



Cristiani Hertel

Estudo da influência das condições de preparação de pontos quânticos de grafeno nas suas propriedades ópticas e no seu desempenho como sonda desliga/liga (off/on) mediada por Fe³⁺

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da PUC-Rio.

Orientador: Prof. Ricardo Queiroz Aucélio
Coorientador: Prof. Jones Limberger

Rio de Janeiro
Setembro 2021



Cristiani Hertel

Estudo da influência das condições de preparação de pontos quânticos de grafeno nas suas propriedades ópticas e no seu desempenho como sonda desliga/liga (*off/on*) mediada por Fe³⁺

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo.

Prof. Ricardo Queiroz Aucélio

Orientador
Departamento de Química – PUC-Rio

Prof. Jones Limberger

Coorientador
Departamento de Química – PUC-Rio

Profa. Maria Luiza Rocco Duarte Pereira

UFRJ

Prof. Wagner Felipe Pacheco

UFF

Profa. Adriana Gioda

Departamento de Química – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 27 de setembro de 2021

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

Cristiani Hertel

Mestranda do Programa de Pós-Graduação pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio). Bacharel em Química Industrial pela Universidade Severino Sombra (2013).

Ficha Catalográfica

Hertel, Cristiani

Estudo da influência das condições de preparação de pontos quânticos de grafeno nas suas propriedades óticas e no seu desempenho como sonda desliga/liga (off/on) mediada por Fe^{3+} / Cristiani Hertel; orientador: Ricardo Queiroz Aucélio; coorientador: Jones Limberger. – 2021.

90 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2021.

Inclui bibliografia

1. Química - Teses. 2. Pontos quânticos. 3. Grafeno. 4. Fotoluminescência. 5. Glutathione. 6. Ácido ascórbico. I. Aucélio, Ricardo Queiroz. II. Limberger, Jones. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. IV. Título.

CDD: 540

Agradecimentos

Em primeiro lugar, à Deus, por todo cuidado, por me dar saúde e permitir que eu chegasse até aqui.

Ao Profº Drº Ricardo pela oportunidade, pela orientação e paciência ao longo desses anos e por todo o apoio ao longo dessa jornada.

Ao Profº Drº Jones pela co-orientação e por sido sempre muito disponível para auxiliar no que fosse necessário.

Ao Marcelo Gomes, meu amor, meu amigo e meu companheiro nessa jornada. Obrigada por todo apoio, carinho, força e dedicação no nosso dia a dia. Por ter dado suporte ao longo de todos esses anos e ter comprado esse sonho junto comigo.

A minha família e em especial, meus pais, Sorlene e Jocimar, por terem sempre me incentivado a estudar e buscar me desenvolver como pessoa e como profissional.

A minha sogra Maria Alice e Paulo Cesar por terem sido minha segunda família e terem me dado todo apoio e suporte sempre que precisei.

A minha tia Neia e minha prima/irmã, Evelyn, por fazerem parte dessa história, me apoiando e torcendo por mim

A minha grande amiga, Gabriela Barbosa, por todo incentivo e apoio ao longo de todos esses anos.

Um agradecimento especial a Anna De Falco, por ter me acolhido desde o primeiro dia de trabalho juntas e ter se tornado essa grande amiga. Por todos os puxões de orelha, por ter me aturado e principalmente por não ter desistido de mim. Obrigada por tudo.

Aos meus amigos e colegas do LEEA, Joseany, Juliana, Marlin, Tatiana, Jarol, Henrique, Rafaela, Rosana por todo apoio e momentos divertidos que tornaram o trabalho mais leve.

Aos amigos que a PUC me deu, Francesca, Alessandra, Daphne e Leonny, por terem se tornado minha rede de apoio e por todos os momentos divertidos.

Aos meus amigos Mellina Damasceno, Diego Veneu, Cristiane Mauad e Camilla Fontoura por me apoiarem desde o início.

Aos amigos que se tornaram família, Clarissa, Priscila, Beatriz e Pedro. Obrigada pelo apoio e amizade, principalmente nos momentos mais difíceis.

A todos os professores do Departamento de Química da PUC-Rio que contribuíram com o meu desenvolvimento na área acadêmica.

À PUC-Rio e ao Departamento de Química por ter me proporcionado realizar o mestrado com bolsa.

Às agências de fomento, CNPq e FAPERJ.

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

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização bem-sucedida deste trabalho, que me apoiaram, mas cujo nome me falha a memória. Muito obrigado!

Resumo

Hertel, Cristiani; Aucélio, Ricardo Queiroz (Orientador); Limberger, Jones (Co-Orientador). **Estudo da influência das condições de preparação de pontos quânticos de grafeno nas suas propriedades óticas e no seu desempenho como sonda desliga/liga (*off/on*) mediada por Fe³⁺**. Rio de Janeiro, 2021. 90p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A robustez do processo de preparação de pontos quânticos de grafeno (GQDs), utilizando uma abordagem *bottom-up*, e ácido cítrico (GQDs não funcionalizados) ou ácido cítrico/glutationa (GQDs dopados com N) como precursores, foram estudadas para avaliar variações nas propriedades óticas desses nanomateriais em função das condições de preparo (massa de precursor, taxa de aquecimento e do meio hidro-esfoliante). Foram preparados três diferentes tipos de GQDs para comparar, principalmente, as respostas fotoluminescentes e a supressão desta pelo Fe³⁺. Os GQDs não funcionalizados apresentaram fotoluminescência intensa ($\lambda_{\text{excitação}} = 330 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}}$ na faixa de 450-460 nm). Os GQDs preparados em meio básico apresentaram luminescência até quatro vezes maior ($\lambda_{\text{emissão}}$ na mesma região). Os GQDs-GSH apresentaram resposta luminescente até duas ordens de grandeza maior ($\lambda_{\text{excitação}} = 347 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 425 \text{ nm}$) e sua interação com Fe³⁺, usado como mediador para quantificação de ácido ascórbico (AA), produziu supressão do sinal original e deslocamento do $\lambda_{\text{emissão}}$ para 440 nm. A variação nas proporções de glutaciona e ácido ascórbico não implicaram em diferenças significativas nas características gerais desses GQDs-GSH, apontando para a robustez das condições de preparação dos mesmos. A adição de Fe³⁺ ($4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) reduziu o sinal original pela metade, permitindo distinguir a recuperação do sinal causada pela adição de AA. As curvas analíticas normalizadas para AA apresentaram linearidade no intervalo de concentração entre $1,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A análise de uma amostra real produziu recuperação afetada pela instabilidade do analito no ambiente de sonda.

Palavras-Chave

Pontos quânticos; grafeno; fotoluminescência; glutaciona; ácido ascórbico.

Abstract

Hertel, Cristiani; Aucélio, Ricardo Queiroz (Advisor); Limberger, Jones (Co-Advisor). **Study of factors that influence the production of graphene quantum dots in terms of optical properties and as off/on analytical probes mediated by Fe³⁺**. Rio de Janeiro, 2021. 90p. Master's Thesis - Department of Chemistry, Pontifical Catholic University of Rio de Janeiro.

The robustness of graphene quantum dots (GQDs) production, using a bottom-up approach, using citric acid (non-functionalized GQDs) or citric acid/glutathione (N-doped GQDs) as precursors, were studied to evaluate variations in the optical properties of these nanomaterials as a function of the experimental conditions (precursor proportion, heating rate, and hydro-exfoliating medium). Three different types of GQDs were prepared to compare, mainly, the photoluminescent responses and their suppression by Fe³⁺. Non-functionalized GQDs showed intense photoluminescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 330$ nm and $\lambda_{\text{emission}}$ in the range of 450-460 nm). The GQDs prepared in basic condition medium showed luminescence property up to four times greater ($\lambda_{\text{emission}}$ in the same region). The GQDs-GSH showed a luminescent response up to two orders of magnitude higher ($\lambda_{\text{excitation}} = 347$ nm and $\lambda_{\text{emission}} = 425$ nm), and their interaction with Fe³⁺, used as a mediator for the quantification of ascorbic acid (AA), produced suppression of the original signal and $\lambda_{\text{emission}}$ shift to 440 nm. The variation in the proportions of glutathione and ascorbic acid did not imply significant differences in the general characteristics of these GQDs-GSH, pointing to the robustness of their preparation conditions. The addition of Fe³⁺ (4.0×10^{-4} mol L⁻¹) reduced the original signal by half, allowing to distinguish the recovery of the signal caused by the addition of AA. The normalized analytical curves for AA showed linearity in the concentration range between 1.0×10^{-5} and 1.0×10^{-4} mol L⁻¹. Analysis of a real sample produced recovery affected by analyte instability in the probe environment.

Keywords

Quantum dots; graphene; photoluminescence; glutathione; ascorbic acid.

Sumário

1. Introdução	17
1.1. Contextualização do trabalho	17
1.2. Estrutura da dissertação	18
1.3. Objetivos do trabalho	19
1.3.1. Objetivos gerais	19
1.3.2. Objetivos específicos	19
2. Fundamentação teórica	20
2.1. Fotoluminescência: Conceitos básicos	20
2.2. Nanomateriais fotoluminescentes: Pontos Quânticos	21
2.3. Pontos Quânticos de Carbono	24
2.4. Pontos quânticos de grafeno e suas propriedades	25
2.5. Preparo das dispersões de GQDs	26
2.6. Aplicação de GQDs como sondas analíticas fotoluminescentes	27
3. Materiais, Instrumentos e Métodos	31
3.1. Materiais	31
3.2. Instrumentos	31
3.3. Estudo da influência dos parâmetros experimentais da preparação de pontos quânticos na luminescência das dispersões	32
3.3.1. Planejamento experimental	32
3.3.2. Preparo das dispersões de GQDs e de GQDs-GSH	36
3.4. Caracterização das dispersões	37
3.4.1. Análise por espalhamento dinâmico de luz	37
3.4.2. Medições de fotoluminescência e de absorção no UV-vis	38
3.5. Estudo de estabilidade dos pontos quânticos de grafeno	39
3.6. Estudo de repetibilidade das características luminescentes das dispersões de pontos quânticos de grafeno	39

3.7. Estudo da supressão dos GQDs-GSH com Fe ³⁺	40
3.8. Procedimentos para determinação de ácido ascórbico	41
3.8.1. Preparo das amostras de medicamento	41
3.8.2. Determinação pelo método usando sonda luminescente do tipo desliga/liga (<i>off/on</i>)	41
3.8.3. Determinação por cromatográfica líquida de alto desempenho	41
4. Resultados e discussão	43
4.1. Avaliação preliminar das dispersões de pontos quânticos de grafeno	43
4.1.1. Estimativas de tamanho hidrodinâmico e de carga superficial	43
4.1.2. Espectros de extinção e de luminescência no UV-vis	47
4.2. Estudo da influência das condições experimentais de preparo nas características dos pontos quânticos	50
4.2.1. Preâmbulo sobre o processo de aquecimento	50
4.2.2. Influência no preparo dos pontos quânticos de grafeno a partir do ácido cítrico	55
4.2.3. Influência no preparo dos pontos quânticos de grafeno a partir da mistura de glutathione e ácido cítrico	60
4.3. Efeito do Fe ³⁺ na supressão do sinal dos GQDs-GSH	64
4.4. Avaliação da cinética de formação do GQDs-GSH-Fe ³⁺	68
4.5. Uso das dispersões de GQDs-GSH-Fe ³⁺ como sonda analítica <i>off/on</i> de ácido ascórbico.	72
4.5.1. Estudo para detecção de ácido ascórbico	72
4.5.2. Avaliando a influência na concentração de ferro na detecção de ácido ascórbico	75
4.5.3. Curvas analíticas para quantificação de ácido ascórbico	77
4.5.4. Validação do método de quantificação de ácido ascórbico utilizando GQDs-GSH-Fe ³⁺ como sondas analíticas	79
5. Conclusão	83
6. Trabalhos futuros	85

Lista de figuras

- Figura 1: Diagrama simplificado de Jablonski (adaptado de Joseph R. Lakowicz, 2006).⁴ 21
- Figura 2: Esquema de excitação e emissão de pontos quânticos com a estrutura da banda de energia típica de semicondutores. BV é a banda de valência, BC é a banda de condução, ΔE é o deslocamento de Stokes, E_g é a energia do gap, E_{ex} é a energia de excitação, E_{em} 0-4 são as diferentes energias de emissão. 23
- Figura 3: Desenho esquemático do planejamento experimental composto central circunscrito mostrando níveis dos fatores codificados em $-\sqrt{2}$, -1, 0, +1, $+\sqrt{2}$. No eixo X estão relacionados os valores de temperatura (230, 250, 300, 350 e 370 °C). No eixo Y, estão relacionados os valores de massa de ácido cítrico (0,3, 0,5, 1,0, 1,5 e 1,7 g). 33
- Figura 4: Estrutura de monitoramento do preparo das dispersões de pontos quânticos de grafeno com auxílio de câmera térmica. 35
- Figura 5: Ilustração das etapas do procedimento de preparo das dispersões de GQDs ou GQDs-GSH. 37
- Figura 6: Comparação dos tamanhos hidrodinâmicos dos GQDs em dispersão, sendo (a) GQDs-água e (b) GQDs-NaOH. Para ambos, A = 0,3000 g, B = 1,0000 g e C = 1,7000 g de ácido cítrico. 44
- Figura 7: Comparação dos tamanhos hidrodinâmicos dos GQDs-GSH, sendo (a) dispersões analisadas no dia do preparo e (b) dispersões analisadas após 10 meses de armazenamento, onde 1:1, 1:3 e 1:5 são proporções estequiométricas de glutatona/ácido cítrico. 46
- Figura 8: Espectros de extinção das dispersões (A) GQDs-Água e (C) GQDs-NaOH. Espectro de fotoluminescência de (B) GQDs-Água e (D) GQDs-NaOH. Massa inicial de precursor de 0,3000 g e temperatura final de aquecimento de 300 °C. 49
- Figura 9: (A) Espectros de extinção da dispersão de GQDs-GSH; (B) Espectro de fotoluminescência da dispersão de GQDs-GSH. Precursor com proporção glutatona: ácido cítrico de 1:5 e temperatura final de aquecimento de 300 °C. 50
- Figura 10: Coloração típica obtida ao final da etapa de fusão dos precursores em que (a) ácido cítrico, sendo A = 0,3 g, B = 1,0 g, e C = 1,7 g. Em (b) mistura glutatona e ácido cítrico proporções A = 1:5, B= 1:3 e C = 1:1. 52

- Figura 11: Comparação entre as temperaturas estabelecidas para a chapa de aquecimento e a temperatura no interior do béquer contendo ácido cítrico (medidos com a câmera térmica e com base em diferentes massas de ácido cítrico realizados nas temperaturas ajustadas na chapa). 52
- Figura 12: Intensidade fotoluminescente (área integrada da banda de emissão e excitação em 450/330 nm) medidas da dispersão de GQDs feitas com ácido cítrico pelo método de esfoliação em água e diluídas em água: Condição: (partida) massa de ácido cítrico/temperatura: (1) 1,0000 g/230 °C; (2) 1,5000 g/250 °C; (3) 0,5000 g/250 °C; (4) 1,7000 g/300 °C; (5) 1,0000 g/300 °C; (6) 0,3000 g/300 °C; (7) 1,5000 g/300 °C; (8) 0,5000 g/300 °C; (9) 1,0000 g/370 °C. 56
- Figura 13: Superfície de resposta advinda do planejamento CCD usado na produção de GQDs usando ácido cítrico e esfoliação em água. 57
- Figura 14: Intensidade fotoluminescente (área integrada da banda de emissão e excitação em 455/330 nm) medidas da dispersão de GQDs feitas com ácido cítrico pelo método de esfoliação em solução de NaOH e diluídas em água: Condição: (partida) massa de ácido cítrico/temperatura: (1) 1,0000 g/230 °C; (2) 1,5000 g/250 °C; (3) 0,5000 g/250 °C; (4) 1,7000 g/300 °C; (5) 1,0000 g/300 °C; (6) 0,3000 g/300 °C; (7) 1,5000 g/300 °C; (8) 0,5000 g/300 °C; (9) 1,0000 g/370 °C. 58
- Figura 15: Superfície de resposta advinda do planejamento CCD usado na produção de GQDs usando ácido cítrico e esfoliação em solução aquosa de NaOH (0,750 mol L⁻¹). 59
- Figura 16: Perfis espectrais fotoluminescentes normalizados (banda de emissão) dos (a) GQDs-Água com excitação em 330 nm e (b) GQDs-NaOH com excitação em 330 nm. 60
- Figura 17: Comparação entre os perfis espectrais normalizados típicos do (a) GQDs-GSH em relação ao do (b) GQDs-Água. 61
- Figura 18: Bandas de emissão fotoluminescente das dispersões preparadas com diferentes proporções molares glutaciona: ácido cítrico. 62
- Figura 19: Comparação entre as respostas fotoluminescentes dos dois lotes de dispersões de GQDs-GSH produzidas nas diferentes proporções molares de glutaciona/ácido ascórbico. 63
- Figura 20: Coloração do material fundido no momento da interrupção do aquecimento e adição de água no preparo das dispersões de dois lotes, L1 (A) e L2 (B), de GQDs-GSH variando as proporções glutaciona: ácido cítrico de 1:5 até 2:1. 63

Figura 21: Espectros de fotoluminescência dos GQDs-GSH preparados com glutatona/ácido cítrico na proporção de 1:5. A) dispersão em pH 5,00; B) dispersão em pH 3,00. Adições de Fe^{3+} (a) 0 mol L^{-1} ; (b) $1,0 \times 10^{-5}$; (c) $2,0 \times 10^{-5}$; (d) $4,0 \times 10^{-5}$; (e) $6,0 \times 10^{-5}$; (f) $8,0 \times 10^{-5}$; (g) $1,0 \times 10^{-4}$; (h) $1,2 \times 10^{-4}$; (i) $1,4 \times 10^{-4}$; (j) $1,6 \times 10^{-4}$; (k) $1,8 \times 10^{-4}$; (l) $2,0 \times 10^{-4}$; (m) $2,2 \times 10^{-4}$; (n) $2,4 \times 10^{-4}$; (o) $2,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

65

Figura 22: A) Resposta espectral fotoluminescente dos GQDs-GSH na proporção 1:5 em pH 3,00 com adições de Fe^{3+} de (a) 0 mol L^{-1} ; (b) $1,0 \times 10^{-5}$; (c) $2,0 \times 10^{-5}$; (d) $4,0 \times 10^{-5}$; (e) $6,0 \times 10^{-5}$; (f) $8,0 \times 10^{-5}$; (g) $1,0 \times 10^{-4}$; (h) $1,2 \times 10^{-4}$; (i) $1,4 \times 10^{-4}$; (j) $1,6 \times 10^{-4}$; (k) $1,8 \times 10^{-4}$; (l) $2,0 \times 10^{-4}$; (m) $2,2 \times 10^{-4}$; (n) $2,4 \times 10^{-4}$; (o) $2,6 \times 10^{-4}$; (p) $2,8 \times 10^{-4}$; (q) $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. B) Curva normalizada.

67

Figura 23: Resposta espectral fotoluminescente dos GQDs-GSH em pH 3,00, com adições de Fe^{3+} de (a) 0 mol L^{-1} ; (b) $1,0 \times 10^{-5}$; (c) $2,0 \times 10^{-5}$; (d) $4,0 \times 10^{-5}$; (e) $6,0 \times 10^{-5}$; (f) $8,0 \times 10^{-5}$; (g) $1,0 \times 10^{-4}$; (h) $1,2 \times 10^{-4}$; (i) $1,4 \times 10^{-4}$; (j) $1,6 \times 10^{-4}$; (k) $1,8 \times 10^{-4}$; (l) $2,0 \times 10^{-4}$; (m) $2,2 \times 10^{-4}$; (n) $2,4 \times 10^{-4}$; (o) $2,6 \times 10^{-4}$; (p) $2,8 \times 10^{-4}$; (q) $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Sendo A) dispersão de trabalho de GQDs-GSH preparada na proporção de precursores 1:3 B) Curva normalizada de A; C) dispersão de trabalho GQDs-GSH na proporção de precursores 1:1; D) Curva normalizada de C.

68

Figura 24: Resposta espectral fotoluminescente dos GQDs-GSH 1:5, com adições de Fe^{3+} de (a) 0 mol L^{-1} (amarelo) (b) $1,0 \times 10^{-5}$ (azul); (c) $2,0 \times 10^{-5}$ (verde); (d) $8,0 \times 10^{-5}$ (magenta); (e) $1,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (vermelho) A) em pH 3,00; B) em pH 5,00. Espectros de cada grupo obtidos em 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min após a adição de Fe^{3+} .

69

Figura 25: Perfis de resposta medidos em modo cinético para amostras de GQDs-GSH na presença de Fe^{3+} (concentração final de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) onde temos em A: GQDs-GSH 1:5, B: GQDs-GSH 1:3 e C: GQDs-GSH 1:1.

70

Figura 26: Avaliação do comportamento cinético usando as razões entre o sinal original (L_0) da dispersão de trabalho de GQDs-GSH (feitas a partir de dispersões originais preparadas com proporção 1:1 de precursores) e o sinal medido após adição de Fe^{3+} (concentração final de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em 30, 60, 90, 120, 150 min. R^2 do ajuste de 0,9469.

71

Figura 27: Perfil de resposta do teste cinético para adições de $70 \mu\text{L}$ da dispersão original de GQDs-GSH em cubeta contendo 3 mL de solução Fe^{3+} ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).

72

Figura 28: Resposta fotoluminescente da interação entre GQDs-GSH- Fe^{3+} com ácido ascórbico, onde: a) dispersão de trabalho de

GQDs-GSH (preparada com precursores na proporção de 1:5); b) GQDs-GSH-Fe³⁺, e dispersões de GQDs-GSH-Fe³⁺ seguidas de adições de ácido ascórbico, sendo c) 100 µL, d) 200 µL, e) 400 µL, f) 600 µL, g) 800 µL e h) 1000 µL da solução estoque à $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. 73

Figura 29: Interação entre GQDs-GSH-Fe³⁺ e ácido ascórbico acompanhado por varreduras do espectro de emissão da dispersão em intervalos de tempo após a adição do ácido ascórbico, onde a) 1 min., b) 2 min. e c) 3 min. 74

Figura 30: Perfil espectral de resposta da interação do ácido ascórbico com GQDs-GSH pela mediação de diferentes concentrações de Fe³⁺. As dispersões de trabalho foram preparadas a partir de dispersões originais feitas nas proporções de precursores de: 1:5; B) 1:3 e C) 1:1. Em todos os casos: a) sinal original da dispersão de GQDs-GSH com e sem ácido ascórbico a 1×10^{-5} mol L⁻¹; para cada concentração de Fe³⁺ b) 6×10^{-4} mol L⁻¹, c) 4×10^{-4} mol L⁻¹ e d) 2×10^{-4} mol L⁻¹ sendo o espectro mais intenso na presença de ácido ascórbico e o menos intenso na ausência de ácido ascórbico. Medições feitas até 1 min após a adição de Fe³⁺. 75

Figura 31: Resposta da avaliação da interação de diferentes concentrações de analito com os GQDs-GSH mediados por Fe³⁺. Em (A) perfil espectral de resposta para adição de 400 µL de ferro. Em (B) Curva obtida para as duas concentrações de ferro utilizadas. 76

Figura 32: Perfil espectral de resposta característico da adição de diferentes concentrações de ácido ascórbico em sondas de GQDs-GSH-Fe³⁺. Sendo a) dispersão de trabalho de GQDs-GSH 1:5, b) dispersão de trabalho de GQDs-GSH 1:5 após adição de Fe³⁺ a $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Dispersões de GQDs-GSH-Fe³⁺ com adições crescentes de ácido ascórbico, onde c) $5,0 \times 10^{-6}$, d) $1,0 \times 10^{-5}$, e) $2,0 \times 10^{-5}$, f) $4,0 \times 10^{-5}$, g) $6,0 \times 10^{-5}$ h) $8,0 \times 10^{-5}$ e i) $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. 78

Figura 33: Respostas das curvas analíticas feitas para o ácido ascórbico utilizando dispersões de GQDs-GSH-Fe³⁺, sendo em a) GQDs-GSH feitas em setembro de 2020. Em b) GQDs-GSH feitas de agosto de 2021. Nos dois conjuntos de respostas se tem as três proporções de precursores. 78

Figura 34: Cromatograma da curva analítica de padrão de ácido ascórbico, onde a) $1,0 \times 10^{-5}$, b) $2,0 \times 10^{-5}$, $4,0 \times 10^{-5}$, c) $6,0 \times 10^{-5}$, d) $8,0 \times 10^{-5}$ e f) $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ 81

Lista de tabelas

Tabela 1: Relação entre os valores reais das variáveis (temperatura e massa) e sua codificação nos pontos do planejamento composto central circunscrito.	33
Tabela 2: Codificação das dispersões de GQDs obtidas com esfoliação em água e em solução de NaOH.	34
Tabela 3: Planejamento das misturas para a preparação dos GQDs-GSH a partir dos precursores (ácido cítrico e glutatona).	35
Tabela 4: Codificação das dispersões de GQDs-GSH obtidas com esfoliação em água.	35
Tabela 5: Comprimentos de onda de excitação e de emissão utilizados para medir fotoluminescência das diferentes dispersões de pontos quânticos.	38
Tabela 6: Resultados de potencial- ζ medidas para as amostras obtidas logo após o preparo das dispersões de GQDs-GSH.	46
Tabela 7: Teor de carbono das dispersões onde A, B e C representam as massas iniciais de 0,3000 g, 1,0000 g e 1,7000 g de ácido cítrico respectivamente para GQDs-Água e 1:1, 1:3 e 1:5 representando as proporções molares de glutatona/ácido cítrico para os GQDs-GSH.	47
Tabela 8: Comparação das condições típicas de aquecimento dos precursores dos pontos quânticos de grafeno preparados com ácido cítrico.	53
Tabela 9: Comparação das condições típicas de aquecimento dos precursores dos pontos quânticos de grafeno preparados com a mistura de glutatona e ácido cítrico em diferentes proporções com aquecimento fixo em 300 °C.	54
Tabela 10: Intensidade fotoluminescente (área integrada da banda de emissão) e comprimento de onda máximo da banda de emissão para as diferentes partidas de GQDs preparadas usando o planejamento experimental CCD e esfoliação em água. Condição: (partida) massa de ácido cítrico/temperatura: (1) 1,0000 g/230 °C; (2) 1,5000 g/250 °C; (3) 0,5000 g/250 °C; (4) 1,7000 g/300 °C; (5) 1,0000 g/300 °C; (6) 0,3000 g/300 °C; (7) 1,5000 g/300 °C; (8) 0,5000 g/300 °C; (9) 1,0000 g/370 °C.	55
Tabela 11: Intensidade fotoluminescente (área integrada da banda de emissão) e comprimento de onda máximo da banda de emissão para as diferentes partidas de GQDs preparadas usando o planejamento experimental CCD e esfoliação em solução aquosa	

de NaOH. Condição: (partida) massa de ácido cítrico/temperatura: (1) 1,0000 g/230 °C; (2) 1,5000 g/250 °C; (3) 0,5000 g/250 °C; (4) 1,7000 g/300 °C; (5) 1,0000 g/300 °C; (6) 0,3000 g/300 °C; (7) 1,5000 g/300 °C; (8) 0,5000 g/300 °C; (9) 1,0000 g/370 °C.	59
Tabela 12: Relação proporção GSH-Ácido cítrico e comprimento de onda de emissão máxima das dispersões de GQDs-GSH.	61
Tabela 13: Condições de preparo da sonda analítica.	79
Tabela 14: Respostas lineares das curvas de ácido ascórbico utilizando GQDs-GSH-Fe ³⁺	80
Tabela 15: Protocolo de medição de sinal do ácido ascórbico.	80
Tabela 16: Parâmetros de análise por HPLC	81
Tabela 17: Parâmetros de mérito do método cromatográfico.	81
Tabela 18: Comparação dos resultados de recuperação (n = 3) para ácido ascórbico utilizando dois lotes de GQDs-GSH como sondas analíticas e HPLC	82

1.Introdução

1.1.Contextualização do trabalho

A aplicação de nanomateriais em química analítica tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, em especial aquelas com propriedades óticas diferenciadas em relação aos macromateriais. Esse maior interesse tem levado ao desenvolvimento tanto de novos métodos analíticos fundamentados em pontos quânticos, quanto em novos métodos de produção, tornando os nanomateriais cada vez mais fáceis de serem obtidos para as mais diversas aplicações. As vantagens desses métodos óticos são os mais variados, podendo ser alcançada maior sensibilidade, maior seletividade ou a possibilidade de produzir sondas analíticas, permitindo quantificações de espécies sem propriedades óticas por meio de alguma alteração no sinal original do ponto quântico.

Recentemente, nanomateriais baseados em carbono tem se destacado na aplicação como sensores analíticos, dentre eles, os pontos quânticos de grafeno (GQDs). O desenvolvimento de alternativas de produção desses nanomateriais tem sido cada vez mais estudado, visto que suas características óticas podem ser ajustadas, por exemplo pelo método de produção e pela funcionalização desses pontos quânticos, tornando mais estáveis e com respostas luminescentes ainda melhores, o que é de grande interesse para aplicação em sondas fotoluminescentes, se destacando pela facilidade na obtenção, baixo custo dos precursores, baixa toxicidade, e elevada biocompatibilidade.¹ Por conta disso, estudo dos fatores que influenciam a produção de GQDs, bem como sua funcionalização se tornam importantes e necessários, pois ainda se compreende pouco sobre como controlar as condições de preparo a fim de se obter propriedades óticas específicas. A interação direta desses nanomateriais dispersos em solução aquosa com analitos ou, pela ação de mediadores, pode causar um deslocamento espectral, amplificação ou até mesmo supressão do sinal fotoluminescente característico desses GQDs. Saber

com gerar GQDs com características específicas pode viabilizar a produção feita sob medida para uma dada situação analítica.

Ao longo dos últimos anos, o Laboratório de Espectroanalíticas e Eletroanalítica Aplicada (LEEA) da PUC-Rio tem se dedicado a pesquisa nessa área, buscando desenvolver e aprimorar métodos analíticos baseados na aplicação diversos nanomateriais, visando maior eficiência em termos de detecção analítica, separação de espécies, etc.

1.2. Estrutura da dissertação

A presente dissertação está estruturada em 6 capítulos. No Capítulo 1, é apresentada uma breve contextualização do trabalho e seus objetivos. No Capítulo 2, é apresentado o referencial teórico com o objetivo de fornecer a compreensão básica de teorias e conceitos relevantes ao tema da pesquisa. São apresentadas conceitos sobre nanomateriais fotoluminescentes. Além disso, esta seção traz uma breve revisão sobre QDs e GQDs, abordando sua produção, propriedades físicas e químicas e aplicações em métodos analíticos relatados usando pontos quânticos de grafeno e pontos quânticos para detecção de diversos analitos. O Capítulo 3 contém informações detalhadas sobre materiais, instrumentos e reagentes empregados, dos procedimentos empregados para preparar soluções e amostras e os procedimentos relativos aos métodos analíticos. No Capítulo 4 são apresentados os resultados e discussão do estudo realizado sobre a produção dos pontos quânticos de grafeno. Essa sessão inclui, i) caracterização dos nanomateriais, ii) estudo das condições de preparo dos diferentes GQDs; iii) interação dos GQDs-GSH com Fe^{3+} ; iv) desenvolvimento do método de quantificação de ácido ascórbico. Finalmente, os Capítulo 5 e Capítulo 6 são dedicados, respectivamente, a conclusão do trabalho e orientações para trabalhos futuros.

1.3.Objetivos do trabalho

1.3.1.Objetivos gerais

Realizar um estudo da influência de alguns fatores da produção de três diferentes tipos de GQDs, pelo método de pirólise de precursores de carbono, seguido de hidro-esfoliação, nas características luminescentes e suas interações mediada por Fe^{3+} com uma específica molécula de interesse biológico. Finalmente, avaliar aos GQDs mais promissores como sonda desliga/liga (*off/on*) para quantificação de ácido ascórbico.

1.3.2.Objetivos específicos

- Produzir diferentes dispersões de pontos quânticos de grafeno a partir do ácido cítrico (GQDs) e de pontos quânticos de grafeno a partir de mistura de ácido cítrico e glutatona (GQDs-GSH).
- Estudar as dispersões produzidas a partir de diferentes parâmetros (massa e temperatura), a fim de avaliar a influência nas características ópticas dessas dispersões.
- Avaliar a resposta fotoluminescente das diferentes dispersões de GQDs e de GQDs-GSH na presença de Fe^{3+} e desenvolver uma sonda do tipo desliga-liga (*off-on*) para determinação de ácido ascórbico.
- Aplicar o método desenvolvido em amostras reais, isto é, medicamento contendo ácido ascórbico.

2.Fundamentação teórica

2.1.Fotoluminescência: Conceitos básicos

O termo luminescência é um termo geral aplicado à fenômenos ópticos que envolvem a absorção de energia por espécies químicas que, após excitadas, retornam para estados de menor energia por conta da emissão de fótons.² Existem diversos tipos de luminescência, podendo diferenciá-los pelo tipo de energia envolvida na excitação e estado excitado envolvido como por exemplo, a eletroluminescência, bioluminescência, quimiluminescência e fotoluminescência (fluorescência e fosforescência).³

Quando o processo de excitação de um átomo, molécula ou nanomaterial semicondutor é decorrente da absorção de fótons, no caso de átomos e moléculas, a excitação as promove para um estado mais energético, por conta de transição eletrônica de elétrons de valência para orbitais (atômicos ou moleculares) de maior energia. Processos radiantes e não radiantes concorrem para a desativação desses estados excitados e quando essa desativação é radiante se observa fotoluminescência. Esse processo pode ser visualizado no diagrama de Jablonsky simplificado da Figura 1 em que somente processos radiantes são indicados. A partir de uma população no estado fundamental, no caso de átomos, a luminescência pode se ressonante ou não ressonante, ou seja, os fótons emitidos podem ter a mesma energia dos fótons envolvido na excitação da população de átomos (ressonante) ou podem ter energia menor quando decaem para um estado de energia que não é o fundamental. No caso de moléculas, os fótons emitidos têm necessariamente menor energia do que os envolvidos na excitação por conta de efeitos de relaxação solvatocrômicos e pela menor tempo dos relaxamentos vibracionais da molécula excitada comparado ao tempo característico da desativação eletrônica radiante.² Nas moléculas, quando a transição radiante ocorre entre estados de energia de mesma multiplicidade (singleto-singleto) o número quântico de spin do elétron promovido foi preservado, e a molécula, inicialmente

no estado fundamental singlete S_0 , é elevada para um estado excitado também singlete (por exemplo o primeiro estado excitado S_1). A desativação radiante $S_1 \rightarrow S_0$ é denominada fluorescência e tem como característica um tempo de vida na ordem de 10^{-9} a 10^{-6} s com comprimento de onda máximo de emissão (λ_{em}) ocorrendo entre 20 e 100 nm maiores que o comprimento de onda máximo de excitação (λ_{exc})². Essa diferença $\lambda_{exc} - \lambda_{em}$ é denominada deslocamento de Stokes ($\Delta\lambda$).

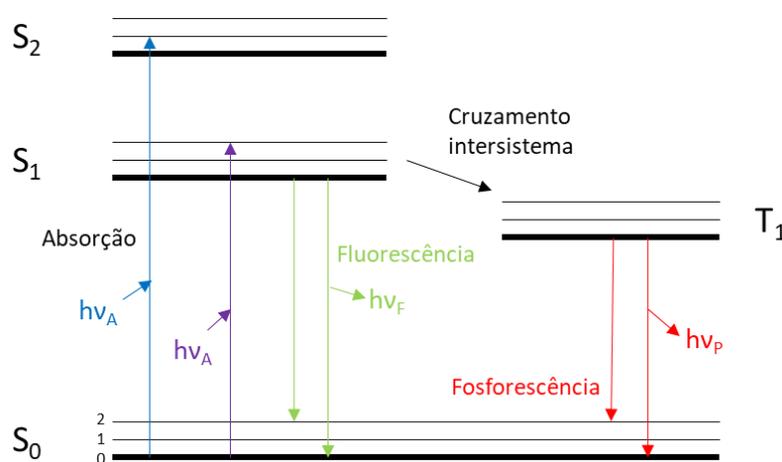


Figura 1: Diagrama simplificado de Jablonski (adaptado de Joseph R. Lakowicz, 2006).⁴

Em situações em que o número quântico de spin eletrônico é invertido na molécula no estado excitado, o estado excitado se torna tripleto e a transição radiante tripleto-singlete (no caso $T_1 \rightarrow S_0$) produz o que se denomina fosforescência, que tem tempo de vida característico da ordem de entre 10^{-4} e 10^{-1} s e valores de $\Delta\lambda$ usualmente maiores do que 100 nm².

2.2. Nanomateriais fotoluminescentes: Pontos Quânticos

Os pontos quânticos (em inglês *Quantum dots*) ou QDs, espécie de semicondutores coloidais monocristalinos, são um dos diversos tipos de nanomateriais responsáveis por promover um impacto significativo em muitas áreas

tecnológicas e nas ciências básicas. As estratégias de obtenção de nanocristais tem sido objeto de estudo no meio científico principalmente por terem impacto nas propriedades ópticas e elétricas, que dependem em sua maioria de seu tamanho, forma e composição. De modo geral, esses nanomateriais apresentam propriedades termodinâmicas distintas de materiais macroscópicos.⁵ Os pontos quânticos inorgânicos normalmente são compostos por elementos dos grupos II - VI, III - V e IV - VI da tabela periódica, destacando-se como os mais comuns os QDs dos grupos II e VI, como por exemplo CdSe, CdTe.⁶ Na década de 1980, Alexei Ekimov e colaboradores⁷ desenvolveram o primeiro método para obtenção de QDs do sistema II - VI de CdTe e CdSe, utilizando precursores metálicos e calcogenetos imersos em matriz vítrea.⁶ Por conta da intensa luminescência, esses QDs atraíram amplo interesse da comunidade científica, principalmente para potenciais aplicações como marcação celular e produção de imagens em sistemas biológicos,⁸ além do potencial uso como sondas para bioanálises⁹ e como materiais luminescentes em detectores.¹⁰

Os QDs apresentam propriedades muito notáveis como luminóforos quando comparados com os corantes luminescentes inorgânicos. Dentre as propriedades se destacam a ampla faixa de absorção (extinção), emissão espectral dependente do tamanho dos QDs (sendo o efeito batocrômico observado na medida em que o tamanho do QDs cresce, maior fotoestabilidade e tempo de vida útil da emissão variando entre várias centenas de picossegundos até, mais tipicamente, da ordem de dezenas de nanossegundos.¹¹ Tais propriedades são consequência do fenômeno conhecido como confinamento quântico (ou efeito do confinamento e efeito quântico), no qual as bandas de valência e de condução do nanomaterial semicondutor se quantizam e a diferença entre os níveis quantizados mais elevado da banda valência e o nível quantizado de menor energia da banda de condução depende do tamanho das nanopartículas.¹² Em materiais maciços (semicondutores macroscópicos), os níveis de energia entre os átomos que formam o semicondutor são degenerados (os átomos experimentam interações similares com a vizinhança) e as bandas se comportam continuamente em termos de energia. Ao excitar um elétron, esse pode ser promovido de uma banda de valência para uma banda de condução, levando a formação de um par elétron-buraco. A distância entre esse elétron e o buraco deixado na camada de valência, é denominada raio de Bohr, que

apresenta um tamanho na ordem de 1^{-10} nm.¹³ Na medida em que as dimensões do semicondutor diminuem, a ponto de se atingir a escala manométrica, os átomos componentes do nanomaterial semicondutor podem ter energias diferentes por conta de diferenças na vizinhança imediata. Dessa maneira, os níveis de energia se manifestam na forma quantizada nas bandas de valência (BV) e de condução (BC), se desdobrando em um conjunto de níveis discretos semelhantes aos níveis de energia atômicos, não apresentando um andamento contínuo em seus níveis de energia, como o esperado em um semicondutor macroscópico.¹³

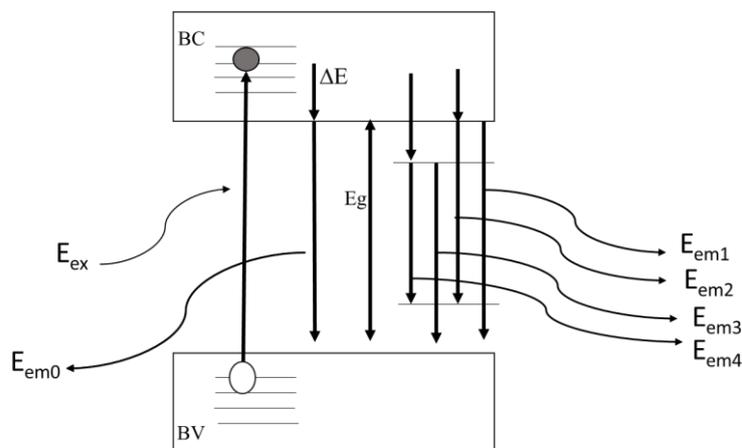


Figura 2: Esquema de excitação e emissão de pontos quânticos com a estrutura da banda de energia típica de semicondutores. BV é a banda de valência, BC é a banda de condução, ΔE é o deslocamento de Stokes, E_g é a energia do gap, E_{ex} é a energia de excitação, E_{em} 0-4 são as diferentes energias de emissão.

O efeito de confinamento quântico é observado quando o raio de um nanocristal de semicondutor se torna comparável ao do raio de Bohr. Quando o raio desse material é menor do raio de Bohr, esse confinamento é considerado forte, resultando num “confinamento” dentro do material.¹³ Dessa forma, o elétron perde a liberdade de seu movimento, sendo obrigado a orbitar ao redor do buraco. O exciton pode então ser descrito pelo modelo do átomo de hidrogênio, ou seja, um átomo composto por um núcleo (o buraco) e um elétron.¹⁴

A fotoluminescência observada para os pontos quânticos semicondutores, são decorrentes da desativação radiante $BC \rightarrow BV$ após excitação eletrônica por exposição à radiação UV-vis. As bandas espectrais de emissão tendem a ser

estreitas (menor largura total na meia altura da banda ou FWHM do que as dos corantes orgânicos) e associada à dispersão de tamanhos das nanopartículas. Já em termos de eficiência quântica luminescente, os valores tendem a ser elevados, em muitos casos se aproximando de 1, em especial para aqueles do tipo core-shell, ou seja, aqueles contendo um núcleo feito de um tipo de semicondutor recoberto com uma camada externa de outro tipo de semicondutor. A eficiência quântica é dada pela razão entre o número de fótons emitidos como fotoluminescência em relação ao número de fótons absorvidos.¹⁵

Os QDs, quando apropriadamente recobertos, por exemplo com ligantes orgânicos, são estáveis em meio aquoso formando uma dispersão coloidal estável. Esse conjunto de nanopartículas coloidais apresentam área superficial muito grande para interagir com outras substâncias em solução.

2.3. Pontos Quânticos de Carbono

Dentre esses nanomateriais fotoluminescentes, estão os pontos quânticos constituídos por carbono, os pontos quânticos de carbono ou CQDs (do inglês, *carbon quantum dots*), bem como os chamados pontos quânticos de grafeno ou GQDs (do inglês, *graphene quantum dots*).

Os CQDs são uma forma de nanomateriais carbonáceos quase esféricos de dimensão zero^{16,17} (todas as dimensões na escala nanométrica até 100 nm mas em geral menores do que 10 nm).¹⁸ Foram obtidos pela primeira vez durante a purificação de paredes nanotubos de carbono por eletroforese preparativa em 2004¹⁹ e depois via ablação a laser de grafite em pó em 2006²⁰

Quando comparados aos QDs inorgânicos, os CQDs apresentam atributos ópticos semelhantes, tornando sua aplicação vantajosa, visto que para a sua obtenção são utilizadas rotas sintéticas de baixo custo e menos exaustivas. Sua maior estabilidade coloidal e baixa toxicidade ambiental e biológica¹⁸, além de fatores como a alta compatibilidade em soluções aquosas²¹ e inércia química, fazem com que esses materiais de destaquem em relação aos pontos quânticos semicondutores tradicionais e corantes inorgânicos. Tais propriedades os tornam

candidatos promissores para possíveis aplicações em bioimagem, biossensor e entrega de biomoléculas, como por exemplo, fármacos.

As excelentes propriedades eletrônicas desses CQDs como doadores e receptores de elétrons, causando quimioluminescência e luminescência eletroquímica, demonstram grande potencial para aplicação em optoeletrônica, catálise e sensores.²² Por apresentarem naturalmente grupos funcionais que permitem a complexação ou funcionalização com espécies químicas próximas de forma seletiva, podem sofrer alterações em sua luminescência de forma a suprimir ou potencializar o seu sinal espectral.

Por conta de poderem ser preparados por diversos procedimentos sintéticos, tem sido cada vez maior a busca pela compreensão dos fatores que influenciam, principalmente, a fotoluminescência desses CDQs. As bordagens conhecidas como *bottom-up e top-down*, tem sido bastante estudadas para a obtenção desses CQDs com características cada vez mais controláveis. Dentre fatores considerados de maior influência na fotoluminescência, estão incluídos: os diferentes centros de emissão, dependência de excitação, alteração no pH e solvente.^{18; 23}

2.4. Pontos quânticos de grafeno e suas propriedades

O termo “CQDs”, em seu sentido mais abrangente, se refere basicamente a todos os nanomateriais compostos principalmente por carbono, incluindo os nanotubos de carbono²⁴ e pontos quânticos de grafeno (GQDs), por exemplo.

Por se tratar de uma forma alotrópica do carbono, o grafeno apresenta uma estrutura bidimensional com espessura de um único átomo.²⁵ Quando essas “folhas” de grafeno bidimensionais se tornam pequenas o suficiente para sofrerem influência do efeito quântico e de confinamento, os GQDs passam a apresentar novas propriedades, sendo muito similares aos QDs. Os GQDs são então definidos como uma espécie de material adimensional com características derivadas do grafeno e CQDs, e podem ser diferenciados do grafeno por ter uma ou poucas folhas de grafeno em camadas com dimensões inferiores a 100 nm, mais comumente entre 3-20 nm,²⁶ um pouco maiores que os CDQs. Os GQDs são superiores em suas

propriedades, como alta fotoestabilidade contra fotobranqueamento e intermitência, biocompatibilidade e baixa toxicidade.²⁷ A estabilidade em água e a possibilidade de se conseguir funcionalizações nas bordas desses nanomateriais tornam as dispersões interessantes para utilização como sondas analíticas, uma vez que a interação com uma espécie química alvo pode promover algum tipo de alterações de forma seletiva em sua resposta fotoluminescente.²⁸

Por esses motivos, os GQDs atraíram atenção significativa dos pesquisadores. Nas primeiras pesquisas sobre GQDs, um grande esforço foi dedicado em desenvolver métodos para a preparação dos mesmos e explorar suas propriedades. Embora sua aplicação no campo analítico seja recente, sensores baseados em GQDs vem sendo explorados, podendo alcançar um alto nível de desempenho.²⁷

Com objetivo de aplicação tecnológica dos GQDs, muitos estudos ainda são necessários para compreender quais fatores de preparo desses nanomateriais mais influenciam na obtenção de nanopartículas com as propriedades desejadas, a fim de se desenvolver de estratégias cada vez mais eficientes de preparo desses GQDs.²⁸

2.5.Preparo das dispersões de GQDs

Existem duas abordagens de preparo dos GQDs, a *top-down* e a *bottom-up*. Os métodos *top-down* são realizados a partir da transformação de materiais como grafite, e posterior quebra em pedaços nanométricos e grafeno.²⁸ Materiais como grafite, grafeno, carvão, nanofibras de carbono, pó de carvão ativado e, recentemente, o carbono derivado da casca de arroz, têm sido usado como matéria-prima para preparar GQDs por métodos *top-down*, através de técnicas como oxidação química, eletroquímica, tratamento hidrotérmico, solvotérmico, ablação à laser, por tratamento assistido por micro-ondas ou ultrassom.²⁹

O preparo de GQDs utilizando abordagens *bottom-up* tem sido preferido nos últimos anos devido ao fato de, poderem produzir GQDs com tamanhos, formas e propriedades bem definidos. Muitos dos métodos são complexos e envolvem condições severas, como os que envolvem carbonização de precursores orgânicos,

síntese orgânica por deposição de vapor químico (CVD) e estratégias que utilizam alta pressão e temperatura. A carbonização de precursores orgânicos, embora afetada pelo baixo rendimento, tem sido amplamente utilizada para sintetizar GQDs devido à sua simplicidade. Os principais precursores de GQDs usados nesta abordagem incluem ácido cítrico, carboidratos (glicose ou sacarose), aminoácidos, acetilacetona, etanolamina e ácido húmico.²⁹ Apesar de ser um dos métodos mais simples e eficientes no preparo dos GQDs, resulta em rendimentos quânticos de luminescentes menores, se comparados aos GQDs preparados por métodos tradicionais.²⁸

Dessa forma, a busca por metodologias ainda mais eficientes, robustas e reprodutíveis de preparo de forma a se obter GQDs com propriedades e características específicas continua despertando o interesse de pesquisadores da área.

Estudos voltados para modificar de maneira funcional os GQDs com espécies que possuem a capacidade de afetar positivamente as propriedades ópticas têm obtido êxito. Um exemplo disso, é a produção de GQDs a partir da pirolise de ácido cítrico e glutathione reduzida (GSH) como precursores. O GSH é um tripeptídeo que consiste em glutamato, cisteína e glicina, e seu uso no preparo apresenta duas vantagens principais sobre os métodos anteriores: aumento considerável do rendimento quântico além de melhorar a compatibilidade biológica de GQDs. Os pontos quânticos de grafeno funcionalizados com glutathione (GQD-GSH) mostram excelentes propriedades de fluorescência com rendimento quântico em torno de 33%.²⁸

2.6. Aplicação de GQDs como sondas analíticas fotoluminescentes

O uso de nanomateriais fotoluminescentes como sensores analíticos são baseados nas alterações das características da fotoluminescência intrínseca do nanomaterial quando este interage com alguma outra espécie química (alvo da sondagem). Tais alterações podem se na intensidade ou área da banda espectral (amplificação ou supressão), na mudança de tempo de vida da emissão ou até

mesmo no deslocamento do comprimento de onda máximo da emissão. Esse tipo de sonda possibilita a detecção e quantificação indireta de uma espécie química alvo (analito) já que é uma propriedade da sonda que é medida e não diretamente uma propriedade do analito. Isso se torna vantajoso para analitos que não apresentam propriedades ópticas inerentes ou relevantes na faixa visível e UV do espectro,³⁰ evitando o uso de procedimentos reacionais de derivação química para formação um produto fotoluminescente do analito.

Nesse cenário, estudos voltados para a compreensão das propriedades dos GQDs, da relação entre condições de preparação e resposta óptica, e do efeito das modificações na estrutura dos GQDs repercutem de forma crucial na escolha de estratégias analítica usando as sondas de GQDs.

Na literatura em química analítica vem crescendo o uso desse tipo de sonda analítica. Por exemplo, visando desenvolver um método eficiente para quantificação de Ag^+ , Bian et al., em 2017³¹ produziram pontos quânticos de grafeno dopados com enxofre (S-GQDs), utilizando um tratamento hidrotérmico e 1,3,6-trinitropireno como fonte de carbono e ácido 3-mercaptopropiônico (MPA) foi empregado como fonte de enxofre. Esse precursor foi escolhido pois tem na estrutura do pireno similaridade com a estrutura do grafeno. A função do MPA era de introduzir nas bordas da estrutura dos GQDs grupos contendo enxofre e grupos carboxilílicos para promover aumento de eficiência quântica e possibilitar sítios de interação com o analito (Ag^+). Essa dopagem com enxofre alterou de forma positiva as propriedades eletrônicas e químicas, proporcionando aos ditos S-GQDs uma resposta sensível aos íons Ag^+ . A detecção de Ag^+ foi sensível e seletiva, propiciando ampla faixa linear de 0,1 - 130,0 μM com um limite de detecção de 30 nM. Em 2018, Saenwong e colaboradores¹⁶ utilizaram um sensor de luminescente seletivo para especiação de ferro, desenvolvido com base em GQDs funcionalizados com uso de glutatona como co-precursor (GQDs-GSH) e usando extrato de óleo de limão como fonte de carbono por ser rico em ácido cítrico. A partir da pirolise desse óleo, na presença de glutatona (GSH), foram obtidos pontos quânticos de grafeno dopados com N e SCO (GSH-GQDs). Na presença de íon férrico (Fe^{3+}), a intensidade da luminescência do GSH-GQDs diminuiu linearmente na medida em que a concentração de Fe^{3+} era aumentada. Para a detecção de Fe^{2+} , era feita a adição de H_2O_2 à amostra para oxidar este para Fe^{3+} e permitir a quantificação de Fe^{2+} por diferença entre ferro total na forma de Fe^{3+} e Fe^{3+} original.

A faixa linear obtida foi de 1,0 - 150 μM com LOD de 0,1 μM . Esse sensor foi utilizado na determinação dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} em cinco diferentes marcas de água potável engarrafada.¹⁶

Xu e colaboradores, em 2017,³² desenvolveram a síntese de dois tipos de pontos de quanticos de grafeno (GQDs) utilizando glutatona, sendo uma na presença e outra na ausência de AgNO_3 respectivamente e através de uma rota simples do tipo *one-pot*. Os íons Ag^+ podem se combinar ao grupo $-\text{SH}$ do GSH para formar Ag_2S , dessa forma, as superfícies dos pontos quânticos de grafeno obtidos (N-GQDs) seriam funcionalizados principalmente por alguns grupos de hidroxilas ($-\text{OH}$), grupos amino ($-\text{NH}_2$) e grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$). Em contrapartida, na ausência de íons Ag^+ , as superfícies dos pontos quânticos de grafeno incluiriam também o grupo $-\text{SH}$. Nesse estudo, os dois tipos de GQDs apresentaram forte fotoluminescência em dispersão, porém com comprimentos de onda de emissão diferentes. Ambos os GQDs apresentaram capacidade de interação com íons metálicos, onde os N-GQDs responderam prontamente aos íons Fe^{3+} , e foram usados como uma prova para detectar íons Fe^{3+} em águas residuais, enquanto os SN-GQDs apresentaram eficiência para detecção de íons Hg^{2+} .³² Em outro estudo recente, Toloza e colaboradores³⁰ estudaram a resposta fotoluminescente de dispersão aquosas de pontos quânticos de grafeno funcionalizados com amino (GQDs-amino), na presença de histamina sendo essa interação mediada por diferentes íons metálicos. Esses ditos GQDs-amino foram preparados a partir da rota hidrotérmica usando ácido cítrico e glutatona como precursores. Uma melhor interação com a histamina foi observada na presença de Eu^{3+} , Fe^{3+} e Cu^{2+} . A sensibilidade das curvas de supressão de fotoluminescência normalizada indicou uma interação mais forte da histamina com a superfície dos GQDs na presença de Fe^{3+} (maior constante de supressão K_s). A resposta linear observada no GQDs-amino- Fe^{3+} (luminescência medida em 345/435 nm) cobriu a concentração de histamina de $4,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (limite de quantificação) até $3,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O método proposto para a determinação de histamina se mostrou simples e eficiente, visto que os resultados analíticos foram comparáveis aos obtidos com um método baseado em HPLC com detecção fluorimétrica após derivação química da histamina. O método foi usado para a análise de atum de modo a se avaliar a qualidade desse pescado em função do teor de histamina.³⁰

Em um estudo mais recente, Toloza e colaboradores³³ fizeram a determinação de sulfato de canamicina de forma indiretamente, através dos efeito em pontos quânticos de grafeno funcionalizados com glutathione (GQDs-GSH) associados a nanopartículas de ouro (AuNPs). O sistema AuNPs-GQDs-GSH-CTAB apresentou uma fotoluminescência suprimida que foi posteriormente amplificada na presença de canamicina. Em condições experimentais otimizadas, a amplificação por fotoluminescência do sistema nanomaterial apresentou resposta linear em função da concentração de canamicina, abrangendo três ordens de magnitude (10^{-7} a 10^{-5} mol L⁻¹). O valor do LOD alcançado foi $3,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ de sulfato de canamicina. Os resultados analíticos foram satisfatórios, se mostrando estatisticamente semelhantes aos obtidos com um método de fluorescência baseado em HPLC (após derivatização química)³⁴.

3. Materiais, Instrumentos e Métodos

3.1. Materiais

As soluções e dispersões aquosas foram preparadas utilizando água ultrapura (resistividade mínima de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida de um purificador de água Milli-Q A10 Gradiente da Millipore (EUA). O ácido cítrico e o hidróxido de sódio foram adquiridos da Vetec (Brasil). A glutatona reduzida (GSH) e o cloreto férrico foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). O ácido sulfúrico foi obtido da Merck (Brasil) e o ácido ascórbico da WWR Chemicals (Reino Unido). Soluções tampão de pH 4,00, 7,00, e 10,00, da Merck, foram usadas para calibrar o pHmetro.

Filtros de seringa com porosidade $0,22 \mu\text{m}$ e diâmetro igual a 30 mm foram obtidos da Agilent Technologies (Japão). Micropipetas automáticas de volumes reguláveis de 1 a $10 \mu\text{L}$, 10 a $100 \mu\text{L}$ e de 100 a $1000 \mu\text{L}$ (marca LabMate) e balões volumétricos de vidro transparente (de 5,00, 10,00, 25,00, 50,00, 100,00 e 250,00 mL) foram utilizados no preparo das soluções e dispersões.

3.2. Instrumentos

Um espectrômetro de fotoluminescência, modelo LS-55 da PerkinElmer (Reino Unido), foi utilizado para obter os espectros de luminescência e para medições de intensidade luminescente em estado estacionário ($\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ fixos). Cubetas de quartzo foram usadas para acondicionar as soluções/dispersões para medição de luminescência. Quando foi necessário manter a temperatura da cubeta constante durante a medição, utilizou-se um banho termostático (PTP-1 de sistema Peltier PCB1500Water, Perkin-Elmer) e agitação usando uma mini barra magnética para uniformizar mais rapidamente a temperatura. Os espectros eletrônicos de absorção no UV-Vis foram obtidos com um espectrofotômetro, da Perkin-Elmer,

Lambda 19 com duplo feixe. O analisador DLS SZ-100 Nanopartica (Horiba, Japão), equipado com um laser de 10 mW de 532 nm, foi usado para medição de espalhamento dinâmico de luz e de potencial- ξ . Análises feitas para comparação de resultados foram feitas com um cromatógrafo líquido de alta eficiência da Agilent (série 1200) com um detector fotométrico de absorção do tipo arranjo de diodos e amostragem automática. As medições de teor de carbono foram feitas em um Analisador de Carbono modelo TOC-VCPN (Shimadzu, Japão).

Na preparação do nanomaterial utilizou-se chapa de aquecimento IKA (Alemanha) e uma chapa com agitação Nova Técnica (Brasil). A produção dos nanomateriais foram acompanhadas com uma câmera térmica. As medições de massa foram realizadas numa balança analítica modelo AUW220D (Shimadzu), calibrada pelo laboratório Peso Exato Automação (Rio de Janeiro). As medições de pH foram realizadas em um pHmetro modelo MPA 210, versão 2.3, da Tecnopon (Brasil). O eletrodo utilizado foi do tipo de membrana de vidro, selado e conjugado com eletrodo de referência de $\text{Ag}|\text{AgCl}(\text{KCl}_{(\text{sat})})$. O equipamento foi calibrado diariamente.

3.3. Estudo da influência dos parâmetros experimentais da preparação de pontos quânticos na luminescência das dispersões

3.3.1. Planejamento experimental

A fim de avaliar a influência de fatores como massa do precursor (ácido cítrico) e temperatura de carbonização e, indiretamente a taxa de aquecimento, nas características fotoluminescentes dos GQDs produzidos, foi utilizado um planejamento experimental de composto central circunscrito (CCD) de dois fatores, cujo desenho experimental (com valores codificados) é mostrado na Figura 3. Esse planejamento foi utilizado para o preparo das dispersões de GQDs em água e em solução aquosa ($0,75 \text{ mol L}^{-1}$) de NaOH. A partir desse modelo de planejamento, os parâmetros variáveis foram organizados de forma que os valores de temperatura

fossem relacionados com os valores no eixo X e os valores de massa de ácido cítrico fossem relacionados com o eixo Y, como apresentado na Tabela 1.

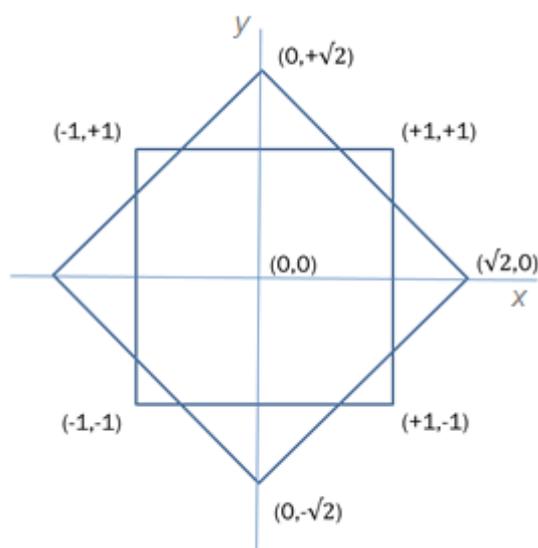


Figura 3: Desenho esquemático do planejamento experimental composto central circunscrito mostrando níveis dos fatores codificados em $-√2$, -1 , 0 , $+1$, $+√2$. No eixo X estão relacionados os valores de temperatura (230, 250, 300, 350 e 370 °C). No eixo Y, estão relacionados os valores de massa de ácido cítrico (0,3, 0,5, 1,0, 1,5 e 1,7 g).

Tabela 1: Relação entre os valores reais das variáveis (temperatura e massa) e sua codificação nos pontos do planejamento composto central circunscrito.

Pontos	Temperatura de configuração da chapa (°C)	Massa de ácido cítrico (g)
$(0, +√2)$	370	1,0000
$(+1, +1)$	350	1,5000
$(+√2, 0)$	300	1,7000
$(+1, -1)$	250	1,5000
$(0, -√2)$	230	1,0000
$(-1, -1)$	250	0,5000
$(-√2, 0)$	300	0,3000
$(-1, +1)$	350	0,5000
$(0, 0)$	300	1,0000

Para facilitar o andamento do experimento, ficou estabelecido que as dispersões seriam preparadas em ordem crescente de temperatura (experimento

ordenado de forma não aleatória), seguido pelas massas de ácido cítrico definido no planejamento. As dispersões aquosas obtidas em cada condição foram codificadas usando um numeral inteiro (que denota a ordem do experimento feito em função do aumento da temperatura) seguido do tipo de meio aquoso usado para esfoliar o material fundido, como indicado na Tabela 2.

Tabela 2: Codificação das dispersões de GQDs obtidas com esfoliação em água e em solução de NaOH.

Temperatura teórica (°C)	Massa de ácido cítrico (g)	GQDs-Água	GQDs-NaOH
230	1,0000	1 Água	1 NaOH
250	1,5000	2 Água	2 NaOH
250	0,5000	3 Água	3 NaOH
300	1,7000	4 Água	4 NaOH
300	1,0000	5 Água	5 NaOH
300	0,3000	6 Água	6 NaOH
350	1,5000	7 Água	7 NaOH
350	0,5000	8 Água	8 NaOH
370	1,0000	9 Água	9 NaOH

No caso dos experimentos para a preparação dos GQDs-GSH, a partir da mistura de ácido cítrico e glutatona, o planejamento foi diferente, com aquecimento em chapa com temperatura fixa em 300°C e usando apenas água como meio para promover a esfoliação para formação do nanomaterial. Nesse estudo levou-se em consideração a influência da estequiometria dos precursores ácido cítrico e glutatona na fotoluminescência do nanomaterial resultante (em dispersão aquosa). As condições estudadas tiveram como referência a relação de precursores usadas por Toloza et al,³⁰ que foram 0,5000 g de ácido cítrico para 0,15000 g de glutatona o que significou uma relação molar ácido cítrico glutatona de aproximadamente 5 vezes. Assim, no experimento decidiu-se fixar a quantidade, em mol, de ácido cítrico em 0,72 mol (quantidade suficiente para preencher o fundo de um copo béquer de 10,0 mL), variando a quantidade de glutatona de 0,14 a 1,43 mol (ver proporções molares na Tabela 3). A fim de avaliar a repetibilidade, foram feitas duas partidas (lotes 1 e 2) seguindo os mesmos parâmetros. O meio líquido usado para esfoliação da mistura fundida foi água ultrapura e a codificação das dispersões

obtidas de GQDs-GSH foi seguida da indicação da proporção inicial de glutatona e ácido cítrico (Tabela 4).

Tabela 3: Planejamento das misturas para a preparação dos GQDs-GSH a partir dos precursores (ácido cítrico e glutatona).

Proporção Molar		Quantidade em mol	
Glutaciona	Ácido cítrico	Glutaciona	Ácido cítrico
1	5	0,14	0,72
1	4	0,18	0,72
1	3	0,24	0,72
1	2	0,36	0,72
1	1	0,72	0,72
2	1	1,43	0,72

Tabela 4: Codificação das dispersões de GQDs-GSH obtidas com esfoliação em água.

Proporção molar dos precursores		Codificação	
Glutaciona	Ácido cítrico	Lote 1	Lote 2
0,14	0,72	1:5 L1	1:5 L2
0,18	0,72	1:4 L1	1:4 L2
0,24	0,72	1:3 L1	1:3 L2
0,36	0,72	1:2 L1	1:2 L2
0,72	0,72	1:1 L1	1:1 L2
1,43	0,72	2:1 L1	2:1 L2

A etapa de aquecimento do processo de preparação das dispersões de pontos quânticos de grafeno foi acompanhada com uma câmera térmica (ver montagem do aparato na Figura 4).



Figura 4: Estrutura de monitoramento do preparo das dispersões de pontos quânticos de grafeno com auxílio de câmera térmica.

3.3.2. Preparo das dispersões de GQDs e de GQDs-GSH

O preparo das dispersões de GQDs em água e em solução de NaOH foram feitos seguindo um mesmo protocolo. Primeiramente foi pesada uma massa de ácido cítrico, em copo béquer, que foi posteriormente aquecido em uma chapa de aquecimento com temperatura final específica para cada experimento. Os parâmetros de massa e temperatura utilizados foram os estabelecidos através do planejamento experimental como indicado na Tabela 1.

Na medida em que a chapa aquecia para alcançar a temperatura final estabelecida, o calor era transferido para o copo béquer, promovendo a fusão do ácido cítrico em seu interior. A coloração do precursor sólido, inicialmente transparente, mudou paulatinamente para um tom caramelo, com a fusão do mesmo, o que indicou o início da sua carbonização. Essa etapa levou de 3 a 20 minutos para ocorrer, dependendo da temperatura final ajustada para a chapa de aquecimento. Neste ponto, adicionou-se 10 mL de água ultrapura ou de solução aquosa de NaOH ($0,75 \text{ mol L}^{-1}$) diretamente nos béqueres para promover a hidro-esfoliação. Em seguida, o béquer foi colocado numa chapa para agitação magnética por 20 min (após adição de uma pequena barra magnética de Teflon). Após esse período, as dispersões foram filtradas, em filtro de seringa, a fim de eliminar partículas grandes residuais da carbonização e outras partículas maiores que $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ que eventualmente se formam na dispersão final. As dispersões foram armazenadas sob o abrigo de luz em temperatura ambiente.

O preparo das dispersões de GQDs-GSH foi também realizado pelo procedimento de fusão dos precursores (ácido cítrico e glutatona) seguida de hidro-esfoliação (nesse caso somente usando água). Os precursores sólidos foram primeiramente pesados e transferidos para um copo béquer, onde foram bem misturados. O copo béquer foi aquecido em chapa de aquecimento ajustada para uma temperatura de 300°C . Conforme a mistura foi se fundindo, a coloração inicialmente incolor foi atingindo um tom caramelo escuro. Nesse caso, esta etapa levou entre 3 e 6 minutos para ocorrer, sendo essa variação de tempo proporcional à quantidade de precursores utilizados para preparar cada dispersão. Após a carbonização dos precursores, foram adicionados 10,00 mL de água ultrapura no

copo béquer, para promoção da esfoliação e formação do nanomaterial, que foi imediatamente transferido para uma chapa para promoção de agitação, com barra magnética de Teflon, por 20 min. Em seguida, as dispersões foram filtradas em filtro de seringa, armazenadas sob o abrigo de luz em temperatura ambiente.

Em ambas as situações de preparo, monitorou-se a mudança de coloração como um parâmetro determinante para avaliar o ponto final do processo. Paralelamente, o aquecimento dos precursores, para a produção dos nanomateriais, foram monitoradas com o auxílio de uma câmera térmica. Na Figura 5, um esquema é apresentado ilustrando o procedimento padrão de preparo de todas as dispersões.

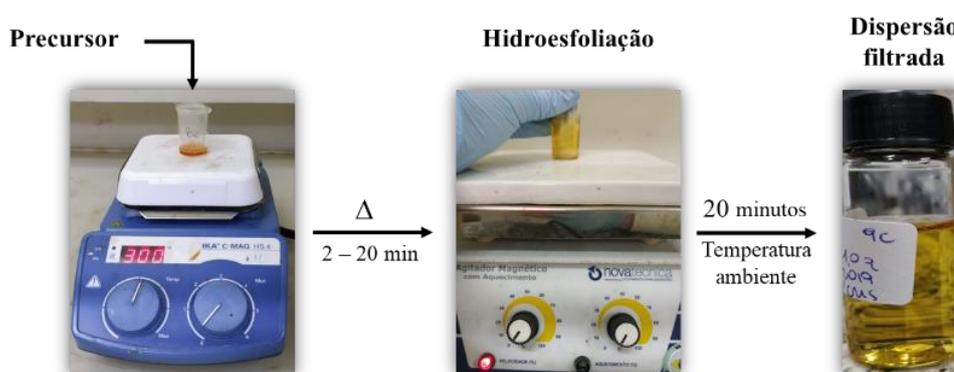


Figura 5: Ilustração das etapas do procedimento de preparo das dispersões de GQDs ou GQDs-GSH.

3.4. Caracterização das dispersões

3.4.1. Análise por espalhamento dinâmico de luz

A medição de espalhamento dinâmico de luz (DLS), promovida pelo material disperso em solução, e do potencial- ζ foi realizado para obter, respectivamente, as distribuições de tamanho hidrodinâmico das nanopartículas e a carga superficial média dos nanomateriais. As medições foram feitas após a homogeneização das amostras em banho de ultrassom por 60 s. Um volume de 2,50 mL de cada amostra foi colocado em uma cubeta de poliestireno com quatro lados opticamente transparentes e caminho óptico de 1 cm. As medições foram feitas em

dez repetições, na temperatura de 25,0 °C e ângulos de 90 °. As medições do potencial- ξ foram feitas em uma célula eletroquímica de acrílico contendo um eletrodo plano de carbono (6 mm de espessura).

3.4.2. Medições de fotoluminescência e de absorção no UV-vis

A fotoluminescência dos GQDs foi medida após as dispersões originais terem sido diluídas em água ultrapura (passando por uma diluição intermediária) e transferidas para uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm e de quatro faces transparentes. Após obter os espectros de excitação e de emissão (com velocidade de 12000 nm min⁻¹) o par de comprimentos de onda de excitação e emissão foram escolhidos para realizar medições de sinal no estado estacionário (par $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ fixos nos valores indicados da Tabela 5). As bandas espectrais passantes foram de 10 nm (excitação e emissão). Os espectros de extinção (no UV-vis) foram obtidos por espectrofotometria de absorção (ajustadas pela lei de Lambert-Beer) usando onde pequenas quantidades das dispersões originais, diluídas em água. Estas foram colocadas em cubetas com duas faces transparentes de quartzo, com caminho óptico de 1 cm. A velocidade de varredura foi de 1000 nm min⁻¹ e a banda espectral passante foi de 10 nm. A faixa de comprimento de onda varrido foi de 200 a 700 nm.

Tabela 5: Comprimentos de onda de excitação e de emissão utilizados para medir fotoluminescência das diferentes dispersões de pontos quânticos.

Tipo de dispersão	Comprimento de onda de Excitação	Comprimento de onda de emissão máxima
GQDs-Água	330	450
GQDs-NaOH	330	450
GQDs-GSH	347	425

3.5. Estudo de estabilidade dos pontos quânticos de grafeno

Para o estudo de estabilidade, foram repetidas três condições de cada tipo de dispersão de GQDs (GQDs-Água, GQDs-NaOH e GQDs-GSH). Para as dispersões de GQDs-Água e de GQDs-NaOH foram estudadas as dispersões feitas com 0,3000 g, 1,0000 g e 1,7000 g de ácido cítrico como material de partida da produção de GQDs. No caso dos GQDs-GSH, dispersões com as proporções molares de GSH/ácido cítrico de 1:5, 1:3 e 1:1, foram usadas no estudo.

Em todos os casos, as dispersões foram preparadas em triplicata e com temperatura de carbonização fixada em 300 °C. As medições de fotoluminescência e de extinção foram feitas logo após o preparo das dispersões originais (após diluição apropriada com água) sendo essas medições realizadas ao longo de 6 meses de forma a se avaliar a estabilidade dos nanomateriais.

3.6. Estudo de repetibilidade das características luminescentes das dispersões de pontos quânticos de grafeno

Para verificar a repetibilidade do processo de preparação das dispersões dos pontos quânticos, em termos da luminescência, foi realizado uma comparação do comportamento da fotoluminescência das réplicas individuais para cada tipo GQDs e também para um pool dessas réplicas. Para GQDs-Água e GQDs-NaOH, foram feitas dispersões com 0,3000 g de ácido cítrico. Para dispersões funcionalizadas com GSH, foi escolhida a dispersão preparada com proporção de 1:5 GSH/ácido cítrico. Em todos os casos, as dispersões foram preparadas com temperatura de carbonização fixada em 300 °C. As dispersões foram preparadas em triplicata por três dias seguidos.

3.7. Estudo da supressão dos GQDs-GSH com Fe³⁺

A solução estoque de Fe³⁺ ($1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) foi preparada a partir da dissolução de uma quantidade adequada de FeCl₃ em solução aquosa ajustada para pH 3,00 pela adição de alíquotas apropriadas de solução de HCl 0,100 mol L⁻¹. Essa solução foi preparada diariamente.

As dispersões de trabalho (dispersões intermediárias) de GQDs-GSH, nas três diferentes proporções estequiométricas de precursores, foram preparadas a partir de 50,00 µL da dispersão original, sendo adicionada em balão volumétrico de 25,00 mL, tendo seu volume final ajustado com água ultrapura.

As dispersões de GQDs-GSH-Fe³⁺ foram preparadas a partir da mistura de uma alíquota da dispersão intermediária de GQDs-GSH e alíquotas adequadas da solução estoque de Fe³⁺, em temperatura ambiente, sendo o volume final foi ajustado para 10,00 mL em balão volumétrico. A adição de HCl 0,100 mol L⁻¹ para o ajuste de pH 3,00, quando necessário, foi feita antes que o volume final da solução fosse ajustado. As dispersões foram transferidas para cubetas de quartzo para medir a fotoluminescência (medida estacionária no $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$). As medições foram realizadas após 1 min da adição da alíquota apropriada de Fe³⁺, sendo esse tempo necessário para avolumar a solução, homogeneizar e transferir para a cubeta.

A fotoluminescência medida a partir das dispersões contendo Fe³⁺ (L) foram normalizados pelos seus respectivos sinais (L₀) originais (dispersão sem a presença de Fe³⁺) a fim de estabelecer uma relação crescente entre o sinal normalizado (L₀/L) e a concentração de Fe³⁺.

3.8.Procedimentos para determinação de ácido ascórbico

3.8.1.Preparo das amostras de medicamento

Para cada amostra do medicamento contendo ácido ascórbico, uma solução estoque foi preparada a partir de uma alíquota do *pool* de 3 comprimidos contendo 0,5000 mg de ácido ascórbico cada, foram macerados, sendo uma alíquota dissolvida em 10,00 mL de água ultrapura e transferido para frasco âmbar. A partir da solução estoque de amostra, uma solução diluída foi preparada, sendo filtrada em seguida utilizando um filtro de membrana de 0,45 μm para remover qualquer material em suspensão do comprimido. As amostras também foram feitas com três repetições para detecção e posterior quantificação.

3.8.2. Determinação pelo método usando sonda luminescente do tipo desliga/liga (*off/on*)

As soluções estoques de ácido ascórbico foram preparadas em concentrações iguais a $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em água.

As Medidas de fotoluminescência foram feitas na faixa de 360 a 600 nm com comprimento de onda de excitação de 347 nm, com velocidade de escaneamento de 1200 nm cm^{-1} e bandas espectrais passantes foram de 10 nm (excitação e emissão)

3.8.3.Determinação por cromatográfica líquida de alto desempenho

As análises por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) foram feitas com base em procedimento descrito na literatura,³⁵ utilizando eluição isocrática e uma fase móvel consistindo em água acidificada, em pH 2,50 e metanol

85/15 % v/v, utilizando uma coluna Agilent Eclipse XDB-C18, de 250 x 4,6 mm x 5 μm .

A cromatografia foi realizada com uma vazão de 1 mL min^{-1} , a 25 °C, e o volume de amostra introduzido foi de 20,0 μL . Nessas condições, o tempo de retenção do ácido ascórbico foi de 2,6 minutos. A Faixa linear da curva analítica constituída a partir do padrão de ácido ascórbico foi de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} , usando três repetições, e a detecção absorciométrica foi feita em 254 nm.

4.Resultados e discussão

4.1.Avaliação preliminar das dispersões de pontos quânticos de grafeno

4.1.1.Estimativas de tamanho hidrodinâmico e de carga superficial

Algumas das dispersões produzidas foram selecionadas para se realizar uma avaliação de algumas características que poderiam ser influenciadas pela variação de condições de produção.

As análises utilizando o espalhamento dinâmico de luz foram feitas com a finalidade de avaliar as condições de preparo (no caso a massa inicial de precursor, mas mantendo a mesma temperatura da chapa de aquecimento) e a influência do meio aquoso de esfoliação (água e solução aquosa de NaOH) no caso dos GQDs feitos com ácido cítrico. No caso das dispersões de GQDs-GSH, avaliou-se a influência da adição de diferentes proporções de glutathione para obter a funcionalização dos ditos GQDs-GSH com grupos contendo heteroátomos (N e/ou S). Com os dados do DLS foi possível avaliar o tamanho hidrodinâmico das nanopartículas e sua carga superficial. Em todos os casos foram feitas três partidas para cada condição experimental, para que em seguida fossem misturadas para formar um pool de dispersões para a análise.

No caso dos GQDs produzidos com ácido cítrico, as análises de DLS só puderam ser realizadas aproximadamente 10 meses após o preparo. Contudo essas dispersões foram armazenadas no escuro e em geladeira (aproximadamente 4 °C). Já no caso das dispersões de GQDs-GSH, as comparações foram realizadas também para dispersões armazenadas por 10 meses, mas também se analisou partidas de GQDs-GSH preparadas no mesmo dia das medições. Assim, pôde-se avaliar o impacto do tempo de preparo nas propriedades do GQDs-GSH. As medições, por sua vez, foram feitas dez vezes ($n = 10$) para uma alíquota transferida para a cubeta.

Para as dispersões preparadas a partir da fusão do ácido cítrico e esfoliação em água (GQDs-água) ou em NaOH (GQDs-NaOH) foram escolhidas as nanopartículas preparadas com 0,3000 g, 1,0000 g e 1,7000 g de ácido cítrico. Para as dispersões de GQDs-GSH, foram analisadas as dispersões preparadas com glutatona/ácido cítrico nas proporções de 1:5, 1:3 e 1:1. Em todos os casos, a chapa de aquecimento foi ajustada com a temperatura final de 300 °C, ou seja, aplicando a mesma taxa de aquecimento.

Ao compararmos as dispersões esfoliadas em água e em solução de NaOH se pode observar que o tamanho hidrodinâmico foi maior para as dispersões preparadas em água quando comparadas com as respectivas preparadas com esfoliação com solução de NaOH, como mostrado na Figura 6. A diferença foi da ordem de 60 nm para as partidas feitas com 0,3000 g e 1,7000 g e a metade disso (29 nm) para as feitas com 1,0000 g de precursor. Pode se especular, pela lógica dos resultados, que provavelmente essa diferença também seria próxima de 60 nm para dispersões feitas com 1,0000 g de ácido cítrico, mas esse valor não foi alcançado provavelmente por algum problema de medição ou por conta de alguma das triplicatas das dispersões (posteriormente misturadas no pool) ter produzido nanomaterial com tamanho muito menor do que o esperado, por conta de algum fator fora do controle e não identificado.

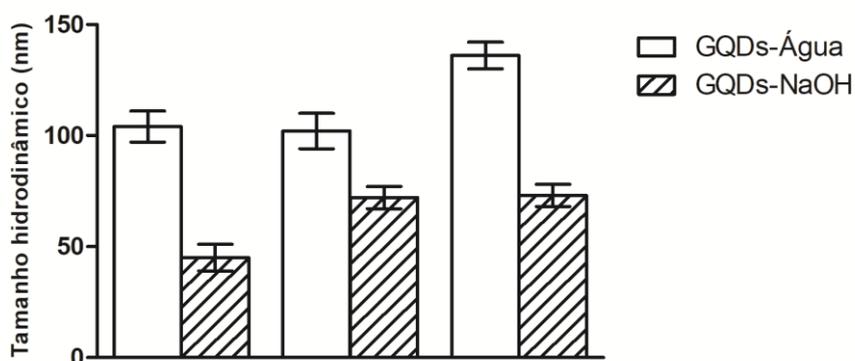


Figura 6: Comparação dos tamanhos hidrodinâmicos dos GQDs em dispersão, sendo (a) GQDs-água e (b) GQDs-NaOH. Para ambos, A = 0,3000 g, B = 1,0000 g e C = 1,7000 g de ácido cítrico.

Essa diferença de tamanho poderia ser explicada por um maior favorecimento da desprotonação dos grupos funcionais que tendem a se formar nas

bordas dos GQDs (grupos -COOH em especial) em meio básico, que pode causar um maior grau de solvatação restringindo a expansão da nanoestrutura, comprimindo-os em tamanhos menores quando comparados aos GQDs esfoliados em água. Em relação às massas de ácido cítrico usadas, em ambos os meios de esfoliação, observou-se uma tendência de se obter nanopartículas maiores partindo de maiores massas de precursor. Esse efeito pode ser atribuído ao fato de que quanto maior a quantidade de ácido cítrico, maior a concentração de nanomaterial inicialmente formado e disperso (maior proximidade entre os núcleos de material carbônico inicialmente formados) que podem então coalescer formando nanopartículas de tamanhos maiores. No caso dos GQDs formados em água, a diferença entre a partida feita com a maior massa de ácido cítrico e a produzida com a menor massa do precursor foi de aproximadamente 31 nm enquanto que para as preparadas em NaOH a diferença foi de aproximadamente 28 nm. Ou seja, as diferenças foram muito semelhantes não importando o meio usado para a esfoliação para produzir o nanomaterial.

No caso das dispersões feitas com adição de glutathione, os tamanhos médios obtidos para os nanomateriais estão indicados na Figura 7, tanto para as dispersões que ficaram armazenadas por 10 meses quanto para as dispersões analisadas no dia da preparação. Pode-se observar que em ambas as situações, o aumento da massa relativa de glutathione contribuiu para um aumento de tamanho das nanopartículas, ou seja maiores tamanhos obtidos com a relação 1 para 1 de glutathione e ácido cítrico. Para as partidas analisadas, logo após a preparação, as nanopartículas preparadas com a massa relativa maior de glutathione foi de 4,6 vezes maior do que a obtida com a menor quantidade de glutathione. A mesma tendência foi observada para as nanopartículas que ficaram estocadas por quase 1 ano (3,1 vezes). Isso novamente deve ser consequência da maior massa de precursor usado na produção de nanomaterial, favorecendo a coalescência de núcleos de carbono que se formam mais proximamente uns dos outros. A contribuição da variação da carga superficial dos nanomateriais na discrepância de tamanho foi, a princípio, descartada pois os valores de potencial- ζ medidos foram muito próximos para todas as nanopartículas, como pode ser observado para as amostras analisadas logo após preparo (Tabela 6). As cargas medidas foram negativas (aproximadamente - 4 mV) evidenciando a

maior presença de grupos funcionais negativamente carregados nas bordas da estrutura do grafeno.

Outra constatação foi o crescimento da nanopartícula ao longo do tempo, já que o tamanho médio das medidas, após 10 meses de estocagem, foram entre 2 a 7 vezes maiores do que as das medidas logo após preparo. Esse efeito é comum para nanomateriais cuja carga superficial é pequena, ou seja, a repulsão eletrostática entre nanopartículas é fraca favorecendo a agregação do nanomaterial ao longo do tempo.

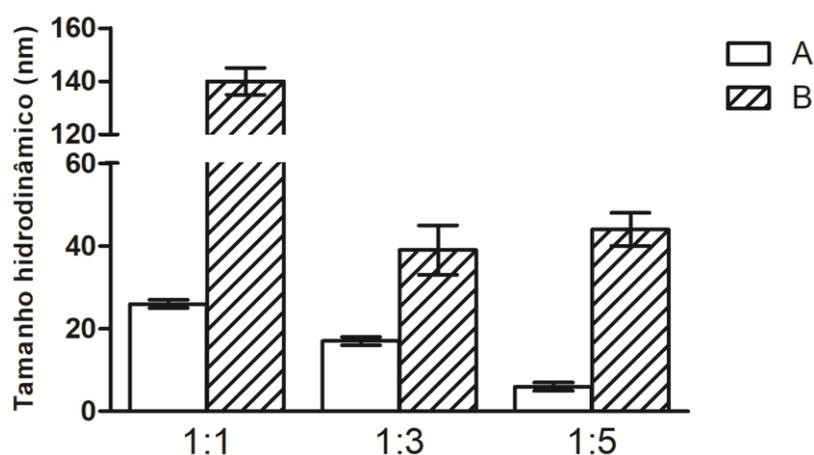


Figura 7: Comparação dos tamanhos hidrodinâmicos dos GQDs-GSH, sendo (a) dispersões analisadas no dia do preparo e (b) dispersões analisadas após 10 meses de armazenamento, onde 1:1, 1:3 e 1:5 são proporções estequiométricas de glutatona/ácido cítrico.

Tabela 6: Resultados de potencial- ζ medidas para as amostras obtidas logo após o preparo das dispersões de GQDs-GSH.

	Tamanho hidrodinâmico (nm)	Potencial ζ (mV)
1:1	26,0 \pm 1,0	-3.5
1:3	17,0 \pm 1,0	-3.8
1:5	6,0 \pm 1,0	-3.9

As análises de teor de carbono nas dispersões também foram realizadas e os resultados, em termos de concentração em mg L^{-1} , estão indicados na Tabela 7. Os resultados mostraram que, logicamente, a carga de material carbônico disperso e/ou dissolvido aumentou em função da massa de material precursor. No caso dos

GQDs, o aumento do teor de carbono foi de 5,5 vezes o que foi exatamente a diferença, em proporção entre as massas menor e maior de precursor. Para as nanopartículas produzidas com adição de glutatona, o teor de carbono na dispersão também aumentou na medida em que a massa de glutatona aumentou (3,3 vezes) o que não reflete totalmente o aumento da massa de material de partida do processo, ou seja, de 1,9 vezes (total de 0,3710g para a proporção 1:1 e um total de 0,1950 g para a proporção 1:5) e também não reflete a diferença em quantidade efetiva de carbono total nas misturas (0,145 mol de C para a mistura 1:1 e 0,009 mol para a mistura 1:5).

Tabela 7: Teor de carbono das dispersões onde A, B e C representam as massas iniciais de 0,3000 g, 1,0000 g e 1,7000 g de ácido cítrico respectivamente para GQDs-Água e 1:1, 1:3 e 1:5 representando as proporções molares de glutatona/ácido cítrico para os GQDs-GSH.

Teor de carbono (mg L ⁻¹)			
GQDs-água		GQDs-GSH	
0,3000 g de precursor	63,0 ± 0,8	Proporção 1:1	430,4 ± 2,7
1,0000 g de precursor	173,8 ± 1,6	Proporção 1:3	226,2 ± 2,2
1,7000 g de precursor	345,0 ± 0,8	Proporção 1:5	137,9 ± 1,5

4.1.2. Espectros de extinção e de luminescência no UV-vis

Para realizar uma primeira avaliação dos espectros eletrônicos das dispersões de pontos quânticos de grafeno (GQDs-Água, GQDs-NaOH ou GQDs-GSH), alíquotas das dispersões foram diluídas em água ultrapura (10,00 mL de volume final) para formar uma dispersão diluída para obtenção dos espectros. Esse fator de diluição variou em função da necessidade de se ajustar a intensidade da extinção e da luminescência sem a preocupação, nesse momento, de se avaliar as intensidades relativas.

Para as dispersões de GQDs, foram usadas, nesse primeiro momento, as dispersões feitas a partir de 0,3000 g de ácido cítrico. Um amplo espectro de extinção, com um pico máximo entre 230 e 240 nm, é característico de pontos quânticos de carbono. Essas características espectrais podem ser atribuídas à transição $\pi - \pi^*$ de C=C (carbono sp²) e à presença de possíveis grupos funcionais

amino na borda dos pontos quântico.³⁶ A primeira banda excitônica das dispersões de GQDs-Água e GQDs-NaOH apareceu em 330 nm (Figura 8 A e Figura 8 C).

Os espectros de fotoluminescência obtidos das dispersões de GQDs-Água e GQDs-NaOH podem ser observados respectivamente na Figura 8 B e Figura 8 D. Em ambos os casos observou-se em máximo de emissão em 450 nm quando excitados em seus respectivos máximos de excitação (326 nm para GQDs-Água e 327 para GQDs-NaOH). Porém, para as dispersões de GQDs-NaOH observou-se duas bandas de excitação (máximos em 250 nm e 327 nm) em contraste com a única banda observada para as dispersões de GQDs-Água. Isso pode indicar que mais de dois níveis de energia da banda de condução estejam envolvidos formando predominantemente dois diferentes pares elétron-vacância. Vale salientar que a intensidade observada para as dispersões GQDs-Água foi em torno de 4 vezes mais intensa do que a observada para as dispersões de GQDs-NaOH (fato não diretamente observado nos espectros mostrados em função dos diferentes fatores de diluição usados). Vale salientar que os perfis espectrais foram os mesmos independente da massa inicial dos precursores.

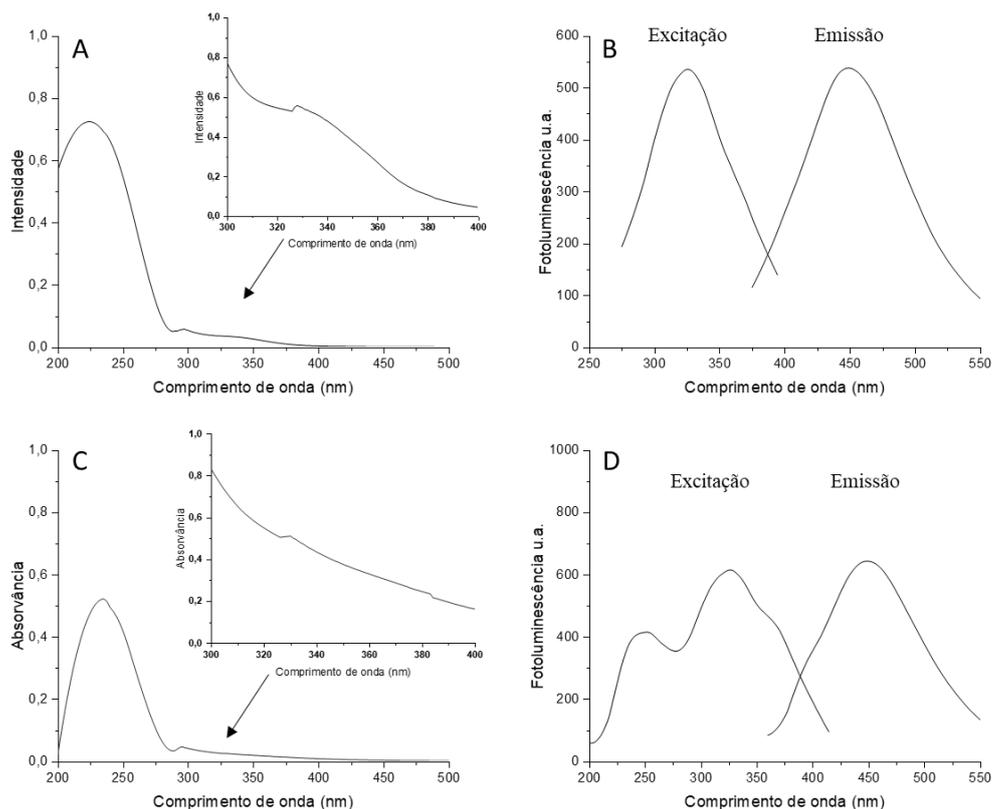


Figura 8: Espectros de extinção das dispersões (A) GQDs-Água e (C) GQDs-NaOH. Espectro de fotoluminescência de (B) GQDs-Água e (D) GQDs-NaOH. Massa inicial de precursor de 0,3000 g e temperatura final de aquecimento de 300 °C.

No caso da dispersão de GQDs-GSH, os espectros eletrônicos foram obtidos apenas para da mistura de precursores na proporção 1:5 para fazer com que a composição do material precursor fosse majoritariamente ácido cítrico, (próximo da situação da produção das GQDs) para evidenciar o efeito da presença de glutaciona no perfil espectral medido. O espectro de extinção (obtida a partir da mistura de precursores na proporção 1:5) apresentou primeiro excitônico em 347 nm (17 nm maior do que o observado para os GQDs) e uma banda intensa com máximo em 224 nm (Figura 9 A). O espectro de fotoluminescência (Figura 9 B) produziram bandas com máximo de excitação em 345 nm (em torno de 20 nm maior do que o observado para as GQDs) e de emissão em 425 nm (25 nm menor do que o observado para os GQDs). Desse modo, o deslocamento de Stokes dos espectros, que é uma medida relativa da diferença entre os níveis de energia envolvidos na formação do par elétron-vacância, foi de 80 nm, ou seja, menor do que os observados para os GQDs (em torno de 125 nm).

Em termos de intensidade relativa, as GQDs-GSH apresentaram cerca de 4 vezes mais intensas do que as GQDs-água muito embora a massa de ácido cítrico usado na produção de GQDs-GSH tenha sido apenas duas vezes menor que a usada para as GQDs. Esse resultado mostrou a importância da funcionalização proporcionada pela glutatona nas propriedades fotoluminescentes dos nanomateriais produzidos.

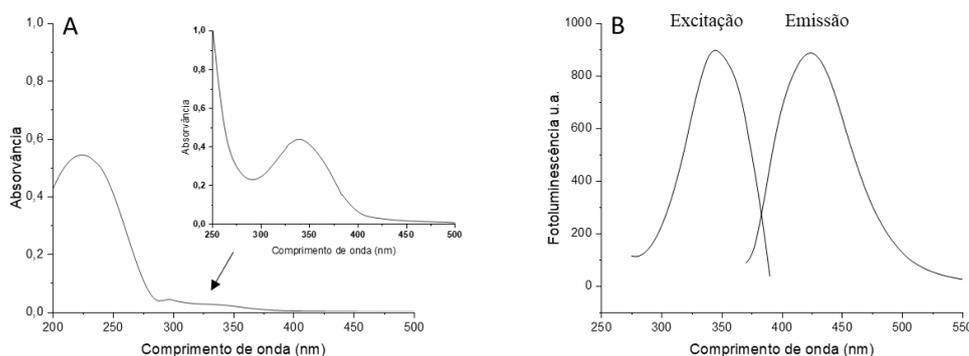


Figura 9: (A) Espectros de extinção da dispersão de GQDs-GSH; (B) Espectro de fotoluminescência da dispersão de GQDs-GSH. Precursor com proporção glutatona: ácido cítrico de 1:5 e temperatura final de aquecimento de 300 °C.

4.2. Estudo da influência das condições experimentais de preparo nas características dos pontos quânticos

4.2.1. Preâmbulo sobre o processo de aquecimento

Apesar de o processo de preparação dos pontos quânticos de grafeno ser operacionalmente simples, poucas informações estão disponíveis na literatura em termos do estudo sistemático, sobre o efeito que a escolha das condições experimentais teria nas características fotoluminescentes das dispersões resultantes. Sendo assim, um estudo foi realizado para avaliar a importância da escolha da massa e proporção relativa de precursores e também da temperatura da chapa de aquecimento (taxa de aquecimento) no processo de produção dos pontos quânticos, pelo processo de fusão seguido de hidro-esfoliação.

O estudo incluiu os três tipos de dispersões citados na seção anterior. As ditas dispersões de GQDs foram preparadas a partir do ácido cítrico e hidroesfoliadas com água ou com solução aquosa de NaOH ($0,750 \text{ mol L}^{-1}$), seguindo a condições estabelecidas para o planejamento experimental CCD, descrito na Tabela 1. Para as denominadas dispersões de GQDs-GSH, a influência da relação molar entre glutaciona e ácido cítrico foi avaliada e apenas água foi usada para a hidroesfoliação. Nesse caso, o planejamento simplificado descrito na Tabela 3 foi utilizado, com temperatura final da chapa fixa em valor teórico de $300 \text{ }^\circ\text{C}$.

Nessa etapa, para todas as produções de dispersões de GQDs, houve acompanhamento feito com a câmera térmica, a fim de se monitorar a temperatura real da chapa (quando as temperaturas da chapa de aquecimento foram ajustadas para valores esperados entre $230 \text{ }^\circ\text{C}$ à $370 \text{ }^\circ\text{C}$) e também da temperatura no interior do béquer, durante a fusão do precursor dos GQDs. Para a produção das dispersões de GQDs-GSH, os monitoramentos foram feitos para se avaliar a temperatura do interior do béquer durante de fusão das misturas com diferentes proporções de glutaciona e ácido cítrico em função da temperatura final estabelecida. Como os precursores possuem pontos de fusão definidos ($153 \text{ }^\circ\text{C}$ para o ácido cítrico e $195 \text{ }^\circ\text{C}$ para a glutaciona) a temperatura final dentro do béquer tende a se estabilizar em algum momento numa temperatura mais baixa do que a temperatura efetiva da chapa de aquecimento.

No caso dos GQDs, em que se variou a temperatura final, o processo de fusão seria afetado pela taxa de aquecimento (de transferência de calor para os precursores) na medida em que a temperatura final foi modificada. Em outras palavras, com o auxílio da câmera térmica foi possível determinar que a temperatura máxima atingida pela chapa era próxima da temperatura estabelecida no experimento, enquanto que no interior do béquer, a temperatura se mantinha em valores mais baixos e constantes em função da mudança de estado físico dos precursores. Durante o processo de aquecimento, logo ao se fundir o ácido cítrico apresentou um aspecto transparente, mas ao longo do processo ocorreu uma mudança de coloração passando a apresentar uma coloração caramelo/marrom (ver Figura 10), indicando carbonização parcial. Ao se atingir tal coloração, o processo de aquecimento era interrompido (conforme protocolo estabelecido na literatura).

Conforme apresentado na Figura 11, enquanto a temperatura da chapa alcançava o valor próximo ao estabelecido no experimento, a temperatura no interior do béquer se estabilizava em um valor próximo dos 200 °C, levando em conta os experimentos realizados nas diferentes temperaturas e usando massa inicial do ácido cítrico não fixa, ou seja, os resultados foram baseados nas massas do planejamento nas temperaturas finais da chapa de aquecimento. Dessa forma, a variação da temperatura aplicada da chapa de aquecimento influenciou apenas no tempo necessário para se atingir o ponto de fusão, ou seja, a taxa de aquecimento ou transferência de calor para o precursor, como indicado na Tabela 8.

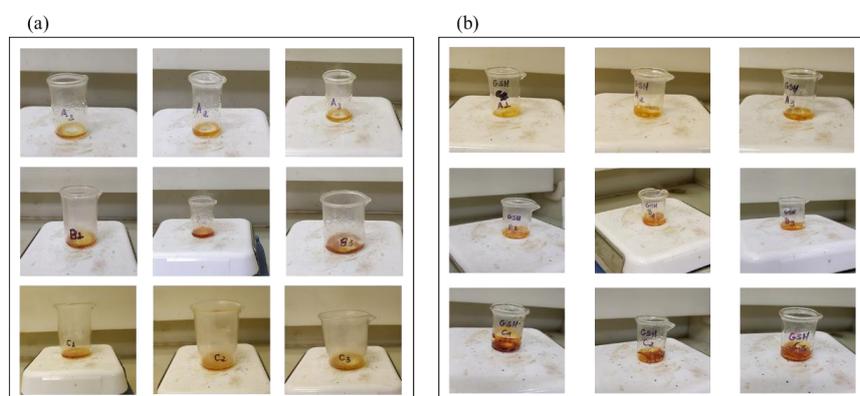


Figura 10: Coloração típica obtida ao final da etapa de fusão dos precursores em que (a) ácido cítrico, sendo A = 0,3 g, B = 1,0 g, e C = 1,7 g. Em (b) mistura glutatona e ácido cítrico proporções A = 1:5, B= 1:3 e C = 1:1.

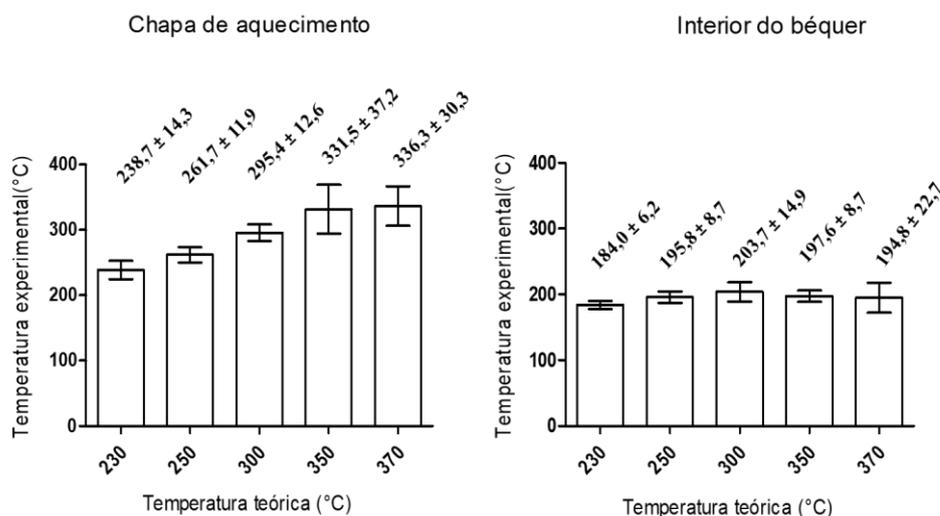


Figura 11: Comparação entre as temperaturas estabelecidas para a chapa de aquecimento e a temperatura no interior do béquer contendo ácido cítrico (medidos com a câmera térmica e com base em diferentes massas de ácido cítrico realizados nas temperaturas ajustadas na chapa).

Tabela 8: Comparação das condições típicas de aquecimento dos precursores dos pontos quânticos de grafeno preparados com ácido cítrico.

Temperatura estabelecida para a chapa (°C)	Temperatura medida da chapa (°C)	Temperatura medida dentro do béquer (°C)	Tempo (min)	Taxa de aquecimento estimada para a chapa (°C min⁻¹)
230	225	175	17,6	11,3
250	250	188	15,2	14,8
300	285	191	6,6	40,9
350	332	201	5,7	53,9
370	353	178	3,4	96,5

No caso das misturas de ácido cítrico com glutaciona, avaliou se a temperatura final dentro do béquer variava significativamente em função da alteração da proporção entre os compostos precursores. Porém, verificou-se que a temperatura medida foi praticamente a mesma (entre 199 °C e 223 °C) considerando os desvios-padrões. Isso repercutiu na similaridade nos tempos de aquecimento e nas taxas de transferência de calor (com exceção da no caso da proporção molar entre glutaciona e ácido cítrico de 2:1 por conta do maior tempo necessário para atingir a temperatura final) (Tabela 9).

Tabela 9: Comparação das condições típicas de aquecimento dos precursores dos pontos quânticos de grafeno preparados com a mistura de glutatona e ácido cítrico em diferentes proporções com aquecimento fixo em 300 °C.

Proporção molar glutatona: ácido cítrico	Temperatura medida da chapa (°C)	Temperatura medida no béquer (°C)	Tempo (min)	Taxa de aquecimento estimada para a chapa (°C min⁻¹)
1:5	275,5 ± 4,5	205,0 ± 13,0	3,0	60,0
1:4	285,0 ± 3,0	221,0 ± 2,0	2,9	67,2
1:3	285,0 ± 3,0	223,0 ± 9,0	2,6	76,1
1:2	285,0 ± 1,0	220,0 ± 7,0	3,4	57,4
1:1	287,0 ± 3,0	215,0 ± 2,0	3,3	57,6
2:1	282,0 ± 3,0	199,0 ± 3,0	6,7	25,9

4.2.2. Influência no preparo dos pontos quânticos de grafeno a partir do ácido cítrico

A intensidade (área integrada da banda) e comprimentos de onda máximos das bandas de emissão da fotoluminescência obtidas das diferentes partidas de GQDs em água estão mostrados na Tabela 10 assim como na Figura 12 cujos valores foram corrigidos pelos fatores de diluição e eventual uso de filtro de densidade óptica usado no momento da medição. Para realizar as medições, alíquotas, da ordem de alguns microlitros, de cada dispersão foram diluídas em água para que a medição pudesse ser realizada sem saturar o detector do fluorímetro.

Tabela 10: Intensidade fotoluminescente (área integrada da banda de emissão) e comprimento de onda máximo da banda de emissão para as diferentes partidas de GQDs preparadas usando o planejamento experimental CCD e esfoliação em água. Condição: (partida) massa de Condição: (partida) massa de ácido cítrico/temperatura: (1) 1,0000 g/230 °C; (2) 1,5000 g/250 °C; (3) 0,5000 g/250 °C; (4) 1,7000 g/300 °C; (5) 1,0000 g/300 °C; (6) 0,3000 g/300 °C; (7) 1,5000 g/300 °C; (8) 0,5000 g/300 °C; (9) 1,0000 g/370 °C.

Dispersões	GQDs-Água	
	Intensidade máxima (unidades arbitrárias)	Comprimento de onda máximo da banda de emissão (nm)
1-Água	$9,9 \times 10^4 \pm 2,2 \times 10^4$	447
2-Água	$1,1 \times 10^5 \pm 1,6 \times 10^4$	456
3-Água	$4,1 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^4$	464
4-Água	$1,2 \times 10^5 \pm 2,6 \times 10^4$	457
5-Água	$1,1 \times 10^5 \pm 5,3 \times 10^4$	467
6-Água	$5,9 \times 10^4 \pm 2,8 \times 10^4$	450
7-Água	$1,3 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^4$	456
8-Água	$7,6 \times 10^4 \pm 1,5 \times 10^4$	453
9-Água	$1,1 \times 10^5 \pm 8,2 \times 10^3$	454

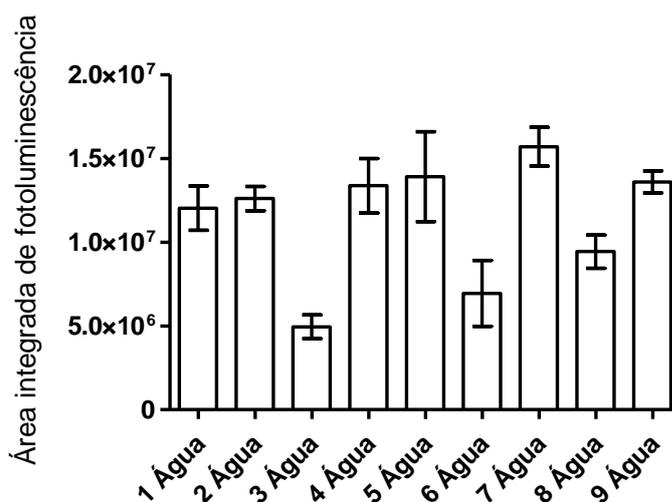


Figura 12: Intensidade fotoluminescente (área integrada da banda de emissão e excitação em 450/330 nm) medidas da dispersão de GQDs feitas com ácido cítrico pelo método de esfoliação em água e diluídas em água: Condição: (partida) massa de ácido cítrico/temperatura: (1) 1,0000 g/230 °C; (2) 1,5000 g/250 °C; (3) 0,5000 g/250 °C; (4) 1,7000 g/300 °C; (5) 1,0000 g/300 °C; (6) 0,3000 g/300 °C; (7) 1,5000 g/300 °C; (8) 0,5000 g/300 °C; (9) 1,0000 g/370 °C.

Houve uma variabilidade de amplitude de 20 nm para os comprimentos de onda máximo da emissão fotoluminescente das dispersões, variando entre 447 nm e 467 nm, o que não pôde ser claramente explicado por uma tendência na variação de temperatura ou massa de precursor. Como o ponto de interrupção do aquecimento foi feito pelo critério do aparecimento da coloração caramelo da mistura, essa variação, que implica em material mais ou menos carbonizado, pode ter influenciado nesse aspecto.

A partir dos valores de intensidade do gráfico de barras (Figura 12) foi possível observar que as dispersões das partidas feitas com as menores massas (0,3000 g ou 0,5000 g) de ácido cítrico (3-Água, 6-Água e 8-Água) produziram luminescência estatisticamente menores do que as produzidas com massas maiores de ácido cítrico. Dentre essas feitas com massas menores de precursor, a que produziu maior sinal foi que foi aquecida com placa ajustada em 300 °C (8-Água), indicando que essa maior taxa de transferência de calor poderia ter produzido mais núcleos carbonizados do que as aquecidas com menor taxa de calor. Em contrapartida, para as dispersões feitas com massas de ácido cítrico (1,0000 g, 1,5000 g e 1,7000 g) a luminescência medida foi estatisticamente similar (confirmado pela análise de variância feito com as dispersões 1-Água, 2-Água e 4-Água, 5-Água, 7-Água e 8-Água com nível de confiança de 95% com $F_{\text{experimental}} = 3,6 < F_{\text{crítico}} = 5,08$).

A superfície de resposta gerada (Figura 13) aponta, aparentemente, para uma tendência em se obter melhor fotoluminescência com maior massa de precursor e maior temperatura. Isso se comprovou pela equação modelo que relaciona o sinal em área integrada (y) com as variáveis temperatura (T) e massa (m): $y = 3,4 \times 10^4 T + 9,9 \times 10^6 m + 1,3 \times 10^2 mT$.

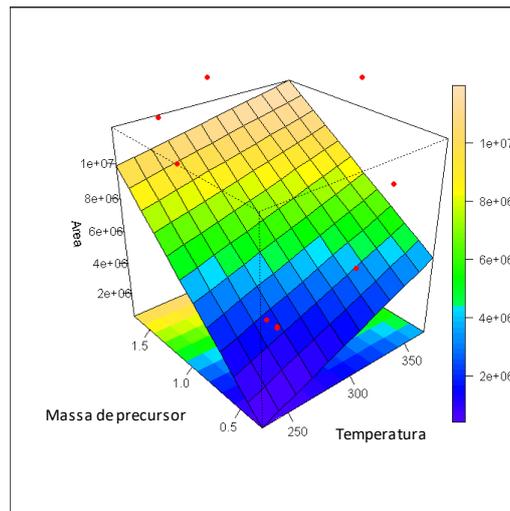


Figura 13: Superfície de resposta advinda do planejamento CCD usado na produção de GQDs usando ácido cítrico e esfoliação em água.

A equação do modelo aponta maior relevância para a escolha da massa de precursor do que para a temperatura da chapa, considerando as faixas temperaturas finais escolhidas. O valor relativamente pequeno do coeficiente de interação (mT) também indicou nenhuma influência mútua entre esses os fatores.

A intensidade (área integrada da banda) e comprimentos de onda máximos das bandas de emissão da fotoluminescência, obtidas das diferentes partidas de GQDs em solução de NaOH, estão mostrados na Figura 14 e na Tabela 11. Alíquotas de GQDs-NaOH também foram diluídas em água antes das medições de fotoluminescência. Os valores mostrados na Tabela 11 assim como na Figura 14 foram corrigidos pelos fatores de diluição e eventual uso de filtro de densidade óptica usado no momento da medição.

De um modo geral, as intensidades observadas com as dispersões de GQDs-NaOH produziram intensidades (área integrada da banda de emissão) maiores, no geral 4 vezes, do que os GQDs-Água. Porém, nesse caso, não houve uma clara evidência de que dispersões preparadas com maiores massas de precursor

produziriam maior intensidade de luminescência e nem se temperaturas maiores ou menores produziram melhores resultados já que estes variaram bastante e sem padrão de comportamento. Isso pode indicar que a esfoliação em NaOH pode produzir uma grande variabilidade no resultado final, ou seja, na qualidade dos pontos quânticos de grafeno. Em contrapartida, os espectros obtidos foram bem repetitivos em termos do comprimento de onda máximo da banda de emissão, variando numa amplitude de apenas 5 nm (entre 455 nm e 460 nm). Isso pode implicar na robustez desses parâmetros na produção de GQDs-GSH (menor efeito na luminescência em função de variações de massa e taxa de aquecimento).

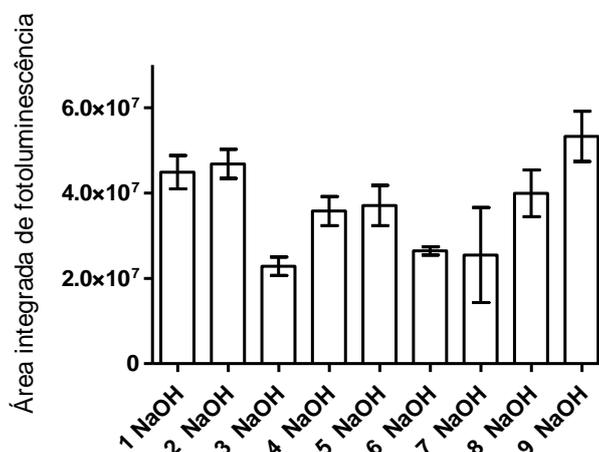


Figura 14: Intensidade fotoluminescente (área integrada da banda de emissão e excitação em 455/330 nm) medidas da dispersão de GQDs feitas com ácido cítrico pelo método de esfoliação em solução de NaOH e diluídas em água: Condição: (partida) massa de ácido cítrico/temperatura: (1) 1,0000 g/230 °C; (2) 1,5000 g/250 °C; (3) 0,5000 g/250 °C; (4) 1,7000 g/300 °C; (5) 1,0000 g/300 °C; (6) 0,3000 g/300 °C; (7) 1,5000 g/300 °C; (8) 0,5000 g/300 °C; (9) 1,0000 g/370 °C.

No caso da superfície de resposta (Figura 15) confirmou-se o padrão que não indica tendência alguma e resultados variando dentro da variância experimental.

Tabela 11: Intensidade fotoluminescente (área integrada da banda de emissão) e comprimento de onda máximo da banda de emissão para as diferentes partidas de GQDs preparadas usando o planejamento experimental CCD e esfoliação em solução aquosa de NaOH. Condição: (partida) massa de ácido cítrico/temperatura: (1) 1,0000 g/230 °C; (2) 1,5000 g/250 °C; (3) 0,5000 g/250 °C; (4) 1,7000 g/300 °C; (5) 1,0000 g/300 °C; (6) 0,3000 g/300 °C; (7) 1,5000 g/300 °C; (8) 0,5000 g/300 °C; (9) 1,0000 g/370 °C.

Dispersões	GQDs-NaOH	
	Intensidade máxima (unidades arbitrárias)	Comprimento de onda máximo da banda de emissão (nm)
1-NaOH	$4,3 \times 10^5 \pm 8,7 \times 10^4$	457
2- NaOH	$4,4 \times 10^5 \pm 7,9 \times 10^4$	456
3- NaOH	$2,5 \times 10^5 \pm 4,4 \times 10^4$	460
4- NaOH	$3,1 \times 10^5 \pm 8,0 \times 10^4$	455
5- NaOH	$3,7 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^5$	458
6- NaOH	$2,5 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^4$	456
7- NaOH	$4,2 \times 10^5 \pm 2,1 \times 10^5$	455
8- NaOH	$3,7 \times 10^5 \pm 8,8 \times 10^4$	452
9- NaOH	$6,7 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^5$	452

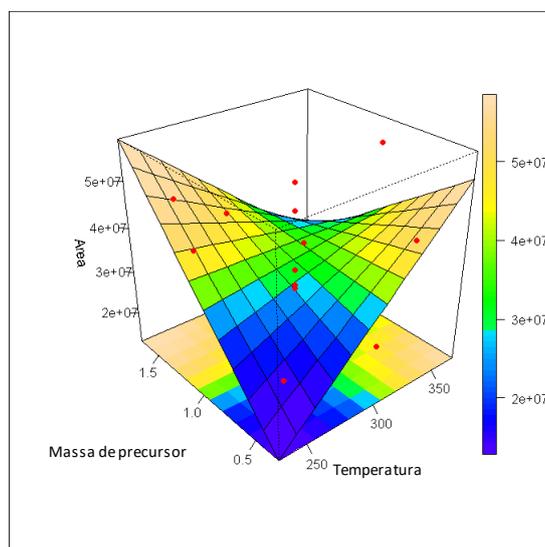


Figura 15: Superfície de resposta advinda do planejamento CCD usado na produção de GQDs usando ácido cítrico e esfoliação em solução aquosa de NaOH ($0,750 \text{ mol L}^{-1}$).

Comparando os espectros normalizados obtidos dos GQDs-Água com os de GQDs-NaOH (Figura 16) pode-se verificar a tendência de os GQDs em NaOH apresentarem um perfil mais fino e um ombro melhor definido um pouco antes de 400 nm.

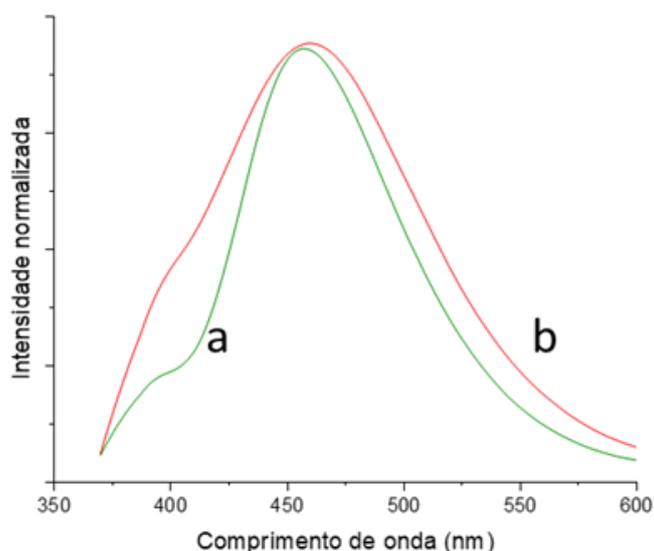


Figura 16: Perfis espectrais fotoluminescentes normalizados (banda de emissão) dos (a) GQDs-Água com excitação em 330 nm e (b) GQDs-NaOH com excitação em 330 nm.

4.2.3. Influência no preparo dos pontos quânticos de grafeno a partir da mistura de glutathiona e ácido cítrico

As dispersões de GQDs-GSH, preparadas misturas de glutathiona e ácido cítrico, foram comparadas em função das características fotoluminescentes em variando a proporção relativa entre os compostos precursores. Vale lembrar que para esta comparação, apenas uma temperatura final da chapa foi usada (300 °C). Em termos do perfil espectral, os comprimentos de onda máximos não variaram significativamente em função da proporção dos precursores (Tabela 12), com exceção da mistura contendo maior proporção de glutathiona em relação ao ácido cítrico (2 para 1), que teve máximo com pequeno deslocamento batocrômico (da ordem de 4 nm). Ainda em relação ao perfil do espectro, notou-se, assim como no estudo preliminar já mencionado, que a emissão dos GQDs-GSH tem perfil mais fino e com máximo deslocado para o azul (em trono de 30 nm) em relação aos perfis de emissão das dispersões de GQDs-Água, o que pode ser visto na Figura 17, que ilustra tais diferenças em espectros normalizados.

Tabela 12: Relação proporção GSH-Ácido cítrico e comprimento de onda de emissão máxima das dispersões de GQDs-GSH.

Proporção molar glutaciona/ácido cítrico	Comprimento de onda máximo da banda de emissão (nm)
1:5	423
1:4	424
1:3	424
1:2	424
1:1	425
2:1	428

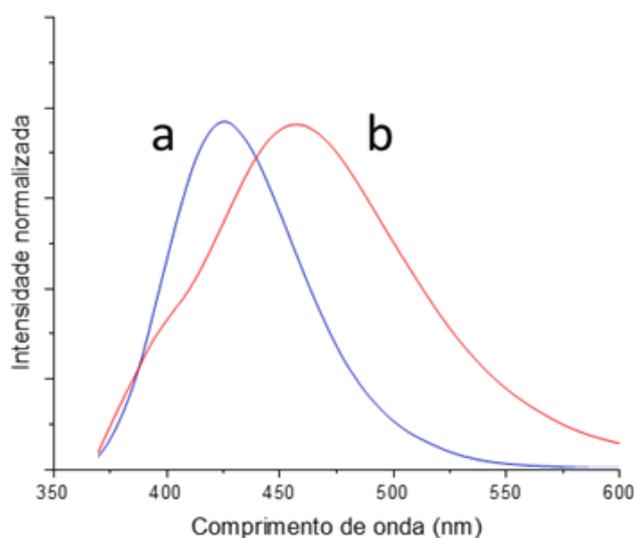


Figura 17: Comparação entre os perfis espectrais normalizados típicos do (a) GQDs-GSH em relação ao do (b) GQDs-Água.

Em termos da magnitude da fotoluminescência, as dispersões de GQDs-GSH produziram intensidades aproximadamente duas vezes mais intensas quando comparadas com as dispersões não funcionalizadas, embora tenham sido utilizadas quantidades menores de ácido cítrico para a sua produção. Em relação às diferentes proporções glutaciona-ácido ascórbico não houve mudanças drásticas nas intensidades produzidas, como pode ser observado nos espectros da Figura 18. A diferença entre a dispersão que produziu menor intensidade (glutaciona: ácido cítrico 1:5) e a maior intensidade (glutaciona: ácido cítrico 1:3) foi de 25% e não

indicou qualquer tendência em relação à mudança de proporção dos precursores e dentro do desvio-padrão do experimento. Isso pode indicar uma variação aleatória função da variabilidade de fatores não controlados do processo (tempo exato de preparo das amostras, homogeneização, temperatura do ambiente de medida).

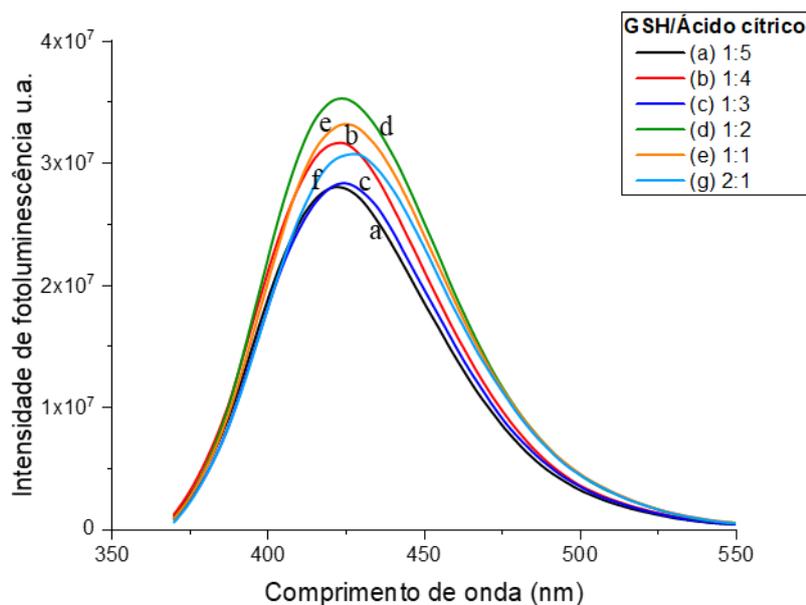


Figura 18: Bandas de emissão fotoluminescente das dispersões preparadas com diferentes proporções molares glutatona: ácido cítrico.

Para avaliar essa questão da variação não controlada, uma segunda partida de cada uma das dispersões foi preparada (L2) e que quando comparada com a luminescência das dispersões da primeira partida (L1) mostrou, primeiramente intensidades fotoluminescentes um pouco menores e outra ordem relativa de intensidades com agrupamentos de dispersões estatisticamente diferentes (Figura 19). Esse experimento duplicado (L1 e L2) mostrou novamente que a interrupção do processo de queima baseado na coloração pode implicar em diferenças no resultado, no caso em termos de intensidade. Esse fato pode ser evidenciado na Figura 0, que mostra imagens das misturas fundidas, dos experimentos L1 e L2, no momento da interrupção do aquecimento. Observou-se uma diferença de coloração entre o primeiro e o segundo lote de material carbonizado e apesar de certa uniformidade no tom entre as amostras do mesmo lote, o do L1 apresentou uma

coloração mais marrom-avermelhada, se comparado ao do L2, o que poderia justificar uma resposta fotoluminescente mais intensa das dispersões de L1 se comparado aos da L2. Ou seja, aparentemente o material mais carbonizado produziu luminescência um pouco mais intensas.

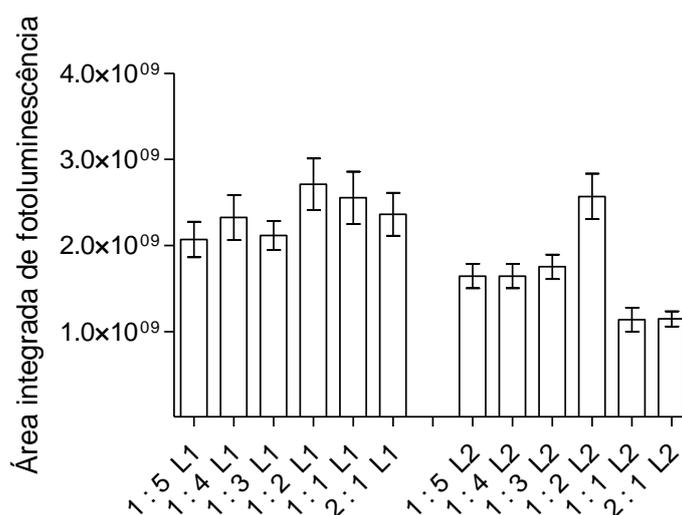


Figura 19: Comparação entre as respostas fotoluminescentes dos dois lotes de dispersões de GQDs-GSH produzidas nas diferentes proporções molares de glutatona/ácido ascórbico.

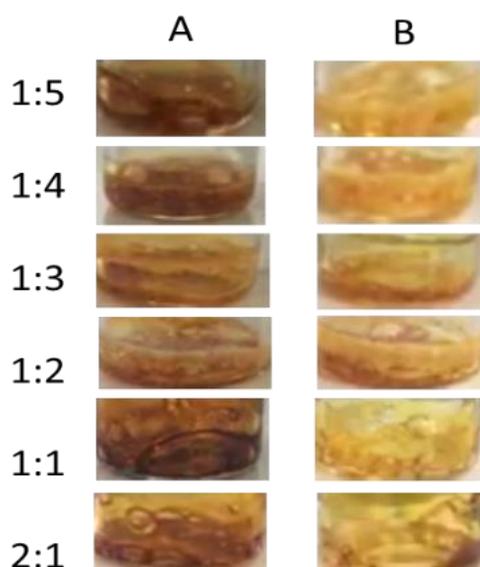


Figura 20: Coloração do material fundido no momento da interrupção do aquecimento e adição de água no preparo das dispersões de dois lotes, L1 (A) e L2 (B), de GQDs-GSH variando as proporções glutatona: ácido cítrico de 1:5 até 2:1.

4.3. Efeito do Fe^{3+} na supressão do sinal dos GQDs-GSH

A partir dos resultados observados na etapa de estudos dos parâmetros que influenciavam a produção dos pontos quânticos de grafeno e a fotoluminescência emitida pelas dispersões, escolheu-se continuar o trabalho com as dispersões de GQDs-GSH. O motivo da escolha foi a maior intensidade e estabilidade do perfil espectral em função de variações na sua produção. Adicionalmente, como o trabalho irá focar no desenvolvimento de sonda do tipo desliga/liga (*off/on*), é conhecido que esse tipo de ponto quântico funcionalizado (pela adição de glutathione na mistura fundida) é sensível à supressão por Fe^{3+} que, por sua vez, faz a mediação do ponto quântico luminescente com espécies químicas (analitos) em solução.²⁸

Afim de avaliar a interação entre os GQDs-GSH, em dispersão, com Fe^{3+} foi feito um estudo avaliando o efeito do aumento incremental da concentração desse íon metálico. Existem já na literatura estudos com CQDs que visaram compreender a interação desses nanomateriais com diversos íons metálicos. Em um estudo feito por Zhang e colaboradores,³⁷ CQDs foram misturados com diferentes íons metálicos que influenciaram diferentemente as respostas fotoluminescentes dos CQDs. No estudo, Fe^{3+} se destacou dentre os demais, apresentando maior sensibilidade e seletividade na interação e causando supressão de luminescência.³⁷ Liu e colaboradores²⁸ utilizaram o Fe^{3+} com um mediador na abordagem *off-on* da fotoluminescência dos GQDs-GSH para a quantificação de fosfatos em soro sanguíneo. Em outro trabalho mais recente, Toloza et al.³⁰ comparou o efeito de Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} e Eu^{3+} na fotoluminescência de GQDs (modificados pelo uso da glutathione no momento da produção) Constatou-se que Fe^{3+} era o íon supressor mais eficiente dos testados e que essa supressão era advinda de formação de complexo de transferência de carga em que Fe^{3+} , ligados aos grupos amino na estrutura do GQDs, subtraem elétrons do par elétron-vacância, impedindo o recombinação excitônica com emissão de fóton.³⁰

Para o estudo, uma alíquota da dispersão de GQDs-GSH foi diluída em água (diluição da dispersão original de GQDs-GSH após uma diluição intermediária antes da diluição final para obter a dispersão de trabalho) até o ponto em que a luminescência medida tivesse intensidade próxima a escala máxima do instrumento

(em torno de 80% a 90% do sinal máximo antes da saturação do detector. Em seguida, dispersões diluídas de GQDs-GSH foram adicionadas de alíquotas incrementais de solução aquosa de Fe^{3+} (microvolumes para não afetar significativamente o volume final da dispersão no balão de 10,00 mL) a fim de avaliar o efeito de supressão da fotoluminescência original da dispersão diluída de GQDs-GSH. Primeiramente o estudo foi realizado em pH original da dispersão diluída (pH 5,00) e posteriormente em dispersão com pH ajustado para 3,00 (pela adição de ácido clorídrico). As concentrações finais de Fe^{3+} nas dispersões de GQDs foi variada entre $1,0 \times 10^{-5}$ e $2,6 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} .

Na Figura 21 são mostrados os espectros da fotoluminescência das dispersões de na presença de Fe^{3+} em que a formação do GQDs-GSH- Fe^{3+} causam supressão de sinal. Ambas com adição de 240,0 μL da dispersão intermediária contendo os GQDs. Podemos observar na Figura 21 A, a supressão do sinal dos GQDs-GSH em pH 5,00 com presença de Fe^{3+} na solução. Além disso, com o aumento da concentração de Fe^{3+} houve um deslocamento de 5 nm no $\lambda_{\text{emissão}}$ em direção da região do vermelho, variando de 425 nm na ausência de supressor para 430 nm na presença de maior concentração de Fe^{3+} . Na Figura 21 B, observa-se a supressão do sinal sofrida pelos GQDs-GSH em pH 3. Nesse caso, não ocorreu deslocamento batocrômico, apresentando aspectos sinais mais simétricos, quando comparados aos sinais obtidos em pH 5.

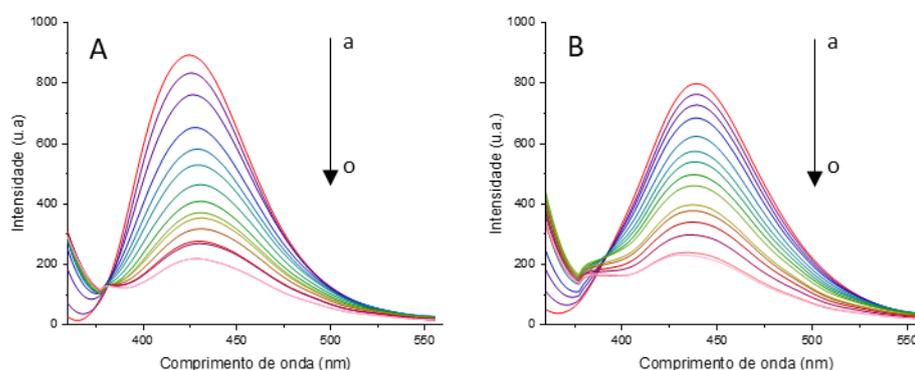


Figura 21: Espectros de fotoluminescência dos GQDs-GSH preparados com glutatona/ácido cítrico na proporção de 1:5. A) dispersão em pH 5,00; B) dispersão em pH 3,00. Adições de Fe^{3+} (a) 0 mol L^{-1} ; (b) $1,0 \times 10^{-5}$; (c) $2,0 \times 10^{-5}$; (d) $4,0 \times 10^{-5}$; (e) $6,0 \times 10^{-5}$; (f) $8,0 \times 10^{-5}$; (g) $1,0 \times 10^{-4}$; (h) $1,2 \times 10^{-4}$; (i) $1,4 \times 10^{-4}$; (j) $1,6 \times 10^{-4}$; (k) $1,8 \times 10^{-4}$; (l) $2,0 \times 10^{-4}$; (m) $2,2 \times 10^{-4}$; (n) $2,4 \times 10^{-4}$; (o) $2,6 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} .

O perfil normalizado de supressão, que é essencialmente do tipo estático (com supressão após ligação entre luminóforo e supressor) foi ajustado com um modelo similar ao da supressão dinâmica (Stern-Volmer) usando a razão entre o sinal original da dispersão e os sinais medidos após supressão (L_0/L). Observou-se melhor ajuste linear em pH 3,00 ($R^2 = 0,9565$) do que em pH 5 ($R^2 = 0,9358$) mas as constantes de ligação (K_s) foram similares.

Ademais, o deslocamento batocrômico na medida em que a concentração de Fe^{3+} aumentava na dispersão em pH 5,00 indicou que, nessa condição, o Fe^{3+} está tendo preferência em se ligar na fração menor de nanopartículas (que emitem mais para o azul) em detrimento da fração maior que emite mais para o vermelho. Já com pH 3,00, tal deslocamento não foi observado indicando que esse pH pode estar uniformizando o tamanho hidrodinâmico das nanopartículas ou alterando a carga superficial a ponto de tornar irrelevante a questão do tamanho da nanopartícula na interação com o Fe^{3+} .

Com base nisso e pelo fato do Fe^{3+} livre ser mais estável em pH mais ácido, embora tenha sido provado que o Fe^{3+} é estabilizado, mesmo em pH 4,00 na presença de GQDs,³⁰ o pH 3,00 foi escolhido para a continuidade do trabalho, comparando agora o efeito da supressão por Fe^{3+} nas dispersões preparadas com GQDs-GSH produzidos a partir de glutatona: ácido cítrico nas proporções de 1:3 e 1:1. Vale salientar que ao se ajustar o pH para 3 percebeu-se uma pequena diminuição da fotoluminescência (na ausência do agente supressor) medida da dispersão diluída (preparada com proporção 1:5 dos precursores) como pode ser notada na comparação entre as Figura 21 A e 21 B. Por conta disso, a alíquota da dispersão original de GQDs-GSH foi aumentada (para cerca de 300 μ L de uma dispersão de diluição intermediária) para que se obtivesse uma fotoluminescência inicial, na dispersão diluída, perto de 900 unidades arbitrárias. Em comparação, para as dispersões diluídas preparadas com dispersão original obtidas nas proporções 1:3 e 1:1 dos precursores, um volume respectivamente de 140 μ L e 160 μ L das devidas dispersões intermediárias foram suficientes para se obter sinais iniciais próximos de 900 unidades arbitrárias. As concentrações finais de Fe^{3+} utilizadas, nestes casos, foram variaram entre $1,0 \times 10^{-5}$ e $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

Na Figura 22 são mostrados a sequência de espectros e o perfil normalizado (L_0/L versus concentração de Fe^{3+}) de supressão da fotoluminescência em pH 3,00, na nova faixa concentração expandida de Fe^{3+} (com $R^2 = 0,9565$).

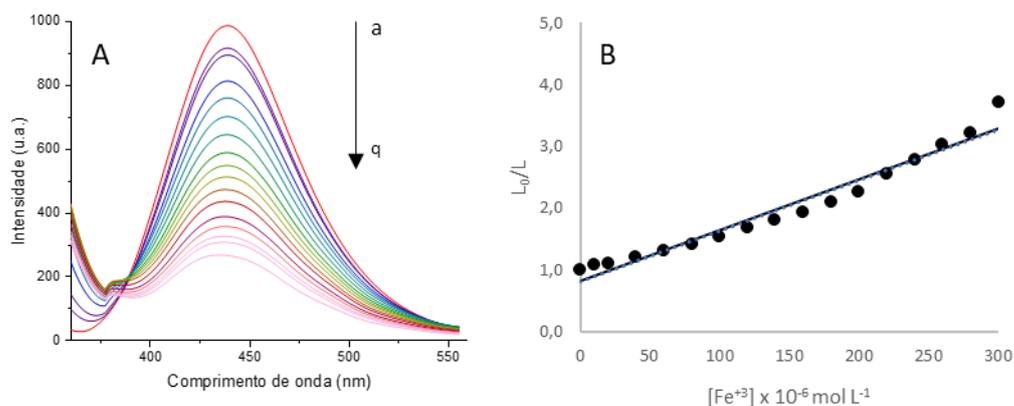


Figura 22: A) Resposta espectral fotoluminescente dos GQDs-GSH na proporção 1:5 em pH 3,00 com adições de Fe^{3+} de (a) 0 mol L^{-1} ; (b) $1,0 \times 10^{-5}$; (c) $2,0 \times 10^{-5}$; (d) $4,0 \times 10^{-5}$; (e) $6,0 \times 10^{-5}$; (f) $8,0 \times 10^{-5}$; (g) $1,0 \times 10^{-4}$; (h) $1,2 \times 10^{-4}$; (i) $1,4 \times 10^{-4}$; (j) $1,6 \times 10^{-4}$; (k) $1,8 \times 10^{-4}$; (l) $2,0 \times 10^{-4}$; (m) $2,2 \times 10^{-4}$; (n) $2,4 \times 10^{-4}$; (o) $2,6 \times 10^{-4}$; (p) $2,8 \times 10^{-4}$; (q) $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. B) Curva normalizada.

Ao se analisar o perfil obtido com as dispersões de trabalho, preparadas a partir das proporções de precursores de 1:3 e 1:1, foi observado o mesmo padrão de resposta espectral, com máximo de intensidade de sinal fotoluminescente estável em 440 nm, como mostrado na Figura 23. A partir das curvas que correlacionam a supressão do sinal (expressa por L_0/L) e a concentração de Fe^{3+} , os ajustes também se apresentaram lineares na faixa de concentração de Fe^{3+} estudada, com valores de R^2 de 0,9487 e 0,9908 respectivamente.

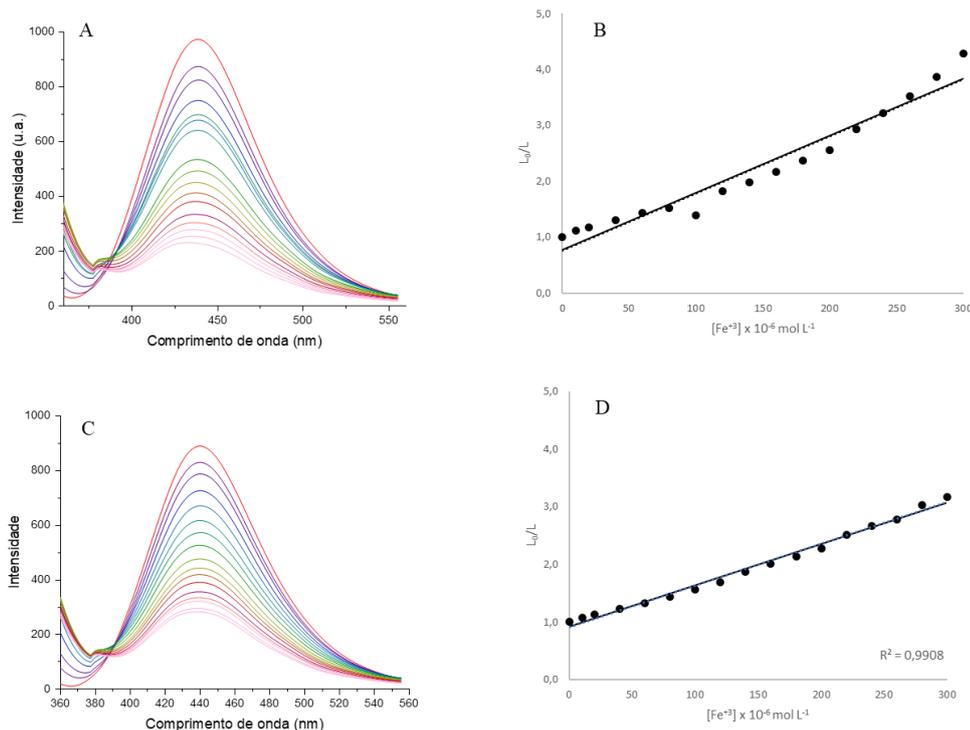


Figura 23: Resposta espectral fotoluminescente dos GQDs-GSH em pH 3,00, com adições de Fe^{3+} de (a) 0 mol L^{-1} ; (b) $1,0 \times 10^{-5}$; (c) $2,0 \times 10^{-5}$; (d) $4,0 \times 10^{-5}$; (e) $6,0 \times 10^{-5}$; (f) $8,0 \times 10^{-5}$; (g) $1,0 \times 10^{-4}$; (h) $1,2 \times 10^{-4}$; (i) $1,4 \times 10^{-4}$; (j) $1,6 \times 10^{-4}$; (k) $1,8 \times 10^{-4}$; (l) $2,0 \times 10^{-4}$; (m) $2,2 \times 10^{-4}$; (n) $2,4 \times 10^{-4}$; (o) $2,6 \times 10^{-4}$; (p) $2,8 \times 10^{-4}$; (q) $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Sendo A) dispersão de trabalho de GQDs-GSH preparada na proporção de precursores 1:3 B) Curva normalizada de A; C) dispersão de trabalho GQDs-GSH na proporção de precursores 1:1; D) Curva normalizada de C.

4.4. Avaliação da cinética de formação do GQDs-GSH- Fe^{3+}

Buscando condições experimentais que permitissem uma resposta fotoluminescente intensa e estável, diversos parâmetros experimentais foram estudados. Além da concentração do agente supressor, no caso o Fe^{3+} , a cinética da reação com os GQDs-GSH também foi avaliada.

Partindo dos resultados obtidos no estudo com diferentes concentrações de Fe^{3+} , quatro concentrações ($1,0 \times 10^{-5}$, $4,0 \times 10^{-5}$, $8,0 \times 10^{-5}$ e $1,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) foram escolhidas e testadas com as dispersões de trabalho produzidas a partir das dispersões originais obtidas com três diferentes proporções de precursores (1:1; 1:3 e 1:5).

Na Figura 24, tem-se resultados de um primeiro experimento (usando dispersões de trabalho feitas a partir da original feita com proporções de precursores

1:5) em que os perfis espectrais foram obtidos após adição das diferentes concentrações e monitoradas logo após e de 5 em 5 min até 30 min após a adição de cada concentração de Fe^{3+} . Os espectros estão agrupados em cores, sendo amarelo o espectro original sem adição de Fe^{3+} seguido dos grupos de espectros azul (Fe^{3+} a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), verde (Fe^{3+} a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), magenta (Fe^{3+} a $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e vermelho. (Fe^{3+} a $1,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).

A comparação também foi feita para dispersões de trabalho com pH ajustado para 3,00 e para as dispersões de trabalho com pH não ajustado (pH 5,00) e verificou-se que a queda de sinal mais efetiva ocorre no intervalo de 10 min e tende a reduzir até estabilizar, no caso das dispersões em pH 3,00 (o grupo de espectros de uma cor tentem a se concentrar numa intensidade). Em contraste, para a dispersão em pH 5,00, os espaçamentos entre espectros de um mesmo grupo de cor continuam grandes mesmo quando se chega ao limite de tempo do monitoramento do experimento. O resultado indicou que em pH 3,00 tende a haver uma estabilização mais rápida do sinal, decorrente da interação do GQDs-GSH com Fe^{3+} .

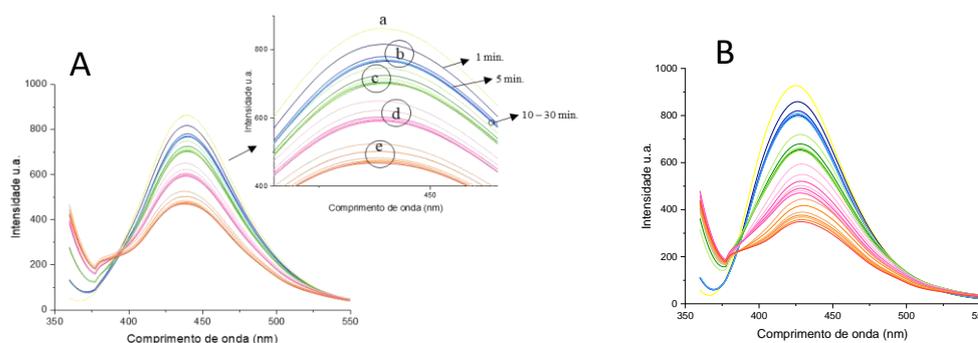


Figura 24: Resposta espectral fotoluminescente dos GQDs-GSH 1:5, com adições de Fe^{3+} de (a) 0 mol L^{-1} (amarelo) (b) $1,0 \times 10^{-5}$ (azul); (c) $2,0 \times 10^{-5}$ (verde); (d) $8,0 \times 10^{-5}$ (magenta); (e) $1,4 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} (vermelho) A) em pH 3,00; B) em pH 5,00. Espectros de cada grupo obtidos em 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min após a adição de Fe^{3+} .

Com o objetivo de avaliar de forma mais efetiva a interação do Fe^{3+} com os GQDs-GSH, nesse caso usando dispersões de trabalho em pH 3,00 e feitas a partir das diferentes proporções de precursores, foram feitas medidas de fotoluminescência no modo cinético do instrumento (monitoração contínua) com par $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ fixos em 347/425 nm. Assim sendo, após a adição de 10,0 μL de Fe^{3+} ,

e avolumação final para 10,00 mL, a dispersão foi transferida para a cubeta para ser analisada sob agitação. O tempo de medição contínua foi de 6 min. Os perfis de respostas podem ser vistos na Figura 25.

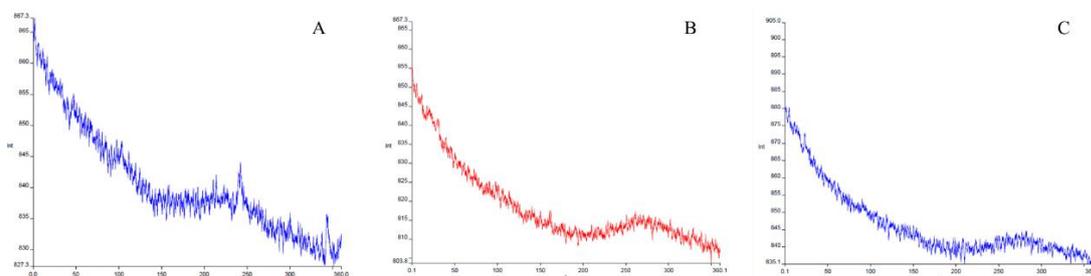


Figura 25: Perfis de resposta medidos em modo cinético para amostras de GQDs-GSH na presença de Fe^{3+} (concentração final de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) onde temos em A: GQDs-GSH 1:5, B: GQDs-GSH 1:3 e C: GQDs-GSH 1:1.

Verificou-se um perfil de queda de significativa até que se atingisse um patamar perto de 180 s (3 min.) havendo a partir desse tempo uma oscilação aparentemente que se repetiu em padrão para os três experimentos. Ao se fazer amostragens do sinal antes da adição do Fe^{3+} (L_0) e nos pontos L_t onde $t = 30, 60, 90, 120$ e 150 min pode-se esboçar um gráfico de L_0/L_t em função do tempo que se aproxima de um perfil de cinética de pseudo-primeira ordem (Figura 26) já que foi possível ajustar uma reta com valor de R^2 de 0,9469. A pseudo-primeira ordem foi considerada por conta da quantidade de pontos quânticos seja significativamente maior (pelo valor do TOC esperado) do que a quantidade de Fe^{3+} adicionada. Porém a curvatura do perfil (não ajustado) pode indicar que existe uma contribuição dos GQDs-GSH na cinética.

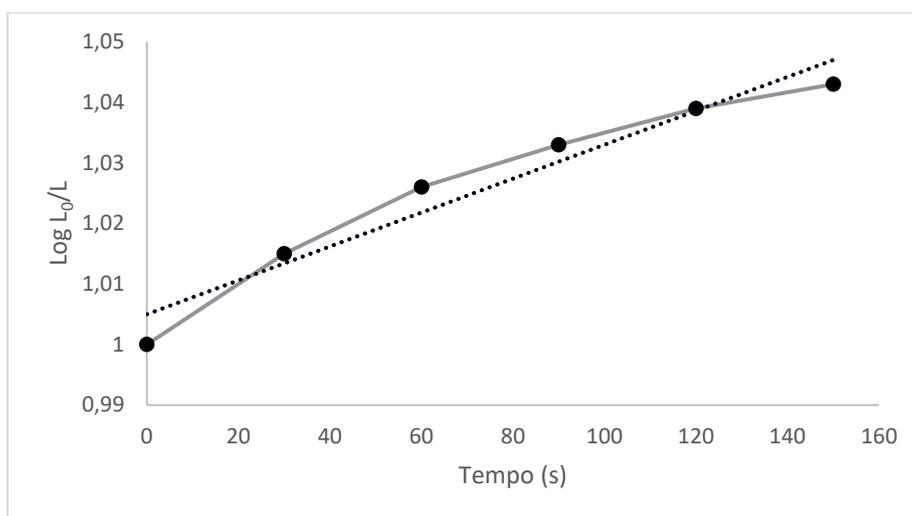


Figura 26: Avaliação do comportamento cinético usando as razões entre o sinal original (L_0) da dispersão de trabalho de GQDs-GSH (feitas a partir de dispersões originais preparadas com proporção 1:1 de precursores) e o sinal medido após adição de Fe^{3+} (concentração final de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em 30, 60, 90, 120, 150 min. R^2 do ajuste de 0,9469.

O experimento foi também feito em ordem reversa, ou seja, adicionou-se uma alíquota de GQDs-GSH numa solução de Fe^{3+} ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Para se obter um perfil qualitativo do efeito, o experimento foi realizado apenas com a dispersão original feita com proporção de precursores de 1:1, e adição de alíquota de $70 \mu\text{L}$ da dispersão original na cubeta onde se tinha 3 mL de solução aquosa de Fe^{3+} (em pH 3,00). A medição foi feita no modo cinético do instrumento e sob agitação constante, por 6 min.

Como pôde se observar, na Figura 27, após a adição das nanopartículas ocorreu um aumento rápido no sinal até atingir a sua intensidade máxima (alcançado em torno dos 30 s após a adição). A partir desse tempo, o sinal começou a perder intensidade, praticamente alcançando a estabilidade a partir dos 100 s. Nesse intervalo a queda de sinal teve perfil exponencial.

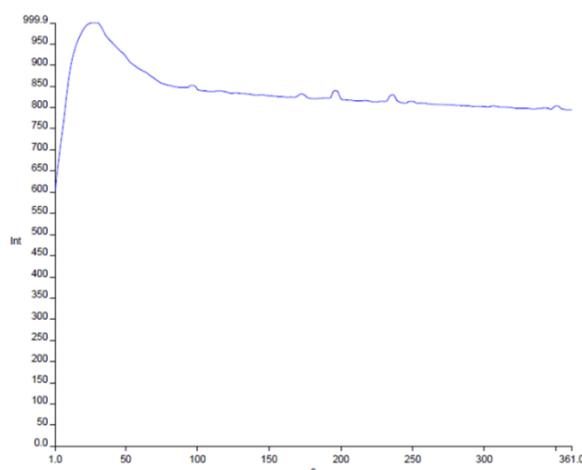


Figura 27: Perfil de resposta do teste cinético para adições de 70 μL da dispersão original de GQDs-GSH em cubeta contendo 3 mL de solução Fe^{3+} ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).

A partir desses dados, concluiu-se que era preciso estabelecer um tempo e uma ordem definida para usar esse sistema como sonda analítica de GQDs-GSH- Fe^{3+} já que havia variação de sinal até a estabilização. Ou seja, as dispersões de trabalho, contendo Fe^{3+} , que seriam usadas como sonda analítica (nesse caso no modo *off*) deveriam ser usadas apenas após 30 minutos da preparação de modo a se ter um sinal estável como visto no experimento com as dispersões preparadas em pH 3,00. Dessa forma se consegue minimizar variações de sinal que contribuiriam significativamente na variabilidade de um resultado analítico para sondas do tipo *off/on*.

4.5. Uso das dispersões de GQDs-GSH- Fe^{3+} como sonda analítica *off/on* de ácido ascórbico.

4.5.1. Estudo para detecção de ácido ascórbico

A partir das condições previamente estabelecidas para o desligamento da luminescência dos GQDs-GSH pelo Fe^{3+} , foi feito um estudo de aplicação como sonda usando o ácido ascórbico como analito modelo. Um estudo preliminar foi realizado utilizando uma dispersão de trabalho preparada com alíquota da dispersão original de GQDs-GSH preparados com proporção de precursores de 1:5 e com HCl

para ajustar o pH para 3,00. O desligamento da dispersão foi feito com adição de uma alíquota de solução Fe^{3+} (concentração de $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), formando o complexo GQDs-GSH-Fe^{3+} . Após 1 min dessa adição, uma alíquota de solução de ácido ascórbico ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi colocada e o volume do balão volumétrico ajustado para 10,00 mL. Em seguida a solução foi transferida para a cubeta para medição.

Como se pode ver na Figura 28, após o *quenching* causado pela adição da alíquota do íon metálico, foi possível retomar o sinal fotoluminescente (efeito *on*) com adições crescentes de ácido ascórbico que, nesse caso, foram variadas de 100,0 a 1000,0 μL . A recuperação do sinal não foi acompanhada por deslocamento algum no comprimento de onda máximo de emissão. A recuperação de sinal foi provavelmente devido ao fato de o ácido ascórbico ser um ligante mais forte que o GQDs-GSH , com isso retirando Fe^{3+} da superfície do ponto quântico, com isso, restaurando a luminescência.

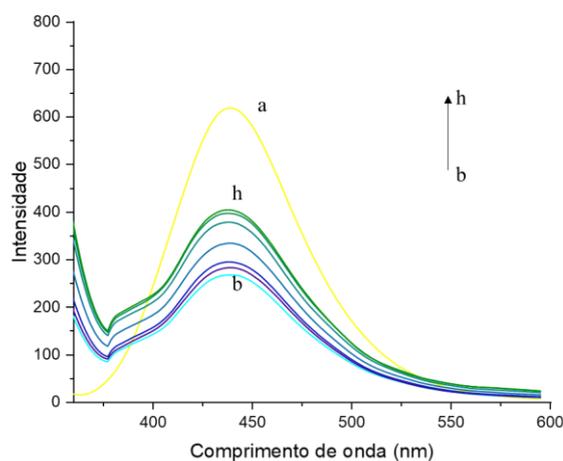


Figura 28: Resposta fotoluminescente da interação entre GQDs-GSH-Fe^{3+} com ácido ascórbico, onde: a) dispersão de trabalho de GQDs-GSH (preparada com precursores na proporção de 1:5); b) GQDs-GSH-Fe^{3+} , e dispersões de GQDs-GSH-Fe^{3+} seguidas de adições de ácido ascórbico, sendo c) 100 μL , d) 200 μL , e) 400 μL , f) 600 μL , g) 800 μL e h) 1000 μL da solução estoque à $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Baseado na resposta positiva da interação da sonda GQDs-GSH-Fe^{3+} com o ácido ascórbico foi feito um teste para avaliar a estabilidade da resposta analítica produzida pelo ácido ascórbico já que é notório que esse composto é facilmente oxidado, mesmo em solução aquosa. O experimento foi feito medindo o sinal, em

tempos específicos, após adição do analito na cubeta sob agitação magnética. Para tal, foram utilizados 200 μL da dispersão original de GQDs-GSH 1:5 adicionados diretamente na cubeta contendo 3,00 mL de solução de Fe^{3+} a $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Após repouso, 400 μL de solução de ácido ascórbico $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi adicionada e a medição iniciada com varreduras a cada 1 min. Como se pode observar na Figura 29, após a adição do ácido ascórbico, o sinal luminescente recuperado volta a diminuir paulatinamente por conta da sua oxidação no ambiente que contém GQDs-GSH. Os espectros feitos com intervalos de 1 min corroboram esse comportamento, com diminuição (desligamento) contínuo da fotoluminescência previamente recuperada (com a ligação da sonda). Essa diminuição, em alguns experimentos, foi continuada até se obter o sinal original da sonda desligada. Em outros, essa queda estabilizou num patamar mais acima do da sonda desligada com Fe^{3+} . Provavelmente, após oxidar no meio aquoso o Fe^{3+} é novamente liberado para recombinar com o GQDs-GSH, desligando, paulatinamente a sonda.

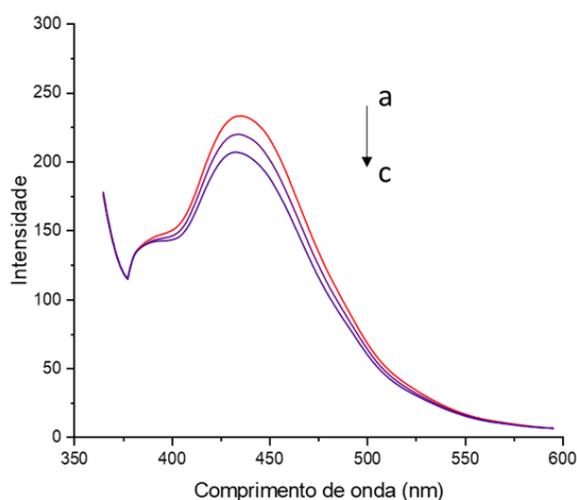


Figura 29: Interação entre GQDs-GSH- Fe^{3+} e ácido ascórbico acompanhado por varreduras do espectro de emissão da dispersão em intervalos de tempo após a adição do ácido ascórbico, onde a) 1 min., b) 2 min. e c) 3 min.

Dessa forma, estabeleceu-se que as medições de sinal seriam feitas no tempo de até 1 min após a adição do ácido ascórbico, para minimizar o efeito da variação

de sinal medido na sonda em função da oxidação do analito. Esse tipo de situação é facilmente resolvido em sistemas automatizados de análise em fluxo, em que se consegue repetibilidade temporal na medição de sinal. Porém, nesse trabalho, como essa variação ocorre na escala de tempo não muito curta, tentou-se reproduzir bons resultados em batelada com o controle do tempo em que medição foi feita.

4.5.2. Avaliando a influência na concentração de ferro na detecção de ácido ascórbico

Buscando a melhor condição para a quantificação de ácido ascórbico com a sonda de GQDs-GSH-Fe³⁺, avaliou-se a proporção ideal entre as concentrações do analito e íon Fe³⁺. Primeiramente, a concentração final de ácido ascórbico adicionada à dispersão foi fixada em $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, no caso dispersões feitas com GQDs-GSH (preparadas com precursores na proporção 1:5; 1:3 e 1:1) com pH 3,00. Após 1 min da adição de ácido ascórbico, alíquota de solução de Fe³⁺ foi adicionada de tal modo que o experimento fosse feito com diferentes concentrações finais de Fe³⁺, sendo elas, $2,0 \times 10^{-4}$, $4,0 \times 10^{-4}$ e $6,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. O experimento foi repetido com dispersão de GQDs-GSH na ausência de ácido ascórbico. Assim sendo, para cada experimento feito com concentração de Fe³⁺ se teve um par de espectros, sendo o menos intenso o sem ácido ascórbico e o mais intenso o com ácido ascórbico. Os resultados são mostrados na Figura 30.

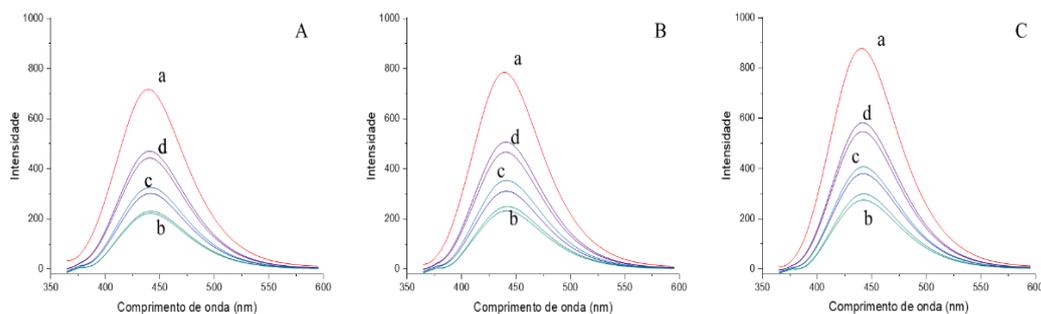


Figura 30: Perfil espectral de resposta da interação do ácido ascórbico com GQDs-GSH pela mediação de diferentes concentrações de Fe³⁺. As dispersões de trabalho foram preparadas a partir de dispersões originais feitas nas proporções de precursores de: A) 1:5; B) 1:3 e C) 1:1. Em todos os casos: a) sinal original da dispersão de GQDs-GSH com e sem ácido ascórbico a 1×10^{-5} mol L⁻¹; para cada concentração de Fe³⁺ b) 6×10^{-4} mol L⁻¹, c) 4×10^{-4} mol L⁻¹ e d) 2×10^{-4} mol L⁻¹ sendo o

espectro mais intenso na presença de ácido ascórbico e o menos intenso na ausência de ácido ascórbico. Medições feitas até 1 min após a adição de Fe^{3+} .

Observou-se, em todos os casos, que apesar dos diferentes tipos de GQDs-GSH presentes nas dispersões, o perfil de resposta foi muito semelhante. A adição da maior concentração de Fe^{3+} resultou num sinal, na presença do analito, muito próximo do sinal sem adição do analito. Dessa forma, o teste mostrou que há uma diferenciação nítida de intensidade na presença de ácido ascórbico, sendo melhor nas concentrações de Fe^{3+} de 4×10^{-4} e 6×10^{-4} mol L^{-1} .

O teste foi repetido utilizando as concentrações de 4×10^{-4} e 6×10^{-4} mol L^{-1} de Fe^{3+} , porém dessa vez, fazendo adições de diferentes volumes de ácido ascórbico (100, 200 e 300 μL da solução estoque à $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}), visando avaliar qual concentração do íon metálico teria uma melhor resposta linear na quantificação do analito em questão. O perfil espectral obtido para todas as dispersões (preparadas a partir de diferentes proporções dos GQDs-GSH) se mostraram semelhantes. Sendo assim, os resultados obtidos para a dispersão de trabalho feita com a dispersão original com proporção precursores igual a 1:5 foi escolhida como exemplo para ilustrar o efeito. Como podemos observar na Figura 31 B, a inclinação da reta nos indica que utilizando a menor concentração do íon Fe^{3+} , 4×10^{-4} mol, obtivemos uma melhor sensibilidade para concentrações baixas de ácido ascórbico. Na Figura 31 A, temos o perfil espectral que corresponde a curva com melhor resposta, no caso 4×10^{-4} mol de Fe^{3+} .

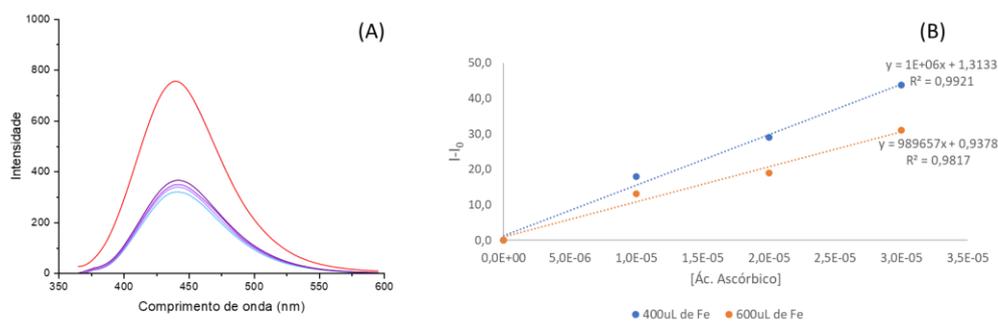


Figura 31: Resposta da avaliação da interação de diferentes concentrações de analito com os GQDs-GSH mediados por Fe^{3+} . Em (A) perfil espectral de resposta para adição de 400 μL de ferro. Em (B) Curva obtida para as duas concentrações de ferro utilizadas.

Como dito, foram utilizadas as dispersões de trabalho feitas a partir das diferentes proporções de precursores. Em todos os casos, a curva que apresentou melhor sensibilidade foi a que utilizou concentração igual a $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de Fe^{3+} como mediador. Nessa concentração foi possível obter uma boa supressão (desligamento) do sinal dos GQDs-GSH, bem como uma boa diferenciação entre as concentrações de analito utilizadas.

4.5.3. Curvas analíticas para quantificação de ácido ascórbico

Tendo todos parâmetros estudados e definidos foram feitas curvas analíticas utilizando as dispersões de trabalho de GQDs-GSH, preparadas a partir das três dispersões originais obtidas com proporções de precursores de 1:5, 1:3 e 1:1. A concentração de Fe^{3+} foi fixada em $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, o pH ajustado para 3,00 e o tempo entre adição do analito e a medição da fotoluminescência fixado em 1 min. O intervalo de concentração de solução padrão de ácido ascórbico analisado foi de $5,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (concentrações finais na sonda). O volume total da sonda foi de 10,00 mL, sendo todas as curvas preparadas com três réplicas.

Nessa etapa, foi feita também uma comparação entre as respostas obtidas utilizando as dispersões preparadas em setembro/2020, dispersões essas que foram utilizadas ao longo de todo o estudo dessa sonda analítica, e novos lotes de dispersões preparadas em agosto/2021, seguindo o mesmo protocolo de preparo, e proporções molares.

Na Figura 32, tem-se um exemplo de perfil espectral de resposta característico da adição de ácido ascórbico na sonda GQDs-GSH- Fe^{3+} . As respostas obtidas foram linearizadas e comparadas como mostrado na Figura 33.

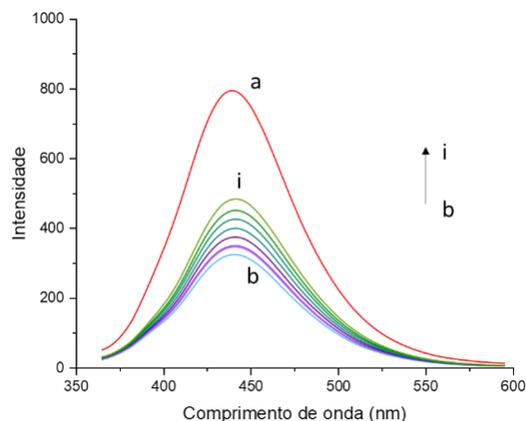


Figura 32: Perfil espectral de resposta característico da adição de diferentes concentrações de ácido ascórbico em sondas de GQDs-GSH-Fe³⁺. Sendo a) dispersão de trabalho de GQDs-GSH 1:5, b) dispersão de trabalho de GQDs-GSH 1:5 após adição de Fe³⁺ a $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Dispersões de GQDs-GSH-Fe³⁺ com adições crescentes de ácido ascórbico, onde c) $5,0 \times 10^{-6}$, d) $1,0 \times 10^{-5}$, e) $2,0 \times 10^{-5}$, f) $4,0 \times 10^{-5}$, g) $6,0 \times 10^{-5}$ h) $8,0 \times 10^{-5}$ e i) $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

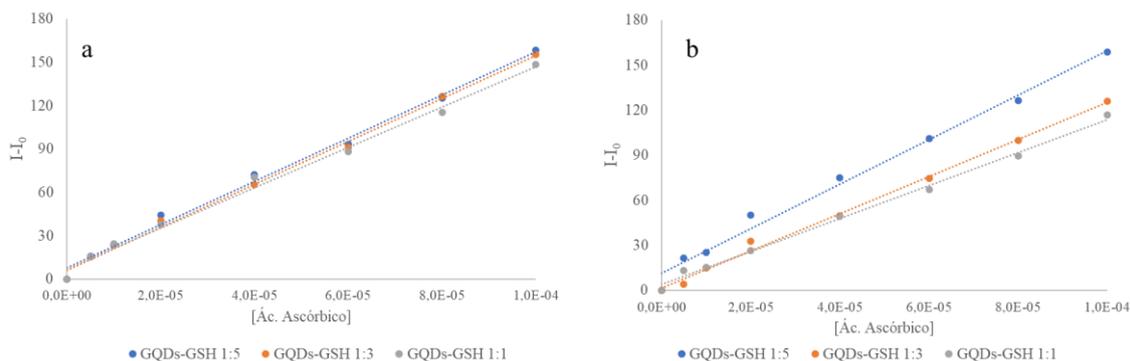


Figura 33: Respostas das curvas analíticas feitas para o ácido ascórbico utilizando dispersões de GQDs-GSH-Fe³⁺, sendo em a) GQDs-GSH feitas em de setembro de 2020. Em b) GQDs-GSH feitas em agosto de 2021. Nos dois conjuntos de respostas se tem as três proporções de precursores.

Pode-se observar que com as dispersões mais antigas (Figura 33 a), as curvas apresentaram comportamentos muito semelhantes, apesar das diferentes proporções de precursores usadas no preparo das dispersões originais. As respostas lineares obtidas para o ácido ascórbico (em termos de R^2) foram 0,9932; 0,9959 e 0,9922 para dispersões feitas com proporção de precursores de 1:5, 1:3 e 1:1, respectivamente. Avaliando as respostas obtidas com as dispersões feitas em agosto/2021 (Figura 33 b), obtém-se como resposta (em termos de R^2) com 0,9885; 0,9959 e 0,9956 para dispersões feitas com proporção de precursores de 1:5, 1:3 e 1:1. Para a dispersão preparada com proporção de precursores de 1:5, notou-se

sensibilidade parecida com os das dispersões mais antigas. Considerando que não houve um ganho na resposta analítica na quantificação de ácido ascórbico ao utilizar as dispersões com quantidades maiores de agente funcionalizante (glutaciona), estabeleceu-se que para a validação do método de quantificação do ácido ascórbico seria feita utilizando as dispersões de GQDs-GSH (tanto lote 2020 quanto 2021) na proporção 1:5 como sondas analíticas.

4.5.4. Validação do método de quantificação de ácido ascórbico utilizando GQDs-GSH-Fe³⁺ como sondas analíticas

De modo a avaliar o uso da dispersão de trabalho GQDs-GSH (dispersão diluída) como potencial sonda analítica, do tipo desliga/liga usando Fe³⁺ como mediador, na quantificação de ácido ascórbico, a análise de uma amostra real foi testada. Para tal usou-se dispersões de trabalho preparadas a partir dos dois lotes de dispersões originais de GQDs-GSH (GQDs-GSH 2020 e GQDs-GSH 2021) obtidas com proporções de precursores de 1:5. As análises foram realizadas em dois dias (com réplicas autênticas e usou-se um método baseado na cromatografia líquida (HPLC) para comparação de resultados.

Primeiramente, foram obtidas as curvas analíticas do método proposto usando as condições de sonda já definidas (Tabela 13) no intervalo de concentração final de ácido ascórbico de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (essa faixa de concentração também foi usada no método cromatográfico).

Tabela 13: Condições de preparo da sonda analítica.

Volume de GQDs-GSH	[Fe ³⁺] mol L ⁻¹	Volume de HCl 0,100 mol L ⁻¹	Tempo para medição	Volume final da sonda
200 µL	$4,0 \times 10^{-4}$	70,0 µL	30 min	10,00 mL

Os parâmetros da curva (equação da curva sensibilidade, coeficiente de determinação) são indicadas na Tabela 14. O limite de quantificação, considerando que este seria a concentração de ácido ascórbico necessária para produzir um sinal equivalente ao sinal da sonda desligada mais 10 vezes o desvio padrão da sonda

desligada ($L_{(GQDs-GSH-Fe^{3+})} + 10s_{L(GQDs-GSH-Fe^{3+})}$), também é mostrada na Tabela (para cada dia de experimento).

Tabela 14: Respostas lineares das curvas de ácido ascórbico utilizando GQDs-GSH-Fe³⁺

	Dia 1		Dia 2	
	GQDs-GSH 2020	GQDs-GSH 2021	GQDs-GSH 2020	GQDs-GSH 2021
Equação da curva	$Y = (1230000 \pm 64920) x + (13.02 \pm 3.648)$	$Y = (782100 \pm 49230) x + (12.65 \pm 2.766)$	$Y = (1738000 \pm 58160) x + (-1.224 \pm 3.268)$	$Y = (1407000 \pm 53890) x + (8.841 \pm 3.028)$
R ²	0,9498	0,9300	0,9792	0,9729
Sensibilidade, m	1230000	782100	1738000	1407000
Limite de Quantificação (mol L ⁻¹)	$2,85 \times 10^{-5}$	$1,74 \times 10^{-5}$	$4,93 \times 10^{-5}$	$5,45 \times 10^{-5}$

^aCalculada como a concentração de ácido ascórbico que produz um sinal de $L_{(GQDs-GSH-Fe^{3+})} + (10 \times s_{L(GQDs-GSH-Fe^{3+})})$ usando o valor médio da sonda desligada mais dez vezes o desvio-padrão desse sinal.

Como fonte de ácido ascórbico numa amostra real foi utilizada 1 caixa (do lote 34461 com validade de 03/2023) da formulação farmacêutica ViterC, Natulab (Brasil). A caixa continha 20 comprimidos de 500 mg de ácido ascórbico cada. Após a construção das curvas analíticas, procedeu-se a análise da amostra com adição de alíquota de 100,0 µL na sonda analítica desligada com Fe³⁺ (dispersão de GQDs-GSH-Fe³⁺) seguindo os protocolos estabelecidos na Tabela 15

Tabela 15: Protocolo de medição de sinal do ácido ascórbico.

Volume de amostra	[Fe ³⁺] mol L ⁻¹	Volume de HCl 0,1 mol L ⁻¹	Tempo entre para medição	Volume final da sonda
100 µL	$4,0 \times 10^{-4}$	70,0 µL	1 min	10,00 mL

Utilizando o método cromatográfico adaptado da literatura, obteve-se os cromatogramas mostrados, com diferentes concentrações de analito, na Figura 34, que mostra o pico de ácido ascórbico no tempo de retenção em 2,61 min. Como pode se observar, não existe nenhum outro sinal que interfira na detecção do analito.

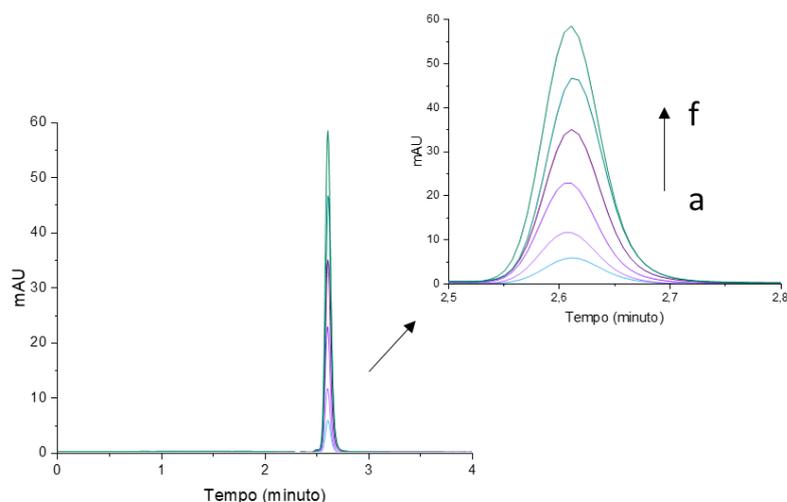


Figura 34: Cromatograma da curva analítica de padrão de ácido ascórbico, onde a) $1,0 \times 10^{-5}$, b) $2,0 \times 10^{-5}$, c) $4,0 \times 10^{-5}$, d) $6,0 \times 10^{-5}$, e) $8,0 \times 10^{-5}$ e f) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$

As condições de método cromatográfico podem ser vistas na Tabela 16 e os parâmetros de mérito do método cromatográfico adaptado estão relacionados na Tabela 17.

Tabela 16: Parâmetros de análise por HPLC

Fase móvel	Vazão	Temperatura	Volume de amostra
Água pH 2,5 e metanol 85/15% v/v	1 mL min^{-1}	$25 \text{ }^\circ\text{C}$	$20,0 \text{ }\mu\text{L}$

Tabela 17: Parâmetros de mérito do método cromatográfico.

	Dia 1	Dia 2
Equação da curva	$Y = (2152000 \pm 46660)x + (0.3253 \pm 2.621)$	$Y = (2359000 \pm 31030)x + (0.5282 \pm 1.743)$
R^2	0,9912	0,9967
Sensibilidade (m)	2152000	2359000

Nesse ponto vale salientar que a determinação de ácido ascórbico se mostrou desafiadora por conta da sua instabilidade nas condições de sonda. Uma série de análises foram realizadas e as recuperações, com o método da sonda analítica, foi muito afetada (em geral com valores aquém do desejável) pela oxidação do ácido

ascórbico, tornando difícil um controle na recuperação usando abordagem em batelada. No entanto, na medida em que se foi ajustando o procedimento conseguiu-se alguns resultados mais próximos aos obtidos com o método de referência. Na Tabela 18, as recuperações obtidas para a amostra (com base no valor indicado na bula) são mostradas onde uma das réplicas, no primeiro dia, apontou um erro de recuperação relativamente maior, provavelmente associado ao tempo da medição da amostra em relação ao dos padrões da curva. Em contraste, os resultados com o método cromatográfico foram muito repetitivos ao longo as análises indicando que a amostra teria de fato perto de 550 mg de ácido ascórbico.

Tabela 18: Comparação dos resultados de recuperação (n = 3) para ácido ascórbico utilizando dois lotes de GQDs-GSH como sondas analíticas e HPLC

	Fotoluminescência		HPLC
	GQDs-GSH 2020	GQDs-GSH 2021	
Dia 1			
R ²	0,9498	0,9300	0,9912
LOQ	2,85 x 10 ⁻⁵	1,74 x 10 ⁻⁵	1,21 x 10 ⁻⁵
L1 (g)	0,6087 ± 0,0695	0,8855 ± 0,0465	0,5478 ± 0,0494
Recuperação (%)	121,74 ± 13,90	177,10 ± 9,30	109,55 ± 9,87
(em relação à bula)	(608 mg)	(885 mg)	(548 mg)
Dia 2			
R ²	0,9792	0,9729	0,9967
LOQ	4,93 x 10 ⁻⁵	5,45 x 10 ⁻⁵	7,39 x 10 ⁻⁶
L1 (g)	0,4703 ± 0,0682	0,6167 ± 0,0237	0,5465 ± 0,0492
Recuperação (%)	94,06 ± 13,64	123,33 ± 4,74	109,30 ± 9,85
(em relação à bula)	(473 mg)	(617 mg)	(547 mg)
Valor de referência indicado pela bula = 500 mg de ácido ascórbico			

5. Conclusão

A robustez das condições do processo de produção dos GQDs, por fusão seguida por esfoliação, foi avaliada através da produção de diferentes dispersões dos nanomateriais, utilizando uma variação de parâmetros (massa de precursor, proporção de agente funcionalizante e temperatura) organizados por um planejamento experimental de corpo central. Dessa forma, foi possível avaliar um número maior de combinações de parâmetros em um menor número de experimentos. Foi possível observar que para dispersões de GQDs produzidas em água, com menores massas de ácido cítrico, produziram respostas luminescentes menores, em comparação com as produzidas com maiores massas. Dentre essas de menor massa, se destacou como a produzida em maior temperatura. Entre as de maiores massas, a resposta luminescente foi estatisticamente maior. Em contra partida, dispersões preparadas em meio básico, mesmo apresentando luminescência 4 vezes maior que as produzidas em água, não puderam ter as respostas luminescente diretamente relacionadas as quantidades de massa e as temperaturas. As dispersões de GQDs funcionalizadas com GSH foram produzidos com diferentes proporções de glutatona: ácido cítrico e em duplicata. Essas dispersões apresentaram luminescência intensa, com duas ordens de grandeza superior aos GQDs não funcionalizados. Nesse caso, foi observado os materiais que tiveram uma coloração mais escura no momento em que a queima foi interrompida, apresentaram luminescência mais intensa, indicando que aparentemente um material mais carbonizado pode produzir luminescência mais intensa. Ou seja, a escolha do fim do processo de aquecimento seria um fator crítico que não foi estudado.

O estudo de interação dos GQDs-GSH com Fe^{3+} tiveram bons resultados de supressão do sinal original em condições ajustadas e a qualidade da supressão pareceu ser dependente da concentração de Fe^{3+} e do pH do meio. Com base no desligamento de luminescência produzido pelo Fe^{3+} , testou-se o ácido ascórbico como agente de recuperação de sinal, sendo esse então fazendo o papel de analito

numa aplicação da sonda de GQDs-GSH-Fe³⁺. Porém, a instabilidade do ácido ascórbico no ambiente da sonda fez com que a recuperação de sinal perdesse intensidade ao longo do tempo, dificultado explorar esse efeito num método de análise em batelada para o ácido ascórbico. Os resultados obtidos com a análise de uma amostra real contendo ácido ascórbico apresentaram recuperações que melhoraram na medida que a prática do analista se aperfeiçoou (em relação ao tempo da medição). Porém, mesmo assim os melhores resultados ainda destoaram dos obtidos pelo método cromatográfico. A utilização da análise de injeção em fluxo (FIA) pode ser uma alternativa para ter mais controle do tempo de medição em relação ao da injeção do analito no sistema. Não se descarta o fato de excipientes da amostra também terem contribuído para o resultado pouco satisfatório. Apesar disso, a abordagem de sonda desliga/liga com base nos pontos quânticos de grafeno podem trazer vantagens analíticas, como a literatura vem mostrando, por conta da simplicidade, baixo custo e não envolvendo o uso de reagentes tóxicos, empregados para derivatização química, no caso de analitos não luminescentes.

6.Trabalhos futuros

Neste trabalho foram produzidos três tipos de QDs diferentes, variando precursores e meios de esfoliação. Devido à limitação de tempo, não foi possível explorar mais possibilidades, por exemplo o de usar solução de NaOH, como meio esfoliante, para produzir QDs-GSH. A concentração do NaOH na solução esfoliante também poderia ser uma variável a ser explorada no futuro, usando planejamento experimental. Medições de potencial zeta nos diferentes valores de pH (3,00 e 5,00) também devem ser realizadas para explicar melhor o diferente comportamento da supressão com Fe^{3+} . Além disso, outras caracterizações como espectroscopia fotoeletrônica de raios X, microscopia eletrônica e espalhamento Raman podem ser usadas para compara as diferentes QDs. O mecanismo de interação pode ser melhor estudado com uso de fluorimetria resolvida no tempo.

Com relação à aplicação, o ácido ascórbico se mostrou sensível ao meio da sonda, requerendo uma medição logo após a sua adição. Esse tipo de situação provoca variâncias elevadas e erro sistemático, se a análise for feita em batelada. Assim, uma possibilidade futura seria automatizar o método usando regime de fluxo de tal forma a se ter sempre a amostragem automatizada e a mistura com o meio sonda ocorrendo numa zona em fluxo e um tempo exato de passagem da zona pelo sistema de detecção. Outros analitos mais interessantes, por exemplo, aminas biogênicas, poderiam se determinadas com o método baseado nessa sonda *off/on*.

Em resumo:

- Explorar mais possibilidades em termos de fatores na preparação das QDs, como ponto final de queima do material, por exemplo.
- Fazer a caracterização mais completa desses nanomateriais.
- Avaliar o potencial de aplicação das dispersões QDs-GSH- Fe^{3+} como sondas analíticas para analitos como a cadaverina, por exemplo.
- Avaliar e desenvolver métodos analíticos utilizando os QDs não funcionalizados produzidos neste trabalho.

- Investigar, mais detalhadamente, os mecanismos de interação entre os esses nanomateriais e o ácido ascórbico.
- Adaptar o método de determinação de ácido ascórbico misturando esse com a sonda desligada em fluxo, usando análise por injeção em fluxo (FIA).

7.Referências

- 1 DE FALCO, A. et al. Luminescence imaging and toxicity assessment of graphene quantum dots using in vitro models. p. 1-10, 2021. Disponível em: < 10.1080/1536383x.2021.1995367
- 2 SOTOMAYOR, M. D. P. T. et al. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. v. 31, p. 1755-1774, 2008.
- 3 LUCENA, P. R. D. et al. Fotoluminescência em materiais com desordem estrutural. v. 50, p. 138-144, 2004.
- 4 LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. third. 2006. 954
- 5 ALGAR, W. R. et al. Semiconductor Quantum Dots in Bioanalysis: Crossing the Valley of Death. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 23, p. 8826-8837, 2011.
- 6 SILVA, F. O. et al. O estado da arte da síntese de semicondutores nanocristalinos coloidais. v. 33, p. 1933-1939, 2010.
- 7 EKIMOV, A. I.; EFROS, A. L.; ONUSHCHENKO, A. A. Quantum size effect in semiconductor microcrystals. v. 56, n. 11, p. 921-924, 1985.
- 8 MEDINTZ, I. L. et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. v. 4, n. 6, p. 435-446, 2005.
- 9 PETRYAYEVA, E.; ALGAR, W. R.; MEDINTZ, I. L. Quantum dots in bioanalysis: a review of applications across various platforms for fluorescence spectroscopy and imaging. **Appl Spectrosc**, v. 67, n. 3, p. 215-52, Mar 2013. ISSN 1943-3530.
- 10 ALIVISATOS, P. The use of nanocrystals in biological detection. v. 22, n. 1, p. 47-52, 2004.
- 11 ANGELIS, R. et al. Chemical Sensitivity of Luminescent Epitaxial Surface InP Quantum Dots. v. 3, p. 1-5, 2013.
- 12 ULBRICHT, R. et al. Loosening quantum confinement: observation of real conductivity caused by hole polarons in semiconductor nanocrystals smaller than the Bohr radius. **Nano Lett**, v. 12, n. 9, p. 4937-42, Sep 2012. ISSN 1530-6992.

- 13 SMYDER, J. A.; KRAUSS, T. D. Coming attractions for semiconductor quantum dots. v. 14, n. 9, p. 382-387, 2011.
- 14 BIMBERG, D.; GRUNDMANN, M.; LEDENTSOV, N. N. **Quantum Dot Heterostructures**. 2001. ISBN 0 471 97388 2.
- 15 PETRUSHKIN, S. V.; SAMARTSEV, V. V. Chapter 1 - Thermodynamic fundamentals of fluorescent cooling. In: (Ed.). **Woodhead Publishing Series in Electronic and Optical Materials**: Woodhead Publishing, 2009. p.1-48.
- 16 SAENWONG, K. et al. GSH-doped QDs using citric acid rich-lime oil extract for highly selective and sensitive determination and discrimination of Fe³⁺ and Fe²⁺ in the presence of H₂O₂ by a fluorescence "turn-off" sensor. **Rsc Advances**, v. 8, n. 18, p. 10148-10157, 2018. ISSN 2046-2069.
- 17 RAJA, I. S. et al. Toxicity of Zero- and One-Dimensional Carbon Nanomaterials. v. 9, n. 9, p. 1214, 2019. Disponível em: < 10.3390/nano9091214.
- 18 BAKER, S. N.; BAKER, G. A. Luminescent carbon nanodots: emergent nanolights. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 49, n. 38, p. 6726-44, Sep 2010. ISSN 1521-3773.
- 19 XU, X. et al. Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments. **J Am Chem Soc**, v. 126, n. 40, p. 12736-7, Oct 2004. ISSN 0002-7863.
- 20 SUN, Y. P. et al. Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence. **J Am Chem Soc**, v. 128, n. 24, p. 7756-7, Jun 2006. ISSN 0002-7863.
- 21 SHASHA, P.; KIM, J. H.; PARK, S. J. Celery Stalk-Derived Carbon Dots for Detection of Copper Ions. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 19, n. 10, p. 6077-6082, Oct 2019. ISSN 1533-4880.
- 22 WANG, Y.; HU, A. Carbon quantum dots: synthesis, properties and applications. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 2, n. 34, p. 6921-6939, 2014.
- 23 ZHU, S. J. et al. The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): current state and future perspective. **Nano Research**, v. 8, n. 2, p. 355-381, Feb 2015. ISSN 1998-0124.
- 24 BOURLINOS, A. B. et al. Surface functionalized carbogenic quantum dots. **Small**, v. 4, n. 4, p. 455-458, Apr 2008. ISSN 1613-6810.

- 25 LI, L. et al. Focusing on luminescent graphene quantum dots: current status and future perspectives. **Nanoscale**, v. 5, n. 10, p. 4015-39, May 2013. ISSN 2040-3372.
- 26 SHEN, J. et al. Graphene quantum dots: emergent nanolights for bioimaging, sensors, catalysis and photovoltaic devices. **Chemical Communications**, v. 48, n. 31, p. 3686, 2012-01-01 2012. ISSN 1359-7345.
- 27 SUN, H. et al. Recent advances in graphene quantum dots for sensing. v. 16, n. 11, p. 433-442, 2013.
- 28 LIU, J. J. et al. Glutathione-functionalized graphene quantum dots as selective fluorescent probes for phosphate-containing metabolites. **Nanoscale**, v. 5, n. 5, p. 1810-5, Mar 2013. ISSN 2040-3372.
- 29 ZHOU, S. et al. Graphene quantum dots: recent progress in preparation and fluorescence sensing applications. **RSC Advances**, v. 6, n. 112, p. 110775-110788, 2016.
- 30 TOLOZA, C. A. T. et al. Photoluminescence suppression effect caused by histamine on amino-functionalized graphene quantum dots with the mediation of Fe³⁺, Cu²⁺, Eu³⁺: Application in the analysis of spoiled tuna fish. v. 133, p. 448-459, 2017.
- 31 BIAN, S. Y. et al. Facile synthesis of sulfur-doped graphene quantum dots as fluorescent sensing probes for Ag⁺ ions detection. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 242, p. 231-237, Apr 2017. ISSN 0925-4005.
- 32 XU, T. T. et al. Synthesis of high fluorescence graphene quantum dots and their selective detection for Fe³⁺ in aqueous solution. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 243, p. 863-872, May 2017. ISSN 0925-4005.
- 33 TOLOZA, C. A. T. et al. Kanamycin detection at graphene quantum dot-decorated gold nanoparticles in organized medium after solid-phase extraction using an aminoglycoside imprinted polymer. **Methodsx**, v. 5, p. 1605-1612, 2018. ISSN 2215-0161.
- 34 Gold nanoparticles coupled with graphene quantum dots in organized medium to quantify aminoglycoside anti-biotics in yellow fever vaccine after solid phase extraction using a selective imprinted polymer. **J Pharm Biomed Anal**, v. 158, p. 480-493, Sep 2018. ISSN 1873-264X.
- 35 CASTRO, R. N. et al. HPLC ASSAY FOR THE DETERMINATION OF ASCORBIC ACID IN HONEY SAMPLES. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 24, n. 7, p. 1015-1020, 2001.

- ³⁶ BLANCO, E. et al. Green and fast synthesis of amino-functionalized graphene quantum dots with deep blue photoluminescence. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n. 5, 2015-05-01 2015. ISSN 1388-0764.
- ³⁷ ZHANG, Y. L. et al. Graphitic carbon quantum dots as a fluorescent sensing platform for highly efficient detection of Fe³⁺ ions. **Rsc Advances**, v. 3, n. 11, p. 3733-3738, 2013. ISSN 2046-2069.