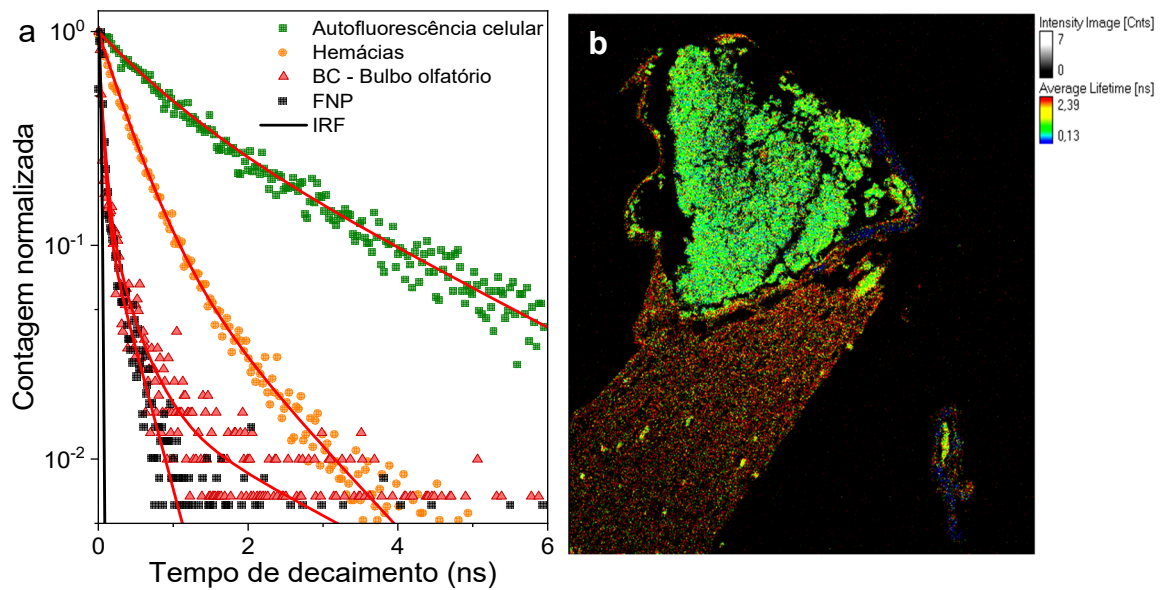


Figura 25 - a) Gráfico de tempo de vida de fluorescência com os ajustes de decaimento exponencial para as amostras de FNP em filtro (quadrados pretos); BC em bulbo olfatório (triângulos vermelhos); Hemácias em bulbo olfatório (círculos laranja); autofluorescência de tecidos (quadrados verdes). b) Imagem do bulbo olfatório de um rato após a análise de tempo de vida médio para cada pixel, cores mais frias indicam menor tempo de vida e cores mais quentes, maior tempo de vida.

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma amostra controle também foi investigada para procurar partículas semelhantes em um bulbo olfatório de um rato que não inalou as partículas, apenas dessa forma pode-se ter uma lâmina controle já que não tem como para amostras de humanos. Nas imagens Espectral e Canal desta lâmina na Figura 26, registrou-se uma área mais ampla que aquela da Figura 24 contendo as partículas de BC, e determinou-se que estas estavam limpas de partículas, comprovando mais uma vez a presença de partículas de BC no bulbo olfatório dos ratos que a inalaram. A Figura 26 – c mostra a mesma região espectral com a presença de partículas de BC.

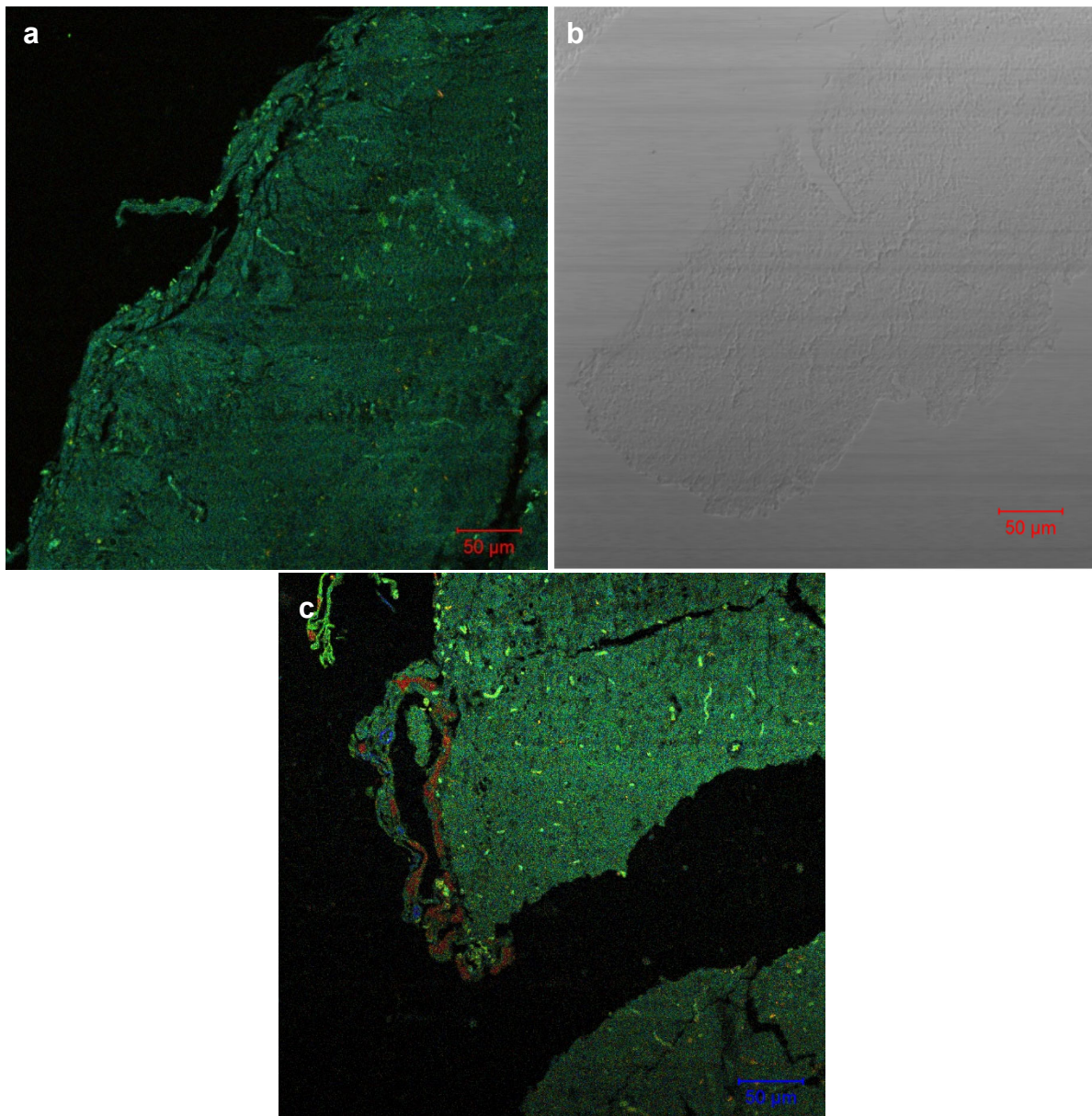


Figura 26 - a) Imagem controle Espectral do bulbo olfatório de um rato, à esquerda, e imagem Canal transmitida da mesma região. Não há a presença de partículas de BC. b) Imagem Espectral da mesma região que a controle, agora, de um animal que inalou a partícula de BC, é possível visualizar a presença das partículas em vermelho em abundância.

Fonte: Elaborada pela autora.

Finalmente, imagens de lâminas de tecidos humanos da região cerebral foram realizadas, e para descobrir a via de entrega para o bulbo olfatório, tecidos de possíveis canais que levam estas partículas para o cérebro foram analisados como a meninge e o linfonodo. Na Figura 28 temos a imagem Espectral da meninge (a) e logo abaixo o espectro de emissão das regiões circuladas na imagem b). No espectro, as

curvas de emissão são referentes ao tecido (azul), hemácias (azul) e partículas de BC (vermelha). Nota-se uma emissão mais acentuada no azul devido à grande abundância do colágeno nos tecidos para a autofluorescência dos tecidos. Da mesma região, a imagem Canal mostra a localização da partícula BC como pontos escuros no modo de transmissão (imagem c).

Para o linfonodo ílo pulmonar humano, na Figura 28 d), não há a contribuição do colágeno na imagem espectral, e as regiões demarcadas nesta imagem compõe os espectros do gráfico em e). A curva verde é a de autofluorescência do tecido e a vermelha para a contribuição da partícula BC, não temos hemácias aparentes nesse tecido. A imagem f) é a imagem canal da mesma região, e novamente, os pontos pretos no modo transmissão revelam a localização da emissão e da transmissão das partículas de BC.

Nestas imagens, nota-se que as partículas estão em regiões periféricas, próximas a vasos sanguíneos (hemácias), portanto, encontraram-se vias para que cheguem ao bulbo olfatório e cérebro humano, mas é necessário mostrá-las nesses tecidos para uma confirmação de que estão lá.

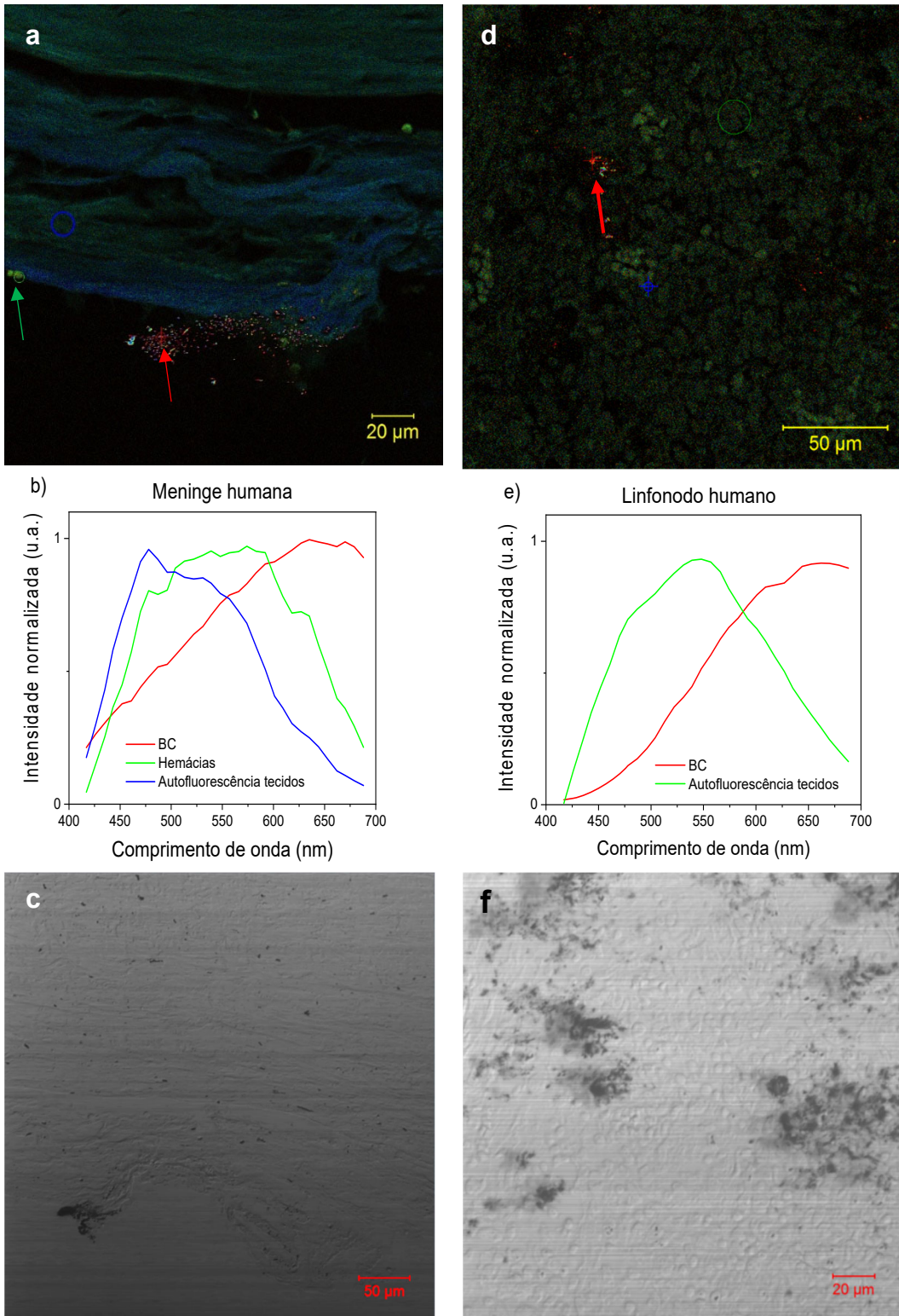


Figura 27 - a) Imagem Espectral da meninge e b) do linfonodo, partícula de BC em vermelho nas imagens. b) e e) Espectros de emissão das regiões marcadas nas imagens, verde: autofluorescência dos tecidos; azul: hemácias; vermelho: partículas de BC; c) e f) Imagens no modo Canal da luz transmitida, partícula de BC aparece colocalizada com a imagem Espectral como pontos escuros.

Fonte: Elaborada pela autora.

Por fim, a Figura 28 mostra uma imagem de bulbo olfatório humano, e vemos que quase não há a presença de nanopartículas de BC, comprovamos uma via mas não a presença expressiva de partículas de BC neste tecido. Podemos ver na imagem um pequeno ponto vermelho no centro e o espectro abaixo comprova a assinatura de uma partícula de BC. Nada podemos afirmar sobre a presença de partículas de *Black Carbon* no cérebro. Sabemos que as vias possuem um número expresso destas, mas não foi possível dizer o mesmo de tecidos do bulbo olfatório. A investigação deverá seguir para outras regiões, elucidando o possível caminho e interações toxicológicas destas no cérebro humano.

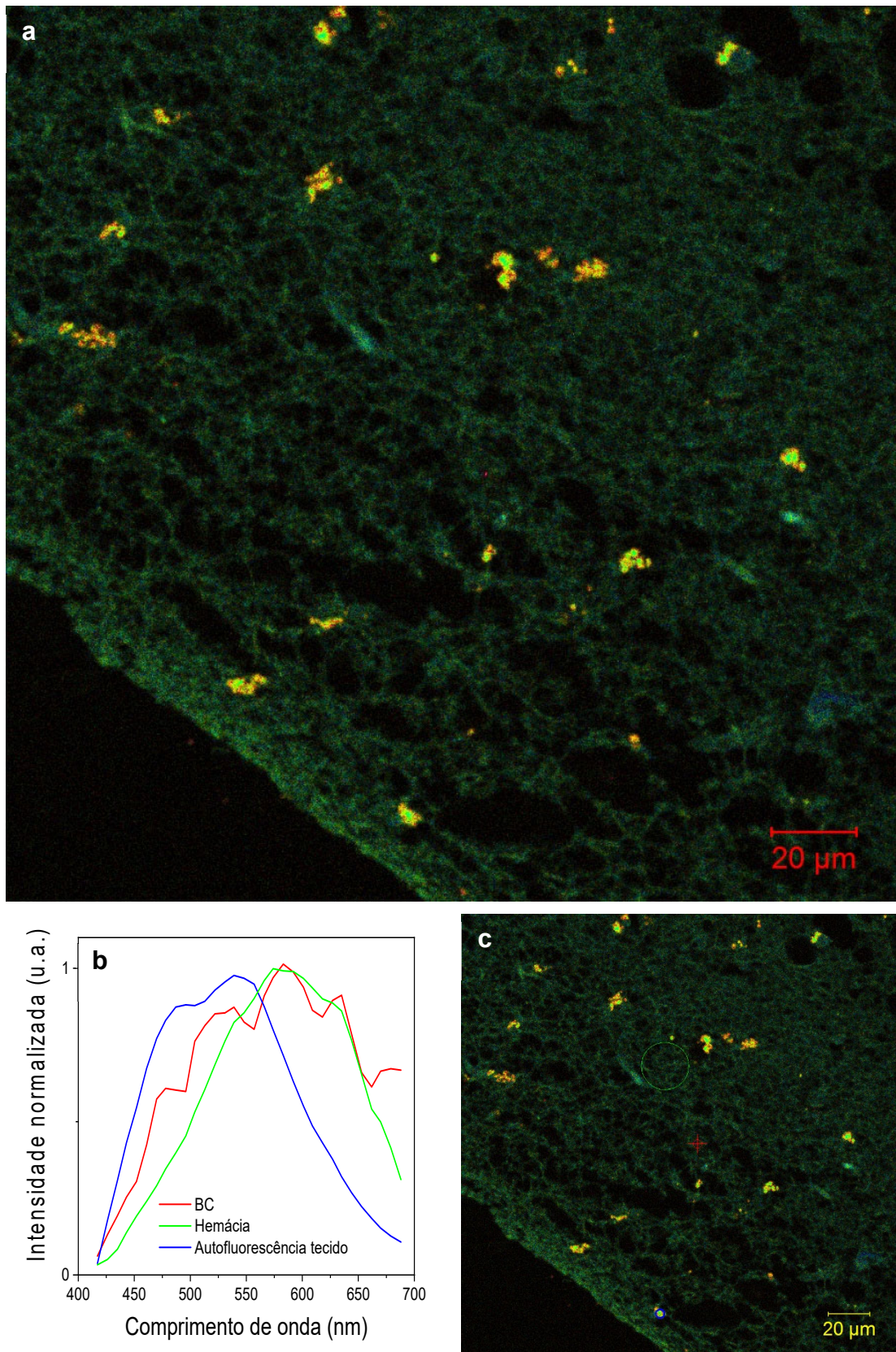


Figura 28 - a) Imagem Espectral do Bulbo olfatório humano, partícula de BC em vermelho no centro da imagem. b) Espectro de emissão das regiões marcadas na imagem c) verde: autofluorescência dos tecidos; azul: hemácias; vermelho: partículas de BC.

Fonte: Elaborada pela autora.

## 6 CONCLUSÕES

A caracterização óptica de subunidades nanométricas de *Black Carbons* foi concluída com sucesso ao longo deste trabalho, foram determinados os espectros de emissão de fluorescência para excitação de 2 fótons e constatada a presença de *photon up-conversion* e emissão jogada para o vermelho. Através desta caracterização determinou-se uma impressão digital para identificação destas partículas em amostras biológicas, diferenciando as partículas de BC das partículas de matéria orgânica e inorgânica, e em tecidos humanos. Para comprovar a localização das partículas foram caracterizadas suas absorções por 2 fótons através dos perfis de transmissão e tempo de vida de fluorescência.

A absorção tanto para 1 fóton quanto para 2 fótons foi determinada após a remoção do espalhamento Mie com  $n = 1$  para ambas as curvas, ajustado entre os pontos experimentais em 800 nm – 1100 nm. Os reais espectros de absorção que tornaram-se possíveis após a metodologia de monodispersão em meio aquoso alcalino, foram deconvolucionados nas regiões de contribuição para cada forma de arranjo de agregação e através desta análise conclui-se que a estrutura espacial dos estados agregados das nanopartículas é responsável por todos os processos **foto físicos (*photon up-conversion, red shift*) e fotoquímicos (geração de  $^1\text{O}_2$ )**, sendo estas características encontradas em partículas de diferentes origens.

Por fim, quantificou-se em 34% a eficiência de geração de oxigênio singleto por uma nanopartícula isolada dispersa em meio aquoso, comprovando seu aspecto nanotoxicológico dando enfoque a sua formação de moléculas agregadas em tamanhos mesoscópicos. A conjunção da metodologia de remoção dos filtros de amostras ambientais atrelado a caracterização das partículas de poluição em subunidades nanométricas, permite sua **identificação inequívoca** em tecidos humanos e no ambiente.

Nas próximas etapas, se utilizará da impressão digital das partículas de BC e a microscopia por excitação de 2P para a identificação em ambientes marinhos e zooplanktons *in vivo*. A metodologia de suspensão servirá para uma ampla caracterização destas partículas em meios com diferentes pHs, forças iônicas,

presença de matéria orgânica e luz, para simular o ambiente marinho e definir uma ferramenta mais completa para a identificação, além de buscar a quantificação da ação toxicológica dos agregados quando iluminados em zooplanktons.



## REFERÊNCIAS

- 1 AYRES, J. G. *et al.* Evaluating the toxicity of airborne particulate matter and nanoparticles by measuring oxidative stress potential - a workshop report and consensus statement. **Inhalation Toxicology**, v. 20, n.1, p.75-99,2008.
- 2 EASTWOOD, P. **Particulate emissions from vehicles**. New York: Wiley, 2008.
- 3 MICHELSEN, H. A. *et al.* A review of terminology used to describe soot formation and evolution under combustion and pyrolytic conditions. **ACS Nano**, v.14, n. 12, p.12470, 2020.
- 4 BOVÉ, H. *et al.* Ambient black carbon particles reach the fetal side of human placenta. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, Dec. 2019.
- 5 MAJID, H.; MADL, P. Lung deposition predictions of airborne particles and the emergence of contemporary diseases. **Health**, v.2, n.2, p.51-59, 2011.
- 6 AYRES, J. G. *et al.* Evaluating the toxicity of airborne particulate matter and nanoparticles by measuring oxidative stress potential - a workshop report and consensus statement. **Inhalation Toxicology**, v.20, n.1, p.75-99,2008.
- 7 FRIAS, D. P. *et al.* Nrf2 positively regulates autophagy antioxidant response in human bronchial epithelial cells exposed to diesel exhaust particles. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, Dec. 2020.
- 8 GARDINER, D. *et al.* Impact of air pollution on allergic diseases. **Korean Journal International Medicine**, v.26, n.3, p.262-273,2011.
- 9 SALDIVA, P. H. N. *et al.* Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo, Brazil: a preliminary report. **Environmental Research**, v. 65, n. 2, p. 218–225, May 1994.
- 10 ZHANG, Y. *et al.* An overlooked source of nanosized lead particles in the atmosphere: residential honeycomb briquette combustion. **Journal of Hazardous Materials**, v. 436, p. 129289, March 2022.
- 11 MAHER, B. A. *et al.* Magnetite pollution nanoparticles in the human brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 39, p. 10797–10801, Sept. 2016.
- 12 CETESB. **Qualidade do ar**. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/ar/>. Acesso em: 18 dez. 2022.
- 13 DE SIMONI, F. *et al.* **O estado da qualidade do ar no Brasil**. Disponível em: [https://www.wribrasil.org.br/sites/default/files/wri-o-estado-da\\_qualidade-do-ar-no-brasil.pdf](https://www.wribrasil.org.br/sites/default/files/wri-o-estado-da_qualidade-do-ar-no-brasil.pdf). Acesso em: dez.22.

14 DE MIRANDA, R. M. *et al.* Urban air pollution: A representative survey of PM 2.5 mass concentrations in six Brazilian cities. **Air Quality, Atmosphere and Health**, v. 5, n. 1, p. 63–77, Mar. 2012.

15 **AIR pollution**. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/air-pollution>. Acesso em: 18 dez. 2022.

16 ISLAM, N. *et al.* Air quality and PM10-associated poly-aromatic hydrocarbons around the railway traffic area: statistical and air mass trajectory approaches. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 41, n. 5, p. 2039–2053, Oct. 2019.

17 ZHANG, Y. *et al.* Direct observations of fine primary particles from residential coal burning: insights into their morphology, composition, and hygroscopicity. **Journal of Geophysical Research: atmospheres**, v. 123, n. 22, p. 12,964–12,979, 2018.

18 ZHI, M. *et al.* The characteristics of atmospheric particles and metal elements during winter in Beijing: size distribution, source analysis, and environmental risk assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 211, p.15 Mar. 2021.

19 BOND, T. C. *et al.* Bounding the role of black carbon in the climate system: a scientific assessment. **Journal of Geophysical Research Atmospheres**, v. 118, n. 11, p. 5380–5552, 2013.

20 ZHANG, J. *et al.* Liquid-liquid phase separation reduces radiative absorption by aged black carbon aerosols. **Communications Earth & Environment**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2022.

21 CHEN, T. Y.; SKOOG, A. Abiotic aggregation of organic matter in coastal and estuarine waters: cases in the eastern long island sound, USA. **Water**, v. 13, n. 21, Nov. 2021.

22 FABIANO', M.; DANOVARO, R. Composition of organic matter in sediments facing a river estuary (Tyrrhenian Sea): relationships with bacteria and microphytobenthic biomass. **Hydrobiologia**.v.277, p.71-84.1994.

23 MANNINO, A.; HARVEY, H. R. Black carbon in estuarine and coastal ocean dissolved organic matter. **Limnology and Oceanography**, v. 49, n. 3, p. 735–740, 2004.

24 DE MARCHI, L. *et al.* The influence of simulated global ocean acidification on the toxic effects of carbon nanoparticles on polychaetes. **Science of the Total Environment**, v. 666, p. 1178–1187, May 2019.

25 PRADEEP RAM, A. S. *et al.* Bacterial-viral interactions in the sea surface microlayer of a black carbon-dominated tropical coastal ecosystem (Halong Bay, Vietnam). **Elementa**, v. 6, p.13,2018.

- 26 FREITAS, S. R. *et al.* The coupled aerosol and tracer transport model to the Brazilian developments on the regional atmospheric modeling system (CATT-BRAMS)-Part 1: Model description and evaluation atmospheric. **Chemistry and Physics**, v. 9, p.2843-2861,2009.
- 27 ZAVERI, R. A. *et al.* Rapid growth of anthropogenic organic nanoparticles greatly alters cloud life cycle in the Amazon rainforest. **Science Advances**, Dez, 2022.
- 28 WANG, X. *et al.* Deriving brown carbon from multiwavelength absorption measurements: Method and application to AERONET and Aethalometer observations. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 16, n. 19, p. 12733–12752, 2016.
- 29 IRD. **Page d'accueil**. 2022.
- 30 BOND, T. C.; BERGSTROM, R. W. Light absorption by carbonaceous particles: an investigative review. **Aerosol Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 27–67, 2006.
- 31 CLARKE, A. D. Aerosol light absorption by soot in remote environments. **Aerosol Science and Technology**, v. 10, n. 1, p. 161–171, 1989.
- 32 GOULAY, F.; SCHRADER, P. E.; MICHELSEN, H. A. Effect of the wavelength dependence of the emissivity on inferred soot temperatures measured by spectrally resolved laser-induced incandescence. **Applied Physics B: lasers and optics**, v. 100, n. 3, p. 655–663, 2010.
- 33 BOND, T. C. *et al.* Bounding the role of black carbon in the climate system: a scientific assessment. **Journal of Geophysical Research Atmospheres**, v. 118, n. 11, p. 5380–5552, 16 jun. 2013.
- 34 BOVÉ, H. *et al.* Biocompatible label-free detection of carbon black particles by femtosecond pulsed laser microscopy. **Nano Letters**, v. 16, n. 5, p. 3173–3178, 2016.
- 35 DANIELS, J. A. **Advances in environmental research [S.l.] Nova Science**, 2012. V.5
- 36 SZEWCZYŃSKA, M.; DĄBROWSKA, J.; PYRZYŃSKA, K. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the particles emitted from the diesel and gasoline engines. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 26, n. 2, p. 801–807, 2017.
- 37 CHU, Q. *et al.* Hydrogen abstraction/addition reactions in soot surface growth. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 23, n. 4, p. 3071–3086, 2021.

38 ROY, R. *et al.* Particulate matter bound polycyclic aromatic hydrocarbons: toxicity and health risk assessment of exposed inhabitants. **Atmospheric Environment**, v. 210, p. 47–57, Aug. 2019.

39 ZHANG, Y. *et al.* Study on fluorescence spectroscopy of PAHs with different molecular structures using laser-induced fluorescence (LIF) measurement and TD- DFT calculation. **Spectrochimica Acta Part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 224, n. 5, Jan. 2020.

40 BRICAUD, A.; MOREL, A.; PRIEUR, L. Absorption by dissolved organic matter of the sea (yellow substance) in the UV and visible domains. **Limnology and Oceanography**, v. 26, n. 1, p. 43–53, 1981.

41 MARTIN, J. W. *et al.* The polarization of polycyclic aromatic hydrocarbons curved by pentagon incorporation: the role of the flexoelectric dipole. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 121, n. 48, p. 27154–27163, Dec. 2017.

42 MEI, J. *et al.* Aggregation-induced emission: together we shine, united we soar! **Advanced Materials**, v.26, n.31, 2014.

43 TU, Y. *et al.* Much to Explore aggregate science in the Meso World Matter. **Cell Press**, v. 32, n.6, Sept. 2021.

44 BLUM, H. F. Photodynamic action. **Physiological Reviews**, v.12, n.1, p.23–55, Jan, 2022.

45 FOOTE, C. S. Type I and type II mechanisms of photodynamic action. **ACS Symposium**, v. 339, p. 22–38, 1987. DOI: 10.1021/bk-1987-0339.ch002.

46 DAI, J. *et al.* Aggregation-Induced emission photosensitizers: from molecular design to photodynamic therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.63, n.5, p.1996, 2020.

47 DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy targeted to pathogens. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 17, n. 3, p. 245–254, 2004.

48 DOUGHERTY, T. J. *et al.* Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889–905, 1998.

49 OSSOLA, R. *et al.* Singlet oxygen quantum yields in environmental. **Chemical Reviews**, v.121, n.7, p.41, 2021.

50 LI, M. *et al.* photochemical aging of soot in the aqueous phase: release of dissolved black carbon and the formation of  $^1\text{O}_2$ . **Environmental Science & Technology**, v. 53, n. 21, p. 12311–12319, 2019.

51 LI, Meng. Role of elemental carbon in the photochemical aging of soot.

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 30, p. 7717–7722, 2018.

52 FENNEL, F. *et al.* Fluorescence quantum yields of dye aggregates: a showcase example based on self-assembled perylene bisimide dimers. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, n. 11, p. 7612–7620, 2018.

53 BRICKS, J. L. *et al.* Fluorescent J-aggregates of cyanine dyes: basic research and applications review methods and applications in fluorescence. **Method and Applications in Fluorescence**, v.6, n.1, 2017.

54 WASSERFALLEN, D. *et al.* Suppressing aggregation in a large polycyclic aromatic hydrocarbon. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 4, p. 1334–1339, 2006.

55 BHARMORIA, P.; BILDIRIR, H.; MOTH-POULSEN, K. Triplet-triplet annihilation based near infrared to visible molecular photon up conversion. **Chemical Society Reviews**, v. 49, p.6529, 2020.

56 SINGH-RACHFORD, T. N.; CASTELLANO, F. N. Photon up conversion based on sensitized triplet-triplet annihilation. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, p. 2560, Nov. 2010.

57 TAKANO, A. P. C. *et al.* Pleural anthracosis as an indicator of lifetime exposure to urban air pollution: An autopsy-based study in Sao Paulo. **Environmental Research**, v. 173, p. 23–32, 2019.

58 DEMOKRITOU, P. *et al.* Development and laboratory performance evaluation of a personal cascade impactor. **Journal of the Air and Waste Management Association**, v. 52, n. 10, p. 1230–1237, 2002.

59 GROWNEY, D. J. *et al.* Is Carbon black a suitable model colloidal substrate for diesel soot? **Langmuir**, v. 31, n. 38, p. 10358–10369, 2015.

60 KHODABAKHSHI, S.; FULVIO, P. F.; ANDREOLI, E. Carbon black reborn: structure and chemistry for renewable energy harnessing **Carbon**, v.162, n. 5, Feb. 2020.

61 KEYTE, I. J.; HARRISON, R. M.; LAMMEL, G. Chemical reactivity and long-range transport potential of polycyclic aromatic hydrocarbons-a review. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 24, p. 9333–9391, 2013.

62 KIM, W. S. *et al.* Sample preparation for size analysis of diesel soot particles using field-flow fractionation. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 24, n. 13, p. 1935–1951, 2001.

63 KELESIDIS, G. A.; PRATSINIS, S. E. Soot light absorption and refractive index during agglomeration and surface growth. **Proceedings of the Combustion**

**Institute**, v. 37, n. 1, p. 1177–1184, 2019.

64 KUMAR, A.; DIXIT, C. K. Methods for characterization of nanoparticles. **Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids**, p. 44–58, 2017.

65 SORENSEN, C. M. Light scattering by fractal aggregates: a review. **Aerosol Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 648–687, Jan.2001.

66 COX, A. J.; DEWEERD, A. J.; LINDEN, J. An experiment to measure Mie and Rayleigh total scattering cross sections. **American Journal of Physics**, v. 70, n. 6, p. 620–625, 2002.

67 KIM, I. I.; MCARTHUR, B.; KOREVAAR, Comparison of laser beam propagation at 785 nm and 1550 nm in fog and haze . **Optical Wireless Communications**, v.4214,Nov.2000.

68 YI, J.; JEONG, H.; PARK, J. Modulation of nanoparticle separation by initial contact angle in coffee ring effect. **Micro and Nano Systems Letters**, v. 6, n. 1, Dec. 2018.

69 PAWLEY, J. B. **Handbook of biological confocal microscopy**. Berlin: Springer, 2006.

70 WAKED, D. et al. Effect of chronic exposure to fine particulate matter on cardiac tissue of NZBWF1 mice. **International Journal of Experimental Pathology**, 2023.

71 MARICQ, M. M.; XU, N. The effective density and fractal dimension of soot particles from premixed flames and motor vehicle exhaust. **Journal of Aerosol Science**, v. 35, n. 10, p. 1251–1274, 2004.

72 OUF, F.-X. *et al.* **True density of soot particles**: a comparison of results highlighting the influence of the organic contents. Diponivel em: <https://hal-normandie-univ.archives-ouvertes.fr/hal-02275869/document>. Acesso em: 21 dez. 2022.

73 RISSLER, J. *et al.* Effective density characterization of soot agglomerates from various sources and comparison to aggregation theory. **Aerosol Science and Technology**, v. 47, n. 7, p. 792–805, 2013.

74 JAGER, C. *et al.* Spectral properties of carbon black. **Journal Noncrystalline Solids**, .258,n.1-3,p.161-179,Nov.1999.

75 BETRANCOURT, C. *et al.* Quantitative measurement of volume fraction profiles of soot of different maturities in premixed flames by extinction-calibrated laser-induced incandescence. **Applied Physics B: lasers and optics**, v. 125, n. 1, Jan. 2019.

76 MICHELSEN, H. A. *et al.* Modeling laser-induced incandescence of soot: A

summary and comparison of LII models. **Applied Physics B: lasers and optics**, v. 87, n. 3, p. 503–521, 2007.

77 MOUTON, T. *et al.* Laser-induced incandescence technique to identify soot nucleation and very small particles in low-pressure methane flames. **Applied Physics B: lasers and optics**, v. 112, n. 3, p. 369–379, Sept. 2013.

78 MICHELSEN, H. A. Effects of maturity and temperature on soot density and specific heat. **Proceedings of the Combustion Institute**, v. 38, n.1, p.1197. 2021

79 SEMWOGERERE, D.; WEEKS, E.R. **Confocal microscopy**. Disponível em. <https://physics.emory.edu/faculty/weeks/lbe05.pdf>. Acesso em.dez,2022.