



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio de Janeiro

**Rocio Reyna Soto Chochocca**

**Avaliação metrológica na estabilidade de  
pontos quânticos de grafeno quanto à  
morfologia e relações de  
composição-atividade biológica**

**Dissertação de Mestrado**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Metrologia (Área de concentração: Metrologia para Qualidade e Inovação) da PUC-Rio.

Orientador : Prof. Ricardo Queiroz Aucélio  
Coorientador: Prof. Renan Lira de Farias

Rio de Janeiro  
março de 2024



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio de Janeiro

**Rocio Reyna Soto Chococca**

**Avaliação metrológica na estabilidade de  
pontos quânticos de grafeno quanto à  
morfologia e relações de  
composição-atividade biológica**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Metrologia (Área de concentração: Metrologia para Qualidade e Inovação) da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora.

**Prof. Ricardo Queiroz Aucélio**

Orientador

Departamento de Química – PUC-Rio

**Prof. Renan Lira de Farias**

Coorientador

Departamento de Química – PUC-Rio

**Prof<sup>a</sup>. Elisabeth Costa Monteiro**

Programa de Pós-Graduação em Metrologia – PUC-Rio

**Prof<sup>a</sup>. Adriana Gioda**

Departamento de Química – PUC-Rio

**Prof. Jones Limberger**

Departamento de Química – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 26 de março de 2024

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

### **Rocio Reyna Soto Chococca**

A autora obteve seu diploma de graduação em Engenharia Ambiental na Universidade Peruana Unión (UPeU) em 2021. Posteriormente, trabalhou por 11 meses como Analista Físico-Químico, período em que adquiriu amplo conhecimento no contexto laboratorial.

#### Ficha Catalográfica

Soto Chococca , Rocio Reyna

Avaliação metrológica na estabilidade de pontos quânticos de grafeno quanto à morfologia e relações de composição-atividade biológica / Rocio Reyna Soto Chococca; orientador: Ricardo Queiroz Aucélio; coorientador: Renan Lira de Farias. – 2024.

v., 88 f: il. color. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Centro Técnico Científico, Programa de Pós-Graduação em Metrologia, 2024.

Inclui bibliografia

1. Metrologia – Teses. 2. Metrologia para Qualidade e Inovação – Teses. 3. Pontos quânticos de grafeno. 4. Interação com biomoléculas. 5. Metrologia. 6. Estabilidade temporal. 7. Espectroscopias de absorção e de luminescência. I. Aucélio, Ricardo Queiroz. II. De Farias, Renan Lira. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Centro Técnico Científico. Programa de Pós-Graduação em Metrologia. IV. Título.

CDD: 389.1

## Agradecimentos

Ao Deus, minha guia inabalável ao longo deste percurso acadêmico.

Agradeço ao Prof. Dr. Ricardo Queiroz Aucélio, meu orientador, por sua competência e pelas valiosas lições aprendidas nos campos da Química, do ensino e do pensamento crítico. Seu estímulo constante e colaboração eficaz foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Também expresso minha gratidão ao Prof. Dr. Renan Lira de Farias, meu co-orientador, por sua amizade, confiança, ensinamentos e sólida colaboração científica, e, acima de tudo, por sempre acreditar em meu potencial.

Agradeço aos meus pais, Basilio e Marcelina, por serem exemplos de vida. Aos meus irmãos Ever, Josue, Yesenia e Guisela, pelo apoio e amor incondicional que compartilhamos. Ao meu querido parceiro Khupher, agradeço por estar sempre presente, apoiando, incentivando e torcendo por mim. A Sergio, Clara, Marlin, Andres e Juan, agradeço pelas contribuições e pelo incentivo.

Quero reconhecer a equipe técnica e administrativa do PósMQI Márcia Ribeiro, Paula Guimarães e Felipe Coimbra pela informação administrativa e apoio técnico.

Meu agradecimento especial ao grupo do laboratório de Eletroanalítica, Espectroanalítica e Análise Elementar Aplicada (LEEA), por toda a ajuda e pelas lembranças agradáveis compartilhadas.

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

## Resumo

Soto Chochocca , Rocio Reyna; Aucélio, Ricardo Queiroz; De Farias, Renan Lira. **Avaliação metrológica na estabilidade de pontos quânticos de grafeno quanto à morfologia e relações de composição-atividade biológica.** Rio de Janeiro, 2024. 88p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós - Graduação em Metrologia (Área de concentração: Metrologia para a Qualidade e Inovação), Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Os pontos quânticos de grafeno têm potencial para aplicações biológicas devido às suas propriedades ópticas e de tamanho nanométrico. Este estudo investigou por 28 dias (672 h) as interações de GQDs de diferentes precursores (ácido cítrico + ureia e ácido cítrico + tioacetamida) com biomoléculas modelo (albumina sérica humana - HSA) e DNA do timo de bezerro (ctDNA). Os GQDs-ureia mostraram estabilidade no diâmetro hidrodinâmico (12 nm) e carga superficial (-7 mV). Já os GQDs-tioacetamida apresentaram agregação progressiva de 5,0 nm iniciais para 22,7 nm após 28 dias, sem sedimentação devido à compensação de cargas preservando a dispersão coloidal. Ensaio revelaram supressão da fluorescência da HSA com aumentos na concentração dos GQDs. A constante de interação ( $K_i$ ) GQDs-ureia oscilou inicialmente, estabilizando após 48 h. Para GQDs-tioacetamida houve menor flutuação de  $K_i$  ao longo de 672 h, indicando rearranjos conformacionais das biomoléculas com os GQDs antes do equilíbrio. A interação com o DNA, acompanhada por titulação absorciométrica no UV-Vis mostrou biointeração fraca de natureza hidrofóbica/eletrostática para ambos GQDs, com constantes de ligação aparentes ( $\sim 10^5$  L mol<sup>-1</sup>). Ensaio com brometo de etídio revelou alterações na estrutura do DNA sem intercalação dos GQDs. Testes estatísticos confirmam a reprodutibilidade das interações dos GQDs com proteínas (HSA) e DNA no período de 28 dias (95 % de confiança). A estabilidade dos parâmetros de quantificação ao longo do tempo sugere a viabilidade dos GQDs como sondas analíticas após longos períodos de bioconjugação. Assim, o estudo apresenta bases metrologicamente sólidas para aplicação segura de GQDs em tecnologias biomédicas, expandindo o entendimento da relação tempo-estrutura-atividade nesses nanossistemas.

## Palavras-chave

Metrologia; Pontos quânticos de grafeno; Fotoluminescência; Relação de composição-atividade biológica; Ureia; Tioacetamida

## Abstract

Soto Chochocca , Rocio Reyna; Aucélio, Ricardo Queiroz (Advisor); De Farias, Renan Lira (Co-Advisor). **Metrological evaluation of the stability of graphene quantum dots regarding morphology and composition-biological activity relationships**. Rio de Janeiro, 2024. 88p. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Metrologia (Área de concentração: Metrologia para a Qualidade e Inovação), Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Graphene quantum dots have potential for biological applications due to their optical properties and nanometric size. This study investigated for 28 days (672 h) the interactions of GQDs from different precursors (citric acid + urea and citric acid + thioacetamide) with model biomolecules (human serum albumin - HSA) and Calf thymus DNA (ctDNA). The GQDs-urea showed stability in hydrodynamic diameter (12 nm) and surface charge (-7 mV). In contrast, GQDs-thioacetamide showed progressive aggregation from 5.0 nm initially to 22.7 nm after 28 days, without sedimentation due to charge compensation preserving colloidal dispersion.

Tests revealed quenching of HSA fluorescence with increases in GQD concentration. The GQDs-urea interaction constant ( $K_i$ ) fluctuated initially, stabilizing after 48 h. For GQDs-thioacetamide there was less fluctuation in  $K_i$  over 672 h, indicating conformational rearrangements of the biomolecules with the GQDs before equilibrium. Interaction with DNA monitored by UV-Vis photometric absorption titration showed weak bio-interaction of a hydrophobic/electrostatic nature for both GQDs, with apparent binding constants ( $\sim 10^5$  L mol<sup>-1</sup>). Ethidium bromide assay revealed changes in DNA structure without intercalation of the GQDs. Statistical tests confirm the reproducibility of GQDs interactions with proteins (HSA) and DNA over 28 days (95 % confidence). The stability of the quantification parameters over time suggests the viability of GQDs as analytical probes after long periods of bioconjugation. Thus, the study presents metrologically sound bases for the safe application of GQDs in biomedical technologies, expanding the understanding of the time-structure-activity relationship in these nanosystems.

## Keywords

Metrology; Graphene quantum dots; Photoluminescence; Composition-biological activity relationship; Urea; Thioacetamide

## Sumário

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Motivação	15
1.2	Objetivo	18
1.2.1	Objetivo geral	18
1.3	Contribuições	19
1.4	Organização das partes restantes da dissertação	19
2	Conceitos teóricos fundamentais	20
2.1	Nanomateriais e nanotecnologias	20
2.1.1	Metrologia em (nano)química: metrologia analítica para nanomateriais	22
2.2	Pontos quânticos	24
2.2.1	Pontos quânticos de carbono e de grafeno	27
2.2.2	Fotoluminescência dos pontos quânticos	29
2.2.3	Toxicidade dos pontos quânticos de grafeno	31
2.2.3.1	Toxicidade in vitro	32
2.2.3.2	Toxicidade in vivo	33
2.2.4	Aplicações dos pontos quânticos de grafeno como sondas analíticas e como marcadores de células	34
2.2.4.1	Incerteza associada aos nanomateriais: variabilidade das propriedades e desafios para a química analítica	35
3	Parte Experimental	37
3.1	Reagentes e materiais	37
3.2	Medidas físicas	37
3.3	Preparação de pontos quânticos de grafeno (GQDs)	38
3.4	Medições de teor de carbono total e estimativa das concentrações de GQDs	39

3.5	Estudos morfológicos em série temporal após preparação das dispersões de GQDs	40
3.6	Preparação das soluções	40
3.7	Estudo temporal de interação dos GQDs e das biomoléculas	41
3.7.1	Estudo espectrofluorimétrico da interação de GQDs com HSA	41
3.7.2	Titulação do DNA por espectrofotometria de absorção	42
3.8	Ensaio de competição pelo DNA com brometo de etídio	43
4	Resultados e Discussão	44
4.1	Características das dispersões de GQDs e valor de referência para sua concentração	44
4.2	Experimentos de interação com biomoléculas (HSA/DNA)	50
4.2.1	Estudo da Interação entre HSA e GQDs	51
4.3	Estudos de ligação com DNA: Titulação espectrofotométrica	61
4.4	Ensaio de competição com o intercalador brometo de etídio (BET)	67
5	Conclusões	70
	Referências bibliográficas	72

## Lista de figuras

- Figura 1 - Estrutura química dos aditivos. Fonte, adaptado de [11]. 18
- Figura 2 - Metrologia analítica de nanomateriais e suas principais implicações. Fonte, adaptado de [26]. 24
- Figura 3 - Esquema de de confinamento quântico, pontos quânticos e moléculas. BV é a banda de valência, BC é a banda de condução,  $\Delta E_{(\text{mat. masivo})}$  é o deslocamento de Stokes,  $\Delta E_{(\text{GQs})}$  é a energia do gap, HOMO-LUMO é semicondutores em massa com níveis de energia contínuos dentro de bandas. Fonte adaptada de [37]. 26
- Figura 4 - Fases do processo de preparação das dispersões de GQDs utilizando misturas ácido cítrico/ureia e ácido cítrico/tioacetamida. Fonte, Autora. 39
- Figura 5 - Espectros de excitação e emissão das dispersões originais sem diálise de GQDs: GQDs-U (A) e GQDs-TAA (C) em  $\text{H}_2\text{O}$ , além de GQDs-U (B) e GQDs-TAA (D) em tampão Tris-HCl-NaCl. Fonte, Autora. 46
- Figura 6 - Espectros Raman das dispersões dialisadas de GQDs-U (A) e GQDs-TAA (B). Fonte, Autora. 47
- Figura 7 - Diâmetro hidrodinâmico dos GQDs-U: (A) réplica (RI), (B) réplica (RII) Diâmetro hidrodinâmico dos GQDs-TAA: (C) réplica (RI), (D) réplica (RII). Fonte, Autora. 50

Figura 8 - (A-C), Os espectros de fluorescência da HSA (a 298 K) obtidos na ausência e na presença de quantidades crescentes do supressor (GQDs-U ou GQDs-TAA), com  $\lambda_{ex} = 281$  nm e utilizando tampão tris-HCl-NaCl (pH = 7,4). As concentrações utilizadas foram  $[HSA] = 1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> e  $[GQDs]$  variando de 0 a  $5,45 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> (GQD-U) e 0 a  $6,41 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> (GQD-TAA). Os gráficos de fluorescência em função de  $[GQDs]$  são apresentados nas Figuras (B-D), que indicam, como exemplo, os resultados obtidos após 72 h para GQDs-U e 96 h para GQDs-TAA. 52

Figura 9 - Gráficos normalizados de fluorescência em função da concentração de GQDs-U (em termos de TCC) em 297 K e 313 K. 54

Figura 10 - Gráficos de tendência: (A) Constante de extinção de Stern-Volmer ( $K_i$ ), (B) Constante de extinção bimolecular ( $K_q$ ) e (C) O número de sítios de ligação ao ligante ( $n$ ) em relação à interação de GQDs-U com HSA. 57

Figura 11 - Gráficos de tendência: (A) Constante de extinção de Stern-Volmer ( $K_i$ ), (B) Constante de extinção bimolecular ( $K_q$ ) e (c) O número de sítios de ligação ao ligante ( $n$ ) em relação à interação de GQDs -TAA com HSA. 58

Figura 12 - Na região UV-Vis, os espectros eletrônicos foram obtidos usando um tampão de sal Tris-HCl em pH 7,4. Variações nas proporções molares entre o DNA e os GQDs (GQD-U e GQD-TAA) foram exploradas (A e C). As Concentrações utilizadas foram  $[GQDs - U] = 1,65 \times 10^{-6}$  L mol<sup>-1</sup> e  $[GQDs - TAA] = 1,65 \times 10^{-6}$  L mol<sup>-1</sup>, mantendo uma concentração inicial de DNA de  $8,65 \times 10^{-5}$  L mol<sup>-1</sup>. As adições incrementais do DNA variaram de 20 a 120  $\mu$ L. (B e D), a constante de ligação ( $K_{bap}$ ) foi determinada através da análise de correlação linear Benesi-Hildebrand, que indicam, como exemplo, os resultados obtidos após 96 h para GQD-U e 504 h para GQD-TAA. 63

Figura 13 - Em (A), perfis das constantes de velocidade ( $K_{bap}$ ) para interação GQDs-U com ctDNA em duplicatas; e (B), perfis de  $K_{bap}$  para interação GQDs-TAA com ctDNA em duplicatas. 64

Figura 14 - Representação das diferentes formas de interação com o DNA. Fonte, adaptado de [156]. 68

Figura 15 - Em (A), espectro de BET-ctDNA com a sequência GQDs-U; e (B), espectro de BET-ctDNA com a sequência GQDs-TAA. Espectro de supressão da fluorescência do aduto GQDs – ctDNA, [aduto] = 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , na ausência e na presença de diferentes concentrações do supressor, [GQDs] = 0, 2,5, 5,0, 7,5, 10, 13, 15, 18, 20 e 23  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Fonte, Autora. 69

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Potencial zeta das dispersões dialisadas de GQDs a pH 7,4.	48
Tabela 2 - Diâmetro hidrodinâmico das dispersões dializadas de GQDs a pH 7,4.	49
Tabela 3 - Valores de $K_i$ e $K_q$ associados à supressão da fluorescência da HSA na presença de GQDs/HSA, avaliados em 298 K.	53
Tabela 4 - Valores de $K_i$ e $K_q$ associados à supressão da fluorescência da HSA na presença de GQDs/HSA, avaliados em 297 e 313 K.	55
Tabela 5 - Constante de formação aparente $K_b$ , número de sítios de ligação ( $n$ ) e parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação entre HSA e os GQDs em 298 K.	55
Tabela 6 - Constante de formação aparente $K_b$ , número de sítios de ligação ( $n$ ) e parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação entre HSA e os GQDs em 297 a 313 K.	57
Tabela 7 - Valores de $K_i$ e desvio-padrão (da regressão linear) para o sistema GQDs e HSA em função do tempo após a preparação da dispersão dialisada de GQDs-U.	58
Tabela 8 - Valores de $K_i$ e desvio-padrão (da regressão linear) para o sistema GQDs e HSA em função do tempo após a preparação da dispersão dializada de GQDs-TAA.	60
Tabela 9 - Dados gerais da constante de ligação aparente ( $K_{bap}$ ), do coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) em relação ao hipocromismo medido em 205 nm monitorado durante a titulação espectrofotométrica da dispersão de GQDs com DNA.	64
Tabela 10 - Valores da constante de ligação aparente, $K_{bap}$ , obtido em experimentos realizados ao longo de um mês da preparação das dispersões dialisadas de GQDs-U.	65

Tabela 11 - valores da constante de ligação aparente,  $K_{bap}$ , obtido em experimentos realizados ao longo de um mês da preparação das dispersões dialisadas de GQDs-TAA.

66

## Lista de Abreviaturas

3T3balbC	Linha celular estabelecida de fibroblastos embrionários de camundongo
A549	Cultura de células basais epiteliais de adenocarcinoma humano alveolar
ADME	Absorption, distribution, metabolism, excretion
AMES	Ensaio de mutação reversa de salmonella typhimurium
AMNM	Metrologia analítica para nanomateriais
ANOVA	Análise de variância
CNM	Nanomateriais de carbono ( <i>Carbon nanomaterials</i> )
CQDs	Pontos quânticos de carbono
ctDNA	DNA <i>calf thymus</i>
DFT	Teoria funcional da densidade
DGO	Óxido de grafeno dobre
DLS	Dynamic light scattering
ENMs	Nanomateriais projetados
FA	Ácido fólico
GQDs	Pontos quânticos de grafeno ( <i>Graphene quantum dots</i> )
HCT-116	Linha celular de câncer colorretal humano
HepG2	Linha celular de câncer de fígado
HSA	Albumina do soro humano
MDA-MB-231	Linha celular de câncer de mama triplo negativo
NM	Nanomateriais
PEG	Polietilenoglicol
SERS	Espectroscopia Raman com Superfície Aprimorada
TEM	Transmission electron microscopy
TCC	Conteúdo de carbono total
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta visível

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Motivação

Dentre os diversos tipos de nanopartículas, os nanomateriais de carbono (CNM, do inglês *carbon nanomaterials*) apresentam propriedades ópticas e físico-químicas peculiares e de interesse científico e tecnológico, podendo serem citadas a suas propriedades ópticas, catalíticas, assim como propriedades térmicas e elétricas peculiares [1]. Além disso, os CNM podem formar arquiteturas nanoestruturadas com elevada resistência mecânica. Essas propriedades permitem que os CNM e derivados sejam aplicados na optoeletrônica, indústria do petróleo, agricultura, geração de energia renovável, tecnologias da luz entre outras [2]. Nesse conjunto de nanomateriais, os ditos pontos quânticos de carbono (GQDs, do inglês, *graphene quantum dots*) referem-se a nanofolhas de grafeno com dimensões menores que 100 nm podendo ter espessuras inferiores a 10 camadas empilhadas.

Os GQDs podem ser preparados a partir de diferentes precursores e com variações diferentes de rotas de tal forma que os produtos apresentam diversidade nas suas características. Os GQDs exibem propriedades luminescentes cujo perfil espectral/temporal dependem da presença de impurezas (heteroátomos ligados à bordas de sua estrutura) mas, ao contrário dos pontos quânticos inorgânicos cristalinos, as propriedades ópticas do GQDs variam em menor escala em função da variação de seu tamanho. Além disso, por terem características de colóides (pelo tamanho e grupamentos nas bordas que podem adquirir cargas elétricas), elas são compatíveis em meio aquoso podendo ser mantidas dispersas por um período longo de tempo. Sendo constituídos principalmente de carbono, um elemento abundante em sistemas biológicos, eles são considerados biocompatíveis. Portanto, têm sido objeto de estudo na área de biomedicina como agentes de imagem e biossondas luminescentes [3]. Embora os GQDs apresentem essas e outras características promissoras, do ponto de vista das aplicações tecnológicas e da saúde, as propriedades ópticas e de toxicidade desses nanomateriais foram pouco estudadas em termos de alterações em longo prazo após o tempo de preparação. A partir da avaliação dos

valores medidos, e que são relacionados diretamente com as propriedades de interesse, pode-se obter informação decisiva sobre a qualidade do nanomaterial e seu prazo de uso em aplicações específicas. Vale salientar que nanomateriais possuem variabilidade relativamente elevada em termos de tamanho, modificações químicas de borda, graus dopagem, defeitos, entre outros aspectos que impactam nas suas propriedades. Do ponto de vista científico, é importante salientar que muito pouca atenção tem sido dada aos aspectos metrológicos relacionados à reprodução de características entre partidas de preparação de nanomateriais em geral e na estabilidade dessas características em função do tempo.

Na química analítica, os nanomateriais estão sendo cada vez mais utilizados como sondas e sensores e substituindo reagentes químicos tradicionais em reações químicas para colorimetria, para catálise/biocatálise de analitos, e para medições indiretas por variação, por exemplo, de luminescência. Em contrapartida, quando reagentes tradicionais são usados nessas aplicações, pode-se facilmente obtê-los com alta pureza e forma específica bem definida em termos de composição isotópica, estado eletrônico e de oxidação e ou estrutura molecular ou complexa. Com tais requisitos definidos a obtenção de solução reagente é bem reprodutível, ficando a incerteza apenas relacionada à concentração em função da precisão dos aparatos (balança, vidrarias volumétricas, micropipetas, etc.) e a perícia do analista. Já no caso de nanomateriais, a homogeneidade de nanopartículas não é garantida numa partida e variações de tamanho e composição podem ocorrer em função de variações mínimas e aleatórias no processo de preparação de partidas diferentes.

Em aplicações na área clínica, no melhor do nosso entendimento não foram encontrados estudos metrológicos sistemáticos para GQDs que correlacionem as influências do tamanho das partículas, concentração, variabilidade em composição e do tempo de envelhecimento das dispersões com a toxicidade intrínseca de contato com amostras biológicas. Tais dados são cruciais para estabelecer limites de concentração compatíveis com a homeostase metabólica do organismo e na obtenção de resposta analítica confiáveis. Em estudos recentes, Nurunnabi *et al.* [4] relataram que GQDs modificados com grupos carboxilatos não induziram mecanismos de morte celular programada (apoptose) em culturas celulares tumorais (MDA-MB231 e A549). Em contrapartida, observou-se maior compatibilidade no meio aquoso para os GQDs carboxilados em comparação aos GQDs não modificados, em função das cargas que os grupos carboxila adquiriram em pH 8, tornando-os solúveis no meio aquoso dispersante.

Essa característica de compatibilidade foi explorada para o imageamento *in vivo* de tumores xenográficos, uma vez que processo inflamatório no microambiente tumoral demanda maior quantidade de água ao seu redor.

Por outro lado, Goldestein e colaboradores demonstraram maiores efeitos citotóxicos dos GQDs na viabilidade celular das linhagens HepG2 e 3T3balbC, embora não tenham observado formação de micronúcleos, indicativos de genotoxicidade, por meio do ensaio AMES (ensaio de mutação reversa de *Salmonella typhimurium*) ou teste de mutação reversa bacteriana. Além disso, ensaios imuno-histoquímicos em lâminas de tecido de fígado reportaram que esse órgão estava envolvido na metabolização desses nanomateriais [5, 6]. Os GQDs também têm sido usados em ensaios de toxicologia genética com DNA, uma vez que mutações cromossômicas são eventos importantes na carcinogênese [7]. Até o momento, não há relatos na literatura científica a respeito de um estudo sistemático metrológico para correlacionar as propriedades físico-químicas dos GQDs com os perfis de toxicidade em nível molecular, especificamente nas interações dos GQDs, produzidos a partir de diferente precursores, com proteínas reguladoras do metabolismo.

Esses dados podem ser úteis para estimar as relações quantitativas de estrutura-atividade e possíveis predições de ADME (absorção, biodistribuição, metabolismo e excreção) dos GQDs no interior de um organismo, visando suas aplicações como biossondas e biomarcadores luminescentes. Nesse sentido, a albumina humana (HSA, do inglês *Human Serum Albumin*), proteína sérica de maior concentração no plasma sanguíneo (aproximadamente  $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ ), desempenha funções principais no transporte de hormônios e controle da pressão osmótica. A HSA pode ser utilizada como biomolécula modelo em estudos *in vitro* para avaliar o impacto dos GQDs nas funções metabólicas do corpo [8]. Em trabalhos anteriores do nosso grupo, estudos foram realizados relacionando a variabilidade das propriedades luminescentes em função da variação das condições de preparação de GQDs pela rota hidroexfoliação de material em fusão (ácido cítrico e modificadores como glutationa reduzida) [9, 10].

No entanto, em nenhum deles foram abordadas as interações dos GQDs frente a biomacromoléculas dando-se ênfase aos perfis de toxicidade.

Especificamente nessa dissertação, esperava-se produzir e caracterizar GQDs a partir de misturas de ácido cítrico e ureia ou tioacetamida (Figura 1). Além disso, visava-se avaliar, ao longo do tempo após a preparação das dispersões aquosas, as propriedades luminescentes e morfológicas dos GQDs, bem como sua interação com as biomacromoléculas HSA e ct-DNA (do inglês *desoxiribonucleic acid from Calf thymus*), buscando mimetizar, em nível

molecular, a interferência dos GQDs na homeostase metabólica.

A partir dos dados coletados em série temporal, utilizou-se uma comparação de estatísticas paramétricas (como o teste de Shapiro-Wilk, ANOVA de uma variável e o teste *t* de *Student* pareado) e, para uma amostra específica de GQDs-TAA com DNA, utilizou-se apenas o teste não paramétrico Wilcoxon. A finalidade foi determinar variações nas relações estrutura/atividade dos nanomateriais. Em suma, a pesquisa visa contribuir para o avanço seguro e confiável das aplicações de pontos quânticos de grafeno (GQDs) em diversas áreas. Isso se dará ao abordar questões críticas de qualidade, estabilidade e toxicidade por meio de uma abordagem metrológica abrangente.

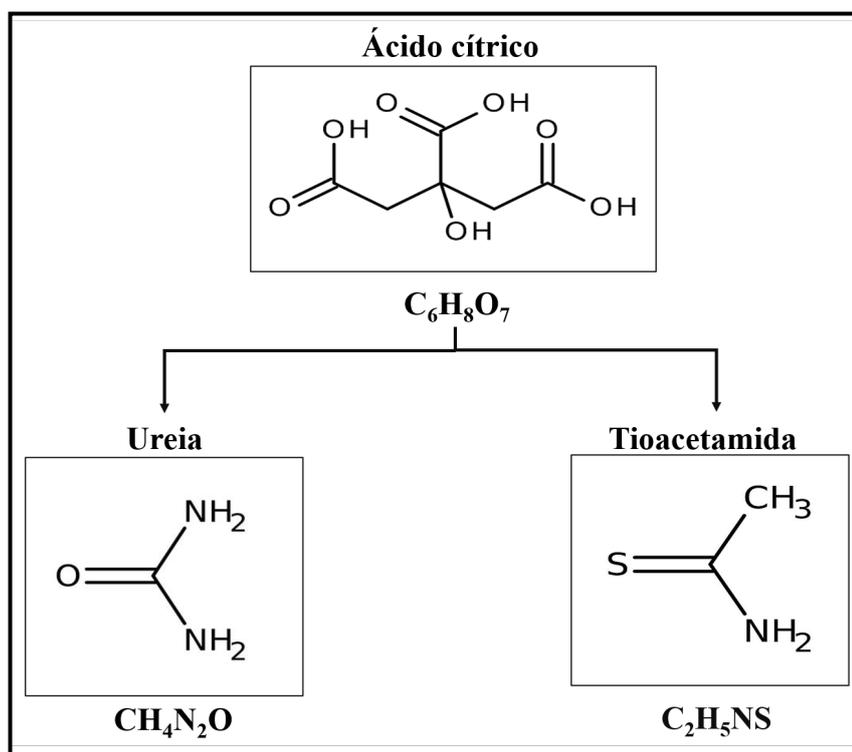


Figura 1: Estrutura química dos aditivos. Fonte, adaptado de [11].

## 1.2

### Objetivo

#### 1.2.1

##### Objetivo geral

O objetivo da dissertação é estudar a variação da fotoluminescência, tamanho hidrodinâmico e carga superficial de dois diferentes tipos de GQDs, assim como suas relações de estrutura-atividade biológica a partir da interação com HSA e DNA, extraindo informação sobre variabilidade dessas caracterís-

ticas, em função do tempo de envelhecimento desses nanomateriais, por meio de testes estatísticos.

### 1.3

#### Contribuições

As principais contribuições deste trabalho são as seguintes:

1. Realização da comparação de características de dispersões de GQDs preparados a partir de ácido cítrico/ureia e ácido cítrico/tioacetamida
2. Avaliação da estabilidade, no prazo de aproximadamente 1 mês, das mudanças nas características ópticas (fotoluminescência) e morfológicas (tamanho hidrodinâmico e carga superficial) dos dois tipos de GQDs
3. Estudo sistemático, em função do tempo de envelhecimento dos GQDs, das relações estrutura-atividade biológica a partir da interação dos nanomateriais com DNA e HSA.

### 1.4

#### Organização das partes restantes da dissertação

Capítulo 2. Descreve conceitos relevantes ao tema da pesquisa, abordando aspectos como nanomateriais e nanotecnologias, metrologia em (nano)química, pontos quânticos, pontos quânticos de carbono e de grafeno. Destaca-se também a fotoluminescência dos pontos quânticos de grafeno e a análise da toxicidade associada a esses materiais nanoestruturados.

Capítulo 3. Fornece informações detalhadas sobre reagentes e materiais empregados na pesquisa, bem como os procedimentos utilizados para a preparação de soluções e amostras. Além disso, são abordados os procedimentos relativos aos métodos analíticos adotados durante o desenvolvimento do estudo.

Capítulo 4. São apresentados e discutidos neste estudo os resultados relacionados à interação com as biomoléculas (HSA e DNA), assim como a análise de estabilidade ao longo do tempo. A variabilidade dessas características em função do tempo de envelhecimento dos nanomateriais explorada por meio de testes probabilísticos.

Capítulo 5. Apresenta as conclusões do estudo.

## 2

### Conceitos teóricos fundamentais

#### 2.1

##### Nanomateriais e nanotecnologias

Os nanomateriais são geralmente definidos como possuindo estruturas internas ou de superfície em uma ou mais dimensões na faixa de tamanho de 1 a 100 nm [12]. Existem diversas famílias de nanomateriais de importância nas ciências básicas e aplicadas, como pontos quânticos, nanotubos de carbono grafeno, fulereno, nanotubos inorgânicos e nanopartículas metálicas.

Os nanomateriais metálicos e pontos quânticos, em particular, apresentam propriedades físico-químicas diferenciadas devido ao seu pequeno tamanho, que produz efeito de confinamento quântico/eletrônico e alta relação entre área de superfície e volume em comparação com o material em sua forma macroscópica. Suas propriedades ópticas, reatividade e resistência dependem do tamanho, composição, forma e estrutura [13].

Nos últimos vinte anos, as vantagens claras do uso e das aplicações de nanomateriais em produtos de consumo têm impulsionado uma nova fase no desenvolvimento da nanotecnologia [14], acelerando assim o uso e a gama de aplicações de nanomateriais [15].

No entanto, à medida que essas indústrias passam a utilizar nanomateriais de composição, forma, tamanho diversos surgem riscos de que alguns desses possam, de alguma forma impactar o ambiente e afetar a saúde humana. Em especial, muitos dos nanomateriais projetados não passaram por uma avaliação adequada em termos de toxicidade [16]. Além disso, pouco se avaliou o efeito do envelhecimento nesses nanomateriais, pois eles podem sofrer modificações morfológicas e mudanças na composição específica, como no caso dos GQDs, cuja composição pode variar conforme o método de síntese utilizado e as modificações introduzidas durante o processo de fabricação.

Atualmente, as regulamentações de produtos contendo nanomateriais projetados (ENMs, do inglês engineered nanomaterials) são escassas, mesmo em países com maior volume de ENMs produzidos, como Estados Unidos e China.

Após uma análise abrangente dos ciclos de vida dos ENMs, existem desafios para a definição regulatória por parte dos órgãos competentes. Por exemplo, os ENMs apresentam características físico-químicas variáveis, o que torna difícil para os reguladores estabelecerem uma definição regulatória única. Além disso, a diversidade de fontes e rotas de transporte dos ENMs representa um desafio adicional, tornando complexo o monitoramento e a previsão eficazes de seu destino no meio ambiente. Ademais, a falta de métodos confiáveis para quantificar as exposições a ENMs emerge como um obstáculo significativo nesse cenário.

Adicionalmente, devido às diversas propriedades intrínsecas dos ENMs e às condições ambientais dinâmicas, a previsão da biodisponibilidade dessas substâncias na biota e no ambiente se torna uma tarefa complexa. Por último, destaca-se a existência de lacunas de conhecimento sobre a toxicidade e os mecanismos tóxicos dos ENMs, dificultando a previsão precisa de seus riscos [17].

Maynard *et al.* [18] abordou as particularidades da avaliação de risco para nanomateriais, destacando a importância da área superficial das partículas em contraste com sua composição química. Ele destacou os desafios enfrentados ao tentar caracterizar a resposta inflamatória em roedores expostos à nanopartículas de dióxido de titânio nanométrico, onde a dose-resposta não pode ser determinada apenas pela massa, mas também pela estrutura da partícula, especialmente sua área superficial. Essa abordagem indicou que aspectos além da dose tradicional precisam ser cuidadosamente considerados.

Além disso, o tamanho das partículas influencia a resposta dos instrumentos de medição, e a falta de informações confiáveis sobre os níveis de exposição pode complicar a avaliação de dose. O estado das partículas, como a aglomeração, também pode afetar a dose em situações reais de exposição, como durante o armazenamento ou a produção de nanomateriais. Cenários relevantes de exposição incluem a exposição a nanomateriais envelhecidos, a exposição a nanomateriais frescos durante a produção e possíveis exposições mistas durante atividades de limpeza em espaços confinados.

Recentemente, têm surgido esforços para criar sistemas de avaliação de risco para os ENM. Uma abordagem inicial proposta é desenvolver uma árvore de decisão, começando com testes de toxicidade *in vitro* simples e rápidos. Se estes testes apresentarem resultados preocupantes, então são realizados testes mais complexos e dispendiosos, geralmente em animais (testes de toxicidade *in vivo*). Portanto, a seleção dos primeiros testes deve ser feita com cautela [19].

Apesar dos possíveis riscos dos ENMs, a nanotecnologia possui um grande potencial no campo da medicina, incluindo nas técnicas de imagem, ferramen-

tas de diagnóstico, sistemas de entrega de medicamentos, engenharia de tecidos, implantes e terapias farmacêuticas [20]. De fato, tem-se conseguido grandes avanços no tratamento de várias doenças, incluindo as cardiovasculares, câncer, condições musculoesqueléticas, doenças psiquiátricas e neurodegenerativas, infecções bacterianas, virais e diabetes [21].

A nanotecnologia aplica os princípios da engenharia, eletrônica, física, ciência dos materiais e preparação em nível molecular ou submicrométrico, sendo uma tecnologia com bases científicas interdisciplinares [22]. Existem duas principais abordagens na área da nanotecnologia: "*bottom-up*" e "*top-down*". A abordagem "*bottom-up*" envolve a manipulação e organização de átomos e moléculas para a construção de nanoestruturas, materiais e dispositivos com precisão atômica ou molecular [23]. Já a abordagem "*top-down*" consiste na criação de nanoestruturas a partir da remoção progressiva de porções de um material bulk ou entidade maior, porém sem um controle preciso em nível atômico [23].

Recentemente, ambas as abordagens têm experimentado um avanço significativo, impulsionado pelo desenvolvimento e implementação de instrumentos altamente sensíveis. Ferramentas como microscopia de força atômica, microscopia de varredura por tunelamento, litografia por feixe de elétrons, epitaxia por feixe molecular, espectroscopias Raman e de luminescência entre outras, tornaram-se acessíveis, contribuindo para o progresso nesse campo emergente. Esses instrumentos capacitam a observação e manipulação de novas nanoestruturas. A comunidade científica, ao investigar e compreender a funcionalidade de materiais em escalas micro/nano, busca desenvolver técnicas inovadoras que maximizem o desempenho funcional desses materiais com o mínimo de energia e recursos.

Apesar desses desafios, a nanotecnologia continua a desempenhar um papel vital em inovações médicas e tecnológicas. A colaboração entre disciplinas e esforços regulatórios é essencial para equilibrar o potencial funcional dos nanomateriais com a minimização de impactos adversos.

Em última análise, a conclusão é clara: é imperativo abordar lacunas na avaliação de riscos, fortalecer regulamentações e promover uma abordagem integrada para garantir que os nanomateriais alcancem seu potencial máximo, beneficiando a sociedade de maneira segura e sustentável.

### 2.1.1

#### **Metrologia em (nano)química: metrologia analítica para nanomateriais**

A Química Analítica desempenha um papel fundamental na compreensão do comportamento complexo observado nos nanomateriais projetados (ENMs).

Ademais, nanomateriais vem sendo empregados na Química Analítica na forma de sondas, sensores e substituindo reagentes tradicionais para provocar reações redox, de produção de cor ou luminescência ou mesmo na modificação de substratos utilizados, por exemplo, nas técnicas de separação de componentes [24].

Por outro lado, diversos métodos e técnicas de Química Analítica são empregados para isolar, purificar, determinar a composição dos nanomateriais brutos, bem como para detectar, caracterizar e quantificar nanomateriais em matrizes complexas presentes em produtos de consumo nano adicionados à cosméticos e em alimentos, no ambiente e em amostras biológicas como tecidos e fluídos corporais [25].

A Metrologia Analítica para Nanomateriais (AMNM) é a metrologia aplicada aos propósitos analíticos de nanomateriais (NM). Na Figura 2, são resumidos os principais conceitos da AMNM com base em três palavras-chave: *metrologia*, *nanomateriais* e *finalidade analítica*.

Conforme é definido, a metrologia é a ciência da medição e é sustentada pelos princípios da rastreabilidade metrológica e medição de incerteza associado a um valor medido. Em análises, especialmente as químicas, os resultados devem se aproximar o máximo possível do valor real e os valores medidos devem ter rastreabilidade metrológica ao Sistema Internacional de Unidades. Ademais, a variabilidade do valor medido deve ser adequada e bem definida (incerteza). Para alcançar esse objetivo, a metrologia se baseia em ferramentas para medições confiáveis, com padrões de medição, como materiais de referência certificados, além de métodos padrão, cálculos estatísticos, entre outros.

A rastreabilidade metrológica, a estimativa da incerteza de medição e a validação de métodos apropriados para a determinação de nanomateriais em amostras específicas têm papel fundamental, já que estes tendem a se tornar componentes importantes em termos de rejeitos e na forma de contaminantes no ambiente. Ademais, os princípios de metrologia precisam ser aplicados quando nanomateriais são parte dos dispositivos de análise (sensores, sondas, catalisadores, etc.) com intuito de caracterização e avaliação de desempenho quando utilizados nos métodos analíticos [26–28].

Nos últimos anos, a nanociência e a nanotecnologia se tornaram tendências revolucionárias em quase todos os campos de atividade, e sua influência também se manifesta na ciência analítica. Primeiramente, porque o uso de nanomateriais como ferramentas analíticas está se tornando cada vez mais comum. Em segundo lugar, é necessário estudar nanomateriais em diferentes tipos de amostras para fins de controle analítico. Nestes dois aspectos, a metrologia analítica para nanomateriais pode fornecer informações confiáveis, baseadas em medições experimentais, de modo a dar subsídios para tomada

de decisão.

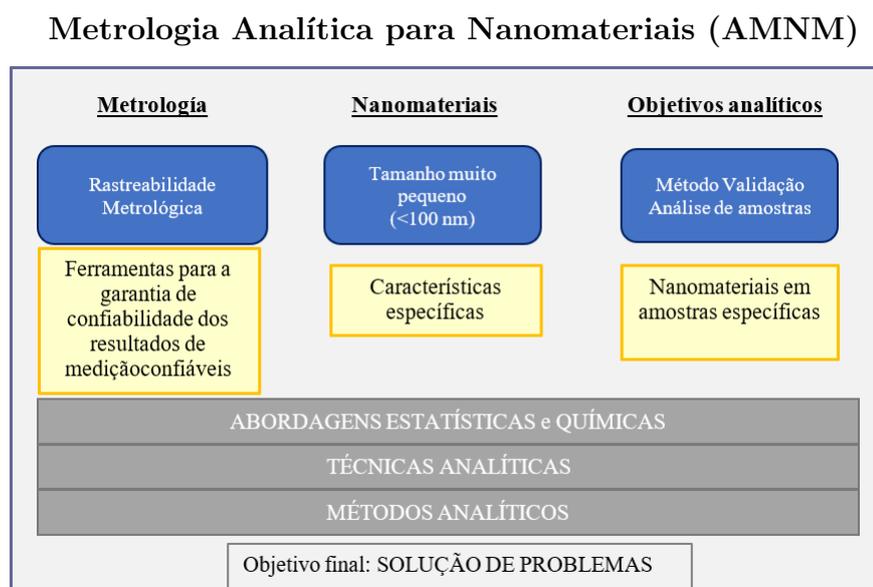


Figura 2: Metrologia analítica de nanomateriais e suas principais implicações. Fonte, adaptado de [26].

## 2.2

### Pontos quânticos

Os pontos quânticos, nanomateriais de dimensão zero, também designados como semicondutores coloidais monocristalinos, têm chamado atenção do ponto de vista científico por terem potencial na aplicação nos campos da nanotecnologia e optoeletrônica. As estratégias de obtenção desses nanocristais têm sido minuciosamente estudadas devido ao impacto direto que exercem sobre as propriedades ópticas e elétricas desses nanomateriais, as quais são, em grande parte, influenciadas por seu tamanho, forma e composição [29].

Na década de 1980, Alexei Ekimov e sua equipe desenvolveram o primeiro método para a obtenção de pontos quânticos (QDs) do sistema II-VI, como CdSe e CdTe, utilizando precursores metálicos e calcogenetos imersos em matriz vítrea. O destaque para a intensa luminescência, conforme evidenciado por Silva [30], serviu de impulso para investigações mais aprofundadas.

Em um estudo subsequente, James R. e colaboradores [31] empreenderam uma comparação abrangente das propriedades de nanocristais III-V e II-VI, concentrando-se especialmente na covalência presente nesses nanocristais. A conclusão a que chegaram é que os argumentos baseados na covalência de rede desempenham um papel significativo ao explicar as diferenças observadas na síntese de nanopartículas, na estrutura eletrônica e na dinâmica eletrônica [31].

Os pontos quânticos são notáveis como luminóforos, destacando-se em relação aos corantes luminescentes orgânicos. Em especial, pode-se destacar sua ampla faixa de absorção, emissão espectral dependente do tamanho (efeito batocrômico com aumento do tamanho), alta foto-estabilidade e tempo de vida da emissão que podem variar de várias centenas de picossegundos a dezenas de nanossegundos [32]. Tais propriedades são decorrentes do confinamento quântico, no qual os semicondutores que emitem luz quando estimulados por um campo eletromagnético externo é aplicado.

No caso da excitação com radiação no UV-vis, absorvem energia, resultando na promoção dos elétrons da banda de valência (BV) para a banda de condução (BC), que no caso dos pontos quânticos assumem níveis de energia discretos. Nesse processo forma-se uma *quasipartícula* denominada excitônico ou o par elétron-vacância. Nessa situação, a energia do *band-gap* sofre uma pequena diminuição por conta da atração eletrostática entre o elétron e o buraco.

Quando perturbados, por exemplo influenciados por um ente externo, os elétrons podem recombinar-se com os buracos liberando o excesso de energia na forma de fótons. Os efeitos de confinamento quântico levam a um *band-gap* crescente dependente do tamanho com níveis de energia quantizados observáveis.

Os níveis de energia quantizados identificados nos pontos quânticos resultam em estruturas eletrônicas que se encontram em uma posição intermediária entre moléculas individuais, caracterizadas por uma única lacuna HOMO - LUMO, e semicondutores massivos, os quais exibem níveis de energia contínuos dentro de bandas [33], conforme representado na Figura 3.

A energia absorvida que promove os elétrons é geralmente maior do que a energia dos fótons emitidos na relaxação, o que é explicado, em parte pela atração elétron-buraco e defeitos de superfície do nanomaterial. No entanto, em casos específicos, por exemplo quando os pontos quântico é dopado com um elemento lantanídeo, pode-se observar o que se é denominado *up-conversion*, ou seja, a emissão de radiação de maior energia do que a energia absorvida. A energia do fóton emitido é determinada pelo tamanho, forma e composição dos pontos quânticos, sendo por isso passíveis de ajustes quando do desenho do nanomaterial a ser produzido [34], o que é conveniente para para diversas aplicações, incluindo no desenvolvimento de sensores [35] e de marcadores para imageamento biomédico [36].

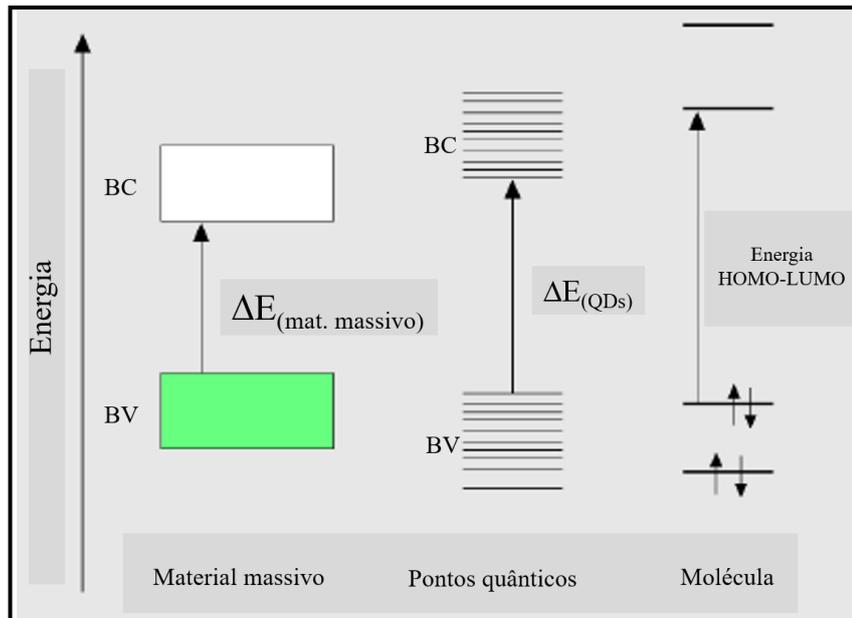


Figura 3: Esquema de de confinamento quântico, pontos quânticos e moléculas. BV é a banda de valência, BC é a banda de condução,  $\Delta E_{(\text{mat. masivo})}$  é o deslocamento de Stokes,  $\Delta E_{(\text{GQs})}$  é a energia do gap, HOMO-LUMO é semicondutores em massa com níveis de energia contínuos dentro de bandas. Fonte adaptada de [37].

O efeito de confinamento quântico torna-se evidente quando o raio de um nanocrystal de semiconductor se aproxima do raio de Bohr, resultando em um confinamento forte. Esse fenômeno leva a uma órbita restrita do elétron ao redor do buraco, formando um exciton que segue um modelo semelhante ao átomo de hidrogênio. De forma forma geral, a fotoluminescência em pontos quânticos semicondutores ocorre devido à desativação radiante  $BC \rightarrow BV$  após a excitação radiante. As emissões espectrais resultantes são estreitas e associadas à dispersão de tamanhos das nanopartículas. Notavelmente, os pontos quânticos do tipo core-shell apresentam alta eficiência quântica luminescente, frequentemente se aproximando de 1. Quando recobertos adequadamente, os QDs permanecem estáveis em meio aquoso, formando uma dispersão coloidal com uma grande área superficial propícia para interações em solução [38–40].

### 2.2.1

#### Pontos quânticos de carbono e de grafeno

Nanomateriais de carbono com as três dimensões inferiores a 100 nanômetros são comumente denominados pontos quânticos de carbono (CQDs). Quando na forma de escamas ou fragmentos de grafeno, eles são denominados pontos quânticos de grafeno (GQDs).

Esses nanomateriais baseados em carbono vem se demonstrando muito promissores na ciência e na tecnologia devido às suas propriedades que incluem a compatibilidade em meio aquoso, onde formam dispersões coloidais estáveis, a potencial biocompatibilidade, por serem essencialmente formados de carbono, resistência contra fotodegradação além das propriedades ópticas, em especial a fotoluminescência, sua natureza ecologicamente amigável tendo menor toxicidade em relação aos pontos quânticos inorgânicos de Cd e Pb, além de poderem ser obtidos por procedimentos relativamente simples. Devido a essas propriedades intrínsecas, a viabilidade do uso de CQDs/GQDs foi demonstrada em uma infinidade de aplicações em ciências de materiais, ciências químicas e ciências biológicas [41, 42].

Embora GQDs possam ser considerados como um tipo de CDs, estes geralmente possuem uma estrutura distinta. CDs são nanopartículas que tendem à esfericidade compostas por partes amorfas e cristalinas [43]. Apesar de muitos pesquisadores demonstrarem a existência da seção cristalina de carbono  $sp^2$  [44, 45], eles geralmente possuem menor cristalinidade em comparação com GQDs. Em contraste, a maioria dos GQDs é produzida a partir de grafeno, [46] óxido de grafeno (GO), [47, 48], moléculas com estrutura específica com anéis benzênicos e a partir de outros precursores que contêm carbono [49].

Para alcançar os melhores resultados em aplicações envolvendo CQD/GQD, é importante compreender que o método de produção desses materiais pode ser do tipo *top-down* e *bottom-up* [50].

O método *top-down* envolve o corte de materiais de carbono massivos convertendo o em CQD/GQD por meio de vários métodos, como exfoliação em líquido, ablação laser e técnicas de litografia por feixe de elétrons. Alguns métodos podem produzir nanomaterial rico em grupos funcionais contendo oxigênio, o que é benéfico em termos de compatibilização com meio aquoso e criação de sítios de interação. Li *et al.* [51] descreve as diferentes origens e métodos de síntese de GQDs. GQDs por meios físicos ou químicos de corte de materiais como grafeno, óxido de grafite, carvão, nanotubos de carbono ou fibras de carbono. No entanto, estas abordagens *top-down* possuem algumas desvantagens, como defeitos e falta de controle mais apurado em termos de obtenção de tamanho e forma do nanomaterial que não podem ser controlados.

As abordagens *bottom-up* parte de moléculas precursoras que formam CDs ou GQD por meio de métodos como o hidrotérmico assistido por micro-onda, reações catalisadas por metais entre outros. Comparado ao método *top-down*, a abordagem *bottom-up* permite o melhor controle de tamanho e da morfologia.

Embora CDs e GQDs possuam estruturas centrais diferentes, ambos podem ser funcionalizados com grupos na superfície e bordas, especialmente grupos funcionais relacionados ao oxigênio, como carboxila e hidroxila [52]. Esses grupos de superfície contribuem significativamente para as propriedades ópticas de CDs e GQDs e os tornam dispersíveis em meio aquoso. Além disso, heteroátomos, como nitrogênio, enxofre e outros elementos, melhoram consideravelmente a luminescência e a condutividade elétrica de CDs e GQDs, ajustando as estruturas eletrônicas [53].

A partir da descoberta acidental de materiais luminescentes de carbono, as propriedades ópticas tornaram-se um dos temas mais frequentemente estudados. Diversos CDs e GQDs com diferentes cores de luminescência, abrangendo desde o UV até a região do infravermelho próximo, foram sintetizados por várias abordagens [54, 55]. No entanto, as propriedades ópticas desses materiais são também questões controversas, especialmente em relação ao mecanismo de luminescência. O debate sobre a origem da luminescência é decorrente do comportamento peculiar em que, em alguns casos, a posição do pico de emissão pode variar de acordo com o comprimento de onda de excitação [56].

Observações experimentais inconsistentes, bem como propriedades indefinidas obtidas por diferentes abordagens, tornam a origem da luminescência mais complexa até por que as propriedades luminescentes dos CDs e GQDs são muitas vezes relacionadas aos grupos funcionais de superfície, como carboxila e hidroxila [57]. A redução ou oxidação desses grupos pode afetar totalmente as propriedades ópticas, resultando em diferentes intensidades de luz visível e PL [58]. Tal importância dos grupos de superfície na fotoluminescência dos CDs e GQDs foi confirmada por estudos usando técnicas eletroquímicas e espectroscópicas que revelaram informações sobre a dinâmica de portadores e a contribuição de diferentes centros de emissão de fótons.

Além disso, foi observado que o solvente influencia a fotoluminescência, ou seja, diferentes polaridades de solventes alteram o grau de conjugação dos carbonos  $sp^2$  nos GQDs. Isso ocorre por conta das interações eletrostáticas entre os GQDs e as moléculas do solvente, bem como por efeitos de solvatação, em que as moléculas de solvente se organizam ao redor dos GQDs, podendo distorcer ligeiramente a estrutura eletrônica das regiões conjugadas  $sp^2$ . Essas interações modulam o grau efetivo de conjugação  $\pi$  dos domínios  $sp^2$ , afetando

diretamente a estrutura eletrônica dos QDs. Conseqüentemente, o *band gap* de energia entre os níveis de energia envolvidos nas transições eletrônicas responsáveis pela fotoluminescência é alterada, resultando em diferentes energias de emissão fotoluminescente [58].

### 2.2.2

#### Fotoluminescência dos pontos quânticos

As propriedades fotofísicas únicas dos QDs inorgânicos foram as primeiras a despertar entusiasmo para aplicações em imagens e análises biológicas. A luminosidade intensa da fotoluminescência é resultado de elevados rendimentos quânticos ( $\Phi = 0,1-0,9$ ) combinados com grandes coeficientes de extinção molar ( $10^5-10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) possuindo largos perfis de absorção que aumentam continuamente em magnitude desde o primeiro pico excitônico até comprimentos de onda mais curtos no ultravioleta próximo.

As cores da fotoluminescência dos QDs resultam da variação do comprimento de onda de emissão do pico de acordo com o tamanho, morfologia e composição do nanocristal. O tamanho e a cor da fotoluminescência do QD podem ser controlados pelo ajuste da temperatura e a duração do crescimento do cristal durante a síntese. Outras propriedades ópticas vantajosas dos QDs podem incluir tempos de vida no estado excitado mais longos do que dos corantes fluorescentes orgânicos ( $> 10 \text{ ns}$ ), uma resistência superior ao fotobranqueamento e degradação química devido à composição inorgânica e confinamento do exciton, além de seções transversais de absorção de fótons ( $10^3-10^4 \text{ gigamol}$ ) que são várias ordens de magnitude maiores do que as dos corantes fluorescentes.

Dessa forma, os QDs se destacam como excelentes sondas para rastrear processos dinâmicos ao longo do tempo e para imagens de tecidos ou outros espécimes biológicos complexos, onde a excitação no infravermelho próximo ajuda a superar desafios relacionados à autofluorescência e à atenuação da luz de excitação por absorção forte de proteínas (por exemplo, hemoglobina) na região visível [59, 60].

A dependência do tamanho do QD na fotoluminescência é o resultado do efeito do confinamento quântico (QCE do inglês quantum confinement effect). Como um material em massa é reduzido a dimensões em nanoescala, a densidade de estados diminui perto da banda de condução e da banda de valência, resultando no surgimento de estados excitônicos discretos. A energia do intervalo da banda aumenta ainda mais com a diminuição do tamanho do nanocristal, pois o éxciton fica confinado a dimensões menores do que o raio de Bohr [61].

O comprimento de onda de emissão muda, pois a recombinação do éxciton ocorre entre os estados de borda da banda estados. Por exemplo, o CdSe, quando em sua forma massiva (bulk), apresenta uma energia de banda proibida (*band gap*) de 1,76 eV e um diâmetro de Bohr de 9,6 nm. Já o CdSe, quando confinado em nanoestruturas de tamanhos entre 2-7 nm, exibe uma diminuição da energia de banda proibida conforme o tamanho da partícula decresce.

Especificamente, a energia da banda proibida do CdSe nestas nanoestruturas diminui de 2,8 eV (para partículas de 2 nm) para 1,9 eV (partículas de 7 nm). Este decréscimo da energia de banda proibida é acompanhado por uma mudança no comprimento de onda da fotoluminescência, que varia de 450 nm a 650 nm. Ou seja, quanto menor o tamanho da nanopartícula de CdSe, menor será sua energia de banda proibida e maior o comprimento de onda de emissão.

A extensão da faixa na qual tanto a energia da banda proibida quanto o comprimento de onda da PL podem ser ajustados por meio do confinamento quântico depende do material que compõe o nanocristal (no caso, CdSe) e também de sua energia de banda proibida quando em forma massiva.

No caso dos GQDs, como recentemente demonstrado, esses podem ser utilizados como marcadores luminescentes universais para alvos moleculares e possibilitar a visualização, em tempo real, de dinâmicas de tráfego em células vivas [62]. De fato, existe um grande potencial para aplicação dos CDs e GQDs em função da sua luminescência e biocompatibilidade e tamanho que facilita sua difusão e interação com biomoléculas, potencialmente sem comprometer suas funções.

Entretanto, o uso generalizado dos GQDs é limitado pela falta de garantia dos procedimentos que produzam nanomateriais de forma reprodutiva tanto em termos de distribuição de tamanho, carga superficial e grau e tipo de grupos funcionais. O centro de fotoluminescência dominante dos GQDs advém do efeito de confinamento quântico dos domínios  $\pi$  conjugados, o estado de superfície/borda nos GQDs, bem como do efeito sinérgico desses dois fatores [63, 64].

Os GQDs apresentam um núcleo de grafeno e grupos químicos anexados (quantitativamente/qualitativamente), indeterminada. A emissão fotoluminescente é influenciada tanto pelo núcleo de grafeno quanto pelos grupos químicos circundantes. Especificamente, o núcleo de grafeno determina a emissão intrínseca, enquanto os grupos químicos anexados exercem controle sobre o estado da superfície [65].

No caso dos GQDs com um núcleo de grafeno perfeito e uma quantidade reduzida de grupos químicos na superfície, acredita-se que o *bandgap* dos domínios  $\pi$  conjugados seja o verdadeiro centro intrínseco da fotoluminescência.

Destaca-se o QCE, que ocorre quando os GQDs possuem dimensões do exciton menores que o raio de Bohr [66, 67]. Uma abordagem relevante para investigar a fotoluminescência do QCE é a introdução de GQDs preparados por reações orgânicas, destacando suas propriedades eletrônicas e ópticas especiais [68]. Por exemplo, Yang *et al.* investigaram a fotofísica dos GQDs sintetizados organicamente, concluindo que o estado intrínseco depende do tamanho, enquanto o deslocamento do nível de energia entre o estado intrínseco e o estado de borda determina as propriedades ópticas [64].

Se o deslocamento do nível de energia for suficientemente grande, a fotoluminescência prevalece, caso contrário, o longo tempo de vida do estado intrínseco possibilita o cruzamento intersistema para o estado excitado tripleto do estado de borda [69].

Zhu *et al.* [70] mostraram para casos específicos de carbono e hidrogênio  $C_{132}H_{34}$  e  $C_{222}H_{42}$ , é possível que os estados intrínsecos diminuam para um nível de energia inferior ao do estado de borda, resultando na perda da fotoluminescência esperada.

Na pesquisa por SK *et al.* comentaram que por meio da aplicação da teoria funcional da densidade (DFT) e cálculos DFT dependentes do tempo, torna-se possível observar que a fotoluminescência de um GQD pode ser significativamente modulada com base em seu tamanho, configuração de borda, forma, grupos químicos ligados, presença de heteroátomos e defeitos. Além disso, identificou-se que o PL de um GQDs grande que consiste em uma rede de carbono heterogeneamente hibridizada é determinada pelos pequenos aglomerados  $sp^2$  isolados, em contraste com os carbonos  $sp^3$  isolados [71].

### 2.2.3

#### **Toxicidade dos pontos quânticos de grafeno**

Para avançar nas aplicações biomédicas dos GQDs, é essencial obter uma compreensão completa de sua toxicidade. Uma das razões do crescente interesse nesses nanomateriais é atribuída, em parte, à sua estrutura essencialmente de carbono, que confere uma baixa toxicidade previsível [72, 73]. No entanto, é imperativo realizar uma análise da toxicidade dos GQDs para garantir que seu comportamento reativo e tamanho pequeno não desencadeiem respostas adversas ao serem introduzidos em qualquer sistema biológico. A disciplina dedicada ao estudo desses efeitos é conhecida como "Nanotoxicologia".

Até o momento, a nanotoxicologia tem se desenvolvido por meio de uma combinação de estudos experimentais *in vitro* e *in vivo*, bem como previsões computacionais (também conhecidas como inserções computacionais), com simulações baseadas em fenômenos biológicos complexos [74]. As

abordagens experimentais *in vitro* e *in vivo* fornecem percepções empíricas sobre os efeitos tóxicos de nanomateriais em sistemas biológicos, enquanto as previsões computacionais complementam esses estudos por meio de simulações baseadas em modelos teóricos. Essa combinação de métodos experimentais e computacionais é fundamental para o avanço da nanotoxicologia, permitindo uma compreensão mais abrangente dos mecanismos subjacentes à toxicidade em nanoescala e orientando o desenvolvimento de nanomateriais mais seguros e biocompatíveis.

### 2.2.3.1

#### Toxicidade *in vitro*

Os GQDs destacam-se pelo seu pequeno tamanho, o que lhes confere a capacidade de atuar como moléculas. Diversas rotas de produção resultam na formação de GQDs ou pontos quânticos de óxido de grafeno (GOQDs), proporcionando diferentes características físicas. Estudos foram realizados para avaliar a toxicidade *in vitro* dos GQDs, considerando grupos funcionais substituintes e métodos de produção. Resultados variados foram obtidos, destacando, por exemplo, que GQDs funcionalizados com o polietilenoglicol (PEG) apresentaram menor toxicidade em comparação com os GQDs "brutos". A biocompatibilidade do PEG reduziu reações adversas nas organelas celulares [75].

A dimensão dos GQDs-PEG também influenciou a toxicidade, uma vez que nanopartículas maiores agem de maneira distinta, agindo menos como biomoléculas. Estudos específicos, como os de Chong *et al.* [76], indicaram ausência de toxicidade em ensaios realizados em células A549 e HeLa, demonstrando viabilidades superiores a 80% em concentrações específicas. Outros pesquisadores, como Sun *et al.* [77] e Wu *et al.* [78], corroboraram esses resultados, destacando altas taxas de viabilidade celular em diferentes linhagens celulares e concentrações de GQDs.

A introdução de nitrogênio na estrutura dos GQDs, como demonstrado por Liu *et al.* [79] e Zhu *et al.* [80], também revelou baixa toxicidade em células HeLa e RSC96, respectivamente, ampliando as possibilidades de aplicação biomédica desses nanomateriais. Zhu *et al.* ainda observaram boa biocompatibilidade em células MC3T3, indicando potencial para bioimagem. A funcionalização com macromoléculas hidrofílicas, como PEG, foi crucial para superar a hidrofobicidade inerente dos GQDs em meio aquoso, contribuindo para sua estabilidade e impedindo a agregação.

O processo sintético desempenha um papel primordial na toxicidade dos GQDs, determinando suas características físicas. Diferentes vias produção

conduzem a GQDs variados, como os GoQDs, mais hidrofílicos devido aos grupos de oxigênio. Estudos específicos, como os de Zhang *et al.* [81] e Ge *et al.* [82], evidenciam a importância da síntese na obtenção de GQDs com propriedades específicas, como baixa toxicidade em células-tronco e emissão de fotoluminescência no vermelho, indicando potencial para terapia fotodinâmica.

Apesar dos estudos que demonstram a baixa toxicidade dos GQDs, a necessidade de investigações mais aprofundadas persiste, especialmente considerando diferentes tipos de células mamíferas e a possibilidade de inflamação. Estudos em macrófagos apontam efeitos na apoptose, autofagia e produção de citocinas associadas à inflamação. A genotoxicidade dos GQDs é uma área pouco explorada, mas essencial para avaliar danos a longo prazo no DNA, embora, até o momento, pareça ser insignificante quando comparada ao óxido de grafeno. Este último causa acumulação significativa de células na fase sub-G1, levando ao aumento da apoptose [78].

### 2.2.3.2

#### Toxicidade *in vivo*

Até o momento, há poucas pesquisas relatadas sobre estudos de toxicidade *in vivo*. Um estudo abrangente conduzido por Nurunnabi *et al.* [4] revelou que os GQDs carboxilados se acumularam em órgãos como fígado, baço, pulmão, rim e em células tumorais, após injeção intravenosa em seu modelo de camundongo. Além disso, análises bioquímicas séricas, avaliações histológicas e contagens completas de células sanguíneas demonstraram baixa toxicidade e ausência de danos aos órgãos após 21 dias.

Os resultados de Ge *et al.* [82] mostraram que os GQDs exibem alta capacidade de imagem de fluorescência e também capacidades de Terapia Fotodinâmica (PDT) quando injetados em camundongos. Os camundongos foram injetados com  $4 \text{ mg kg}^{-1}$  de GQDs e irradiados com luz branca (400-800 nm) nos dias 1 e 7, resultando redução do tamanho de um tumor reduzido em comparação com os controles.

Some *et al.* [83] utilizaram camundongos com tumores HCT 116 em suas costas como modelo animal. O GQD-curcumina foi identificado como um agente que inibia o crescimento do tumor e prolongava a vida em comparação com os controles de solução salina com PH controlado tamponada com tampão fosfato (PBS), GQD e óxido de grafeno duplamente oxidado (DGO). Após 24 dias, os tamanhos dos tumores nos controles foram 1000, 1027 e 1100  $\text{mm}^3$ , respectivamente, enquanto o GQD-curcumina registrou menos de 300  $\text{mm}^3$ . Apesar de o estudo não ter como objetivo principal avaliar a toxicidade dos GQDs, os resultados sugeriram que os GQDs em si não apresentam toxicidade

significativa para as células tumorais.

Huang *et al.* [84] realizaram testes *in vivo* de GQDs obtidos por esfoliação ácida e GQDs funcionalizados com ácido fólico (FA) e íon gadolínio com uma carga elétrica positiva de +3 ( $Gd^{3+}$ ) em embriões de peixe-zebra. Constatou-se que ambos tinham efeitos negligenciáveis nas taxas de eclosão e sobrevivência em comparação com o controle (sem GQDs) durante 96 h pós-fertilização, mesmo em concentrações de até  $500 \mu\text{gml}^{-1}$  de GQDs ou FA-GQDs. A única exceção foi observada para FA-Gd-GQDs a  $500 \mu\text{gml}^{-1}$ , resultando em uma notável inibição da taxa de eclosão, da ordem de  $\sim 60\%$ . A associação desse efeito com o aumento da dissociação de  $Gd^{3+}$  foi sugerida.

Esses resultados destacam a importância de considerar a toxicidade não apenas dos GQDs puros, mas também dos grupos funcionais ou medicamentos adicionados a eles [84].

Em uma investigação efetuada por Chong *et al.* [76], a toxicidade *in vivo* de PEG-GQDs em camundongos foi examinada para múltiplas doses, utilizando injeção intravenosa (IV) ou intraperitoneal (IP) ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$  a cada dois dias, ao longo de 14 dias). Os resultados indicaram que não houve diferença observável na toxicidade para os PEG-GQDs em comparação com o controle. Em contraste, alguns camundongos dosados com PEG-GO apresentaram mortalidade, atribuída ao pequeno tamanho dos PEG-GQDs, que permitiu uma eficaz eliminação, evitando o acúmulo no corpo. Análises dos principais órgãos 1 ou 40 dias após um ciclo de dosagem não revelaram diferenças em comparação com o controle [85].

#### 2.2.4

#### Aplicações dos pontos quânticos de grafeno como sondas analíticas e como marcadores de células

A modificação funcional e a formação de conjuntos de GQDs desempenham um papel fundamental em sua aplicação na tecnologia, proporcionando uma versatilidade única [86]. Dotados de grupos de ácido carboxílico em sua superfície (provavelmente nas bordas na nanoestrutura), os GQDs possibilitam a funcionalização por meio de ligações covalentes ou interações não covalentes com diversas espécies, incluindo inorgânicas, orgânicas ou biológicas [87, 88]. A funcionalização, seja covalente ou não covalente, apresenta vantagens específicas, desde o aprimoramento das propriedades ópticas [89], mediante a ligação covalente com moléculas orgânicas até a capacidade de interação com biomoléculas, impulsionando o desenvolvimento de sensores altamente eficazes para o reconhecimento de biomoléculas [90, 91]. A funcionalização dos GQDs não apenas intensifica sua luminescência, mas também confere seletividade nas

interações com espécies químicas específicas [92].

Além disso, essas estruturas baseadas em carbono destacam-se por sua biocompatibilidade, baixa toxicidade, estabilidade na fotoluminescência (PL) e resistência à degradação fotônica em comparação com pontos quânticos inorgânicos. No campo da biologia, optoeletrônica e energia, os GQDs têm atraído atenção significativa, especialmente na criação de biossensores altamente sensíveis e eventualmente, seletivos para a detecção de íons metálicos, moléculas pequenas e biomacromoléculas, oferecendo novas possibilidades para o diagnóstico de doenças, monitoramento ambiental e avaliação de segurança [93, 94].

Pesquisas recentes revelaram métodos de produção e purificação de GQDs codopados com heteroátomos, como nitrogênio (N), enxofre (S), boro (B) e fósforo (P), permitindo ajustes na lacuna de banda, densidade de elétrons e melhoria no rendimento quântico e atividade química [95–97]. A presença de grupos químicos de superfície, defeitos estruturais e dopagem de superfície com íons metálicos também influenciam significativamente na fotoluminescência dessas nanoestruturas de carbono [89, 98, 99]. Apesar dos desafios, como a necessidade de aprimorar a eficiência quântica (QY) dos GQDs e explorar novos tipos de biossensores, suas vantagens notáveis em termos de sensibilidade, seletividade, rapidez e eficiência de custo permanecem evidentes, permitindo adaptação aos requisitos específicos de diversas aplicações em termos de sondagem analítica [100–102].

#### 2.2.4.1

##### **Incerteza associada aos nanomateriais: variabilidade das propriedades e desafios para a química analítica**

Existem vários tipos de nanopartículas, como as metálicas e os pontos quânticos, com propriedades e aplicações que dependem de fatores como composição, tamanho e forma. Do ponto de vista da química analítica se o nanomaterial produz sinal ou serve como mediador para obtenção de um sinal que tem utilidade quantitativa é importante que as condições para a produção do sinal, e em consequência a condição do nanomaterial, esteja plenamente dominada.

Pode-se citar dois exemplos que ilustram a situação. As nanopartículas metálicas, por exemplo as de ouro (AuNPs), quando excitadas produzem o efeito de ressonância plasmônica localizada de superfície (LSPR) que leva a obtenção de bandas espectrais na região visível do espectro eletromagnético. Essas bandas têm formato e localização que dependem do tamanho, forma, natureza do capeamento e quantidade, que são críticas nas aplicações das AuNPs que vão desde detecção química até catálise [103–105]. Em termos de

quantidade de nanopartículas, existem modelos matemáticos que permitem a estimativa de nanomaterial disperso em solução, com base no diâmetro médio e no máximo de extinção espectral.

No entanto, foi demonstrado que dependendo da forma de produção das nanopartículas, ou seja em função de variações nos precursores, temperatura e de processo (agitação e tempo de reação) as AuNPs, como sondas, serão mais ou menos sensíveis à presença de analitos [106], no caso aminoglicosídeos, que provocam distúrbios no LSPR das AuNPs provocando variações de sinal que podem ou não serem sensíveis e/ou proporcionais em relação à concentração do aminoglicosídeo dependendo das condições de produção da partida de AuNPs.

No caso dos GQDs, Hertel [107] estudou a variabilidade nas propriedades ópticas de dispersões de pontos quânticos de grafeno funcionalizados (GQDs-GSH) e não funcionalizados (GQDs) em função das quantidades relativas e precursores e da taxa de aquecimento para fusão do nanomaterial, inclusive o grau de queima dos precursores. Verificou-se uma notável robustez nas intensidades e posição espectral da fotoluminescência das dispersões de GQDs obtidas em função das variações dos parâmetros citados, porém com maior variabilidade para as GQDs não funcionalizadas.

Ainda no caso dos GQDs e CQDs, não existe um modelo matemático que permite a estimativa de concentração de nanomateriais em dispersão. Por conta disso, vem se usando teor de carbono da dispersão como parâmetro de referência para estabelecimento de protocolos analíticos. Porém esse teor de carbono pode ter uma porção significativa de material carbônico que não necessariamente é nanomaterial (por exemplo resíduos de precursores e produtos de pirólise).

Portanto, a variabilidade e a incerteza metrológica associada são características importantes de nanomateriais estudados em química analítica. Compreender e controlar os parâmetros críticos na produção dos nanomateriais é essencial para garantir confiabilidade.

## 3

### Parte Experimental

#### 3.1

##### Reagentes e materiais

Neste estudo, os reagentes e materiais utilizados foram adquiridos de vários fornecedores. A albumina de soro humano (HSA) e o ácido desoxirribonucleico (DNA), no caso o DNA do timo de bezerro (ctDNA, da sigla em inglês *Calf thymus* DNA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA), ambos com pureza superior a 99,9 %.

O ácido cítrico e ureia foram obtidos da Merck (Alemanha), a tioacetamida da Sigma-Aldrich e o cloreto de sódio da Vetec (Brasil). O tampão Tris-HCl em que Tris refere-se a 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol, foi adquirido da Molecular Sigma Biology (Reino Unido).

Para a preparação das soluções, foi usada água ultrapura com uma resistividade inferior a  $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ , obtida de um purificador de água Milli-Q Gradient System A10 da Millipore nos (EUA). Além disso, membranas de diálise (peso molecular retido de 3,5 kDa, ou seja,  $5,811886733 \times 10^{(-24)}$  kg foram fornecidas pela Spectrum Laboratories Inc.(EUA).

#### 3.2

##### Medidas físicas

As análises de fluorescência foram realizadas em um espectrofotômetro de luminescência do modelo LS 55 da Perkin-Elmer (Reino Unido). Para a medição da luminescência, foram utilizadas cubetas de quartzo, com 1 cm de comprimento de caminho óptico. Para manter as dispersões na cubeta a temperaturas constantes e específicas, durante alguns dos experimentos de fotoluminescência, foi empregado um sistema termostático (PTP-1 Fluorescence Peltier System, em conjunto com o PCB1500Water Peltier System da Perkin-Elmer).

Os espectros de absorção molecular foram realizados em um espectrofotômetro de feixe duplo de absorção UV-Vis modelo Varian Cary 100 Conc (Austrália). A espectroscopia Raman foi realizada com um espectrômetro modelo Xplora da Horiba (Japão) equipado com um detector de dispositivo de

carga acoplada e um laser de estado sólido (laser de 532 nm) com a cor verde para excitar as soluções dos GQDs. É relevante ressaltar que a cor verde produziu melhor resposta que as cores azul e vermelho.

As medições de dispersão dinâmica de luz (DLS) foram conduzidas para obter distribuições de tamanho hidrodinâmico, distribuição de tamanho e potencial zeta dos GQDs, usando, para tal, o instrumento Nanoparticle SZ-100 da Horiba (Japão), equipado com um laser de 10 mW com comprimento de onda de 532 nm. Todas as medições foram realizadas dez vezes com um tempo de exposição de 120 s, uma temperatura de 25 °C e um ângulo de 90° ou 173°, conforme adaptação de [108].

A determinação do teor total de carbono foi feita em um analisador modelo TOC-VCPN (Shimadzu, Japão). O banho de ultrassom modelo USC-2800 da Unique (Brasil) foi utilizado para homogeneização das dispersões dos GQDs, enquanto o agitador de amostras tipo Vortex modelo NA 3600 da Norte Científica (Brasil) foi empregado para preparação da solução de HSA, deste modo diminuindo a tendência de formação de aglomerados dispersões no sistema.

Na preparação do nanomaterial foram utilizadas uma chapa de aquecimento (modelo 509 da Fisatom, Brasil) e uma chapa com agitação (modelo 751 da Fisatom, Brasil). As medições de massa foram realizadas em uma balança analítica modelo MSU da Cubis® (Alemanha), calibrada pelo laboratório Peso Exato Automação (Rio de Janeiro), acreditado pelo Inmetro. As medições de pH foram realizadas em um pHmetro modelo 827 da Metrohm (Brasil). O eletrodo utilizado foi do tipo de membrana de vidro, selado e conjugado com eletrodo de referência de Ag/AgCl(KCl(sat)). Cada etapa do processo foi meticulosamente controlada, garantindo a confiabilidade e a validade dos resultados obtidos neste estudo.

### 3.3

#### Preparação de pontos quânticos de grafeno (GQDs)

O preparo das dispersões aquosas de GQDs foi realizada seguindo uma rota já estabelecida na literatura, com pequenas modificações, conforme citado LIU, Jing-Jing *et al.* [86].

Brevemente, em três copos becker de 100 mL, nos quais 1,04 g de ácido cítrico foram misturados com 0,30 g de ureia (para produzir as denominadas GQDs-U) ou de tioacetamida (para produzir as denominadas GQDs-TAA). Ureia e tioacetamida foram utilizados para produzir funcionalização dos nanomateriais de carbono.

As misturas foram aquecidas com a chapa ajustada para 240 °C e man-

tidas até atingirem fusão, com mudança de cor para marrom claro, o que demandou entre 3-5 minutos. Neste ponto, adicionou-se diretamente aos frascos, 100 mL de água ultrapura na temperatura ambiente, promovendo assim a hidro-esfoliação do material carbonizado. Essas dispersões, denominadas de “dispersões originais de GQDs”, apresentaram coloração amarelo-claro (no caso da mistura preparada com ureia) e laranja (no caso da mistura preparada com tioacetamida) e foram mantidas em agitação por um período de 20 min.

Posteriormente, procedeu-se à diálise 50 mL das “dispersões originais de GQDs” presentes nos três copos becker de 100 mL, por 24 h, utilizando uma membrana com diâmetro de poro de 3,5 kDa, a fim de remover partículas maiores da carbonização e reduzir a concentração de resíduos de precursores. Essas dispersões foram denominadas de “dispersões dialisadas de GQDs” O procedimento empregado é simplificado na ilustração indicada na Figura 4.

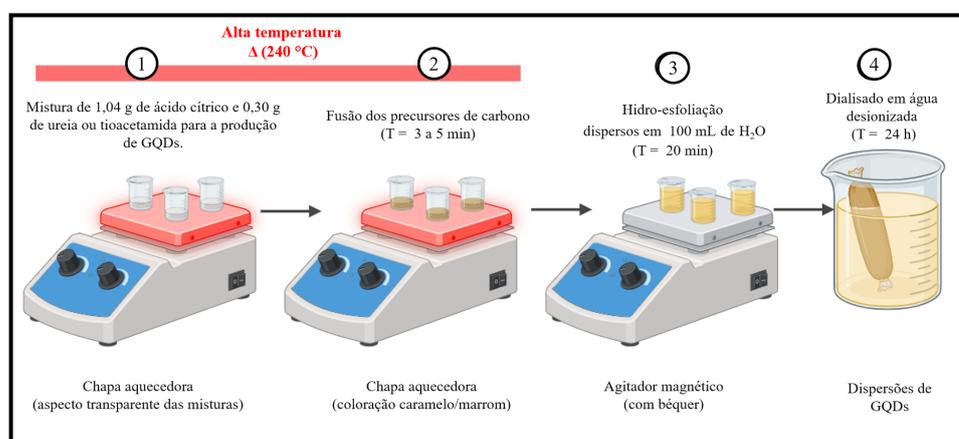


Figura 4: Fases do processo de preparação das dispersões de GQDs utilizando misturas ácido cítrico/ureia e ácido cítrico/tioacetamida. Fonte, Autora.

### 3.4

#### Medições de teor de carbono total e estimativa das concentrações de GQDs

A análise do conteúdo de carbono total (TCC) foi realizada com o objetivo de quantificar a concentração de carbono presente nas dispersões dialisadas utilizadas nos experimentos. Essa quantificação funcionou como uma referência de concentração padrão.

Para a análise, utilizou-se o injetor de líquidos de um analisador de carbono total que permitiu a medição direta das amostras. Os resultados de TCC foram reportados em concentrações de carbono expressas em  $\text{mg L}^{-1}$  inicialmente.

Contudo, quando foi necessário para os cálculos e comparações experimentais, essas concentrações em  $\text{mg L}^{-1}$  foram convertidas para  $\text{mol L}^{-1}$ . Essa

conversão baseou-se no fator de massa molar de carbono puro, que é de 12,01 g mol<sup>-1</sup>. Dessa forma, estabeleceu-se uma referência confiável e comparável entre as concentrações de carbono nas diversas dispersões empregadas no trabalho.

### 3.5

#### **Estudos morfológicos em série temporal após preparação das dispersões de GQDs**

A caracterização dos nanomateriais sintetizados (GQDs-U e GQDs-TAA) foi realizada por meio de diferentes técnicas analíticas. Logo após a preparação das dispersões dialisadas, foram obtidos os espectros de fotoluminescência e Raman como primeira etapa de caracterização. Além disso, para avaliar a estabilidade coloidal ao longo do tempo, foram feitas medições do tamanho hidrodinâmico, distribuição de tamanho e potencial zeta das nanoestruturas em suspensão. Essas análises de estabilidade foram realizadas em série temporal, nos tempos de 1, 15 e 28 dias após o preparo das dispersões.

Conforme a necessidade e os objetivos de cada técnica, diluições das dispersões foram feitas em água ou tampão Tris-HCl-NaCl pH 7,4 antes das medições. Para os experimentos de série temporal, as dispersões dialisadas foram armazenadas em geladeira (4 °C) entre as medidas. Previamente a cada novo experimento, estas passaram ainda por banho de ultrassom para garantir a dispersão adequada dos nanomateriais antes da preparação das amostras de trabalho. Dessa forma, buscou-se uma caracterização completa e confiável dos materiais.

### 3.6

#### **Preparação das soluções**

A solução tampão de Tris-salino (Tris-HCl-NaCl) foi preparada a partir de um volume de 5 mL de solução estoque comercial de tampão Tris-HCl (a 1 mol L<sup>-1</sup>) que foi diluído para 1 L com uma solução de NaCl (3,0 g L<sup>-1</sup>) para se obter de concentração final de 5 mmol L<sup>-1</sup> de Tris-HCl e 50 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl. O pH final de 7,4 foi ajustado utilizando alíquotas de solução de HCl 1 mol L<sup>-1</sup>. A solução tampão foi armazenada em geladeira (4°C).

A preparação da solução de DNA do timo de bezerro (ctDNA) foi realizada um dia antes da execução do experimento e envolveu a adição de aproximadamente 10 mg dessa biomolécula a 5 mL da solução tampão Tris-HCl-NaCl. A relação de absorvâncias de 260/280 nm determinada por espectrofotometria foi de 1,89, indicando ausência de proteínas.

A concentração de ctDNA foi determinada por espectrofotometria de absorção, utilizando a lei de Lambert-Beer, usando o coeficiente de absortividade

molar ( $\epsilon$ ) de  $6600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para a banda de 260 nm, conforme indicado na Equação 3-1, onde  $C$  representa a concentração de ctDNA (em  $\text{mol L}^{-1}$ ),  $A_{260}$  representa a absorvância na banda em 260 nm, e  $b$  é o caminho óptico (1 cm) [109]. A concentração final foi determinada como  $8,65 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$  e mantida a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

$$C = \frac{A_{260}}{6600 \cdot b} \quad (3-1)$$

A solução albumina do soro humano (HSA), a  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , foi preparada também um dia antes do experimento, permitindo sua dissolução completa sem agitação. Nesse processo, adicionou-se,  $0,3323 \text{ g}$  de HSA (com uma massa molar do monômero de  $66478 \text{ g mol}^{-1}$ ) a  $5 \text{ mL}$  de tampão Tris-HCl-NaCl. Posteriormente essa solução foi diluída, com a solução tampão Tris-HCl-NaCl, para uma concentração final de  $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  e mantida a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.7

#### Estudo temporal de interação dos GQDs e das biomoléculas

Uma avaliação da interação entre GQDs-U e GQDs-TAA com biomoléculas foi realizada visando avaliar a estabilidade dos GQDs e entender o tipo de interação envolvida. Este aspecto é importante para aplicações em nanomedicina e sensores biológicos avançados. O estudo foi realizado em pH 7,4 e temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . Os perfis de interação foram acompanhados ao longo de um período de 28 dias. Análises foram realizadas em intervalos específicos de tempo (24, 48, 72, 96, 168, 336, 504 e 672 h) para avaliar a evolução da interação.

#### 3.7.1

##### Estudo espectrofluorimétrico da interação de GQDs com HSA

Para avaliar a interação com a biomolécula HSA, realizaram-se medidas de fluorescência na presença de concentrações crescentes dos nanomateriais dialisados (GQDs-U e GQDs-TAA).

Inicialmente, partiu-se de uma solução estoque de HSA em concentração conhecida de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . Um volume de  $84 \text{ } \mu\text{L}$  desta solução estoque foi transferido para um balão volumétrico de  $25 \text{ mL}$ , completando-se o volume final com o tampão Tris-HCl-NaCl. Obteve-se, dessa forma, uma solução de trabalho de HSA com concentração adequada para os experimentos planejados.

Em seguida, um volume de  $14 \text{ mL}$  dessa solução recém preparada foi retirado e transferido para um segundo balão volumétrico de  $100 \text{ mL}$ . Novamente completou-se o volume total com adição do tampão, resultando

na solução final de HSA na concentração padronizada de  $1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> usada posteriormente na titulação com os nanomateriais dialisados.

As soluções medidas no experimento foram preparadas em balões específicos contendo, em todos, a mesma concentração de HSA ( $1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>), em meio tamponado, porém, em cada balão, contendo uma concentração específica de GQDs (estimada pelo TCC entre  $5,4 \times 10^{-6}$  a  $5,5 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> para GQDs-U e entre  $6,4 \times 10^{-6}$  a  $6,4 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> para GQDs-TAA).

As diferentes alíquotas (na ordem de  $\mu$ L), usadas na fortificação das soluções de HSA, foram obtidas de dispersões dialisadas diluídas preparadas adicionando 166  $\mu$ L dessas em balão de 50 mL antes do ajuste final de volume com solução de tampão Tris-HCl-NaCl. Os espectros de fluorescência da solução de HSA (com e sem adição de GQDs) foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 293-443 nm (banda característica do HSA) com excitação a 281 nm.

O sinal foi medido em termos de altura da banda de emissão em 348 nm. O procedimento foi repetido ao longo de um período de 28 dias (como indicado mais acima) após a preparação das dispersões dialisadas. Esse mesmo experimento foi realizado para os GQDs-U em duas diferentes temperaturas, 297 K e 313 K, com a finalidade de determinar os parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação entre a biomolécula HSA e esses nanomateriais.

### 3.7.2

#### Titulação do DNA por espectrofotometria de absorção

Nos estudos de interação entre os GQDs e o DNA, foi realizado uma titulação espectrofotométrica de absorção em que alíquotas da solução de DNA foram adicionadas diretamente na cubeta contendo um volume fixo (2,0 mL) das dispersões de GQDs em tampão. Após cada adição de solução de DNA, a cubeta foi agitada manualmente, previamente às medições absorciométricas, compensando o efeito de diluição por meio da adição de alíquota equivalente na cubeta de referência contendo solução tampão.

Os volumes adicionados (um total de seis adições) de solução de DNA variaram entre 0 a 120  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>. As dispersões usadas na titulação foram preparadas usando 100  $\mu$ L da dispersão dialisada de GQDs-U ou 300  $\mu$ L da dispersão dialisada de GQDs-TAA diretamente na cubeta de quartzo (1 cm de caminho óptico) onde se adicionou solução tampão Tris-HCl-NaCl para completar o volume final de 2 mL. A cubeta de referência continha apenas 2 mL de solução tampão. Os espectros de absorção foram adquiridos na faixa de 200 a 400 nm. O procedimento foi repetido ao longo de um período de 28 dias após a preparação das dispersões dialisadas.

### 3.8

#### Ensaio de competição pelo DNA com brometo de etídio

O estudo de competição, utilizando brometo de etídio (BET) como sonda, foi realizado por meio da espectrofluorimetria. Todas as soluções foram preparadas em meio tamponado (Tris-HCl-NaCl). A solução de BET foi preparada na concentração de  $1 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e a solução de DNA foi preparada na concentração de  $20 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. As dispersões de GQDs foram preparadas na concentração aproximada (em termos de TCC) de  $2 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. A preparação da solução do complexo BET-DNA foi feita usando 25 mL da solução de DNA onde se misturou 33 µL da solução de BET, de forma a se ter uma razão molar do aduto BET-DNA igual a 1:10.

Em 10 tubos de ensaio foram adicionados 2,5 mL da solução de BET-DNA para, em seguida, se adicionar alíquotas crescentes de volume de dispersão de GQDs (0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 13; 15; 18; 20; 23 µL). O volume de dispersão de GQDs foi mantido relativamente pequeno (> 1 % em relação ao volume da solução BET-DNA) para não haver necessidade de correção por diluição.

Após um período de repouso de 5 min, os espectros de emissão (característicos do BET-DNA) foram registrados entre 520 e 700 nm, com o comprimento de onda de excitação em 499 nm.

## 4

### Resultados e Discussão

#### 4.1

##### Características das dispersões de GQDs e valor de referência para sua concentração

Para garantir a representatividade das preparações dos diferentes GQDs, três ensaios foram realizados, no mesmo dia e usando o mesmo procedimento (hidro-esfoliação das misturas dos precursores em fusão) para GQDs-U e GQDs-TAA.

As três dispersões originais, de cada um dos tipos de GQDs, foram então misturadas para se obter a *pool* de dispersões de originais de GQDs-U e a *pool* de dispersões originais de GQDs-TAA. Após realização de diálise, para reduzir o teor residual de precursores e resíduos destes assim como de nanomateriais de tamanho menor do que 3,5 kDa, mediu-se a concentração de carbono total (TCC) de cada uma das dispersões dialisadas. Nas dispersões de GQDs-U, o valor de TCC foi de  $0,395 \text{ mg mL}^{-1}$ , enquanto para a dispersão dialisada de GQDs-TAA foi de  $0,465 \text{ mg mL}^{-1}$ . Os valores de pH dessas dispersões dialisadas foram medidos, usando a tira universal de pH, ficando na faixa de pH 4 para a dispersão de GQDs-U e pH 3 para a dispersão de GQDs-TAA.

Vale aqui fazer uma observação sobre o valor adotado como referência de concentração para os GQDs nessa dissertação, pois no caso dos pontos quânticos (QDs) de carbono, não existe um modelo teórico para estimativa de concentração destes numa dispersão coloidal.

No caso dos pontos quânticos (QDs) semicondutores inorgânicos, como os CdTe QDs e CdSe QDs, a luminescência guarda uma relação bem comportada em relação ao tamanho da nanopartícula, podendo se fazer uma correlação entre o deslocamento batocrômico e o crescimento do diâmetro da nanopartícula. Essa característica permite a proposição de equações, como a equação de Brus [110], em que, a partir do valor do comprimento de onda máximo de emissão, calcula-se o diâmetro de nanopartícula e, a partir disso e da extinção da dispersão coloidal, obtém-se uma boa estimativa de concentração de nanomaterial.

Similarmente, no caso de nanopartículas esféricas de ouro (AuNPs) ou prata (AgNPs), a posição do comprimento de onda máximo da ressonância plasmônica localizada de superfície e a informação a respeito do diâmetro médio da nanopartícula permite estimar sua concentração em dispersões coloidais [111].

Para os QDs de carbono, em especial os GQDs, o comportamento da luminescência não é tão dependente do tamanho da nanoestrutura. Além disso o empilhamento de nanofolhas pode produzir distorção na relação quantidade de nanofolhas por  $\text{cm}^3$  de dispersão, afetando assim a estimativa da concentração de GQDs. Assim, para se ter uma referência de quantidade na preparação de dispersões de nanomateriais dessa natureza adotou-se o uso do teor total de carbono (TCC). Porém, vale salientar que o TCC pode refletir também a presença de material carbônico residual da preparação dos nanomateriais (que persistem mesmo após diálise) e, além disso, como uma nanoestrutura pode ter da ordem de  $10^2$  a  $10^3$  átomos de carbono, o TCC indica um valor que é centenas de vezes maior que a concentração de fato das nanoestruturas dispersas no meio aquoso.

Os espectros de fotoluminescência dos GQDs, apresentados na Figura 5, foram obtidos com a diluição das dispersões originais sem diálise (fator de diluição de aproximadamente 100 vezes). Os espectros foram obtidos em duas situações, sendo a primeira no pH original após diluição, no caso pH na faixa de 6 para GQDs-U e pH na faixa de 5 para GQDs-TAA. Por conta dos estudos posteriores requererem o uso do pH fisiológico (pH 7,4), os espectros também foram obtidos após diluição em solução tampão Tris-HCl-NaCl.

No caso dos GQDs-U, após diluição em água, o comprimento máximo da banda de excitação foi em 348 nm, com exibição de uma banda de emissão simples e bastante simétrica, com comprimento de onda máximo em 430 nm (Figura 5 A). Para os GQDs-TAA, a banda de excitação teve máximo em 324 nm e um espectro de emissão apresentou simetria e um comprimento de onda máximo de 406 nm (Figura 5 C).

Vale salientar que, de maneira geral, o perfil espectral obtido é característico de GQDs e em concordância com resultados relatados por Padilha *et al.*, a partir de uma mistura de ácido cítrico e ureia e dopagem com Ag ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 349/441$  nm) [112] e Tabaraki *et al.* a partir de uma mistura de ácido cítrico e tioacetamida ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 340/422$  nm) [113]. Os deslocamentos de Stokes ( $\Delta\lambda$  que são a diferença entre os máximos de excitação e de emissão) foram de 83 nm (GQD-U) e 82 nm (GQD-TAA).

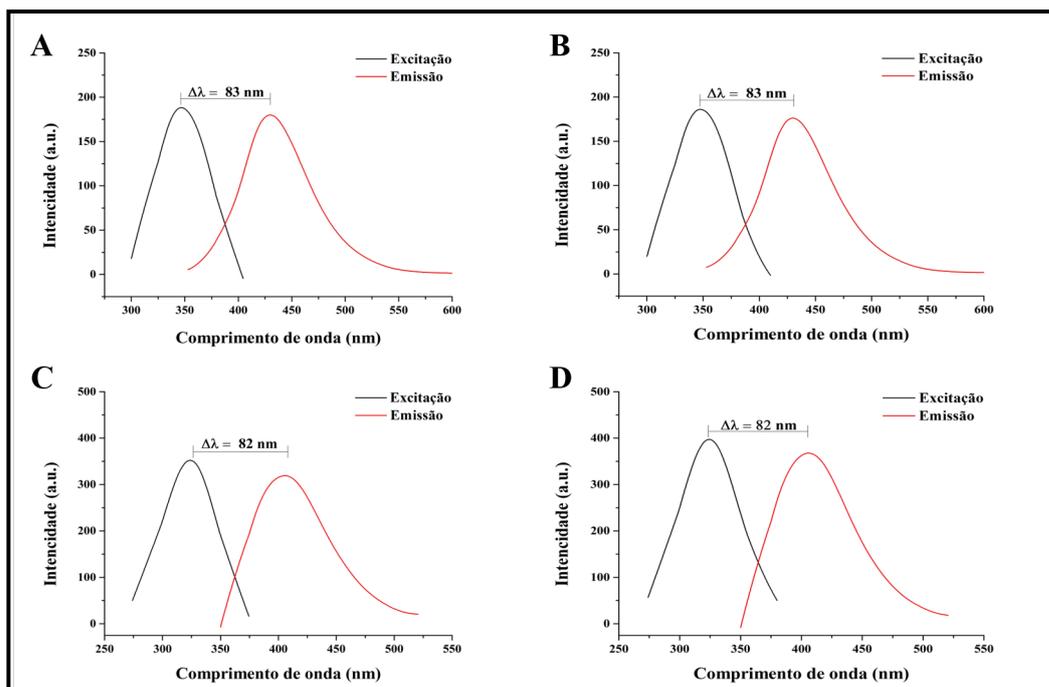


Figura 5: Espectros de excitação e emissão das dispersões originais sem diálise de GQDs: GQDs-U (A) e GQDs-TAA (C) em  $H_2O$ , além de GQDs-U (B) e GQDs-TAA (D) em tampão Tris-HCl-NaCl. Fonte, Autora.

Os espectros de fotoluminescência obtidos em pH 7,4 também apresentaram simetria das bandas e indicaram comprimentos de onda máximos de excitação e de emissão respectivamente de 338 nm e 430 nm para os GQDs-U, com  $\Delta\lambda = 83$  nm (Figura 5 B). Para as dispersões de GQDs-TAA, comprimentos de onda máximos de excitação e emissão foram respectivamente em 335 nm e 405 nm com  $\Delta\lambda = 82$  nm (Figura 5 D).

Com relação às intensidades, a fotoluminescência medida das dispersões tamponadas foi em torno de duas vezes mais intensas do que as observadas após diluição das dispersões dialisadas em água. É fato que a fotoluminescência dos GQDs pode variar, em especial em termos de intensidade, em função do pH do meio aquoso, por conta de fatores como protonação de grupos funcionalizados, mudança de densidade de carga superficial, grau de agregação, devido à variação da capacidade de repulsão eletrostática, entre outros fatores. Considerando que os GQDs possuem grupos carboxilato em sua estrutura, esses grupos pode estar desprotonados e carregados negativamente em pH 7,4, o que pode afetar sua solubilidade, estabilidade coloidal e propriedades ópticas nesse meio.

Os espectros Raman dos GQDs são apresentados na Figura 6, evidenciando distintas bandas D e G do grafeno localizadas em  $1349\text{ cm}^{-1}$  e  $1607$

$\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. A presença dessas características Raman marcantes, como as bandas D e G, está em conformidade com a predominância de átomos de carbono na configuração  $\text{sp}^2$  nas nanoestruturas gráficas. Esses resultados são consistentes com as observações anteriores feitas por Pedrozo-Peñañiel, *et al.* [108], que também observaram bandas D e G em  $1349 \text{ cm}^{-1}$  e  $1607 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, nos espectros Raman de seus GQDs. No trabalho de Pedrozo-Peñañiel *et al.* [108], eles atribuíram a banda D à presença de defeitos estruturais e bordas nos nanocristais de GQDs, enquanto a banda G foi relacionada aos modos vibracionais de estiramento das ligações  $\text{C}=\text{C}$  dos domínios  $\text{sp}^2$ . A consistência entre nossos resultados e os obtidos por Pedrozo-Peñañiel *et al.* reforça a natureza gráfica dos GQDs sintetizados, com predominância de átomos de carbono hibridizados  $\text{sp}^2$  em sua estrutura. Embora as bandas D e G sejam as principais características espectrais observadas, é importante notar que, caso os GQDs possuam grupos carboxilato em sua estrutura, estes estarão desprotonados em pH 7,4, podendo exibir bandas Raman adicionais correspondentes aos modos vibracionais desses grupos funcionais, como mencionado anteriormente.

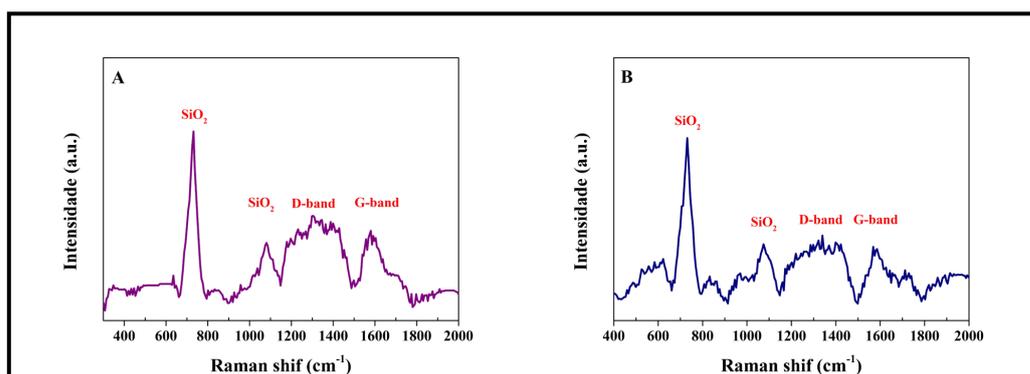


Figura 6: Espectros Raman das dispersões dialisadas de GQDs-U (A) e GQDs-TAA (B). Fonte, Autora.

Os resultados das medições de potencial-zeta, ou seja carga superficial dos GQDs dispersos em água, são apresentados na Tabela 1. Esses experimentos foram realizados em pH 7,4, após tamponamento com tampão Tris-HCl-NaCl, já que os estudos que iriam ser realizados com interação com biomoléculas estariam ajustados nesse valor de pH. Esse estudo foi realizado com duas réplicas de dispersões dialisadas (denominadas RI e RII) para avaliar a consistência dos resultados obtidos com repetição de produção de GQDs. As medições foram realizadas dentro de um período de 28 dias, com a primeira medição feita um dia (24 h) após a preparação da dispersão dialisada. As outras duas medições foram realizadas após 15 e 28 dias, sendo que, no intervalo dessas

medições, as dispersões foram guardadas em geladeira (4 °C). É importante salientar que o estudo com cada réplica das dispersões dialisadas foi realizado em um intervalo de mês diferente.

As medições revelaram valores negativos de carga superficial menores do que -10 mV com variação mínima ao longo do intervalo do experimento. Ademais, as cargas superficiais dos GQDs produzidos com os diferentes modificadores químicos (ureia e tioacetamida) foram bastante próximos, com resultados médios globais de  $-7,2 \pm 0,8$  mV para GQDs-U e  $-7,1 \pm 0,6$  mV para GQDs-TAA, considerando todos os dias medidos e resultados das duas réplicas de experimento e desvio-padrão combinado.

O valor de carga superficial levemente negativo pode, provavelmente, ser atribuído a uma fração dos grupos carboxílicos, que modificam o nanomaterial, que estariam desprotonados na condição de pH do experimento. Vale salientar que esta carga superficial, mesmo de pequeno valor, é responsável pela estabilidade das nanopartículas em dispersões coloidais. A presença da carga negativa produz repulsão eletrostática entre as nanopartículas, prevenindo a formação de agregados e, eventualmente, sedimentação, assegurando uma dispersão homogênea e estável a longo prazo. Ademais, o resultado obtido é relevante, pois mostra a consistência do nanomaterial produzido, considerando réplicas e diferença nas fontes precursoras.

Tabela 1: Potencial zeta das dispersões dialisadas de GQDs a pH 7,4.

Dia	GQDs-Ureia (mV)		GQDs-Tioacetamida (mV)	
	RI	RII	RI	RII
1	$-7,5 \pm 0,3$	$-5,4 \pm 0,3$	$-7,4 \pm 0,2$	$-7,7 \pm 0,1$
15	$-7,8 \pm 0,4$	$-8,2 \pm 0,2$	$-6,9 \pm 0,4$	$-6,2 \pm 0,3$
28	$-6,3 \pm 0,2$	$-8,1 \pm 0,5$	$-6,8 \pm 0,1$	$-7,8 \pm 0,1$
Média e desvio-padrão	$-7,2 \pm 0,8$		$-7,1 \pm 0,6$	

A análise por dispersão dinâmica de luz (DLS) dos GQDs-U e GQDs-TAA adicionou mais uma camada de compreensão, revelando diâmetros hidrodinâmicos médios desses nanomateriais em situação de dispersão coloidal. Os valores do diâmetro hidrodinâmico são apresentados na Tabela 2, indicando uma tendência de agregação do nanomaterial após o período de 15 dias no caso dos GQDs-TAA, crescendo de um valor de diâmetro médio de 5,0 nm (considerando a média de RI e RII) no dia 1 para 22,7 nm ao final do período do experimento, ou seja uma variação que mostrou tendência e foi acima do esperado (de quase cinco vezes) mesmo considerando a incerteza associada a esse tipo de medição (ver distribuições de tamanho na Figura 7). No entanto, considerando um período longo, essa agregação não foi suficiente para pro-

vocar sedimentação do nanomaterial já que o tamanho final ainda pode ser compensado pela carga superficial de forma a manter a dispersão coloidal.

Já no caso dos GQDs-U, o diâmetro médio se manteve razoavelmente constante já que não houve tendência clara de crescimento em função do tempo. O diâmetro médio no primeiro dia de medição foi de 12,4 nm, comparável ao diâmetro de 13,7 nm após 28 dias. Esse resultado mostrou a estabilidade desse sistema, que não pode ser creditada somente à carga superficial, mas talvez com o tipo de funcionalização das bordas dessas nanopartículas feitas com ureia em relação às produzidas com tioacetamida. É possível que nos GQDs-U os grupos funcionais contendo nitrogênio, os quais poderiam estar protonados em pH 7,4. Contribuam para tornar o potencial zeta dos GQDs-U menos negativo, porém ainda haveria certa repulsão eletrostática entre as nanopartículas pois o balanço geral de cargas resultaria no impedimento da agregação excessiva, contribuindo para a estabilidade coloidal observada, juntamente com o efeito da funcionalização das bordas com grupos provenientes da ureia.

Essas interações complexas podem ser influenciadas por uma variedade de fatores, como forças de van der Waals, interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e interações de solvatação [114].

A influência dessas forças pode levar à formação de agregados, resultando, conseqüentemente, em um aumento no diâmetro hidrodinâmico, conforme evidenciado pelos resultados para GQDs-TAA. Essas observações encontram respaldo nos resultados de estudos anteriores [115, 116].

Tabela 2: Diâmetro hidrodinâmico das dispersões dializadas de GQDs a pH 7,4.

Dia	GQDs-Ureia (nm)		GQDs-Tioacetamida (nm)	
	RI	RII	RI	RII
1	8,1 ± 2,0	16,6 ± 2,4	4,4 ± 1,6	5,6 ± 3,7
15	6,7 ± 1,9	10,3 ± 3,6	5,6 ± 2,0	8,1 ± 3,5
28	12,4 ± 2,4	14,9 ± 5,1	19,1 ± 4,4	26,3 ± 5,3
Média e desvio-padrão	11,5 ± 7,6		11,5 ± 8,9	

As distribuições de diâmetro hidrodinâmico são mostrados na Figura 7 (A e B para as réplicas de GQDs-U e C e D para as réplicas de GQDs-TAA). Essas distribuições mostram claramente a tendência de crescimento para os GQDs-U ao contrário do que pode ser constatado ao se observar as distribuições dos GQDs-TAA.

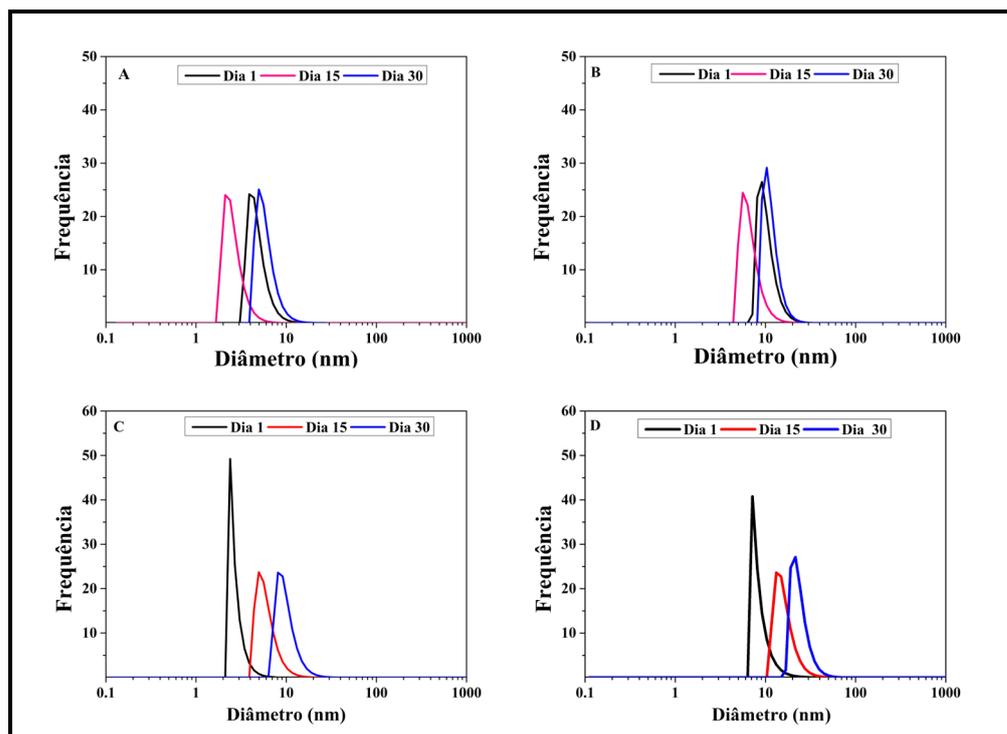


Figura 7: Diâmetro hidrodinâmico dos GQDs-U: (A) réplica (RI), (B) réplica (RII) Diâmetro hidrodinâmico dos GQDs-TAA: (C) réplica (RI), (D) réplica (RII). Fonte, Autora.

Apesar da pequena variação observada no caso dos GQDs-TAA, existiu uma consistência de perfil de distribuição nas réplicas de ambos os precursores, GQDs-U e GQDs-TAA, o que é fundamental em termos da confiabilidade nas aplicações analíticas de imageamento desses nanomateriais. As distribuições indicadas na Figura 7 visualmente reforça essa consistência, exibindo sobreposições nas distribuições de tamanho para as diferentes réplicas. Esses achados enfatizam a uniformidade nas características hidrodinâmicas, consolidando a confiança na metodologia utilizada de preparação das dispersões dos GQDs.

## 4.2

### Experimentos de interação com biomoléculas (HSA/DNA)

Compreender o tipo de interação envolvida entre uma sonda e uma biomolécula é um aspecto importante no que diz respeito a aplicações em nanomedicina e sensoriamento biológico avançado. Estudos dessa natureza têm implicações significativas no desenvolvimento de nanomateriais funcionais para diversas aplicações biotecnológicas. Nesta dissertação, os dois diferentes GQDs foram avaliados em função de suas interações com duas biomoléculas-modelo: a Albumina de soro humano (HSA) e o ácido desoxirribonucleico (DNA), especificamente o DNA do timo de bezerro (ctDNA).

### 4.2.1

#### Estudo da Interação entre HSA e GQDs

A fluorescência intrínseca do HSA é principalmente atribuída a um único resíduo de triptofano (W214) e dezenove resíduos de tirosinas, localizados na região de Sudlow I [117]. A fluorescência do HSA exibe uma notável sensibilidade às condições do ambiente em seu entorno imediato, nos quais fatores locais e a presença de outras espécies químicas podem exercer influência [118]. Por conta disso, o HSA é um excelente bio-indicador.

Por meio da espectroscopia de fluorescência, informações sobre o mecanismo de interação de uma espécie química com o HSA podem ser obtidas em função do tipo de supressão da fluorescência da HSA [119], permitindo a estimativa da constante de supressão estática ( $K_b$ ) entre a espécie química em estudo e o HSA, ou seja, a constante de Stern-Volmer ( $K_i$ ) no caso da supressão dinâmica e a constante  $K_b$  no caso de supressão estática.

De forma a se avaliar a afinidade dos dois tipos de GQDs com o HSA, a partir do mecanismo de supressão de fluorescência, diferentes alíquotas das dispersões diluídas dos GQDs foram adicionadas à balões volumétricos de 10,00 mL contendo HSA em tampão Tris-HCl-NaCl. Após adição dos GQDs, o volume dos balões foi ajustado, de tal forma que a concentração de HSA fosse constante ( $1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>), e as concentrações de GQDs (estimadas pelo teor de carbono em termos de mol L<sup>-1</sup>) variassem na ordem dentro da ordem de grandeza de  $10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em termos de TCC (o que seria da ordem de  $10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> em termos de nanomateriais contendo da ordem de  $10^2$  carbonos por nanoestrutura).

O conteúdo de cada balão foi transferido para a cubeta de forma a se fazer a varredura (de 293 a 443 nm, com excitação em 281 nm) para obter a banda de emissão de fluorescência característica do HSA. Nessa condição foi constatado que não ocorre efeito filtro imposto pelo nanomaterial, pois em 281 nm a extinção do nanomaterial é baixa e no experimento o TCC é da ordem de  $10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Esse experimento foi repetido na temperatura ambiente do laboratório (em torno de 298 K), em intervalos de tempo de envelhecimento das dispersões de GQDs (24, 48, 72, 96, 168, 336, 504 e 672 h) permitindo o cálculo da constante de supressão provocada pelos GQDs na fluorescência do HSA.

O conjunto de espectros típicos de um experimento de supressão de HSA com GQDs-U e com GQDs-TAA são mostrados respectivamente na Figura 8 A e Figura 8 B com as curvas normalizadas de supressão (Figura 8 B e Figura 8 D) cujas sensibilidades são usadas para estimar os valores das constantes de interação.

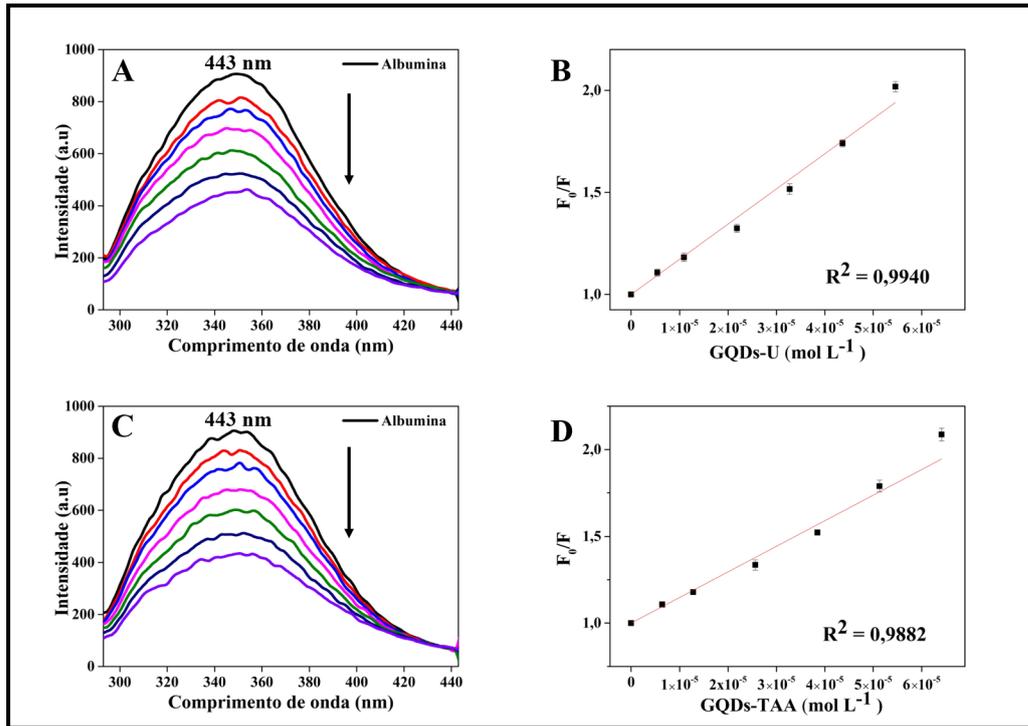


Figura 8: (A-C), Os espectros de fluorescência da HSA (a 298 K) obtidos na ausência e na presença de quantidades crescentes do supressor (GQDs-U ou GQDs-TAA), com  $\lambda_{ex} = 281$  nm e utilizando tampão tris-HCl- NaCl (pH = 7,4). As concentrações utilizadas foram  $[HSA] = 1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> e  $[GQDs]$  variando de 0 a  $5,45 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> (GQD-U) e 0 a  $6,41 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> (GQD-TAA). Os gráficos de fluorescência em função de  $[GQDs]$  são apresentados nas Figuras (B-D), que indicam, como exemplo, os resultados obtidos após 72 h para GQDs-U e 96 h para GQDs-TAA.

Nesse contexto a intensidade de fluorescência ( $F$ ) medida das soluções de HSA na presença de GQDs foi normalizada pelo sinal medido da solução de HSA na ausência de GQDs ( $F_0$ ), para estabelecer uma relação matemática de sinal normalizado ( $F_0/F$ ) em função da concentração estimada de GQDs-U. Dessa forma a constante de supressão ( $K_i$ ) foi obtida da sensibilidade da curva. Podendo ainda se extrair a constante de velocidade de supressão bimolecular ( $K_q$ ) a partir da relação indicada na Eq. 4-1, conhecida como equação de Stern-Volmer [120] em que,  $\tau_0$  refere-se à ordem de tempo de meia-vida da HSA (valor típico utilizado foi  $(10^{-8}$  s) na ausência do supressor, e  $[Q]$  representa a concentração do supressor [121, 122], no caso, a concentração de GQDs-U estimada a partir do TCC.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_i [Q] = 1 + K_q \times \tau_0 \times [Q] \quad (4-1)$$

Na medida em que a quantidade de GQDs era aumentada, observou-se

uma redução na intensidade da banda de emissão do HSA. Tal efeito pode estar associado à uma combinação de longo prazo das duas espécies (GQDs e HSA) que resulta num mecanismo estático de supressão. Por outro lado, caso o efeito de supressão seja causado por colisões entre as duas espécies, no tempo em que o HSA se encontra no estado excitado, não haverá interação de longo prazo, apenas a imediata transferência de energia do fluoróforo para o supressor (mecanismo de supressão dinâmica) [123].

Na Tabela 3, são mostrados os valores de  $K_i$  e de  $K_q$  extraídos do experimento. Primeiramente, os resultados foram bastante consistentes em relação às réplicas (RI e RII), o que mostrou repetibilidade de comportamento levando em conta que houve em torno de 1 mês entre cada experimento (réplica). Ademais, os valores de  $K_i$  e de  $K_q$  foram estatisticamente iguais independentemente do tipo de GQDs o que mostra certa robustez na produção do nanomaterial funcionalizado independentemente do modificador químico usado. É interessante frisar que, no caso da tioacetamida, funcionalizações com N e S eram esperadas diferentemente da funcionalização apenas com N no caso do uso da ureia.

Tabela 3: Valores de  $K_i$  e  $K_q$  associados à supressão da fluorescência da HSA na presença de GQDs/HSA, avaliados em 298 K.

Réplicas de GQDs	Constante de interação	Constante de velocidade
	$K_i(L mol^{-1})$	de supressão biomolecular* $K_q(L mol^{-1} s^{-1})$
<b>GQDs-U (RI)</b>	$(1,6 \pm 0,3) \times 10^4$	$(1,6 \pm 0,3) \times 10^{12}$
<b>GQDs-U (RII)</b>	$(1,7 \pm 0,2) \times 10^4$	$(1,7 \pm 0,2) \times 10^{12}$
<b>GQDs-TAA (RI)</b>	$(1,5 \pm 0,7) \times 10^4$	$(1,5 \pm 0,7) \times 10^{12}$
<b>GQDs-TAA (RII)</b>	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^4$	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^{12}$

\*  $\tau_0 = 10^{-8}$  s

Destaca-se que os valores obtidos para  $K_q$  apresentam uma magnitude com duas ordens de grandeza superior ao coeficiente de difusão típico da HSA ( $2,0 \times 10^{10} L mol^{-1} s^{-1}$ ) [124], situação essa que evidencia contribuição de mecanismo estático no processo de supressão, concordando com estudos anteriores no caso para moléculas discretas [121, 125]. Experimentos de supressão de fluorescência de HSA, similares aos citados acima, foram feitos para estudar a interação dos GQDs (no caso foi testado apenas o GQDs-U como modelo) com HSA, porém usando duas temperaturas diferentes e constantes fixadas em 297 K e 313 K. As curvas nas duas diferentes temperaturas foram construídas num mesmo dia e após aproximadamente 60 dias da preparação da dispersão de GQDs-U dialisada. Esse experimento visou aprofundar o entendimento sobre o mecanismo responsável pela supressão de fluorescência do HSA, ou seja, o

tipo de interação entre essas espécies químicas. As curvas normalizadas de fluorescência ( $F_0/F$ ) em função da concentração de GQDs-U (em termos de TCC) são mostradas na Figura 9 e os respectivos valores de  $K_i$  e  $K_q$  se encontram na Tabela 4.

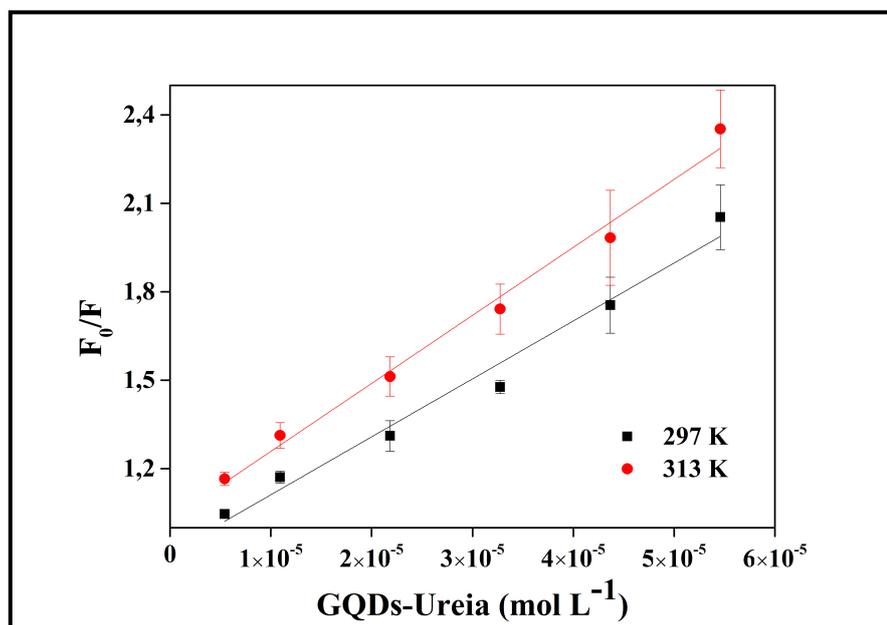


Figura 9: Gráficos normalizados de fluorescência em função da concentração de GQDs-U (em termos de TCC) em 297 K e 313 K.

Os resultados apontam claramente para uma inequívoca diferença entre os valores de sensibilidade (ver valores de  $K_i$  na Tabela 4.), sendo tal diferença em termos dos valores de  $K_i$  de 1,4 vezes. Outra constatação foi a de que a sensibilidade observada em 313 K foi maior do que a obtida em 297 K, indicando que o aumento da temperatura provocou maior efeito de supressão, comportamento esse típico de supressão dinâmica conforme destacado por Moreira *et al.*[122].

Embora a curvatura típica de eventos mistos não seja observada claramente nos gráficos normalizados; na curva obtida em 297 K se observa uma leve curvatura, corroborada pela degradação do coeficiente de determinação da regressão linear ( $R^2 = 0,972$ ), o que pode indicar que um processo de supressão misto esteja ocorrendo. Já no experimento feito em 313 K, a supressão dinâmica é amplificada com a contrapartida da diminuição da efetividade da supressão estática, o que leva, graficamente, para um melhor ajuste linear (no caso  $R^2 = 0,994$ ).

Tabela 4: Valores de  $K_i$  e  $K_q$  associados à supressão da fluorescência da HSA na presença de GQDs/HSA, avaliados em 297 e 313 K.

GQDs	T (K)	Constante de interação	Constante de velocidade
		$K_i(L mol^{-1})$	de supressão biomolecular*
			$K_q(L mol^{-1} s^{-1})$
GQDs-U	297	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^4$	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^{12}$
	313	$(2,3 \pm 0,3) \times 10^4$	$(2,3 \pm 0,3) \times 10^{12}$

\* $\tau_0 = 10^{-8}$  s

Em síntese, qualitativamente, conclui-se que o processo de supressão pode estar ocorrendo de maneira mista, incorporando componentes estáticos e dinâmicos [122], porém prevalecendo o efeito dinâmico. A interação entre HSA e os GQDs foi avaliada também por meio do valor da constante de ligação  $K_b$ , que é obtida a partir da modificação da equação de fluorescência normalizada em função da contração do supressor, conforme expresso na Eq.4-2, em que  $F_0$  e  $F$  e  $[Q]$  já foram definidos e  $n$  corresponde o número de sítios de interação que o supressor ocupou na estrutura da proteína (HSA).

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad (4-2)$$

Os valores de  $\log K_b$  e de  $n$  foram obtidos respectivamente a partir do coeficiente linear e angular da curva e são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5: Constante de formação aparente  $K_b$ , número de sítios de ligação ( $n$ ) e parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação entre HSA e os GQDs em 298 K.

Réplicas de GQDs	Afinidade de ligação		
	$K_b$ ( $mol L^{-1}$ )	$n$	$\Delta G^\circ$ ( $kJ mol^{-1}$ )
GQDs-U (RI)	$(5,9 \pm 0,8) \times 10^5$	$1,2 \pm 0,2$	-3,05
GQDs-U (RII)	$(6,0 \pm 0,2) \times 10^5$	$1,2 \pm 0,2$	-2,97
GQDs-TAA (RI)	$(7,4 \pm 0,5) \times 10^5$	$1,1 \pm 0,1$	-3,88
GQDs-TAA (RII)	$(4,9 \pm 0,5) \times 10^5$	$1,0 \pm 0,2$	-3,66

Novamente se observou uma boa aproximação entre os valores medidos para as réplicas de GQDs e que os valores de  $K_b$  são similares e da ordem de  $10^5 mol L^{-1}$ . Porém, vale ressaltar que esses valores estão superestimados por conta de maior contribuição de supressão produzida por colisões (supressão dinâmica).

Porém, a partir dos valores supostos de  $K_b$ , a literatura destaca que valores na faixa de  $10^3$  a  $10^6$  indicam a relevância das interações de atração, capazes de facilitar o transporte de compostos pela corrente sanguínea através da proteína [125]. Nesse contexto, os resultados obtidos para ambos GQDs podem validar a existência de mecanismo estático com ligação dos GQDs em algum sítio da proteína. A observação de um valor de  $n$  próximo a 1 mostra que essa interação ocorre em um único sítio que, no caso seria sítio I de Sudlow sendo isso também sugerido em outras fontes da literatura onde se tem informações a respeito de outros complexo QDs-HSA [126, 127].

Considerando que os valores para  $K_b$ , da tabela 5, advém de processo estático, a energia livre de Gibbs padrão ( $\Delta G^\circ$ ) foi estimada usando a Eq.4-3, encontrando-se o valores levemente negativos, da ordem de  $-3 \text{ kJ mol}^{-1}$ , indicados na tabela 5, que apontam para espontaneidade do processo de ligação, novamente partindo do princípio de que a supressão seja 100 % de natureza estática.

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_b \quad (4-3)$$

A análise dos parâmetros termodinâmicos e de força motriz entre GQDs e HSA é importante para avaliar a espontaneidade do processo ( $\Delta G$ ) e compreender os diferentes tipos de forças intermoleculares envolvidas no reconhecimento intermolecular entre GQDs e o sítio de ligação na biomolécula [128, 129].

Conforme a literatura consultada, quando  $\Delta H > 0$  e  $\Delta S > 0$ , as interações são predominantemente hidrofóbicas; em contraste, quando  $\Delta H < 0$  e  $\Delta S < 0$ , observam-se ligações de hidrogênio, com ou sem interações de forças de van der Waals. Por fim, para  $\Delta H > 0$  e  $\Delta S < 0$ , o processo de complementariedade é regido por interações expressivamente eletrostáticas [130–132]. A variação de entalpia ( $\Delta H$ ) do processo foi estimada a partir do valor de  $\Delta H^\circ$  obtida pela equação de van't Hoff (Eq.4-4), que pode ser relacionada com as variações de entropia ( $\Delta S$ ) e de energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) por meio da equação Eq.4-5.

$$\ln \left[ \frac{K_1}{K_2} \right] = \frac{\Delta H^\circ}{R} \left[ \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right] \quad (4-4)$$

$$\Delta G = -\Delta H - T\Delta S \quad (4-5)$$

Usando o sistema GQDs-U/HSA como modelo e a partir dos valores supostos para as constantes de ligação  $K_{b1}$  e  $K_{b2}$ , obtidos respectivamente a 297 K e 298 K, na Eq.4-4 (em que R é a constante dos gases igual a  $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ), obteve-se, um valor de  $\Delta H$  de  $-25 \text{ kJ mol}^{-1}$ , o que indica que o processo é exotérmico. Desta forma os valores de  $\Delta G$  são negativos assim

como os valores de  $\Delta S$  (Tabela 6). Assim, pode-se afirmar que o processo de supressão ocorre espontaneamente, sendo entálpicamente favorável ( $\Delta H < 0$ ) sendo a condução do processo de supressão orientada entropicamente, através da formação de ligações de hidrogênio (com ou sem interações de forças de van der Waals) entre GQDs e a HSA [131, 133, 134]. A fração de GQDs que se liga ao HSA também provocou diminuição da entropia do sistema ( $\Delta S < 0$ ).

Tabela 6: Constante de formação aparente  $K_b$ , número de sítios de ligação ( $n$ ) e parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação entre HSA e os GQDs em 297 a 313 K.

Réplicas de GQDs	T (K)	Afinidade de ligação				
		$K_b$ ( $mol L^{-1}$ )	$n$	$\Delta H$ ( $kJ mol^{-1}$ )	$\Delta S$ ( $J mol^{-1} K^{-1}$ )	$\Delta G$ ( $kJ mol^{-1}$ )
GQDs-U	297	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^5$	$1,19 \pm 0,06$	-25	-5,4	-95
	313	$(1,5 \pm 0,5) \times 10^5$	$0,96 \pm 0,02$			

Nas Figuras 10 e nas Figuras 11 são mostradas as variações dos valores das constantes  $K_i$  e  $K_q$  além dos dados afinidade ( $n$ ) obtidos na série temporal do estudo realizado em duas réplicas. No caso da interação GQDs-U/HSA observou-se, de maneira geral, uma oscilação dos dados experimentais dentro do período até 48 h, ocorrendo então uma tendência de estabilização dos valores de  $K_i$ ,  $K_q$  e  $n$  até 672 h após a preparação da dispersão dialisada. Tal oscilação pode estar relacionada com a estabilização de carga e processos de esfoliação e crescimento/empilhamento das nanoestruturas nas primeiras horas de preparação. Assim que os parâmetros morfológico e de carga se estabilizam, os valores calculados tendem a se manter constantes. Por outro lado, os dados apontam, desde o princípio, que existe apenas um sítio de interação.

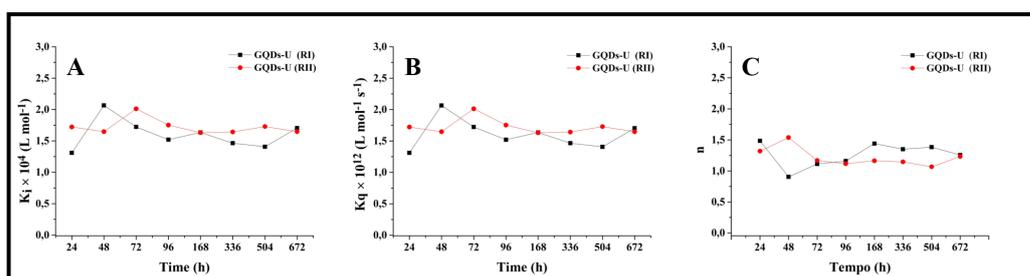


Figura 10: Gráficos de tendência: (A) Constante de extinção de Stern-Volmer ( $K_i$ ), (B) Constante de extinção bimolecular ( $K_q$ ) e (C) O número de sítios de ligação ao ligante ( $n$ ) em relação à interação de GQDs-U com HSA.

Para a interação GQDs-TAA/HSA notou-se que os valores obtidos para os parâmetros  $K_i$ ,  $K_q$  e  $n$  tiveram uma oscilação menor ao longo do tempo de estudo de interação desses GQDs com o HSA, com menor dispersão dos valores

e sem aumento ou decréscimo sistemático. Ou seja, aparentemente interação GQDs/HSA tendeu à alcançar uma posição de equilíbrio mais facilmente. Assim como para o sistema GQDs-U/HSA, houve, desde o princípio, indicação clara da existência de apenas um sítio de interação.

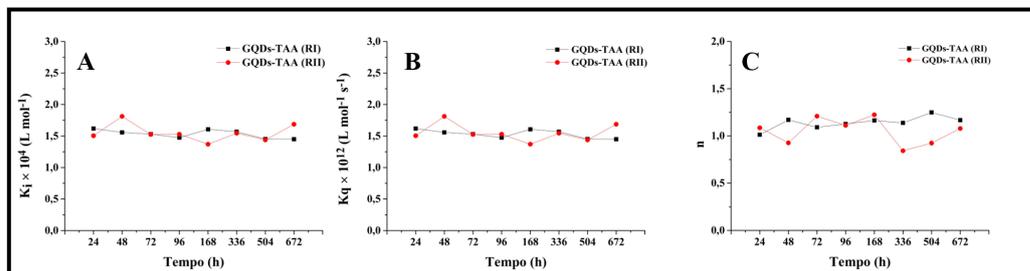


Figura 11: Gráficos de tendência: (A) Constante de extinção de Stern-Volmer ( $K_i$ ), (B) Constante de extinção bimolecular ( $K_q$ ) e (c) O número de sítios de ligação ao ligante ( $n$ ) em relação à interação de GQDs -TAA com HSA.

Uma avaliação estatística do comportamento da interação dos GQDs com o HSA foi realizada usando os valores de  $K_i$  obtidos do estudo temporal. Na Tabela 7, são mostrados os valores de  $K_i$  e desvios-padrões (da regressão que gerou  $K_i$  como sensibilidade) para o sistema GQDs-U/HSA, de forma a melhor visualizar os dados que seriam testados estatisticamente.

Tabela 7: Valores de  $K_i$  e desvio-padrão (da regressão linear) para o sistema GQDs e HSA em função do tempo após a preparação da dispersão dialisada de GQDs-U.

Tempo (horas)	Valor de $K_i$ (GQDs-U/HSA) $L \text{ mol}^{-1}$	
	Réplica	
	RI	RII
24	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^4$	$(1,7 \pm 0,2) \times 10^4$
48	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^4$
72	$(1,7 \pm 0,1) \times 10^4$	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^4$
96	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,7 \pm 0,1) \times 10^4$
168	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^4$	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^4$
336	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^4$
504	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,7 \pm 0,2) \times 10^4$
672	$(1,7 \pm 0,2) \times 10^4$	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^4$

A primeira avaliação foi realizado com o teste de Shapiro-Wilk para verificar se os dados das amostras (GQDs-U/HSA) seguem uma distribuição

normal. Isso foi feito pela combinação dos conjuntos de dados RI e RII dos GQDs-U/HSA. O resultado mostrou um valor  $W$  de 0,93 e um valor- $p$  de 0,23. Como o valor- $p$  é maior que o nível de significância comumente utilizado (0,05), não há evidência suficiente para rejeitar a hipótese nula de normalidade. Sendo assim, foi possível proceder com a análise de variância (ANOVA de uma variável).

De maneira geral, os resultados da ANOVA de uma variável para os valores RI e RII mostraram que, em função do fator "Tempo", não há um efeito significativo nas médias de ambos os valores. Para RI, o valor  $F$  associado ao fator "Tempo" é de 0,12, com valor  $p$  de 0,73.

Para RII, o valor  $F$  é de 0,74, com valor  $p$  de 0,42. Como ambos os valores  $p$  são maiores do que o nível de significância de 0,05, não há evidência suficiente para concluir que existem diferenças significativas nas médias de RI e RII entre os diferentes tempos.

Por fim, o teste  $t$  de *Student* pareado comparou diretamente as médias de RI e RII. O resultado mostrou um valor  $t$  de -1,25, com 7 graus de liberdade e valor  $p$  de 0,24. Isso indica que não há evidência para rejeitar a hipótese nula e que a diferença média entre RI e RII é igual a zero. Ou seja, não foram encontradas diferenças significativas entre as médias de RI e RII.

O teste  $t$  de *Student* pareado ( $t$ -pareado) fornece uma avaliação robusta e específica das diferenças entre as amostras emparelhadas de RI e RII, complementando a ANOVA ao focar na relação direta entre RI e RII nos mesmos dados.

Embora a ANOVA não tenha apontado diferenças significativas entre os tempos, o teste  $t$ -pareado analisou mais a fundo a diferença entre RI e RII. No geral, os resultados sugerem que o tempo não influencia significativamente as diferenças entre RI e RII, proporcionando uma avaliação mais consistente da relação entre os dados e o tempo.

Tabela 8: Valores de  $K_i$  e desvio-padrão (da regressão linear) para o sistema GQDs e HSA em função do tempo após a preparação da dispersão dializada de GQDs-TAA.

Tempo (horas)	Valor de $K_i$ (GQDs-TAA/HSA)	
	$L \text{ mol}^{-1}$	
	Réplica	
	RI	RII
<b>24</b>	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^4$
<b>48</b>	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^4$
<b>72</b>	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^4$
<b>96</b>	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^4$
<b>168</b>	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^4$
<b>336</b>	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^4$
<b>504</b>	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^4$
<b>672</b>	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^4$

Para o conjunto de dados GQDS-TAA/HSA, foram aplicadas as mesmas análises estatísticas realizadas anteriormente. Nesse sentido, o teste de Shapiro-Wilk foi obtido pela combinação dos conjuntos de dados RI e RII dos GQDs-TAA/HSA. O valor de W encontrado foi de 0,94, com valor p associado de 0,36. Como o valor p é maior que o nível de significância usual de 0,05, não há evidência suficiente para rejeitar a hipótese nula. Portanto, com base nesse teste, conclui-se que os dados combinados das amostras RI e RII seguem uma distribuição normal com nível de confiança de 95 %.

Na avaliação por ANOVA de uma variável, obteve-se os seguintes resultados: para RI, o valor de F associado ao fator "Tempo" foi de 4,40, com valor p de 0,08; para RII, o valor de F foi de 0,009 com valor p de 0,92. Como os valores p são maiores que o nível de significância de 0,05, não há evidência para rejeitar a hipótese nula de que não existem diferenças significativas entre as médias dos grupos RI e RII em função da variável "Tempo".

Em seguida, realizou-se o teste  $t$  de *Student* pareado para comparação das médias das duas amostras emparelhadas RI e RII. Os resultados mostraram valor  $t$  de -0,32 com 7 graus de liberdade e valor p de 0,75. A hipótese alternativa era de que a diferença média real não fosse igual a zero. Resumidamente, não encontramos evidência para rejeitar a hipótese nula de igualdade das médias entre as amostras emparelhadas RI e RII.

Com base nos resultados estatísticos apresentados, pode-se concluir que as amostras RI e RII são estatisticamente semelhantes. Não foram encontradas diferenças significativas entre as médias de RI e RII, seja ao longo do tempo

(ANOVA) ou na comparação direta entre as amostras emparelhadas (teste *t* pareado). Essa semelhança estatística reforça a conclusão de que a interação entre os GQDs e a biomolécula HSA é estável e relativamente forte ao longo do tempo.

O encadeamento lógico dos testes estatísticos aplicados, juntamente com a concordância de seus resultados, confere robustez e coerência às conclusões obtidas neste estudo.

A partir do estudo com a biomolécula HSA, pode-se afirmar que a interação com os GQDs é estável e relativamente forte, sugerindo o potencial desses nanomateriais como sondas que podem ser distribuídos pelo organismo por meio da HSA, a principal via de transporte de uma variedade de substratos (endógenos e exógenos) através da corrente sanguínea. Os resultados estatísticos corroboram a conclusão de que não foram observadas diferenças significativas na interação entre os GQDs e a HSA ao longo do tempo, demonstrando a estabilidade dessa interação e fundamentando o potencial de aplicação dos GQDs como sondas distribuídas via HSA.

### 4.3

#### **Estudos de ligação com DNA: Titulação espectrofotométrica**

Os GQDs são capazes de formar complexos com o DNA [135–137]. A presença de anéis conjugados na estrutura dos GQDs confere-lhes uma geometria predominantemente planar e a hibridização  $\pi$  dos átomos de carbono, constituintes na nanoestrutura, possibilita o deslocamento eletrônico da nuvem de elétrons  $\pi$  acima e abaixo do plano desses átomos. Essa configuração sugere que esses nanomateriais têm a capacidade de interagir com a estrutura de dupla hélice do DNA por meio de interações de empilhamento  $\pi - \pi$  [135–137].

A interação dos GQDs com oligômeros de DNA tem sido objeto de estudo em diversas pesquisas [138, 139]. Os GQDs, com suas estruturas heterocíclicas planas, podem interagir com o DNA de maneira semelhante a ligantes planos de complexos metálicos, como fenantrolina e dipiridofenazina [140, 141]. É importante observar que os GQDs são constituídos essencialmente de carbono (C) e hidrogênio (H), podendo ter funcionalizações nitrogenadas e sulfuradas, dependendo do precursor utilizado na sua preparação. Durante sua produção sofrem oxidação parcial, introduzindo grupos funcionais como hidroxila, epóxi/éter, carbonila e carboxila em suas superfícies [99, 139, 142]. Esses grupos desempenham um papel fundamental na formação de interações eletrostáticas ou ligações hidrogênio [61, 143].

No contexto da espectroscopia UV-Vis, as bandas de absorção dos GQDs podem sofrer deslocamentos para comprimentos de onda mais longos

(batocrômicos) ou mais curtos (hipsocrômicos), além manifestar hiper ou hipocromismo ao formarem adutos com o DNA. A característica espectral do aduto pode ser associada ao tipo de interação [144, 145]. Por exemplo, no processo de intercalação, ocorre uma interação entre os orbitais  $\pi^*$  dos ligantes aromáticos e o sistema  $\pi$ -stack entre as nucleobases [145–147].

Isso resulta na maior dispersão do sistema eletrônico  $\pi$ , levando à redução do *band gap* entre os orbitais HOMO (Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia) e LUMO (Orbital Molecular Desocupado de Menor Energia) [95, 148]. Nesse cenário, o aduto apresentará o máximo de absorção deslocado para regiões de menor energia (batocromismo). Em comparação com a solução dos GQDs livre. Em diversas situações, esse fenômeno é acompanhado pela diminuição da intensidade da banda de absorção (hipocromismo).

Na continuidade do estudo de avaliação de interação dos GQDs com biomoléculas, os valores das constantes de ligação aparente ( $K_{bap}$ ) entre GQDs e ctDNA foram determinados utilizando a equação de Benesi-Hildebrand (Eq.4-6), em que  $A_0$  e  $A$  representam as extinções dos GQDs livres e dos GQDs na presença de DNA, respectivamente. Os coeficientes  $\varepsilon_G$  e  $\varepsilon_{H-G}$  são os coeficientes de extinção molar dos GQDs e de seus adutos com DNA, respectivamente. Dessa forma,  $K_{bap}$  foi determinado pela relação entre o coeficiente linear, e o coeficiente angular da curva de  $\frac{A_0}{A-A_0}$  vs  $\frac{1}{K_{bap}[DNA]}$ .

$$\frac{A_0}{A - A_0} = \frac{\varepsilon_G}{\varepsilon_{H-G} - \varepsilon_G} + \frac{\varepsilon_G}{\varepsilon_{H-G} - \varepsilon_G} \times \frac{1}{K_{bap}[DNA]} \quad (4-6)$$

Dessa forma, os espectros de absorção dos GQDs foram registrados tanto na ausência quanto na presença de DNA, para um volume de 2,0 mL de solução contendo tampão Tris-HCl-NaCl (pH 7,4) e de dispersão dialisada de GQDs. As concentrações iniciais utilizadas antes da adição de DNA foram de  $1,65 \times 10^{-6}$  L mol<sup>-1</sup> para GQDs-U e de  $5,81 \times 10^{-6}$  L mol<sup>-1</sup> para GQDs-TAA. A concentração inicial da solução estoque de DNA foi de  $8,65 \times 10^{-5}$  L mol<sup>-1</sup>, da qual foram realizadas adições graduais variando de 20 a 120  $\mu$ L. Os espectros obtidos são mostrados na Figura 12 juntamente com os gráficos de Benesi-Hildebrand para determinação das constantes de ligação.

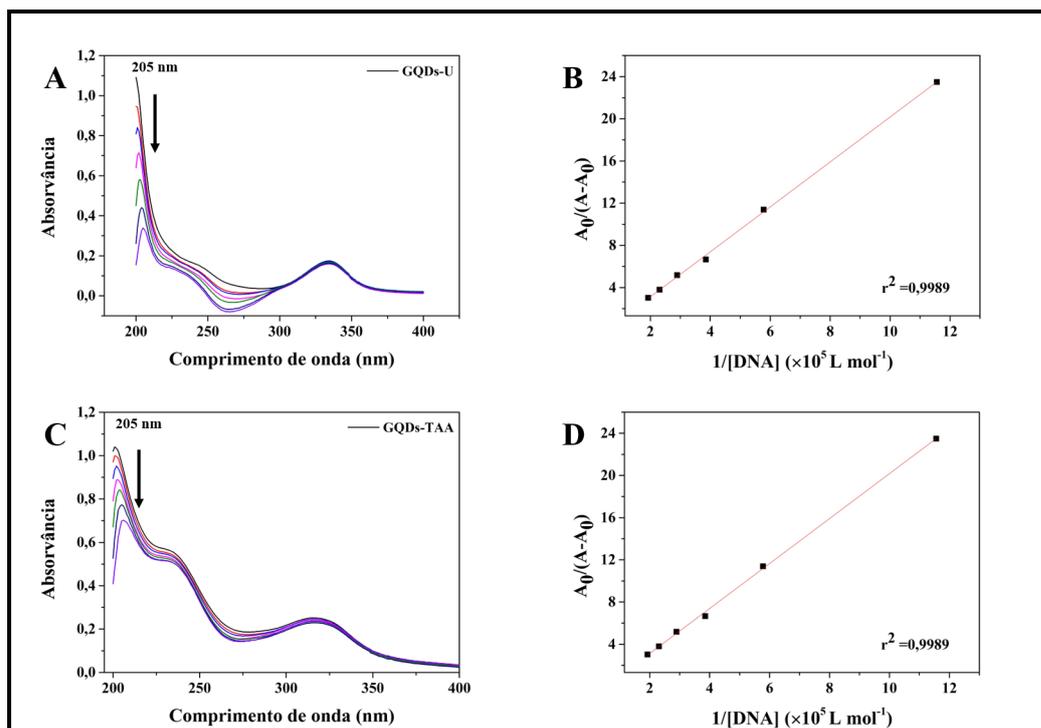


Figura 12: Na região UV-Vis, os espectros eletrônicos foram obtidos usando um tampão de sal Tris-HCl em pH 7,4. Variações nas proporções molares entre o DNA e os GQDs (GQD-U e GQD-TAA) foram exploradas (A e C). As Concentrações utilizadas foram  $[GQDs - U] = 1,65 \times 10^{-6} \text{ L mol}^{-1}$  e  $[GQDs - TAA] = 1,65 \times 10^{-6} \text{ L mol}^{-1}$ , mantendo uma concentração inicial de DNA de  $8,65 \times 10^{-5} \text{ L mol}^{-1}$ . As adições incrementais do DNA variaram de 20 a 120  $\mu\text{L}$ . (B e D), a constante de ligação ( $K_{bap}$ ) foi determinada através da análise de correlação linear Benesi-Hildebrand, que indicam, como exemplo, os resultados obtidos após 96 h para GQD-U e 504 h para GQD-TAA.

Os espectros de extinção, no UV-vis, das soluções de DNA revelam uma banda de absorção bem estruturada em 205 nm. Duas bandas espectrais intensas são observadas, a primeira em torno de 239 nm para GQDs-U e em 236 nm para GQDs-TAA, correspondendo à transição  $\pi - \pi^*$  dos grupamentos aromáticos C=C. A segunda banda espectral, um pouco mais larga, aparece em torno de 334 nm para GQDs-U e em 321 nm para GQDs-TAA, atribuída às transições  $n - \pi^*$  das ligações C=O [149–151]. Na figura 12, observa-se que os GQDs interagem com o DNA levando a uma diminuição na energia de transição  $\pi - \pi^*$ , bem como uma potencial diminuição da distância entre os pares de bases nitrogenadas. Como, resultado tem-se uma hipocromicidade na banda centrada em 205 nm, com leve efeito batocrômico. Esses resultados indicam potencial intercalação dos nanomateriais na estrutura do DNA [151, 152].

A determinação da magnitude da constante de formação aparente,  $K_{bap}$ , é

relevante para compreender o mecanismo de ligação. Em sistemas intercaladores ou semi-intercaladores, os valores  $K_{bap}$  geralmente situam-se na faixa de  $10^5$  a  $10^7$  L mol<sup>-1</sup>, enquanto que para contatos não covalentes nos sulcos, a ordem de grandeza varia entre  $10^3$  a  $10^4$  L mol<sup>-1</sup> [153].

No caso específico do composto GQDs, conforme indicado na Tabela 9, em experimentos feitos com duas réplicas, os valores de  $K_{bap}$  sugerem a ocorrência de interações mais fracas, caracterizadas por natureza hidrofóbica, possivelmente entre as bases do DNA.

Tabela 9: Dados gerais da constante de ligação aparente ( $K_{bap}$ ), do coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) em relação ao hipocromismo medido em 205 nm monitorado durante a titulação espectrofotométrica da dispersão de GQDs com DNA.

Réplica de GQDs	$K_{bap} \times 10^5$ (L mol <sup>-1</sup> )
GQDs-U (RI)	$(1,26 \pm 0,1)10^5$
GQDs-U (RII)	$(1,59 \pm 0,2)10^5$
GQDs-TAA (RI)	$(8,88 \pm 0,2)10^5$
GQDs-TAA (RII)	$(1,06 \pm 0,1)10^5$

Na figura 13, é mostrado o perfil de variação dos valores da constante de ligação aparente,  $K_{bap}$ , obtido em experimentos realizados ao longo de um mês (em intervalos de tempo específicos) da preparação das dispersões dialisadas de GQDs.

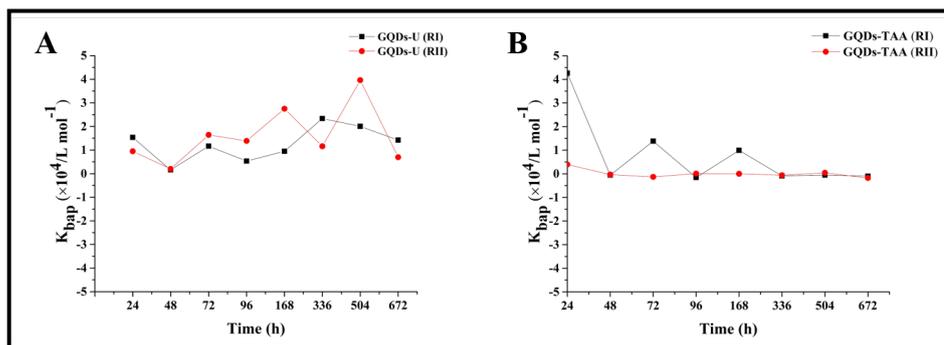


Figura 13: Em (A), perfis das constantes de velocidade ( $K_{bap}$ ) para interação GQDs-U com ctDNA em duplicatas; e (B), perfis de  $K_{bap}$  para interação GQDs-TAA com ctDNA em duplicatas.

É importante ressaltar que na medida em que a concentração de DNA aumenta, percebe-se uma queda percentual de complexos de interação, resultando em uma diminuição do sinal observado. Esses resultados são consistentes

com as conclusões extraídas do testes paramétricos para o GQDs-U e teste não paramétrico para o caso de GQDs-TAA. Os dados temporais obtidos para as réplicas do sistema GQDs-U/DNA (Tabela 10) foram avaliados estatisticamente para uma avaliação crítica.

Tabela 10: Valores da constante de ligação aparente,  $K_{bap}$ , obtido em experimentos realizados ao longo de um mês da preparação das dispersões dialisadas de GQDs-U.

Tempo (horas)	Valor de $K_{bap}$ (GQDs-U/DNA) $L \text{ mol}^{-1}$	
	Réplica	
	RI	RII
<b>24</b>	$(1, 6) \times 10^5$	$(1, 0) \times 10^5$
<b>48</b>	$(0, 2) \times 10^5$	$(0, 2) \times 10^5$
<b>72</b>	$(1, 2) \times 10^5$	$(1, 7) \times 10^5$
<b>96</b>	$(0, 6) \times 10^5$	$(1, 4) \times 10^5$
<b>168</b>	$(1, 0) \times 10^5$	$(2, 8) \times 10^5$
<b>336</b>	$(2, 4) \times 10^5$	$(1, 2) \times 10^5$
<b>504</b>	$(2, 0) \times 10^5$	$(4, 0) \times 10^5$
<b>672</b>	$(1, 5) \times 10^5$	$(0, 7) \times 10^5$

A partir dos dados experimentais de  $K_{bap}$  para as interações GQDs-U/DNA, obtidos em duplicatas (RI e RII), foi realizada uma análise estatística. Inicialmente, o teste de Shapiro-Wilk indicou que o conjunto completo de dados analisados seguia uma distribuição normal, com uma estatística de teste (W) de 0,92 e um valor p de 0,19. Com essa premissa confirmada, a ANOVA de uma variável foi aplicada separadamente para RI e RII, indicando a equivalência das médias de  $K_{bap}$  em função do tempo dentro de cada grupo. Para RI, o valor de F foi 2,57 com um valor p de 0,16, e para RII, o valor de F foi 0,42 com um valor p de 0,53. Ou seja, não houve diferenças significativas nos valores de  $K_{bap}$  ao longo do tempo em cada ensaio temporal. Além disso, o teste  $t$  de *Student* pareado, comparando RI e RII entre si, também não detectou diferença estatisticamente significativa, com um valor de  $t$  de -0,74, 7 graus de liberdade e um valor p de 0,47.

Em suma, os testes estatísticos validaram a equivalência dos dados de  $K_{bap}$  nas condições experimentais aplicadas para o sistema GQDs-U/DNA. O conjunto dos grupos RI e RII apresentou distribuição normal, equivalência de médias internamente e entre si, demonstrando a reprodutibilidade e bom comportamento desse sistema ao longo do tempo.

No caso do sistema GQDs-TAA/DNA, os dados temporais obtidos para as réplicas do sistema (Tabela 11) também foram avaliados do ponto de vista estatístico. Vale salientar que dois dos valores obtidos para RII foram ordens de grandeza diferentes do valor esperado, indicando que houve algum erro experimental nesses dois casos. Esses resultados foram eliminados por serem considerados erros grosseiros.

Tabela 11: valores da constante de ligação aparente,  $K_{bap}$ , obtido em experimentos realizados ao longo de um mês da preparação das dispersões dialisadas de GQDs-TAA.

Tempo (horas)	Valor de $K_{bap}$ (GQDs-TAA/DNA)	
	$L \text{ mol}^{-1}$	
	RI	RII
<b>24</b>	$(42, 6) \times 10^5$	$(4, 0) \times 10^5$
<b>48</b>	$(0, 6) \times 10^5$	$(0, 4) \times 10^5$
<b>72</b>	$(13, 8) \times 10^5$	$(1, 3) \times 10^5$
<b>96</b>	$(1, 6) \times 10^5$	—
<b>168</b>	$(9, 9) \times 10^5$	—
<b>336</b>	$(1, 0) \times 10^5$	$(0, 7) \times 10^5$
<b>504</b>	$(0, 6) \times 10^5$	$(0, 5) \times 10^5$
<b>672</b>	$(1, 0) \times 10^5$	$(1, 8) \times 10^5$

Para avaliar a normalidade dos dados experimentais de  $K_{bap}$  correspondentes às interações entre os GQDs-TAA e o DNA, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk. Este teste apresentou uma estatística de teste (W) de 0,41 e um valor p de 1,325e-06. Dado que o valor p é significativamente menor que qualquer nível de significância comumente utilizado, como 0,05, a hipótese nula é rejeitada. Isto indica que os dados não seguem uma distribuição normal. Portanto, optou-se por utilizar um teste não paramétrico (o teste de Wilcoxon) para comparar os grupos RI e RII.

O teste de Wilcoxon encontrou que o valor p obtido é 0,21, ou seja, p-valor  $> 0,05$ , o qual é maior que o nível de significância. Não temos evidência suficiente para rejeitar a hipótese nula. Isto sugere que não podemos concluir que exista uma mudança significativa na mediana entre as amostras das réplicas RI e RII com um nível de confiança de 95 %. Quanto aos dados faltantes na réplica RII, é importante destacar que, embora existam valores faltantes nos dados dessa réplica, eles foram tratados adequadamente na análise. Os valores faltantes foram removidos antes de realizar o teste de Wilcoxon,

garantindo que apenas as observações completas em ambas as réplicas fossem consideradas. Esta transparência no tratamento dos dados faltantes contribui para a integridade e validade da análise estatística.

A partir destes dados, podem ser consideradas duas hipóteses. A primeira é que houve um erro experimental que repercutiu a longo prazo, fazendo com que os experimentos temporais diferissem. Isto é reforçado com base nos experimentos realizados com HSA, que produziram resultados consistentes mesmo com os GQDs-TAA. A outra hipótese seria a de que o sistema GQDs-TAA/DNA não se comporta de maneira estável, produzindo resultados diferentes devido a variações na interação entre os dois componentes.

Em resumo, pode-se concluir que ambos os tipos de GQDs avaliados são capazes de se ligar e interagir com o DNA. Os resultados das análises estatísticas indicam que não houve diferença significativa entre as réplicas experimentais no caso dos GQDs-U. Portanto, a avaliação metrológica do sistema GQDs-U/DNA indicou que este é um sistema robusto, com uma interação fraca entre este nanomaterial e o DNA. Para o sistema GQDs-TAA/DNA, valeria a pena realizar uma segunda rodada de experimentos para obter uma conclusão sobre sua estabilidade. Além disso, seriam necessários mais estudos para investigar se essas interações com o DNA podem conduzir a efeitos genotóxicos, como danos ou rupturas na molécula de DNA. Testes adicionais de citotoxicidade, genotoxicidade e estabilidade a longo prazo podem fornecer mais informações sobre a segurança desses nanomateriais para aplicações biológicas e biomédicas. Assim, com esse conjunto de evidências, poder-se-ia sugerir que os GQDs podem ser transportados de forma segura pelo sangue através da HSA sem causar efeitos genotóxicos sobre o DNA.

#### 4.4

#### **Ensaio de competição com o intercalador brometo de etídio (BET)**

O ctDNA apresenta uma composição de aproximadamente 58,1 % de pares de bases AT e 41,9 % de pares de bases GC, características que o tornam muito semelhante ao DNA encontrado na placenta humana [154]. Essa biomolécula adota a conformação B, que é prevalente em condições fisiológicas, exibindo uma estrutura de dupla-hélice com fitas antiparalelas, configurando-a como "hélice da mão direita"[154].

Na organização dessa estrutura secundária, as bases nitrogenadas ocupam o centro da hélice, mantidas unidas por ligações de hidrogênio específicas, como A–T (adenina e timina) e G–C (guanina e citosina). Essa configuração é estabilizada por interações de empilhamento que orientam os pares de bases perpendicularmente ao eixo helicoidal. Além disso, a disposição das ligações

no DNA resulta na formação de dois sulcos distintos, um maior e um menor, que servem como sítios propícios para a ligação de moléculas pequenas [155].

Em termos gerais, compostos têm a capacidade de interagir com o DNA por meio de ligações covalentes e interações não-covalentes. A Figura 14 são ilustrados os principais modos de interações não-covalentes, incluindo intercalação, interações nos sulcos e interações eletrostáticas. Esses padrões de interação desempenham um papel fundamental nas propriedades físico-químicas do ctDNA.

A interação de pequenas moléculas com o ctDNA tem sido amplamente estudada devido ao seu potencial para modular processos biológicos fundamentais. Em particular, a intercalação no ctDNA por moléculas planares catiônicas, como o brometo de etídio, causa distorções conformacionais significativas que podem afetar mecanismos celulares dependentes do DNA. Portanto, ensaios de competição de intercalação, nos quais se avalia a habilidade de compostos deslocarem intercaladores modelo do ctDNA, são ferramentas valiosas para investigar o potencial de modular a estrutura e atividade do ctDNA. Os resultados desses ensaios fornecem informações importantes sobre o mecanismo de interação composto-DNA e orientam o desenvolvimento racional de candidatos a fármacos capazes de atuar sobre alvos moleculares no DNA com implicações terapêuticas.

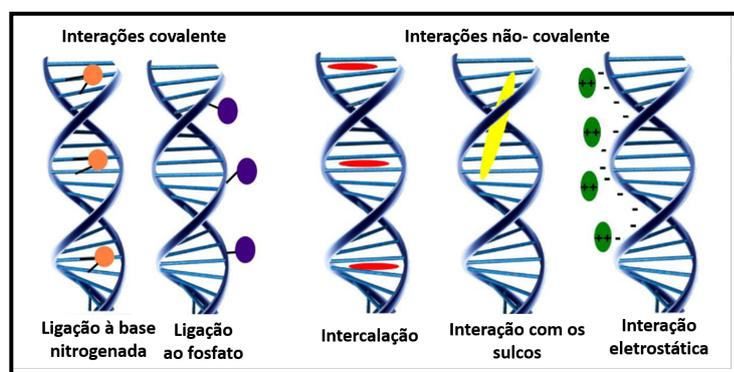


Figura 14: Representação das diferentes formas de interação com o DNA. Fonte, adaptado de [156].

Com o objetivo de verificar a capacidade dos GQDs em agirem como ligantes no DNA, via sulco, foram realizados experimentos de competição utilizando o brometo de etídio, uma sonda fluorescente intercaladora de DNA [157]. Não se espera que ligantes de DNA via sulco sejam capazes de deslocar a sonda BET que interage fortemente no seu sítio de ligação.

A análise da mistura binária BET-DNA apresenta uma banda de emissão com comprimento de onda máximo em 590 nm quando excitado em 499

nm. Conforme ilustrado na Figura 15, nota-se apenas uma mínima supressão na fluorescência do aduto, 3 % para GQDs-U e 10 % para GQDs-TAA, quando a concentração dos GQDs foi variada entre  $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $23 \mu\text{mol L}^{-1}$  para uma proporção de BET-DNA:GQDs de 1:10. Esse resultado não indicou ação intercaladora dos GQDs, mas sim uma possível alteração na estrutura secundária do DNA, possivelmente através de contatos não-covalentes via sulco, proporcionando que alguns complexos de interação BET-DNA se desfizessem, resultando em uma baixa supressão de fluorescência observada para os sistemas, na maior concentração dos GQDs. Os resultados indicam que os GQDs-U e GQDs-TAA não atuam como intercaladores, como evidenciado na Figura 15.

Os resultados obtidos nos experimentos de competição com o brometo de etídio corroboram a hipótese de que os GQDs investigados interagem com o DNA preferencialmente via sulco e não por intercalação entre as bases nitrogenadas. A ausência de deslocamento significativo da sonda BET já intercalada no DNA confirma que não ocorre inserção dos GQDs entre os pares de bases do DNA.

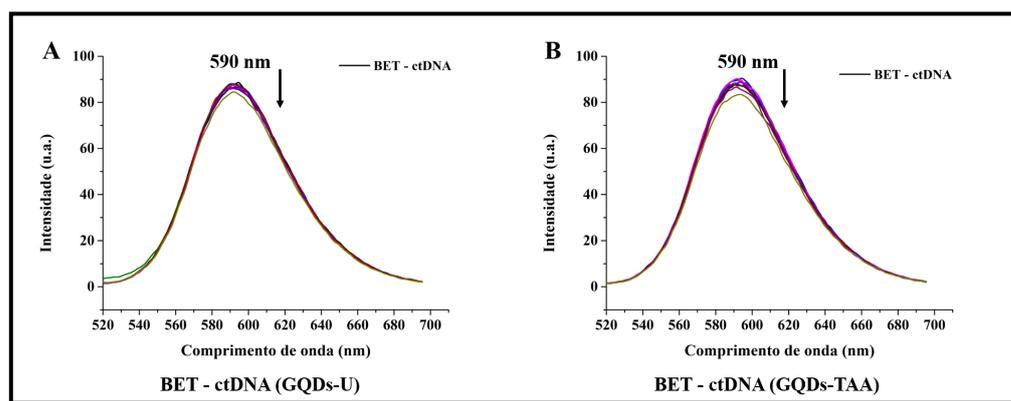


Figura 15: Em (A), espectro de BET-ctDNA com a sequência GQDs-U; e (B), espectro de BET-ctDNA com a sequência GQDs-TAA. Espectro de supressão da fluorescência do aduto GQDs – ctDNA,  $[\text{aduto}] = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$ , na ausência e na presença de diferentes concentrações do supressor,  $[\text{GQDs}] = 0, 2,5, 5,0, 7,5, 10, 13, 15, 18, 20$  e  $23 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Fonte, Autora.

Contudo, é possível que interações não-covalentes com os grupos fosfatos no sulco provoquem discretas mudanças conformacionais na dupla hélice do DNA, resultando na liberação de alguns complexos BET-DNA previamente formados. Essa liberação justificaria a pequena supressão de fluorescência detectada em altas concentrações dos GQDs. Assim, fica evidente o potencial dos GQDs produzidos para aplicações como sondas de DNA via interações no sulco, ao invés do travamento estérico gerado pela intercalação.

## 5

### Conclusões

Nessa dissertação investigou-se o comportamento, ao longo do tempo, dos sistemas de pontos quânticos de grafeno (GQDs) preparados por hidroesfoliação de misturas em fusão de ácido cítrico/tioacetamida e ácido cítrico/ureia. A ideia foi avaliar a estabilidade desse nanomaterial num período de aproximadamente 28 dias após preparação, em duplicata de estudo temporal, de forma a se garantir a confiabilidade no uso desse nanomaterial como sonda analítica ou como marcador celular. Constatou-se que ao longo do período o tamanho hidrodinâmico e a carga superficial (levemente negativa) se mantiveram essencialmente estáveis, assim como não se observou mudanças no comprimentos de onda máximos de excitação e de emissão das nanopartículas. Em relação à interação com a albumina de soro humano, pode-se afirmar que a interação com GQDs é estável e relativamente forte, sugerindo o potencial desses nanomateriais como sondas, pois podem ser distribuídos pelo organismo por meio do HSA, que atua como o principal via de transporte de uma variedade de substratos (endógenos e exógenos) através da corrente sanguínea. Por conta de diferentes sítios de interação na proteína, a supressão provocada pelos GQDs é consistente ao longo do período do teste com constante de supressão ( $K_i$ ). A correlação direta entre  $K_i$  e temperatura indica que a supressão tem natureza essencialmente dinâmica, embora indícios de supressão estática foram observados.

O experimento mostrou que a interação GQDs-HSA ocorre através da formação de ligações de hidrogênio, possivelmente com ou sem a contribuição de interações de forças de van der Waals. Como é evidenciada pelos parâmetros termodinâmicos negativos obtidos para a variação de entalpia ( $\Delta H < 0$ ) e variação de entropia ( $\Delta S < 0$ ).

O estudo de interação com DNA foi conduzido para investigar o comportamento dos GQDs. Os resultados, expressos através da constante de ligação aparente ( $K_{bap}$ ), extraída por titulação espectrofotométrica, indicou uma fraca interação por forças intermoleculares, sendo essas consistentes ao longo do período do estudo. O estudo reforçou a confiabilidade e reprodutibilidade do comportamento dos dois tipos de GQDs estudados. Os comportamentos foram muito similares apesar da variação da composição de precursores usados

na preparação dos GQDs. Os achados ressaltaram a atividade promissora das interações de GQDs com biomoléculas, potencialmente contribuindo para futuras aplicações biomédicas. Os dados indicaram que os nanomateriais podem ser biodistribuídos na biofase por meio da HSA, além de não apresentarem aparente toxicidade ao DNA, tornando esses materiais apropriados para aplicações biomédicas futuras. Este estudo oferece contribuições significativas para a compreensão e aplicação segura dos GQDs no campo biomédico.

Para trabalhos futuros, recomenda-se realizar mais experimentos para avaliar a estabilidade do sistema GQDs-TAA/DNA e investigar possíveis efeitos genotóxicos dessas interações. Testes adicionais de citotoxicidade, genotoxicidade e estabilidade a longo prazo são necessários para avaliar a segurança desses nanomateriais para aplicações biológicas. Com essas evidências, seria possível determinar se os GQDs podem ser transportados pelo sangue via HSA sem causar danos genotóxicos ao DNA.

## Referências bibliográficas

- 1 GUPTA, R.; XIE, H.. **Nanoparticles in daily life: applications, toxicity and regulations**. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 37(3), 2018.
- 2 VANCE, M. E.; KUIKEN, T.; VEJERANO, E. P.; MCGINNIS, S. P.; HO-CHELLA JR, M. F.; REJESKI, D. ; HULL, M. S.. **Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory**. *Beilstein journal of nanotechnology*, 6(1):1769–1780, 2015.
- 3 VARSHA, S.; DEEPAK, G. ; CHANDRA, S. Y.. **Critical review on the toxicity of some widely used engineered nanoparticles**. 2015.
- 4 NURUNNABI, M.; KHATUN, Z.; HUH, K. M.; PARK, S. Y.; LEE, D. Y.; CHO, K. J. ; LEE, Y.-K.. **In vivo biodistribution and toxicology of carboxylated graphene quantum dots**. *ACS nano*, 7(8):6858–6867, 2013.
- 5 DA CUNHA GOLDSTEIN, A.; ARAUJO-LIMA, C. F.; DA SILVA FERNANDES, A.; SANTOS-OLIVEIRA, R. ; FELZENSZWALB, I.. **In vitro genotoxicity assessment of graphene quantum dots nanoparticles: A metabolism-dependent response**. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 885:503563, 2023.
- 6 KIM, D.; YOO, J. M.; HWANG, H.; LEE, J.; LEE, S. H.; YUN, S. P.; PARK, M. J.; LEE, M.; CHOI, S.; KWON, S. H. ; OTHERS. **Graphene quantum dots prevent  $\alpha$ -synucleinopathy in parkinson's disease**. *Nature nanotechnology*, 13(9):812–818, 2018.
- 7 MORTELMANS, K.; ZEIGER, E.. **The ames salmonella/microsome mutagenicity assay**. *Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 455(1-2):29–60, 2000.
- 8 HUANG, S.; QIU, H.; LU, S.; ZHU, F. ; XIAO, Q.. **Study on the molecular interaction of graphene quantum dots with human serum albumin: combined spectroscopic and electrochemical approaches**. *Journal of hazardous materials*, 285:18–26, 2015.

- 9 LIN, J.-F.; TSAI, C.-C. ; LEE, M.-Z.. **Linear birefringence and dichroism in citric acid coated fe<sub>3</sub>o<sub>4</sub> magnetic nanoparticles.** Journal of magnetism and magnetic materials, 372:147–158, 2014.
- 10 AUCÉLIO, R. Q.. **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 Fe<sub>3</sub>.** PhD thesis, PUC-Rio, 2021.
- 11 FISHERSCIENTIFIC. **productos de laboratorio.** <https://www.fishersci.es/shop/products/urea-98-thermo-scientific/11479493>, 2024. Accessed: 09 de jan.de 2024.
- 12 KELLETT, A.; MOLPHY, Z.; SLATOR, C.; MCKEE, V. ; FARRELL, N. P.. **Molecular methods for assessment of non-covalent metallodrug–dna interactions.** Chemical Society Reviews, 48(4):971–988, 2019.
- 13 KHAN, I.; SAEED, K. ; KHAN, I.. **Nanoparticles: Properties, applications and toxicities.** Arabian journal of chemistry, 12(7):908–931, 2019.
- 14 OBERDÖRSTER, G.; MAYNARD, A.; DONALDSON, K.; CASTRANOVA, V.; FITZPATRICK, J.; AUSMAN, K.; CARTER, J.; KARN, B.; KREYLING, W.; LAI, D. ; OTHERS. **Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy.** Particle and fibre toxicology, 2:1–35, 2005.
- 15 LI, F.; PENG, M.; JIANG, L.; SUN, Q.; ZHANG, K.; LIAN, F.; LITONJUA, A. A.; GAO, J. ; GAO, X.. **Vitamin d deficiency is associated with decreased lung function in chinese adults with asthma.** Respiration, 81(6):469–475, 2011.
- 16 WIESNER, M. R.; LOWRY, G. V.; ALVAREZ, P.; DIONYSIOU, D. ; BISWAS, P.. **Assessing the risks of manufactured nanomaterials,** 2006.
- 17 LAI, R. W.; YEUNG, K. W.; YUNG, M. M.; DJURIŠIĆ, A. B.; GIESY, J. P. ; LEUNG, K. M.. **Regulation of engineered nanomaterials: current challenges, insights and future directions.** Environmental Science and Pollution Research, 25:3060–3077, 2018.
- 18 MAYNARD, A. D.. **Nanotechnology: the next big thing, or much ado about nothing?** The Annals of occupational hygiene, 51(1):1–12, 2007.

- 19 WARHEIT, D. B.; HOKE, R. A.; FINLAY, C.; DONNER, E. M.; REED, K. L. ; SAYES, C. M.. **Development of a base set of toxicity tests using ultrafine tio<sub>2</sub> particles as a component of nanoparticle risk management.** *Toxicology letters*, 171(3):99–110, 2007.
- 20 AKAY, M.. **Wiley encyclopedia of biomedical engineering.** United States of America, 2006.
- 21 LOMBARDO, D.; KISELEV, M. A.; CACCAMO, M. T. ; OTHERS. **Smart nanoparticles for drug delivery application: development of versatile nanocarrier platforms in biotechnology and nanomedicine.** *Journal of nanomaterials*, 2019, 2019.
- 22 ALICE, L.; OTHERS. **Empreendedorismo e nanotecnologia farmacêutica.** 2011.
- 23 SUBRAMANI, K.; ELHISSI, A.; SUBBIAH, U. ; AHMED, W.. **Introduction to nanotechnology.** In: *NANOBIOMATERIALS IN CLINICAL DENTISTRY*, p. 3–18. Elsevier, 2019.
- 24 SORIANO, M. L.; ZOUGAGH, M.; VALCÁRCEL, M. ; RÍOS, Á.. **Analytical nanoscience and nanotechnology: Where we are and where we are heading.** *Talanta*, 177:104–121, 2018.
- 25 LABUDA, J.; BAREK, J.; GAJDOSECHOVA, Z.; GOENAGA-INFANTE, H.; JOHNSTON, L. J.; MESTER, Z. ; SHTYKOV, S.. **Analytical chemistry of engineered nanomaterials: Part 1. scope, regulation, legislation, and metrology (iupac technical report).** *Pure and Applied Chemistry*, 95(2):133–163, 2023.
- 26 LOPEZ-SANZ, S.; BERNARDO, F. J. G.; MARTÍN-DOIMEADIOS, R. C. R. ; RIOS, A.. **Analytical metrology for nanomaterials: Present achievements and future challenges.** *Analytica Chimica Acta*, 1059:1–15, 2019.
- 27 MANSFIELD, E.; KAISER, D. L.; FUJITA, D. ; VAN DE VOORDE, M.. **Metrology and standardization for nanotechnology: protocols and industrial innovations.** John Wiley & Sons, 2017.
- 28 SCHULTE, P.; ROTH, G.; HODSON, L.; MURASHOV, V.; HOOVER, M.; ZUMWALDE, R.; KUEMPEL, E.; GERACI, C.; STEFANIAK, A.; CASTRANOVA, V. ; OTHERS. **Taking stock of the occupational safety and health challenges of nanotechnology: 2000–2015.** *Journal of Nanoparticle Research*, 18:1–21, 2016.

- 29 ALGAR, W. R.; SUSUMU, K.; DELEHANTY, J. B. ; MEDINTZ, I. L.. **Semiconductor quantum dots in bioanalysis: crossing the valley of death**, 2011.
- 30 SILVA, F. O.; VIOL, L. C. D. S.; FERREIRA, D. L.; ALVES, J. L. A. ; SCHIAVON, M. A.. **O estado da arte da síntese de semicondutores nanocristalinos coloidais**. *Química nova*, 33:1933–1939, 2010.
- 31 HEATH, J. R.. **Covalency in semiconductor quantum dots**. *Chemical Society Reviews*, 27(1):65–71, 1998.
- 32 DE ANGELIS, R.; CASALBONI, M.; COLANTONI, I.; D'AMICO, L.; DE MATTEIS, F.; HATAMI, F.; MASSELINK, W. T. ; PROSPPOSITO, P.. **Chemical sensitivity of luminescent epitaxial surface inp quantum dots**. 2013.
- 33 MURPHY, C. J.; COFFER, J. L.. **Quantum dots: a primer**. *Applied spectroscopy*, 56(1):16A–27A, 2002.
- 34 FRENCH, D.. **Plasmonic enhancement of photoluminescence and photobrightening in CdSe quantum dots**. University of Arkansas, 2018.
- 35 COSTA-FERNÁNDEZ, J. M.; PEREIRO, R. ; SANZ-MEDEL, A.. **The use of luminescent quantum dots for optical sensing**. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25(3):207–218, 2006.
- 36 GAO, X.; CUI, Y.; LEVENSON, R. M.; CHUNG, L. W. ; NIE, S.. **In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots**. *Nature biotechnology*, 22(8):969–976, 2004.
- 37 ANGELL, J. J.. **Synthesis and characterization of cdse-zns core-shell quantum dots for increased quantum yield**. 2011.
- 38 BIMBERG, D.; GRUNDMANN, M. ; LEDENTSOV, N. N.. **Quantum dot heterostructures**. John Wiley & Sons, 1999.
- 39 PETRUSHKIN, S. V.; SAMARTSEV, V. V.. **Laser cooling of solids**. Elsevier, 2009.
- 40 SMYDER, J. A.; KRAUSS, T. D.. **Coming attractions for semiconductor quantum dots**. *Materials Today*, 14(9):382–387, 2011.
- 41 HUANG, X.; ZHANG, F.; ZHU, L.; CHOI, K. Y.; GUO, N.; GUO, J.; TACKETT, K.; ANILKUMAR, P.; LIU, G.; QUAN, Q. ; OTHERS. **Effect**

- of injection routes on the biodistribution, clearance, and tumor uptake of carbon dots. *ACS nano*, 7(7):5684–5693, 2013.
- 42 YANG, S.-T.; WANG, X.; WANG, H.; LU, F.; LUO, P. G.; CAO, L.; MEZIANI, M. J.; LIU, J.-H.; LIU, Y.; CHEN, M. ; OTHERS. **Carbon dots as nontoxic and high-performance fluorescence imaging agents.** *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(42):18110–18114, 2009.
- 43 LI, X.; ZHANG, S.; KULINICH, S. A.; LIU, Y. ; ZENG, H.. **Engineering surface states of carbon dots to achieve controllable luminescence for solid-luminescent composites and sensitive be<sup>2+</sup> detection.** *Scientific reports*, 4(1):4976, 2014.
- 44 QU, S.; WANG, X.; LU, Q.; LIU, X. ; WANG, L.. **A biocompatible fluorescent ink based on water-soluble luminescent carbon nanodots.** *Angewandte Chemie international edition*, 51(49):12215–12218, 2012.
- 45 LI, H.; HE, X.; KANG, Z.; HUANG, H.; LIU, Y.; LIU, J.; LIAN, S.; TSANG, C. H. A.; YANG, X. ; LEE, S.-T.. **Water-soluble fluorescent carbon quantum dots and photocatalyst design.** *Angewandte Chemie International Edition*, 49(26):4430–4434, 2010.
- 46 PAN, D.; ZHANG, J.; LI, Z. ; WU, M.. **Hydrothermal route for cutting graphene sheets into blue-luminescent graphene quantum dots.** *Advanced materials*, 22(6):734–738, 2010.
- 47 DAI, Y.; LONG, H.; WANG, X.; WANG, Y.; GU, Q.; JIANG, W.; WANG, Y.; LI, C.; ZENG, T. H.; SUN, Y. ; OTHERS. **Versatile graphene quantum dots with tunable nitrogen doping.** *Particle & Particle Systems Characterization*, 31(5):597–604, 2014.
- 48 ZHOU, X.; ZHANG, Y.; WANG, C.; WU, X.; YANG, Y.; ZHENG, B.; WU, H.; GUO, S. ; ZHANG, J.. **Photo-fenton reaction of graphene oxide: a new strategy to prepare graphene quantum dots for dna cleavage.** *ACS nano*, 6(8):6592–6599, 2012.
- 49 WANG, L.; WANG, Y.; XU, T.; LIAO, H.; YAO, C.; LIU, Y.; LI, Z.; CHEN, Z.; PAN, D.; SUN, L. ; OTHERS. **Gram-scale synthesis of single-crystalline graphene quantum dots with superior optical properties.** *Nature communications*, 5(1):5357, 2014.

- 50 LI, M.; CHEN, T.; GOODING, J. J. ; LIU, J.. **Review of carbon and graphene quantum dots for sensing.** *ACS sensors*, 4(7):1732–1748, 2019.
- 51 LI, X.; RUI, M.; SONG, J.; SHEN, Z. ; ZENG, H.. **Carbon and graphene quantum dots for optoelectronic and energy devices: a review.** *Advanced Functional Materials*, 25(31):4929–4947, 2015.
- 52 BAO, L.; ZHANG, Z.-L.; TIAN, Z.-Q.; ZHANG, L.; LIU, C.; LIN, Y.; QI, B. ; PANG, D.-W.. **Electrochemical tuning of luminescent carbon nanodots: from preparation to luminescence mechanism.** *Advanced materials*, 23(48):5801–5806, 2011.
- 53 HU, C.; YU, C.; LI, M.; WANG, X.; YANG, J.; ZHAO, Z.; EYCHMÜLLER, A.; SUN, Y.-P. ; QIU, J.. **Chemically tailoring coal to fluorescent carbon dots with tuned size and their capacity for cu (ii) detection.** *Small*, 10(23):4926–4933, 2014.
- 54 LI, H.; HE, X.; LIU, Y.; HUANG, H.; LIAN, S.; LEE, S.-T. ; KANG, Z.. **One-step ultrasonic synthesis of water-soluble carbon nanoparticles with excellent photoluminescent properties.** *Carbon*, 49(2):605–609, 2011.
- 55 TAN, X.; LI, Y.; LI, X.; ZHOU, S.; FAN, L. ; YANG, S.. **Electrochemical synthesis of small-sized red fluorescent graphene quantum dots as a bioimaging platform.** *Chemical Communications*, 51(13):2544–2546, 2015.
- 56 SUN, Y.-P.; ZHOU, B.; LIN, Y.; WANG, W.; FERNANDO, K. S.; PATHAK, P.; MEZIANI, M. J.; HARRUFF, B. A.; WANG, X.; WANG, H. ; OTHERS. **Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence.** *Journal of the American Chemical Society*, 128(24):7756–7757, 2006.
- 57 LIU, Y.; LIU, C.-Y. ; ZHANG, Z.-Y.. **Graphitized carbon dots emitting strong green photoluminescence.** *Journal of Materials Chemistry C*, 1(32):4902–4907, 2013.
- 58 WANG, L.; ZHU, S.-J.; WANG, H.-Y.; QU, S.-N.; ZHANG, Y.-L.; ZHANG, J.-H.; CHEN, Q.-D.; XU, H.-L.; HAN, W.; YANG, B. ; OTHERS. **Common origin of green luminescence in carbon nanodots and graphene quantum dots.** *ACS nano*, 8(3):2541–2547, 2014.

- 59 HELMCHEN, F.; DENK, W.. **Deep tissue two-photon microscopy.** *Nature methods*, 2(12):932–940, 2005.
- 60 NA, R.; STENDER, I.-M.; MA, L. ; WULF, H. C.. **Autofluorescence spectrum of skin: component bands and body site variations.** *Skin Research and Technology*, 6(3):112–117, 2000.
- 61 MEDINTZ, I. L.; UYEDA, H. T.; GOLDMAN, E. R. ; MATTOUSSI, H.. **Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing.** *Nature materials*, 4(6):435–446, 2005.
- 62 ZHENG, X. T.; THAN, A.; ANANTHANARAYA, A.; KIM, D.-H. ; CHEN, P.. **Graphene quantum dots as universal fluorophores and their use in revealing regulated trafficking of insulin receptors in adipocytes.** *ACS nano*, 7(7):6278–6286, 2013.
- 63 ZHU, S.; SONG, Y.; ZHAO, X.; SHAO, J.; ZHANG, J. ; YANG, B.. **The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): current state and future perspective.** *Nano research*, 8:355–381, 2015.
- 64 ZHU, S.; WANG, L.; LI, B.; SONG, Y.; ZHAO, X.; ZHANG, G.; ZHANG, S.; LU, S.; ZHANG, J.; WANG, H. ; OTHERS. **Investigation of photoluminescence mechanism of graphene quantum dots and evaluation of their assembly into polymer dots.** *Carbon*, 77:462–472, 2014.
- 65 ALIOFKHAZRAEI, M.; ALI, N.; MILNE, W. I.; OZKAN, C. S.; MITURA, S. ; GERVASONI, J. L.. **Graphene science handbook: Applications and industrialization.** Crc Press, 2016.
- 66 RITTER, K. A.; LYDING, J. W.. **The influence of edge structure on the electronic properties of graphene quantum dots and nanoribbons.** *Nature materials*, 8(3):235–242, 2009.
- 67 KIM, R.; PEREBEINOS, V. ; AVOURIS, P.. **Relaxation of optically excited carriers in graphene.** *Physical Review B*, 84(7):075449, 2011.
- 68 KIM, S.; HWANG, S. W.; KIM, M.-K.; SHIN, D. Y.; SHIN, D. H.; KIM, C. O.; YANG, S. B.; PARK, J. H.; HWANG, E.; CHOI, S.-H. ; OTHERS. **Anomalous behaviors of visible luminescence from graphene quantum dots: interplay between size and shape.** *ACS nano*, 6(9):8203–8208, 2012.

- 69 YAN, X.; CUI, X. ; LI, L.-S.. **Synthesis of large, stable colloidal graphene quantum dots with tunable size.** *Journal of the American Chemical Society*, 132(17):5944–5945, 2010.
- 70 ZHU, S.; SONG, Y.; WANG, J.; WAN, H.; ZHANG, Y.; NING, Y. ; YANG, B.. **Photoluminescence mechanism in graphene quantum dots: Quantum confinement effect and surface/edge state.** *Nano Today*, 13:10–14, 2017.
- 71 SK, M. A.; ANANTHANARAYANAN, A.; HUANG, L.; LIM, K. H. ; CHEN, P.. **Revealing the tunable photoluminescence properties of graphene quantum dots.** *Journal of Materials Chemistry C*, 2(34):6954–6960, 2014.
- 72 KAKRAN, M.; G SAHOO, N.; BAO, H.; PAN, Y. ; LI, L.. **Functionalized graphene oxide as nanocarrier for loading and delivery of ellagic acid.** *Current medicinal chemistry*, 18(29):4503–4512, 2011.
- 73 DE FALCO, A.; SANTA-HELENA, E.; TOLOZA, C. A.; ALMEIDA, J. M.; LARRUDE, D. G.; MEIRELLES, F. V. P.; GIODA, C. R.; AUCELIO, R. Q. ; GIODA, A.. **Luminescence imaging and toxicity assessment of graphene quantum dots using in vitro models.** *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*, 30(6):657–666, 2022.
- 74 RAJA, P. M.; LACROIX, G.; SERGENT, J.-A.; BOIS, F.; BARRON, A. R.; MONBELLI, E. ; ELGRABLI, D.. **Nanotoxicology: Role of physical and chemical characterization and related in vitro, in vivo, and in silico methods.** *Metrology and standardization of nanotechnology: protocols and industrial innovations*, p. 363–380, 2017.
- 75 CHANDRA, A.; DESHPANDE, S.; SHINDE, D. B.; PILLAI, V. K. ; SINGH, N.. **Mitigating the cytotoxicity of graphene quantum dots and enhancing their applications in bioimaging and drug delivery.** *ACS Macro Letters*, 3(10):1064–1068, 2014.
- 76 CHONG, Y.; MA, Y.; SHEN, H.; TU, X.; ZHOU, X.; XU, J.; DAI, J.; FAN, S. ; ZHANG, Z.. **The in vitro and in vivo toxicity of graphene quantum dots.** *Biomaterials*, 35(19):5041–5048, 2014.
- 77 ZHOU, L.; GENG, J. ; LIU, B.. **Graphene quantum dots from polycyclic aromatic hydrocarbon for bioimaging and sensing of fe<sup>3+</sup> and hydrogen peroxide.** *Particle & Particle Systems Characterization*, 30(12):1086–1092, 2013.

- 78 WU, C.; WANG, C.; HAN, T.; ZHOU, X.; GUO, S. ; ZHANG, J.. **Insight into the cellular internalization and cytotoxicity of graphene quantum dots.** *Advanced healthcare materials*, 2(12):1613–1619, 2013.
- 79 LIU, Q.; GUO, B.; RAO, Z.; ZHANG, B. ; GONG, J. R.. **Strong two-photon-induced fluorescence from photostable, biocompatible nitrogen-doped graphene quantum dots for cellular and deep-tissue imaging.** *Nano letters*, 13(6):2436–2441, 2013.
- 80 ZHU, S.; ZHOU, N.; HAO, Z.; MAHARJAN, S.; ZHAO, X.; SONG, Y.; SUN, B.; ZHANG, K.; ZHANG, J.; SUN, H. ; OTHERS. **Photoluminescent graphene quantum dots for in vitro and in vivo bioimaging using long wavelength emission.** *RSC Advances*, 5(49):39399–39403, 2015.
- 81 ZHANG, M.; BAI, L.; SHANG, W.; XIE, W.; MA, H.; FU, Y.; FANG, D.; SUN, H.; FAN, L.; HAN, M. ; OTHERS. **Facile synthesis of water-soluble, highly fluorescent graphene quantum dots as a robust biological label for stem cells.** *Journal of materials chemistry*, 22(15):7461–7467, 2012.
- 82 GE, J.; LAN, M.; ZHOU, B.; LIU, W.; GUO, L.; WANG, H.; JIA, Q.; NIU, G.; HUANG, X.; ZHOU, H. ; OTHERS. **A graphene quantum dot photodynamic therapy agent with high singlet oxygen generation.** *Nature communications*, 5(1):4596, 2014.
- 83 SOME, S.; GWON, A.-R.; HWANG, E.; BAHN, G.-H.; YOON, Y.; KIM, Y.; KIM, S.-H.; BAK, S.; YANG, J.; JO, D.-G. ; OTHERS. **Cancer therapy using ultrahigh hydrophobic drug-loaded graphene derivatives.** *Scientific reports*, 4(1):6314, 2014.
- 84 HUANG, C.-L.; HUANG, C.-C.; MAI, F.-D.; YEN, C.-L.; TZING, S.-H.; HSIEH, H.-T.; LING, Y.-C. ; CHANG, J.-Y.. **Application of paramagnetic graphene quantum dots as a platform for simultaneous dual-modality bioimaging and tumor-targeted drug delivery.** *Journal of Materials Chemistry B*, 3(4):651–664, 2015.
- 85 SCHROEDER, K. L.; GOREHAM, R. V. ; NANN, T.. **Graphene quantum dots for theranostics and bioimaging.** *Pharmaceutical research*, 33:2337–2357, 2016.
- 86 LIU, J.-J.; ZHANG, X.-L.; CONG, Z.-X.; CHEN, Z.-T.; YANG, H.-H. ; CHEN, G.-N.. **Glutathione-functionalized graphene quantum dots as selective fluorescent probes for phosphate-containing metabolites.** *Nanoscale*, 5(5):1810–1815, 2013.

- 87 EL-HNAYN, R.; CANABADY-ROCHELLE, L.; DESMARETS, C.; BALAN, L.; RINNERT, H.; JOUBERT, O.; MEDJAHDI, G.; BEN OUADA, H. ; SCHNEIDER, R.. **One-step synthesis of diamine-functionalized graphene quantum dots from graphene oxide and their chelating and antioxidant activities.** *Nanomaterials*, 10(1):104, 2020.
- 88 ZHAN, J.; LEI, Z. ; ZHANG, Y.. **Non-covalent interactions of graphene surface: Mechanisms and applications.** *Chem*, 2022.
- 89 GEORGAKILAS, V.; OTYEPKA, M.; BOURLINOS, A. B.; CHANDRA, V.; KIM, N.; KEMP, K. C.; HOBZA, P.; ZBORIL, R. ; KIM, K. S.. **Functionalization of graphene: covalent and non-covalent approaches, derivatives and applications.** *Chemical reviews*, 112(11):6156–6214, 2012.
- 90 HE, Y.; WANG, X.; SUN, J.; JIAO, S.; CHEN, H.; GAO, F. ; WANG, L.. **Fluorescent blood glucose monitor by hemin-functionalized graphene quantum dots based sensing system.** *Analytica chimica acta*, 810:71–78, 2014.
- 91 ANH, N. T. N.; CHOWDHURY, A. D. ; DOONG, R.-A.. **Highly sensitive and selective detection of mercury ions using n, s-codoped graphene quantum dots and its paper strip based sensing application in wastewater.** *Sensors and Actuators B: Chemical*, 252:1169–1178, 2017.
- 92 QIAN, Z.; MA, J.; SHAN, X.; SHAO, L.; ZHOU, J.; CHEN, J. ; FENG, H.. **Surface functionalization of graphene quantum dots with small organic molecules from photoluminescence modulation to bioimaging applications: an experimental and theoretical investigation.** *Rsc Advances*, 3(34):14571–14579, 2013.
- 93 XIE, R.; WANG, Z.; ZHOU, W.; LIU, Y.; FAN, L.; LI, Y. ; LI, X.. **Graphene quantum dots as smart probes for biosensing.** *Analytical Methods*, 8(20):4001–4016, 2016.
- 94 TABARAKI, R.; NATEGHI, A.. **Nitrogen-doped graphene quantum dots: “turn-off” fluorescent probe for detection of  $Ag^+$  ions.** *Journal of fluorescence*, 26:297–305, 2016.
- 95 SOHAL, N.; MAITY, B. ; BASU, S.. **Recent advances in heteroatom-doped graphene quantum dots for sensing applications.** *RSC advances*, 11(41):25586–25615, 2021.

- 96 TOLOZA, C.. Spectroanalytical methods using graphene quantum dots as photoluminescent probes for the determination of analytes of biological and pharmacological interest. PUC-Rio, p. 1–158, 2018.
- 97 ZHAO, Y.; HU, C.; HU, Y.; CHENG, H.; SHI, G. ; QU, L.. A versatile, ultralight, nitrogen-doped graphene framework. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(45):11371–11375, 2012.
- 98 LUO, P.; JI, Z.; LI, C. ; SHI, G.. Aryl-modified graphene quantum dots with enhanced photoluminescence and improved ph tolerance. *Nanoscale*, 5(16):7361–7367, 2013.
- 99 LI, L.; WU, G.; YANG, G.; PENG, J.; ZHAO, J. ; ZHU, J.-J.. Focusing on luminescent graphene quantum dots: current status and future perspectives. *Nanoscale*, 5(10):4015–4039, 2013.
- 100 FENG, Y.; ZHAO, J.; YAN, X.; TANG, F. ; XUE, Q.. Enhancement in the fluorescence of graphene quantum dots by hydrazine hydrate reduction. *Carbon*, 66:334–339, 2014.
- 101 XU, H.; ZHOU, S.; XIAO, L.; WANG, H.; LI, S. ; YUAN, Q.. Fabrication of a nitrogen-doped graphene quantum dot from mof-derived porous carbon and its application for highly selective fluorescence detection of  $Fe^{3+}$ . *Journal of Materials Chemistry C*, 3(2):291–297, 2015.
- 102 JIN, S. H.; KIM, D. H.; JUN, G. H.; HONG, S. H. ; JEON, S.. Tuning the photoluminescence of graphene quantum dots through the charge transfer effect of functional groups. *ACS nano*, 7(2):1239–1245, 2013.
- 103 BROLO, A. G.. Plasmonics for future biosensors. *Nature Photonics*, 6(11):709–713, 2012.
- 104 HIGGINS, M.; ELY, F.; NOME, R. C.; NOME, R. A.; DOS SANTOS, D. P.; CHOI, H.; NAM, S. ; QUEVEDO-LOPEZ, M.. Enhanced reproducibility of planar perovskite solar cells by fullerene doping with silver nanoparticles. *Journal of Applied Physics*, 124(6), 2018.
- 105 SHAHBAZYAN, T. V.; STOCKMAN, M. I.. *Plasmonics: theory and applications*, volumen 15. Springer, 2013.

- 106 GRASSESCHI, D.; SANTOS, D. P. D.. **Nanomateriais plasmônicos: parte i. fundamentos da espectroscopia de nanopartículas e sua relação com o efeito sers.** Química Nova, 43:1463–1481, 2021.
- 107 HERTEL, C.. **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 Fe<sup>3+</sup>.** PhD thesis, PUC-Rio, 2021.
- 108 PEDROZO-PENAFIEL, M. J.; MIRANDA-ANDRADES, J. R.; GUTIERREZ-BELEÑO, L. M.; LARRUDÉ, D. G. ; AUCELIO, R. Q.. **Indirect voltammetric determination of thiomersal in influenza vaccine using photo-degradation and graphene quantum dots modified glassy carbon electrode.** Talanta, 215:120938, 2020.
- 109 FARIAS, R.; POLEZ, A.; SILVA, D.; ZANETTI, R.; MOREIRA, M.; BATISTA, V.; REIS, B.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N.; ROCHA, F.; LIMA, M. ; OTHERS. **In vitro and in silico assessment of antitumor properties and biomolecular binding studies for two new complexes based on nihi bearing k2n, s-donor ligands.** Materials Science and Engineering: C, 121:111815, 2021.
- 110 CHUKWUOCHA, E.; ONYEAJU, M.. **Simulation of quantum dots (qds) in the confinement regime.** Int. Journal of Applied Sciences and Engineering Research, 1(6):784–792, 2012.
- 111 VILELA, D.; GONZÁLEZ, M. C. ; ESCARPA, A.. **Sensing colorimetric approaches based on gold and silver nanoparticles aggregation: Chemical creativity behind the assay. a review.** Analytica chimica acta, 751:24–43, 2012.
- 112 PADILHA, J. D. S.; AZEVEDO, M. F.; MIRANDA-ANDRADES, J. R.; DE FALCO, A.; KAI, J. ; AUCELIO, R. Q.. **Use of selective quenching of a photoluminescent probe based on a eu (iii)  $\beta$ -diketonate complex for determination of methylmercury in produced water after liquid-liquid extraction.** Talanta, 244:123406, 2022.
- 113 TABARAKI, R.; HAJISHARIFI, F.. **Fluorescence sensors for titanium (iv) and mercury (ii) based on doped carbon dots synthesized from acetamide and thioacetamide, a comparative study.** Chemical Papers, p. 1–9, 2023.

- 114 JAUJA-CCANA, V.; CORDOVA-HUAMAN, A. V.; FELICIANO, G. T. ; GÓMEZ, A. L. R.-T.. **Experimental and molecular dynamics study of graphene oxide quantum dots interaction with solvents and its aggregation mechanism.** *Journal of Molecular Liquids*, 335:116136, 2021.
- 115 KANSARA, V.; PATEL, M.. **Insight into the effect of synthesis parameters on the properties of graphene quantum dots for theranostic application.** *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 684:133097, 2024.
- 116 KHODADADEI, F.; SAFARIAN, S. ; GHANBARI, N.. **Methotrexate-loaded nitrogen-doped graphene quantum dots nanocarriers as an efficient anticancer drug delivery system.** *Materials Science and Engineering: C*, 79:280–285, 2017.
- 117 DING, F.; LIU, W.; ZHANG, L.; YIN, B. ; SUN, Y.. **Sulfometuron-methyl binding to human serum albumin: Evidence that sulfometuron-methyl binds at the sudlow's site i.** *Journal of Molecular Structure*, 968(1-3):59–66, 2010.
- 118 YIN, B.-T.; YAN, C.-Y.; PENG, X.-M.; ZHANG, S.-L.; RASHEED, S.; GENG, R.-X. ; ZHOU, C.-H.. **Synthesis and biological evaluation of  $\alpha$ -triazolyl chalcones as a new type of potential antimicrobial agents and their interaction with calf thymus dna and human serum albumin.** *European journal of medicinal chemistry*, 71:148–159, 2014.
- 119 XIAO, Q.; QIU, H.; HUANG, S.; HUANG, C.; SU, W.; HU, B. ; LIU, Y.. **Systematic investigation of interactions between papain and mpa-capped cdte quantum dots.** *Molecular biology reports*, 40:5781–5789, 2013.
- 120 LAKOWICZ, J. R.. **Principles of fluorescence spectroscopy.** Springer, 2006.
- 121 DA CUNHA, G. A.; DE SOUZA, R. F.; DE FARIAS, R. L.; MOREIRA, M. B.; SILVA, D. E.; ZANETTI, R. D.; GARCIA, D. M.; SPINDOLA, D. G.; MICHELIN, L. F.; BINCOLETTO, C. ; OTHERS. **Cyclopalladated compounds containing 2, 6-lutidine: Synthesis, spectral and biological studies.** *Journal of Inorganic Biochemistry*, 203:110944, 2020.

- 122 MOREIRA, M. B.; FRANCISCATO, D. S.; TOLEDO, K. C.; SOUZA, J. R. B. D.; NAKATANI, H. S. ; SOUZA, V. R. D.. **Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio.** *Química Nova*, 38:227–232, 2015.
- 123 BAGHERI, M.; FATEMI, M. H.. **Fluorescence spectroscopy, molecular docking and molecular dynamic simulation studies of hsa-aflatoxin b1 and g1 interactions.** *Journal of Luminescence*, 202:345–353, 2018.
- 124 CACITA, N.; NIKOLAOU, S.. **Studying the interaction between trinuclear ruthenium complexes and human serum albumin by means of fluorescence quenching.** *Journal of Luminescence*, 169:115–120, 2016.
- 125 DE OLIVEIRA, R. S.; BOFFO, E. F.; REIS, F. C.; NIKOLAOU, S.; ANDRIANI, K. F.; CARAMORI, G. F. ; DORO, F. G.. **A ruthenium polypyridyl complex with the antihypertensive drug valsartan: Synthesis, theoretical calculations and interaction studies with human serum albumin.** *Polyhedron*, 114:232–241, 2016.
- 126 HUANG, S.; QIU, H.; LIU, Y.; HUANG, C.; SHENG, J.; SU, W. ; XIAO, Q.. **Molecular interaction investigation between three cdte: Zn<sup>2+</sup> quantum dots and human serum albumin: a comparative study.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136:955–962, 2015.
- 127 XIAO, Q.; HUANG, S.; QI, Z.-D.; ZHOU, B.; HE, Z.-K. ; LIU, Y.. **Conformation, thermodynamics and stoichiometry of hsa adsorbed to colloidal cdse/zns quantum dots.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1784(7-8):1020–1027, 2008.
- 128 LECKBAND, D.. **Measuring the forces that control protein interactions.** *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 29(1):1–26, 2000.
- 129 IGLESIAS, B. A.; BARATA, J. F.; PEREIRA, P. M.; GIRÃO, H.; FERNANDES, R.; TOMÉ, J. P.; NEVES, M. G. ; CAVALEIRO, J. A.. **New platinum (ii)–bipyridyl corrole complexes: Synthesis, characterization and binding studies with dna and hsa.** *Journal of Inorganic Biochemistry*, 153:32–41, 2015.
- 130 BA, X.-X.; GAO, T.; YANG, M.; JIANG, P.; JIANG, F.-L. ; LIU, Y.. **Thermodynamics of the interaction between graphene quantum**

- dots with human serum albumin and  $\gamma$ -globulins. *Journal of Solution Chemistry*, 49:100–116, 2020.
- 131 ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S.. **Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability.** *Biochemistry*, 20(11):3096–3102, 1981.
- 132 JIANG, X.; JIANG, J.; JIN, Y.; WANG, E. ; DONG, S.. **Effect of colloidal gold size on the conformational changes of adsorbed cytochrome c: Probing by circular dichroism, uv- visible, and infrared spectroscopy.** *Biomacromolecules*, 6(1):46–53, 2005.
- 133 DAS DORES AGUIAR, C.; COELHO, Y. L.; DE PAULA, H. M. C.; SANTA ROSA, L. N.; VIRTUOSO, L. S.; DE OLIVEIRA MENDES, T. A.; DOS SANTOS PIRES, A. C. ; DA SILVA, L. H. M.. **Thermodynamic and kinetic insights into the interactions between functionalized cdte quantum dots and human serum albumin: A surface plasmon resonance approach.** *International Journal of Biological Macromolecules*, 184:990–999, 2021.
- 134 LELIS, C. A.; HUDSON, E. A.; FERREIRA, G. M. D.; FERREIRA, G. M. D.; DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. D. C. H.; PINTO, M. S. ; DOS SANTOS PIRES, A. C.. **Binding thermodynamics of synthetic dye allura red with bovine serum albumin.** *Food chemistry*, 217:52–58, 2017.
- 135 WANG, J.; GAO, Z.; HE, S.; JIN, P.; MA, D.; GAO, Y.; WANG, L. ; HAN, S.. **A universal growth strategy for dna-programmed quantum dots on graphene oxide surfaces.** *Nanotechnology*, 31(24):24LT02, 2020.
- 136 QIAN, Z. S.; SHAN, X. Y.; CHAI, L. J.; CHEN, J. R. ; FENG, H.. **Dual-colored graphene quantum dots-labeled nanoprobe/graphene oxide: functional carbon materials for respective and simultaneous detection of dna and thrombin.** *Nanotechnology*, 25(41):415501, 2014.
- 137 RAFIEI, S.; DADMEHR, M.; HOSSEINI, M.; KERMANI, H. A. ; GANJALI, M. R.. **A fluorometric study on the effect of dna methylation on dna interaction with graphene quantum dots.** *Methods and applications in fluorescence*, 7(2):025001, 2019.
- 138 ZHANG, C.-Y.; YEH, H.-C.; KUROKI, M. T. ; WANG, T.-H.. **Single-quantum-dot-based dna nanosensor.** *Nature materials*, 4(11):826–831, 2005.

- 139 PARAMANIK, B.; BHATTACHARYYA, S. ; PATRA, A.. **Steady state and time resolved spectroscopic study of qd–dna interaction.** *Journal of luminescence*, 134:401–407, 2013.
- 140 LU, L.; GUO, L.; WANG, X.; KANG, T. ; CHENG, S.. **Complexation and intercalation modes: a novel interaction of dna and graphene quantum dots.** *RSC advances*, 6(39):33072–33075, 2016.
- 141 MANDAL, D.; GUPTA, A. N.; CHANDRA, A. ; OTHERS. **Dna supported graphene quantum dots for ag ion sensing.** *Nanotechnology*, 30(25):255501, 2019.
- 142 LI, Y.; HU, Y.; ZHAO, Y.; SHI, G.; DENG, L.; HOU, Y. ; QU, L.. **An electrochemical avenue to green-luminescent graphene quantum dots as potential electron-acceptors for photovoltaics.** *Advanced materials*, 23(6):776–780, 2011.
- 143 ZHANG, Z.; ZHANG, J.; CHEN, N. ; QU, L.. **Graphene quantum dots: an emerging material for energy-related applications and beyond.** *Energy & Environmental Science*, 5(10):8869–8890, 2012.
- 144 CHEN, J.; WANG, M.; ZHOU, X.; NIE, Y. ; SU, X.. **Highly sensitive label-free fluorescence determination of lymphotropic virus dna based on exonuclease assisted target recycling amplification and in-situ generation of fluorescent copper nanoclusters.** *Sensors and actuators B: Chemical*, 326:128847, 2021.
- 145 MAITI, S.; KARMAKAR, S.; KUNDU, S.; ROY, C. N.; DAS, T. K.; CHAKRABORTY, B. ; SAHA, A.. **Sugar moiety driven adsorption of nucleic acid on graphene quantum dots: Photophysical, thermodynamic and theoretical evidence.** *Journal of Molecular Liquids*, 371:121148, 2023.
- 146 MOHAMMADI, S.; KHOEINI, F.; ESMAILPOUR, M. ; KHALKHALI, M.. **Investigation of electrical properties in ab-stacked bilayer graphene-dna nanostructures.** *Superlattices and Microstructures*, 130:182–193, 2019.
- 147 WANG, L.; ZHENG, J.; LI, Y.; YANG, S.; LIU, C.; XIAO, Y.; LI, J.; CAO, Z. ; YANG, R.. **Agnp-dna@ gqds hybrid: new approach for sensitive detection of h<sub>2</sub>o<sub>2</sub> and glucose via simultaneous agnp etching and dna cleavage.** *Analytical chemistry*, 86(24):12348–12354, 2014.

- 148 WU, H.; XU, H.; SHI, Y.; YUAN, T.; MENG, T.; ZHANG, Y.; XIE, W.; LI, X.; LI, Y. ; FAN, L.. **Recent advance in carbon dots: from properties to applications.** Chinese Journal of Chemistry, 39(5):1364–1388, 2021.
- 149 RUAN, J.; WANG, Y.; LI, F.; JIA, R.; ZHOU, G.; SHAO, C.; ZHU, L.; CUI, M.; YANG, D.-P. ; GE, S.. **Graphene quantum dots for radiotherapy.** ACS applied materials & interfaces, 10(17):14342–14355, 2018.
- 150 JIANG, W.; CHEN, J.; GONG, C.; WANG, Y.; GAO, Y. ; YUAN, Y.. **Intra-venous delivery of enzalutamide based on high drug loading multifunctional graphene oxide nanoparticles for castration-resistant prostate cancer therapy.** Journal of nanobiotechnology, 18(1):1–12, 2020.
- 151 LIU, C.; GUO, L.; ZHANG, B. ; LU, L.. **Graphene quantum dots mediated electron transfer in dna base pairs.** RSC advances, 9(54):31636–31644, 2019.
- 152 LIU, J.; ZHANG, T.; LU, T.; QU, L.; ZHOU, H.; ZHANG, Q. ; JI, L.. **Dna-binding and cleavage studies of macrocyclic copper (ii) complexes.** Journal of inorganic biochemistry, 91(1):269–276, 2002.
- 153 BARRA, C. V.; ROCHA, F. V.; MOREL, L.; GAUTIER, A.; GARRIDO, S. S.; MAURO, A. E.; FREM, R. C. ; NETTO, A. V.. **Dna binding, topoiso-merase inhibition and cytotoxicity of palladium (ii) complexes with 1, 10-phenanthroline and thioureas.** Inorganica Chimica Acta, 446:54–60, 2016.
- 154 VOET, D.; VOET, J. G. ; PRATT, C. W.. **Fundamentals of biochemis-try: life at the molecular level.** John Wiley & Sons, 2016.
- 155 PAGES, B. J.; ANG, D. L.; WRIGHT, E. P. ; ALDRICH-WRIGHT, J. R.. **Me-tal complex interactions with dna.** Dalton transactions, 44(8):3505–3526, 2015.
- 156 SILVA, D. E. S.. **Desenvolvimento de novos complexos de prata (i) contendo ligantes tiossemicarbazonas com potencial antitumor-al contra células de câncer de mama triplo negativo.** 2020.
- 157 HUANG, J.; WANG, Z.; KIM, J.-K.; SU, X. ; LI, Z.. **Detecting arbitrary dna mutations using graphene oxide and ethidium bromide.** Analytical chemistry, 87(24):12254–12261, 2015.